



# THESE

Présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Strasbourg  
Spécialité : Neurosciences

Par Joëlle Lopez

Dynamique mnésique du traitement de l'information spatiale  
chez le Rat : approche systémique de la consolidation

4 Décembre 2009

## Membres du jury

Jean-Christophe Cassel  
Anne-Laurence Boutillier  
Bruno Poucet  
Pascal Roullet  
Anne Pereira de Vasconcelos  
Bruno Bontempi

Directeur de thèse  
Rapporteur interne  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Membre invité  
Membre invité



Science is not meant to cure us of mystery, but to reinvent and reinvigorate it.

--- Robert Sapolsky, *Why Zebras Don't Get Ulcers*, p. xii, 1994





## Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier le Dr. Christian Kelche de m'avoir accueilli dans son laboratoire où j'ai pu m'enrichir, tant sur le plan personnel que professionnel, ces quatre dernières années. Merci également pour sa bonne humeur et nos discussions enjouées; ses allers-retours dans le couloir en chantonnant ou en sifflotant ont su égayer plus d'une journée...

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, le Pr. Jean-Christophe Cassel, de m'avoir encadré tout au long de ce périple. Sa passion pour la Recherche et son énergie débordante n'ont fait que renforcer ma motivation. Je le remercie d'avoir aiguisé mon sens critique et de m'avoir poussé toujours plus loin dans mes réflexions. Merci également pour son humour cynique et ses rires contagieux qui ont ponctué cette thèse de moments très agréables !

Je remercie profondément le Dr. Anne Pereira de Vasconcelos, qui a co-encadré cette thèse. Merci pour sa constante disponibilité, son sens de l'écoute et ses encouragements dans les moments de frustration... Sans oublier les moments de joie partagés avec grand plaisir ! Nos nombreuses discussions ont beaucoup contribué à mon épanouissement et à la construction de cette thèse.

Un grand merci au Dr. Anne-Laurence Boutillier, au Dr. Bruno Poucet, au Dr. Pascal Rouillet et au Dr. Bruno Bontempi d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'avoir consacré leur temps à la lecture de ce manuscrit.

Un grand merci également à Brigitte Cosquer et Karin Herbeaux-Geiger pour leurs doigts de fées, leurs précieux conseils, et surtout pour leur bonne humeur et nos nombreux fous rires en salle d'op et salle d'immuno !

Merci à Christophe, Hayat, Julie, Lucas, Marc-Antoine, Nour, PH et Sami pour tous ces moments de complicité et nos nombreux petits délires. Sans eux cette aventure n'aurait pas été aussi riche en couleurs...

Merci à Rodrigue pour son amitié et son soutien qui m'ont été essentiels tout au long de cette thèse.

Merci à tous les membres et stagiaires du ex-LN2C/LINC Espla : Alexandra, Bernadette, Catherine, Chantal, Christine, Daniel, Elise, Georges, Hélène, Marion, Michel, Monique, Olivier, Patrick, Philippe, Sarah S., Sarah P, Vincent et Virginie. Ils ont su construire la bonne ambiance qui règne au laboratoire, et ont ainsi été une sorte de seconde famille pour moi pendant ces quatre années passées en leur compagnie. Pour cela je leur en serai toujours reconnaissante.

Merci à Jenni pour son amitié sans limites et tous les moments complices qu'on a pu partagé. Merci aussi à tous les Doctoneuro et à la grande solidarité qui existe au sein de ce groupe. Je n'oublierai jamais ce voyage en Estonie, si riche en émotions !

Enfin, merci à ma famille pour tout leur amour et leur soutien indéfectibles.



## Liste des publications

### Publications et manuscrit issus des travaux de thèse :

- \* Lopez J, Pereira de Vasconcelos A, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel JC. Contextual cue saliency modulates recruitment during spatial remote memory retrieval in rats. (*soumis à The Journal of Neuroscience*)
- \* Lopez J, Wolff M, Lecourtier L, Cosquer B, Bontempi B, Dalrymple-Alford J, Cassel JC (2009) The intralaminar thalamic nuclei contribute to remote spatial memory. *The Journal of Neuroscience*, 29(10): 3302-3306.
- \* Lopez J, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2008) Differential sensitivity of recent vs. remote memory traces to extinction in a water-maze task in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(2): 460-466.
- \* Lopez J, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2008) Environmental cue saliency influences the vividness of remote spatial memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1): 285-290.

### Publications issues de collaborations pendant la thèse :

- \* Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani R, Certa U, Cassel JC (2009) Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: an approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus*, 19(9): 800-816.
- \* Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, Cosquer B, Lopez J, Certa U, Cassel JC (2006) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: a comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the Rat. *Neuroscience*, 141(4):1649-63.



# Sommaire

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1. <i>Cadre général de la thèse.....</i>	<i>1</i>
2. <i>Objectifs de la thèse .....</i>	<i>2</i>
3. <i>Structure de la thèse.....</i>	<i>4</i>
<b>CONTEXTE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>5</b>
CHAPITRE 1 : MEMOIRE ET MEMOIRE SPATIALE .....	5
1. <i>La mémoire.....</i>	5
1.1 Définitions / Généralités.....	5
1.2 Différentes classifications de la mémoire .....	5
1.3 Sous-systèmes de la Mémoire à Long Terme chez l’Homme.....	6
1.3.1 Historique .....	6
1.3.2 La mémoire déclarative.....	9
2. <i>Hippocampe et mémoire.....</i>	9
2.1 L’Hippocampe.....	9
2.1.1 Terminologie et anatomie.....	9
2.1.2 Rôle de l’hippocampe dans la mémoire déclarative.....	12
2.2 La Mémoire spatiale.....	14
2.2.1 Définitions .....	14
2.2.2 Stratégies .....	14
2.2.3 Hippocampe et mémoire spatiale .....	15
3. <i>Mémoire spatiale chez le Rat .....</i>	18
3.1 Modèle de mémoire ‘episodic-like/declarative-like’ .....	18
3.2 Test de la Piscine de Morris .....	19
3.3 Carte cognitive et cellules de lieu .....	21
3.4 Validation du modèle du Rat.....	23
CHAPITRE 2 : LA CONSOLIDATION SYSTEMIQUE.....	26
1. <i>Théorie de Ribot et la neuropsychologie des patients amnésiques.....</i>	26
1.1 Gradient de Ribot .....	26
1.2 Amnésie rétrograde temporellement graduée .....	26
2. <i>Théorie Standard de la Consolidation .....</i>	26
2.1 Définition .....	26
2.2 Importance des connexions hippocampo-néocorticales.....	27
2.3 Cortex préfrontal et connexions hippocampo-préfrontales.....	28
2.3.1 Le cortex préfrontal.....	28
2.3.2 Connexions hippocampo-préfrontales.....	30
2.4 Théorie Standard de la Consolidation .....	31
2.4.1 Données obtenues chez l’Homme .....	31
2.4.2 Données sur les rongeurs.....	33
3. <i>Théorie des Traces Multiples.....</i>	35
3.1 Définition .....	35
3.2 Données obtenues chez l’Homme .....	35
3.3 Données sur les rongeurs.....	37
4. <i>Théorie de Rudy .....</i>	38
4.1 Définition .....	38

4.2 Données obtenues chez l'Homme et les rongeurs.....	39
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>42</b>
1. <i>Sujets</i> .....	42
2. <i>Piscines de Morris</i> .....	42
3. <i>Inactivations fonctionnelles réversibles</i> .....	45
3.1 Mise au point des inactivations .....	45
3.1.1 Choix de la technique et de la lidocaïne.....	45
3.1.2 Validation avec l'imagerie au 2-désoxyglucose.....	46
3.2 Protocole des implantations de canules.....	49
3.3 Protocole des inactivations.....	50
3.3.1 Habituation .....	50
3.3.2 Dispositif et protocole des micro-injections.....	51
4. <i>Techniques histologiques et immunohistochimiques</i> .....	52
4.1 Euthanasie des rats et prélèvement des cerveaux.....	52
4.2 Coupes au cryostat .....	52
4.3 Coloration au violet de Crésyl.....	52
4.4 Immunohistochimie de la protéine c-Fos .....	53
4.4.1 Principe de l'utilisation de c-fos comme marqueur d'activité neuronale.....	53
4.4.2 Protocole d'immunohistochimie de c-Fos.....	55
<b>RESULTATS .....</b>	<b>57</b>
PUBLICATION 1.....	57
PUBLICATION 2.....	63
PUBLICATION 3.....	71
PUBLICATION 4.....	116
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>127</b>
1. <i>Synthèse des résultats principaux</i> .....	127
2. <i>Effets de l'âge et de la dégradation de la trace</i> .....	129
3. <i>Rôles du cortex préfrontal médian et de l'hippocampe dorsal dans la consolidation systémique d'un souvenir spatial</i> .....	134
3.1 Le cortex préfrontal médian .....	134
3.2 L'hippocampe dorsal.....	137
3.3 Vers quelle théorie pencher pour expliquer la consolidation systémique ? .....	141
4. <i>Rôle du thalamus</i> .....	142
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>146</b>
<i>Conclusions</i> .....	146
<i>Perspectives</i> .....	147
1. <i>Décours temporel de la consolidation systémique</i> .....	147
2. <i>Rôle d'autres structures dans la consolidation systémique d'un souvenir spatial</i> ....	148
2.1 Le thalamus .....	148
2.2 Le néocortex et le lobe temporal médian .....	148
3. <i>Latéralisation</i> .....	150
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>152</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>172</b>

## Liste des figures

**Figure 1** : H.M. et le Lobe Temporal Médian chez l'Homme.

**Figure 2** : La tâche du dessin au miroir.

**Figure 3** : Le système de Mémoire à Long Terme chez l'Homme.

**Figure 4** : Origines du mot 'hippocampe'.

**Figure 5** : Hippocampe du Rat et de l'Homme.

**Figure 6** : Connexions dans la région hippocampique.

**Figure 7** : Stratégies allocentrique et égocentrique.

**Figure 8** : Exemple d'une tâche de réalité virtuelle.

**Figure 9** : Exemple d'activité d'une cellule de lieu.

**Figure 10** : Piscine de Morris.

**Figure 11** : Théorie Standard de la Consolidation.

**Figure 12** : Cortex préfrontal chez l'Homme et le Rat.

**Figure 13** : Connexions hippocampo-préfrontales.

**Figure 14** : Illustrations de l'article de Takashima et coll., 2006.

**Figure 15** : Illustrations de l'article de Bontempi et coll., 1999.

**Figure 16** : Théorie des Traces Multiples.

**Figure 17** : Illustrations de l'article de Nadel et coll., 2007.

**Figure 18** : Illustrations de l'article de Trouche et coll., 2009.

**Figure 19** : Théorie de Rudy.

**Figure 20** : Illustrations de l'article de Bunge et coll., 2004.

**Figure 21** : Photo d'un rat Long Evans.

**Figure 22** : Photos des salles de piscine.

**Figure 23** : Protocole de mémoire de référence.

**Figure 24** : Métabolisme du glucose et du 2-désoxyglucose.

**Figure 25** : Implantation des canules guides.

**Figure 26** : Schéma représentant le placement des mandrins et des canules.

**Figure 27** : Photo du dispositif des micro-injections et de la position de contention.

**Figure 28** : Exemple de coloration au violet de Crésyl.

**Figure 29** : Mécanismes d'expression des gènes précoces tels que *c-fos*.

**Figure 30** : Etapes de l'immunohistochimie de c-Fos.

**Figure 31** : Le thalamus et de ses différents noyaux.

**Figure 32** : Résumé des résultats concernant le niveau de précision de la trace mnésique.

**Figure 33** : Résumé des résultats concernant la dynamique d'extinction d'un souvenir ancien.

**Figure 34**: Boucle hippocampo-thalamo-corticale.

**Figure 35** : Résultats de l'expression de c-Fos dans le cortex périrhinal.



## Liste des principales abréviations

2DG = 2-désoxyglucose

ACC = Cortex Cingulaire Antérieur

ATN = Noyaux Antérieurs du Thalamus

CEC = Cue-Enriched Context

CIC = Cue-Impoverished Context

IL = Cortex Infralimbique

ILN/LT = Noyaux Intralaminaires/Latéraux du Thalamus

IRM(f) = Imagerie par Résonance Magnétique (fonctionnelle)

MCT = Mémoire à Court Terme

MLT = Mémoire à Long Terme

mPFC = Cortex Préfrontal médian

PBS = Phosphate Buffer Solution

PL = Cortex Prélimbique

TEP = Tomographie par Emission de Positons



# Introduction



## Introduction générale

### 1. Cadre général de la thèse

La mémoire est souvent au cœur des préoccupations de notre vie quotidienne. Dès l'enfance, il faut apprendre ses leçons, en espérant pouvoir s'en souvenir le jour de l'examen. Qui n'a jamais eu un jour du mal à se souvenir de l'endroit où est garée sa voiture ? Qui n'est jamais sorti d'un magasin avec l'impression d'avoir oublié d'acheter quelque chose, d'avoir un mot 'sur le bout de la langue' sans pour autant parvenir à le retrouver ? Tous ces petits tracas du quotidien montrent à quel point la mémoire est indispensable, mais cela n'est rien en comparaison avec les souvenirs que l'on a de notre passé. Ce sont ces souvenirs qui constituent notre identité et qui nous permettent de gérer le présent et de préparer l'avenir. Il n'est donc pas surprenant que l'Homme ait été et soit encore fasciné par la mémoire. Les patients amnésiques ont toujours été d'un grand intérêt pour les scientifiques, menant à l'élaboration de plusieurs théories sur le fonctionnement de la mémoire ou sur sa localisation dans le cerveau. Grâce aux progrès technologiques, nous en savons à présent plus sur les lésions à l'origine des amnésies observées, et sur les structures cérébrales impliquées dans la mémoire. Néanmoins, c'est aux modèles animaux que l'on doit la plupart de nos connaissances actuelles sur les mécanismes cellulaires et subcellulaires sous-jacents aux processus mnésiques. En effet, la mémoire étant nécessaire à la survie des espèces, ses mécanismes fondamentaux se retrouvent dans l'ensemble du règne Animal, et donc chez des animaux aussi éloignés de l'Homme que l'aplysie ou la drosophile. Ce sont pourtant les rongeurs que l'on étudie le plus, en partie à cause de l'analogie structurale avec l'Homme des régions cérébrales impliquées dans la mémoire.

On sait à présent que l'hippocampe est une structure importante en ce qui concerne l'apprentissage et la mémoire. Cependant, un doute plane sur son rôle dans le maintien et la récupération des souvenirs anciens, l'observation des patients amnésiques menant à l'idée d'une éventuelle réorganisation spatio-temporelle de la trace mnésique, appelée consolidation systémique. Ainsi, certains pensent que l'hippocampe ne jouerait qu'un rôle transitoire dans le maintien des souvenirs, et qu'il passerait graduellement le relais au néocortex ; c'est l'idée que défend la Théorie Standard de la Consolidation (Squire et Alvarez, 1995). A l'inverse, d'autres pensent que l'hippocampe serait toujours nécessaire au maintien et à la récupération

des souvenirs riches en détails ; c'est la Théorie des Traces Multiples (Nadel et Moscovitch, 1997). Depuis une bonne dizaine d'années, de nombreuses études ont essayé de départager ces deux théories, mais des données contradictoires se sont amassées au fil du temps, chez l'Homme comme chez les rongeurs. Au moment de commencer cette thèse, certaines études chez la Souris avaient démontré le désengagement de l'hippocampe avec le temps dans la récupération d'un souvenir spatial, notamment dans le labyrinthe radial (Bontempi et coll., 1999) ou dans un labyrinthe à cinq branches (Maviel et coll., 2004). Chez le Rat, plusieurs études lésionnelles avaient au contraire montré le rôle permanent de l'hippocampe dans la récupération des souvenirs, et ce dans différentes tâches à caractère spatial. Néanmoins, une seule étude avait tenté d'évaluer le rôle de l'hippocampe dans la récupération de souvenirs anciens en utilisant des inactivations fonctionnelles réversibles, dans la piscine de Morris (Broadbent et coll., 2006), et elle ne s'était pas intéressée au rôle du néocortex. Cette thèse s'est donc focalisée sur les structures cérébrales sous-tendant une éventuelle réorganisation d'un souvenir spatial ancien chez le Rat, dans le cadre des différentes théories sur la consolidation systémique.

## 2. Objectifs de la thèse

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier la réorganisation spatio-temporelle des circuits neuronaux impliqués dans la consolidation et la récupération d'un souvenir ancien. Pour ce faire, il était nécessaire d'utiliser des tests de rétention à des délais assez longs, classiquement entre 25 et 30 jours après l'apprentissage d'une tâche chez le Rat. Ces délais ne posent pas problème dans des tâches telles que le conditionnement de peur où le souvenir est très fort émotionnellement et peut persister au-delà de 90 jours après l'apprentissage. En revanche, dans une tâche spatiale, il est plus difficile de maintenir un souvenir. Le laboratoire n'ayant pas d'expérience en la matière, mes travaux ont donc consisté dans un premier temps à valider un protocole permettant d'obtenir un souvenir ancien 25 jours après l'apprentissage dans la piscine de Morris, et ce dans deux salles représentant deux contextes différents, validation que l'on retrouvera dans la Publication 1.

Un aspect de cette réorganisation spatio-temporelle est l'altération qualitative de la trace mnésique avec le temps. Certaines études suggèrent qu'avec le temps, les souvenirs seraient moins riches en détails, et perdraient donc de leur qualité. Ils pourraient ainsi devenir plus

schématiques et moins flexibles face à de nouvelles situations. En effet, d'ordinaire, un souvenir de type déclaratif (ou 'declarative-like' chez les rongeurs) a pour particularité d'être suffisamment flexible pour nous permettre d'effectuer des inférences dans de nouvelles situations. Ainsi, l'on se sert de ce que l'on a appris par le passé pour s'adapter à une situation différente, mais dont le contexte est similaire. Nous avons donc utilisé l'extinction pour voir si la nature de la trace mnésique évoluait avec le temps (Publication 2).

Une fois cet aspect qualitatif abordé, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement aux interactions hippocampo-néocorticales dans le cadre des différentes théories sur la consolidation systémique (Théorie Standard *vs.* Théorie des Traces Multiples). Par ailleurs, Rudy et ses collaborateurs (2005) ont proposé une théorie alternative à la Théorie Standard de la Consolidation. D'après ces auteurs, le cortex préfrontal médian (l'une des structures du néocortex impliquée dans la consolidation systémique) ne serait pas le lieu de stockage des souvenirs anciens, mais serait nécessaire à la récupération de traces mnésiques dégradées, peu importe leur âge. Cette nouvelle théorie n'ayant pas été testée, nous avons donc comparé l'implication de l'hippocampe dorsal et du cortex préfrontal médian dans la récupération d'une trace mnésique, en fonction de son degré de dégradation (trace non dégradée *vs.* trace dégradée ; Publication 3, manuscrit soumis).

Enfin, même si je me suis focalisée plus particulièrement sur l'hippocampe et le cortex préfrontal médian, il semble évident que d'autres structures pourraient intervenir dans cette consolidation systémique. En effet, l'étude de Bontempi et coll. (1999) a révélé plusieurs aires néocorticales autres que le cortex préfrontal médian qui pourraient être impliquées. D'autre part, les voies neuroanatomiques indirectes entre l'hippocampe et le cortex préfrontal passent par plusieurs structures qui pourraient également participer à la consolidation systémique. Le thalamus est présent dans plusieurs de ces voies, et notamment dans la voie hippocampo-préfrontale indirecte, ce qui en fait donc un candidat très intéressant. Dans la Publication 4, nous nous sommes donc focalisés sur deux groupes de noyaux du thalamus (antérieurs *vs.* intralaminaires), et avons évalué l'impact de lésions de ces noyaux sur l'acquisition d'une tâche spatiale et sur le rappel d'une trace récente *vs.* ancienne.

### 3. Structure de la thèse

Dans une première partie ('Contexte Scientifique'), j'aborderai les concepts généraux concernant la mémoire et les théories sur la consolidation systémique. Le premier chapitre sera consacré aux différents types de mémoire chez l'Homme, à l'hippocampe et son implication dans la mémoire déclarative et la mémoire spatiale, ainsi qu'à la mémoire spatiale chez le Rat. Dans un deuxième chapitre, je détaillerai les différentes théories présentées succinctement dans cette introduction, ainsi que les données chez l'Homme et les rongeurs étayant chacune de ces théories.

Avant de passer aux résultats de mes travaux, j'aborderai brièvement dans la partie 'Matériel et Méthodes' les méthodes principales des expériences effectuées, le détail des autres protocoles se trouvant dans chacune des publications auxquelles mon travail a donné lieu, ainsi que dans un manuscrit actuellement soumis. La troisième partie ('Résultats') sera donc consacrée à la présentation de mes travaux sous forme d'articles publiés ou soumis. Enfin, la dernière partie ('Discussion générale') sera constituée d'une synthèse et d'une discussion générale des résultats principaux, suivies par les conclusions et perspectives de cette thèse.



# Contexte scientifique



## Chapitre 1 : Mémoire et mémoire spatiale

« J'en arrive au vaste palais de la Mémoire, là où se trouvent les trésors des images innombrables, véhiculées par les perceptions de toutes sortes »

--- Saint Augustin, *Les Confessions*, Livre X, 4<sup>ème</sup> siècle

### 1. La mémoire

#### 1.1 Définitions / Généralités

Qu'est-ce que la mémoire ? Cette question suscite un intérêt depuis des millénaires. Aristote, il y a plus de 2000 ans, la définissait dans son *Traité de la mémoire et de la réminiscence* comme « la présence dans l'esprit de l'image, comme copie de l'objet dont elle est l'image », comme une trace appartenant au passé et non au présent. Ce concept n'a cessé d'évoluer avec les âges, les différents courants de pensées, et les avancées scientifiques. Aujourd'hui, les définitions insistent sur l'utilité de ces traces du passé dans notre présent et pour notre avenir. Il est effectivement important pour la survie des espèces de pouvoir se servir d'informations acquises par le passé (de façon consciente ou non) dans certaines situations pour répondre de façon plus appropriée les fois suivantes (Tulving et Lepage, 2000). On définit ainsi la mémoire comme l'ensemble des activités mentales qui permettent de stocker, maintenir, et restituer les informations. Ceci se fait en plusieurs étapes que sont l'encodage, la consolidation et la récupération. L'encodage fait référence au processus qui va permettre à l'information d'être acquise et transformée en une représentation mentale (ou trace mnésique), puis stockée. Ce stockage est lié à la consolidation, un processus impliquant une synthèse protéique et des modifications structurelles et fonctionnelles au niveau synaptique ; il s'agit de la **consolidation synaptique**. Ce processus permet de stabiliser la trace mnésique et ainsi de maintenir le souvenir en mémoire pour qu'il puisse être rendu accessible et rappelé par la suite, à n'importe quel moment.

#### 1.2 Différentes classifications de la mémoire

La définition générale de la mémoire mentionnée ci-dessus n'en est pourtant qu'une parmi d'autres. En effet, on parle plutôt de plusieurs **systèmes de mémoire**, un système étant défini comme un réseau de neurones, anatomiquement et fonctionnellement distinct et intégré, qui se spécialise dans le traitement d'un type spécifique d'information (Tulving, 1972). Ces systèmes de mémoire peuvent se classer selon le registre sensoriel (e.g. visuel, auditif), le

décours temporel (mémoire à court terme vs. mémoire à long terme), le format des représentations mnésiques (e.g. mémoire déclarative, procédurale), ou encore le mode de récupération de la trace (explicite vs. implicite).

Par exemple, on entend souvent dire qu'une personne a une meilleure mémoire visuelle qu'auditive, ou l'inverse. Ce type de mémoire fait partie de ce que l'on appelle les Registres d'Information Sensorielle, qui maintiennent brièvement (de l'ordre d'une centaine de millisecondes pour le système visuel, et de 5 secondes pour le système auditif) une information exactement telle qu'elle a été perçue par un système sensoriel (Roulin, 1998). De plus, ces systèmes de mémoire ne sont pas indépendants les uns des autres : la mémoire déclarative est explicite (le souvenir est récupéré consciemment) et fait partie du système de Mémoire à Long Terme, par exemple.

Néanmoins, la classification la plus connue est celle du décours temporel, avec la Mémoire à Court terme (MCT), et la Mémoire à Long terme (MLT). Cette classification est ancienne puisque dès 1890, William James proposa une distinction entre la mémoire primaire (aujourd'hui MCT) qui comprenait les événements conscients proches du présent, et la mémoire secondaire (MLT) qui comprenait les souvenirs. La MCT a une capacité limitée et maintient les informations perçues de façon temporaire (de quelques secondes à quelques heures). C'est le cas d'un numéro de téléphone que l'on retient le temps de composer le numéro; il est ensuite oublié. Si l'information est manipulée pendant une opération cognitive, on passe alors dans la Mémoire de Travail. C'est par exemple le cas lorsque l'on demande à un sujet de retenir un numéro de téléphone puis de le restituer à l'envers. Si l'information n'est pas répétée régulièrement, elle sera oubliée, comme pour la MCT. Dans les deux cas, si l'information est pertinente et/ou répétée, elle peut alors être consolidée pour être maintenue dans le système de Mémoire à Long Terme de façon plus permanente. C'est sur ce système de mémoire que je vais me focaliser.

### 1.3 Sous-systèmes de la Mémoire à Long Terme chez l'Homme

#### 1.3.1 Historique

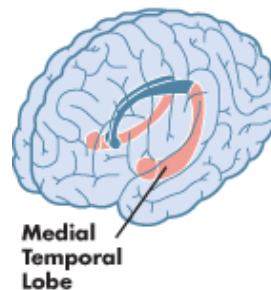
Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, les scientifiques se sont penchés sur la question de la localisation des fonctions cérébrales, et notamment de la mémoire, dans le cerveau. C'était le cas de Franz Joseph Gall avec la phrénologie et sa célèbre 'bosse des mathématiques'; or, aucune donnée scientifique n'est venue appuyer ses théories. En 1957, Scoville et Milner décrivent pour la

première fois le cas de Henry Molaison, mieux connu sous les initiales H.M. Afin de remédier à des crises d'épilepsie très sévères, H.M. a subi une résection bilatérale du lobe temporal médian (Figure 1). Suite à cette intervention chirurgicale, H.M. souffrait d'une **amnésie rétrograde**, une forme d'amnésie où le patient ne se souvient plus des événements qui précèdent un traumatisme ayant causé l'amnésie, et qui peut remonter à quelques heures ou plusieurs années. Ce type d'amnésie sera revu plus en détail dans le chapitre suivant. D'autre part, H.M. souffrait également d'une **amnésie antérograde**, c'est-à-dire une incapacité à former de nouveaux souvenirs ou d'acquérir de nouvelles informations. Il était incapable de se souvenir de personnes qu'il venait de rencontrer ou d'une tâche qu'il venait d'accomplir, y compris manger son repas. Néanmoins, sa capacité à retenir de l'information à très court terme (jusqu'à ce qu'il soit distrait) était intacte, indiquant que le lobe temporal médian n'est pas nécessaire pour cette forme de mémoire. Ceci est donc venu confirmer la dissociation entre le système de Mémoire à Court Terme et le système de Mémoire à Long Terme (voir Milner et coll., 1998, et Squire, 2009, pour des revues). Par ailleurs, les capacités perceptives et intellectuelles de H.M. étaient préservées, suggérant que ces fonctions cérébrales sont localisées ailleurs dans le cerveau.

A



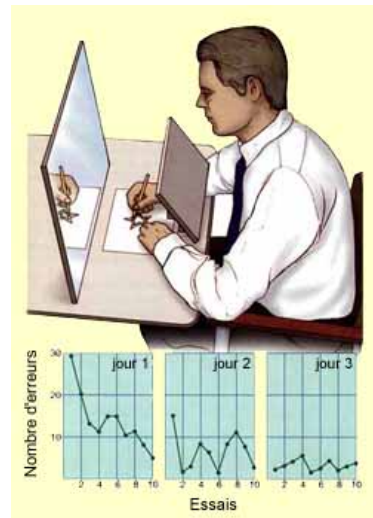
B



**Figure 1** : A) Photo de H.M. ([www.economist.com](http://www.economist.com)) B) Le lobe temporal médian chez l'Homme. Il est composé de l'amygdale, de l'hippocampe, du cortex entorhinal, du cortex périrhinal, du subiculum, présubiculum et parasubiculum (Brewer et Moghekar, 2002). Image de [www.mccare.com](http://www.mccare.com).

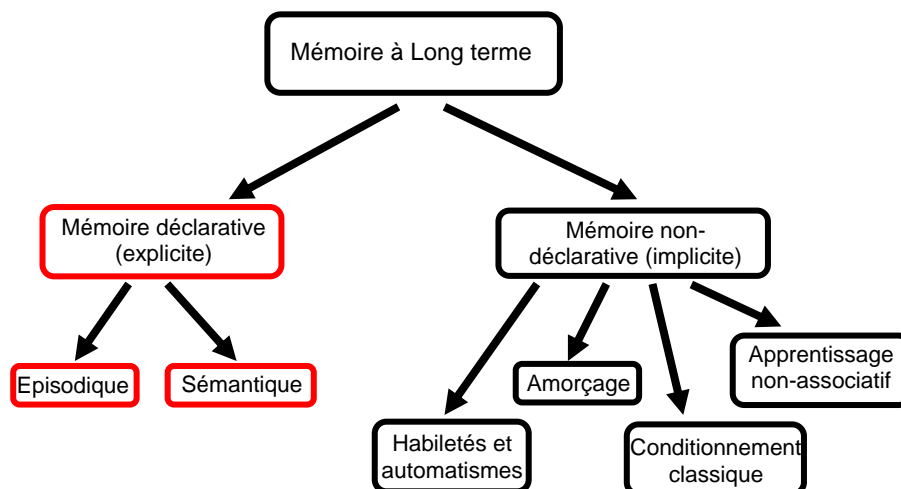
Afin d'établir précisément le degré d'amnésie de H.M., Brenda Milner lui a fait passer une batterie de tests neuropsychologiques, dont le test du dessin au miroir en 1962 (Figure 2). Cette tâche consiste à tracer les contours d'une étoile tout en regardant sa main et l'étoile dans un miroir. Non seulement H.M. améliorait ses performances au cours d'une même journée, mais il s'améliorait également d'un jour à l'autre alors qu'il n'avait aucun souvenir d'avoir effectué cette tâche auparavant (Corkin, 2002 ; Squire, 2009). C'était la première

démonstration qu'il existe plusieurs types de mémoires dans le cerveau, qui en plus ne dépendent pas tous des mêmes structures.



**Figure 2 :** La tâche du dessin au miroir. La personne est amenée à tracer les contours d'une étoile en regardant sa main et l'étoile dans un miroir. La performance s'améliore de jour en jour, y compris chez H.M. Image de [lecerveau.mcgill.ca](http://lecerveau.mcgill.ca).

Il est apparu par la suite que la préservation de souvenirs chez H.M. s'étendait de façon générale aux habiletés motrices et cognitives, d'où la différenciation entre la mémoire déclarative, qui était indiscutablement atteinte chez H.M., et la mémoire non-déclarative, qui comprenait tous les autres sous-systèmes de mémoire qui demeuraient intacts chez lui. Au fil des années et d'études sur d'autres patients amnésiques présentant des lésions similaires, une classification des sous-systèmes de la Mémoire à Long Terme a été établie (Figure 3). Je me focaliserai uniquement sur la mémoire déclarative.



**Figure 3 :** Système de Mémoire à Long Terme et ses différents sous-systèmes (basé sur Squire et Zola-Morgan, 1991). Les encadrés rouges représentent les sous-systèmes d'intérêt dans cette thèse.

### 1.3.2 La mémoire déclarative

La mémoire déclarative (ou explicite) fait référence à des faits, des expériences, et des informations liées à des événements précis, et dépend de l'intégrité du lobe temporal médian (Squire et coll., 1993). Elle est directement accessible à la conscience et peut donc être verbalisée, d'où le terme 'déclarative' (Baddeley, 2001 ; Lucas, 2002). En 1972, Tulving fait la distinction entre la mémoire sémantique et épisodique (Figure 3), deux sous-systèmes de la mémoire déclarative qui interagissent entre eux.

La mémoire **sémantique** fait appel aux connaissances générales d'un individu sur le monde, aux concepts et autres faits (e.g. le vocabulaire) qui ne sont pas liés à un contexte spatio-temporel précis. Par exemple, un individu sait qu'il a une maison de campagne en briques rouges à La Baule les Pins. A l'inverse, la mémoire **épisodique** comprend la mémoire dite 'autobiographique' des événements personnels dans la vie d'un individu et leurs relations dans un contexte spatio-temporel précis (Squire et coll., 1993 ; Baddeley, 2001 ; Tulving, 2002). Si l'on reprend l'exemple cité plus haut, l'individu va se souvenir d'avoir fêté son 40<sup>ème</sup> anniversaire en famille dans cette maison. Saint Augustin, au 4<sup>ème</sup> siècle, décrivait de façon générale la mémoire comme : « là [au palais de la Mémoire] que je me rencontre moi-même, que je me souviens de moi-même, de tout ce que j'ai fait, du moment, de l'endroit où je l'ai fait, des dispositions affectives où je me trouvais en le faisant ». Ceci correspond en fait plutôt bien à la définition actuelle de la mémoire épisodique. C'est une forme de mémoire particulière puisque c'est la seule où l'on se souvient consciemment du passé, où l'on se déplace mentalement dans le temps (Tulving et Lepage, 2000). Nous verrons d'ailleurs plus tard comment ces particularités de la mémoire déclarative chez l'Homme posent problème lorsque l'on veut extrapoler ces définitions à l'animal.

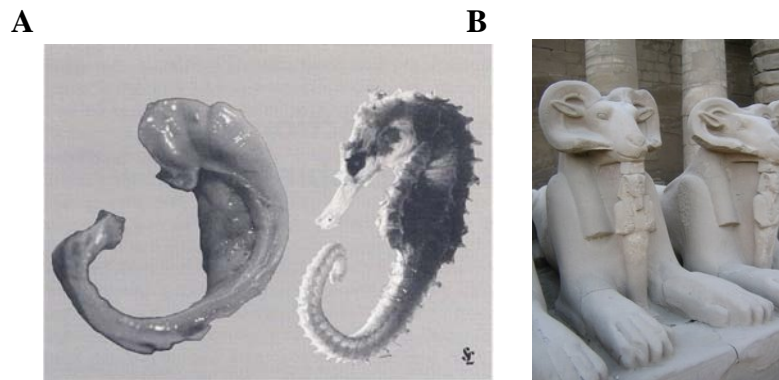
## 2. Hippocampe et mémoire

### 2.1 L'Hippocampe

#### 2.1.1 Terminologie et anatomie

Vers la fin du 16<sup>ème</sup> siècle, l'anatomiste Giulio Cesare Aranzi créa le terme 'hippocampe' pour désigner cette structure qui ressemblait étrangement à l'animal marin, *Hippocampus leiria* (Figure 4A). Les égyptiens y voyaient plutôt les cornes d'un bélier, symbole du dieu Amon en Egypte Ancienne (Figure 4B), et l'appelèrent 'cornu ammonis' (Andersen et coll.,

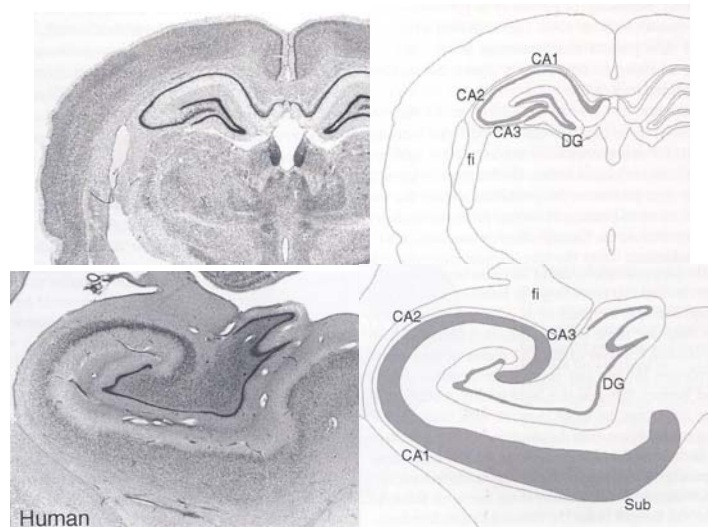
2007). Ce terme désignera ensuite les sous-régions de l'hippocampe, les 3 cornes d'Ammon (CA1, CA2, CA3).



**Figure 4** : Origines du mot 'hippocampe'. A) Hippocampe humain (gauche) à côté d'un *Hippocampus leria* (photo prise du *Hippocampus Book*, Oxford University Press, 2007). B) Dieu Amon sous forme de bélier.

La **région hippocampique** est située dans le lobe temporal médian, et est composée de structures bilatérales et symétriques. Elle est constituée de la formation hippocampique et de la région parahippocampique. La **formation hippocampique** comprend l'**hippocampe** (constitué des 3 sous-régions de la corne d'Ammon et, selon les terminologies, également du gyrus denté) et le subiculum. La **région parahippocampique** inclut le cortex entorhinal, le cortex périrhinal, le présubiculum, et le parasubiculum (Witter et Amaral, 2004 ; Moscovitch et coll., 2005 ; Andersen et coll., 2007). L'hippocampe, faisant partie du télencéphale, est une structure ancienne de l'archicortex. En conséquence, son architecture est commune à plusieurs espèces telles que l'Homme, les primates non-humains et le Rat, avec quelques différences cytoarchitecturales (Figure 5). Il en va de même pour la connectivité entre les structures, et certaines terminologies (e.g. le cortex parahippocampique chez le primate a pour équivalence le cortex postrhinal chez le Rat ; Jarrard et coll., 2004). Ainsi, l'hippocampe postérieur chez l'Homme est équivalent à l'hippocampe dorsal (ou septal) chez le Rat, tout comme l'hippocampe antérieur humain a pour équivalence l'hippocampe ventral (ou temporal) du Rat, ces différences étant dues à un positionnement différent de l'hippocampe dans le cerveau (de Hoz et coll., 2003).

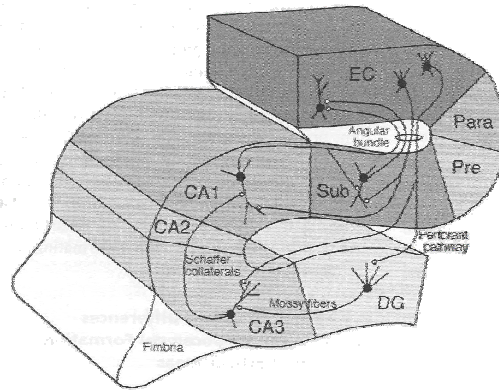




**Figure 5** : Photos et schémas de coupes coronales d'hippocampe du Rat (haut) et de l'Homme (bas). (Images tirées du *Hippocampus Book*, Oxford University Press, 2007) CA = corne d'Ammon ; DG = gyrus denté ; fi = fimbria ; Sub = subiculum.

L'hippocampe est composé de trois couches principales. Dans les cornes d'Ammon, la couche la plus profonde, *stratum oriens*, est polymorphe et comprend des fibres afférentes et efférentes ainsi que des interneurons. Dans le gyrus denté, cette couche polymorphe est nommée le *hile*. Vient ensuite la couche principale, *stratum pyramidale*, constituée de larges neurones pyramidaux dans les cornes d'Ammon, et appelée couche granulaire (*stratum granulosum*) dans le gyrus denté. Enfin, la couche superficielle est appelée couche moléculaire (*stratum moleculare*) à la fois dans les cornes d'Ammon et le gyrus denté (van Strien et coll., 2009).

La principale source d'afférences à l'hippocampe est le cortex entorhinal, avec ce que l'on appelle la boucle trisynaptique (Figure 6). Via la voie perforante, les neurones du cortex entorhinal projettent, vers les cellules pyramidales du gyrus denté et CA3, des informations sur l'environnement en provenance des aires corticales sensorielles et associatives. Les cellules granulaires du gyrus denté projettent ensuite vers CA3 via les fibres moussues. A leur tour, les cellules pyramidales de CA3 projettent vers CA1 via les collatérales de Schaffer. La région CA1 peut également recevoir des informations directement du cortex entorhinal via la voie perforante (voie monosynaptique). En retour, les cellules pyramidales de CA1 projettent directement vers le cortex entorhinal et le subiculum (Andersen et coll., 2007). Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous intéresser au rôle de l'hippocampe dans la mémoire déclarative et dans la mémoire spatiale.



**Figure 6 :** Connexions dans la région hippocampique. DG = gyrus denté, Sub = subiculum, EC = cortex entorhinal, Pre = présubiculum, Para = parasubiculum. (Schéma tiré du *Hippocampus Book*, Oxford University Press, 2007).

### 2.1.2 Rôle de l'hippocampe dans la mémoire déclarative

Dès 1900, von Bechterew suggère que des lésions du lobe temporal médian sont responsables d'amnésies. En effet, des données neuropathologiques d'un patient souffrant de troubles mnésiques montrent des lésions au niveau des cortex piriforme et périamygaloïde, ainsi que de la formation hippocampique. En 1947 (Grunthal) et 1952 (Glees et Griffith), deux autres cas de troubles mnésiques dus à des lésions bilatérales de l'hippocampe et du cortex environnant sont décrits mais de manière anecdotique. Il faudra attendre le cas de H.M., décrit plus haut, pour avoir des données neuropsychologiques plus approfondies. Scoville et Milner (1957) ont comparé le cas de H.M. à d'autres patients avec diverses lésions. L'un d'entre eux en particulier avait subi une résection de l'amygdale et du cortex périamygaloïde, et ne présentait aucune amnésie. Ceci fut la première indication que l'hippocampe joue un rôle sélectif dans la mémoire déclarative. Néanmoins, il manquait des données neuropathologiques pour le confirmer.

Le cas de R.B., ayant développé une amnésie antérograde à la suite d'un accident ischémique, a apporté des éléments nouveaux (Zola-Morgan et coll., 1986). Ce patient ne souffrait d'aucun autre trouble cognitif. Par ailleurs, des analyses neuropathologiques post-mortem ont révélé une lésion bilatérale uniquement restreinte à la région CA1 de l'hippocampe, montrant pour la première fois un rapport direct entre des lésions sélectives de l'hippocampe et l'atteinte de la mémoire déclarative. Ceci fut par la suite confirmé en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et par d'autres données neuropathologiques révélant, chez des patients amnésiques, des altérations morphologiques ou des lésions uniquement au niveau de l'hippocampe, avec, par exemple, une perte bilatérale et sélective de neurones dans la couche pyramidale des cornes d'Ammon ainsi que dans le gyrus denté (Press et coll., 1989 ; Squire et

coll., 1990 ; Victor et Agamaonolis, 1990 ; Rempel-Clower et coll., 1996). Il est intéressant de noter que les troubles mnésiques suivant ces lésions sélectives de l'hippocampe sont moins sévères que ceux observés chez H.M. ou chez d'autres patients présentant des lésions étendues du lobe temporal médian. Ceci suggère que le cortex parahippocampique joue également un rôle important dans la mémoire déclarative.

On peut également s'interroger sur le rôle de l'hippocampe dans les deux sous-systèmes de mémoire déclarative : la mémoire épisodique et la mémoire sémantique. S'agit-il vraiment de deux sous-systèmes bien distincts et donc dépendants de régions cérébrales différentes, ou, comme le suggérait Barsalou en 1988, n'y aurait-il pas plutôt un seul sous-système de mémoire déclarative comprenant des événements plus ou moins génériques? Alors qu'il est clairement démontré que la mémoire épisodique est affectée lors d'une amnésie due à des lésions du lobe temporal médian, les données sont beaucoup moins unanimes en ce qui concerne la mémoire sémantique (Squire et coll., 1993). En effet, certains patients avec une amnésie antérograde ont du mal à acquérir de nouvelles informations sémantiques, mais en sont capables avec beaucoup de répétitions (e.g. le cas de K.C. ; voir Rosenbaum et coll., 2005). Une étude importante s'est focalisée sur 3 patients avec une atteinte sélective et bilatérale de l'hippocampe datant de la naissance ou de l'enfance (Vargha-Khadem et coll., 1997). Ces patients présentaient une amnésie antérograde et rétrograde en ce qui concerne la mémoire épisodique alors que leur mémoire sémantique était relativement préservée, les patients ayant réussi à suivre un parcours scolaire classique. Ces résultats suggèrent l'existence de deux sous-systèmes bien distincts, à savoir la mémoire épisodique qui dépendrait intégralement de l'hippocampe, et la mémoire sémantique qui serait en partie indépendante de cette structure, et donc au moins partiellement épargnée lors d'atteintes de l'hippocampe. Néanmoins, il n'y a aucun moyen de savoir si les connaissances sémantiques acquises chez ces patients sont effectivement dues à un sous-système sémantique distinct et intact, ou si elles sont le résultat de ce qui pourrait être acquis avec une mémoire épisodique résiduelle (Squire et Zola, 1998). Certaines études en IRM fonctionnelle (IRMf) effectuées sur des sujets sains ont ainsi cherché à savoir s'il existait des différences neuroanatomiques sous-tendant la récupération de souvenirs épisodiques ou sémantiques. Quelques études ont montré une activation de l'hippocampe pour les deux types de souvenirs, bien que l'activation soit plus importante pour un souvenir épisodique que sémantique (Ryan et coll., 2008 ; 2009). Cependant, il est possible que les sujets dans ces tâches d'IRMf aient utilisé leur mémoire épisodique pour récupérer les informations sémantiques stockées dans une autre région

cérébrale (Barsalou, 1988 ; Burianova et Grady, 2007 ; Ryan et coll., 2008 ; 2009). En effet, lorsque l'on demande à des sujets de catégoriser les objets se trouvant dans une cuisine, une tâche de nature sémantique, certains d'entre eux s'imaginent dans leur cuisine en train d'ouvrir les tiroirs et de trouver ces objets, sollicitant ainsi clairement leur mémoire épisodique. Ceci pourrait donc considérablement biaiser les résultats d'IRMf. Pourtant, certaines données montrent que l'hippocampe et le gyrus parahippocampique sont impliqués dans la récupération d'informations sémantiques, peu importe la stratégie utilisée (Ryan et coll., 2008). Ceci impliquerait qu'il n'y a qu'un seul sous-système de mémoire déclarative. Néanmoins, d'autres auteurs ont montré un réseau d'activation commun pour la récupération de souvenirs épisodiques et sémantiques, mais avec également des activations spécifiques à chaque type d'information (Rajah et McIntosh, 2005 ; Burianova et Grady, 2007). Par exemple, il semblerait que le cortex préfrontal droit soit impliqué pendant la récupération d'un souvenir épisodique, et le cortex préfrontal gauche pendant la récupération d'un souvenir sémantique (Düzel et coll., 1999 ; Wiggs et coll., 1999). Le débat est donc loin d'être clos.

## 2.2 La Mémoire spatiale

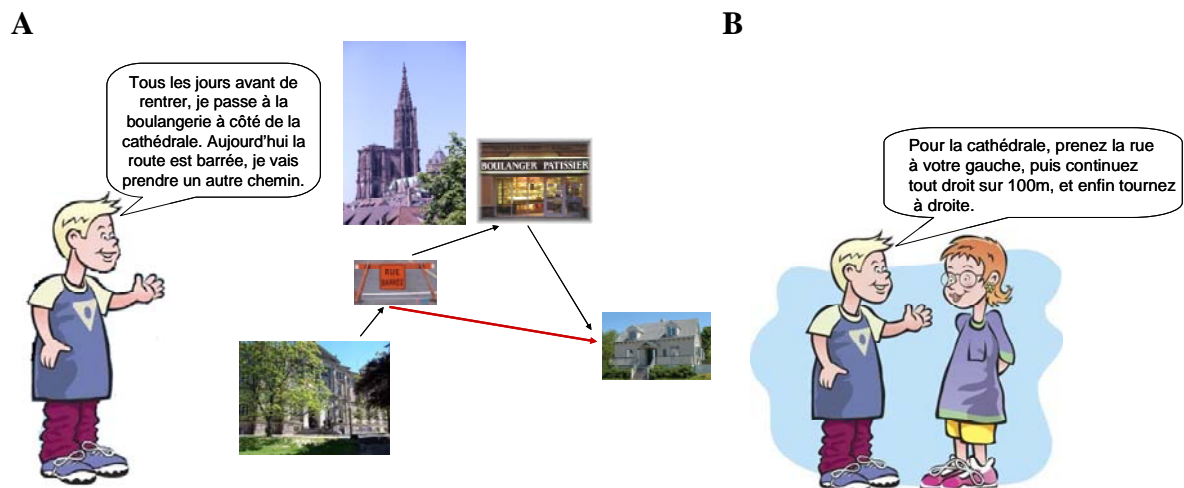
### 2.2.1 Définitions

La mémoire spatiale permet de stocker, maintenir et restituer les informations concernant l'environnement d'un individu, ainsi que son orientation spatiale dans cet environnement via des routes, mais surtout des configurations (Kessels et coll., 2001). Ceci permet à chacun de se souvenir d'endroits et d'y naviguer, un aspect essentiel à la survie. Par son importance adaptative, cette fonction se retrouve chez nombre d'espèces, y compris le Rat dont je parlerai en détail ultérieurement. Chez l'animal, en général, lorsque le souvenir fait partie du système de Mémoire à Long Terme, on parle de **mémoire spatiale de référence**. Lorsqu'il s'agit pour l'animal d'utiliser et de manipuler des informations spatiales sans pour autant qu'elles soient consolidées dans le système de Mémoire à Long Terme, on parle de **mémoire spatiale de travail**.

### 2.2.2 Stratégies

Il y a plusieurs façons de se diriger dans un environnement. Emboîtant le pas à Tolman (1948), O'Keefe et Nadel (1978) distinguent deux stratégies majeures dans leur théorie de la carte cognitive. La première, régie par l'hippocampe, est la stratégie **allocentrique**. Celle-ci implique de créer des relations spatiales entre divers indices pour former une représentation

mentale de l'environnement afin de pouvoir y naviguer. Cette représentation est indépendante de la position du corps. Elle est également très flexible, puisqu'un individu est capable de se rendre au but visé, peu importe son point de départ (O'Keefe et Nadel, 1978 ; Kessels et coll., 2001 ; Hartley et coll., 2003). Si, par exemple, une route est barrée, l'individu est capable de prendre un détour pour arriver à son but (Figure 7A). Cette stratégie fait partie du système 'locale', et peut également s'appeler apprentissage de place. L'autre stratégie majeure, impliquant des structures extra-hippocampiques, et notamment le néocortex et le noyau caudé, est la stratégie **égocentrique**. Celle-ci fait partie du système 'taxon', et consiste à se repérer grâce à ses propres mouvements, sensations proprioceptives, etc. (O'Keefe et Nadel, 1978 ; Kessels et coll., 2001 ; Burgess et coll., 2002). On peut ainsi atteindre un but en suivant la même route à chaque fois (apprentissage de réponse) ; cette stratégie est donc moins flexible, puisque, confronté à une route barrée, un individu n'utilisant que cette stratégie serait perdu (Figure 7B).

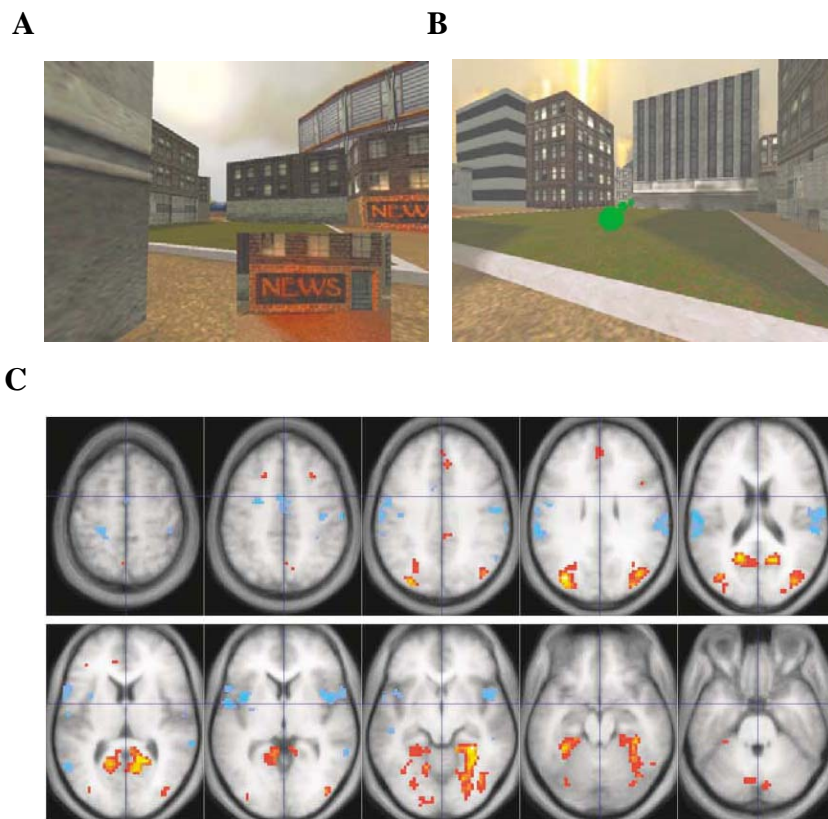


**Figure 7 :** A) Stratégie allocentrique, indépendante du point de vue. B) Stratégie égocentrique, dépendante de ses propres mouvements.

### 2.2.3 Hippocampe et mémoire spatiale

De nombreuses études montrent l'implication de l'hippocampe dans la mémoire spatiale. La plus célèbre est celle de Maguire et coll., en 2000, qui grâce à une technique d'IRM, ont étudié des chauffeurs de taxi Londoniens ayant plus ou moins d'expérience professionnelle. Les résultats ont montré que le volume de l'hippocampe postérieur des chauffeurs de taxi était significativement supérieur à celui des témoins exerçant une autre profession. À l'inverse, le volume de l'hippocampe antérieur des chauffeurs de taxi était plus petit que celui des

témoins. Par ailleurs, les auteurs ont trouvé une corrélation entre le nombre d'années d'expérience professionnelle et le volume de l'hippocampe droit, renforçant l'idée du rôle prépondérant de cette structure dans la navigation et la mémoire spatiale. Plusieurs études se sont également intéressées à l'activité de l'hippocampe selon la stratégie utilisée pour naviguer dans un environnement. En 1998, Maguire et coll. ont demandé à des sujets de se déplacer dans une ville virtuelle, avec différentes stratégies : prendre des routes, faire des détours, ou suivre un chemin balisé (Figure 8A et B). Les auteurs ont ainsi pu montrer en Tomographie par Emission de Positons (TEP) que l'hippocampe droit était plus activé dans les tâches de navigation spatiale que dans les tâches où les sujets n'avaient qu'à suivre des flèches.



**Figure 8 :** A) Exemple de tâche de réalité virtuelle demandant une stratégie allocentrique, le but à atteindre étant dans un encadré en bas à droite. B) Exemple de tâche de réalité virtuelle demandant de suivre un parcours balisé, ici par un point vert. C) Données d'IRMf montrant les régions cérébrales plus activées avec une stratégie allocentrique (rouge), et les régions cérébrales plus activées avec une stratégie égocentrique (bleu). Les trois figures proviennent de Hartley et coll., 2003.

Quelques années plus tard, l'utilisation de stratégies allocentrique ('*wayfinding*') et égocentrique ('*route following*') a été comparée dans un village virtuel grâce à une technique

d'IRMf (Hartley et coll., 2003). Non seulement une stratégie allocentrique correcte était associée à une activité dans l'hippocampe droit, mais en plus, les meilleurs 'navigateurs' avaient une plus grande activation de l'hippocampe pendant la tâche allocentrique, alors qu'ils avaient une plus grande activation du noyau caudé droit pendant la tâche égocentrique (Figure 8C). Ceci suggère deux mécanismes distincts sous-tendant la navigation (apprentissage de place *vs.* apprentissage de réponse).

En ce qui concerne les patients amnésiques, des études ont montré que des patients atteints de lésions hippocampiques étaient affectés dans des tâches de mémoire spatiale, notamment lorsqu'il s'agissait de stratégies allocentriques (Kessels et coll., 2001). Néanmoins, le patient K.C., qui présente une atrophie de l'hippocampe et du cortex parahippocampique, a également fait l'objet d'une étude en IRMf qui a montré que dans une tâche de navigation, il n'avait aucun problème de performance. Dans cette tâche, le cortex parahippocampique était activé chez K.C., alors que l'hippocampe était activé chez les sujets témoins (Rosenbaum et coll., 2007). En revanche, K.C. avait une performance détériorée dans une tâche de reconnaissance de maison. Dans cette tâche-là, les témoins sollicitaient le cortex parahippocampique, alors que l'hippocampe droit était activé chez K.C. Ceci suggère chez K.C. une réorganisation des circuits impliqués dans la mémoire spatiale.

De plus en plus d'études utilisent des tâches de navigation virtuelle, certaines imitant les tâches utilisées chez les rongeurs. Ainsi, dans une tâche aquatique ressemblant à la piscine de Morris, un test très utilisé chez le rongeur comme nous le verrons plus tard, la performance de patients présentant des lésions unilatérales du lobe temporal médian a mis en évidence des problèmes d'apprentissage et de rétention, peu importe l'hémisphère lésé (Astur et coll., 2002). Cependant, les lésions n'étaient pas sélectives de l'hippocampe. Dans une autre tâche de réalité virtuelle, où le sujet devait retrouver un cube sous un des coquillages disposés comme les renforcements alimentaires dans le labyrinthe radial utilisé chez les rongeurs, des patients présentant des lésions focalisées de l'hippocampe ou des lésions unilatérales du lobe temporal médian ont présenté des troubles de mémoire allocentrique, suggérant un rôle sélectif de l'hippocampe dans cette fonction (Parslow et coll., 2005). Si l'on s'intéresse à d'autres paramètres tels que le nombre d'items à mémoriser ou le point de vue dans la tâche de réalité virtuelle, la performance des patients présentant des lésions hippocampiques décline avec un nombre croissant d'items, alors qu'elle n'est pas affectée par un changement de point de vue (Shrager et coll., 2007). Ceci suggère que l'hippocampe n'est pas uniquement dédié à

la mémoire allocentrique (indépendante du point de vue) mais plus globalement à la mémoire déclarative.

Globalement, les données provenant de patients lésés sont difficiles à interpréter, comme le montre une certaine disparité des résultats. Ceci est dû en partie à l'origine et à l'hétérogénéité des lésions, compliquant l'interprétation des données et les comparaisons entre patients. La difficulté vient également du fait qu'un cerveau lésé fonctionne différemment d'un cerveau intact, avec la mise en place de circuits de compensation, par exemple. Ceci peut expliquer que K.C., dans l'étude présentée précédemment, n'ait pas sollicité les mêmes structures cérébrales que les témoins dans une même tâche. Toutes ces difficultés liées à l'historique prédéfini des patients amnésiques ont ainsi motivé la mise en place de modèles animaux. Nous allons à présent nous intéresser au Rat, qui a été utilisé comme sujet dans cette thèse.

### 3. Mémoire spatiale chez le Rat

#### **3.1 Modèle de mémoire 'episodic-like/declarative-like'**

Nous avons vu que les patients souffrent en général d'amnésie causée par un traumatisme, une intervention chirurgicale, une encéphalite, ou une anoxie. Ces lésions sont rarement circonscrites aux limites bien précises des structures et il est donc difficile de déterminer avec précision leurs rôles. Il est donc indispensable de travailler chez l'animal où l'on peut créer des lésions plus ciblées et intervenir à n'importe quel moment du processus mnésique (encodage, consolidation, rappel). Néanmoins, dans la mesure où la mémoire déclarative est par définition verbalisable et consciente, il est difficile de la modéliser chez l'animal. La mémoire épisodique, cependant, comprend 3 critères essentiels: le 'où', le 'quoi', et le 'quand' de l'expérience en question. A ce jour, seule une étude chez l'animal a modélisé de façon convaincante certains éléments de la mémoire épisodique (Clayton et coll., 2001). En effet, ces auteurs ont utilisé des geais à gorge blanche qui ont l'habitude de stocker de la nourriture en la cachant, et qui ont un hippocampe plus volumineux que des oiseaux qui ne stockent pas leur nourriture. Dans cette étude, les oiseaux avaient accès à des aliments périssables tels que des vers de terre ou des criquets, mais également à des denrées non périssables comme des cacahuètes. Une fois cachée, les oiseaux étaient autorisés à aller chercher leur nourriture 4h, 28h ou 100h plus tard, les vers étant pourris après 4h, les criquets après 28h. Les résultats montrent qu'en fonction du nombre d'heures écoulées les oiseaux se sont dirigés vers leurs cachettes contenant les aliments encore comestibles, indiquant une notion du 'où', du 'quoi', et surtout du 'quand'. Cependant, il manque encore l'aspect

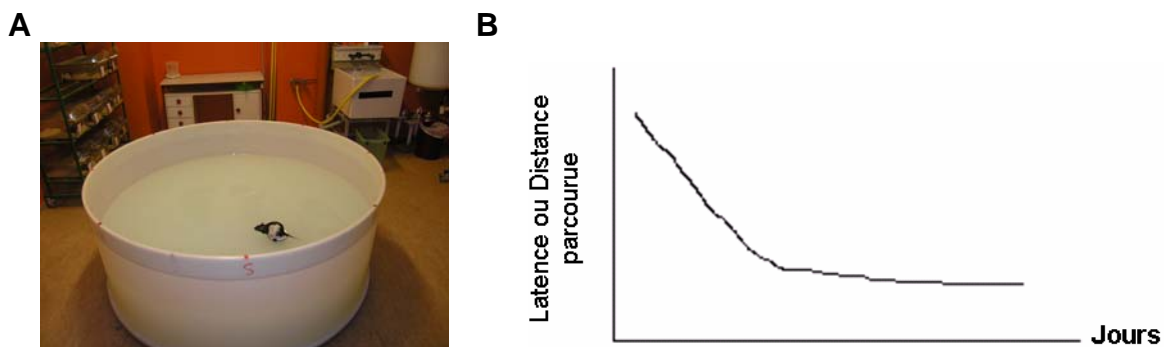


conscient de la mémoire épisodique puisque l'on ne peut les interroger là-dessus, d'où le terme de mémoire 'episodic-like'.

La mémoire spatiale comprend 2 de ces trois critères : le 'où' et le 'quoi'. De plus, tout comme pour la mémoire épisodique où les éléments d'un événement sont reliés entre eux, la mémoire spatiale allocentrique demande de créer des liens entre les divers indices (Aggleton et Pearce, 2001). Il s'agit donc de processus similaires. Les structures cérébrales impliquées dans la mémoire spatiale étant homologues chez l'Homme et le Rat, et certaines souches de rats ayant une grande capacité de mémoire spatiale, nous verrons qu'il s'agit là d'un bon modèle d'étude des processus mnésiques. Tout d'abord, je vais m'intéresser à l'un des tests les plus utilisés chez les rongeurs pour évaluer la mémoire spatiale, et qui a d'ailleurs été utilisé tout au long de cette thèse, à savoir le test de la piscine de Morris.

### 3.2 Test de la Piscine de Morris

En 1981, Richard Morris crée une nouvelle tâche visant à évaluer la mémoire spatiale chez le rat : la piscine de Morris. Cette tâche est aujourd'hui l'une des plus utilisées, avec le labyrinthe radial créé par Olton et Samuleson en 1976. La piscine de Morris a pour avantage de ne pas nécessiter de privation alimentaire, et de placer les rats dans une situation plus 'écologique', de par leur aptitude naturelle à la natation (Hodges, 1996 ; McDonald et coll., 2004). Le principe consiste à placer le rat dans un bassin circulaire rempli d'eau fraîche opacifiée afin qu'il retrouve une plate-forme immergée sous l'eau en se servant des indices distaux qui se trouvent dans la pièce (Morris, 1984). Le fait d'échapper à l'eau froide est une motivation suffisante pour le rat, d'où un apprentissage plus rapide que dans d'autres tests. Pendant la phase d'apprentissage ou d'**acquisition**, qui dure plusieurs jours, le rat sera placé plusieurs fois dans la piscine pour qu'il apprenne la localisation de la plate-forme (Figure 9A).



**Figure 9** : A) Photo d'un rat sur la plate-forme visible d'une piscine de Morris. B) Schéma théorique représentant une acquisition classique dans la piscine de Morris.

Un apprentissage classique se caractérise par une diminution progressive de la latence d'arrivée à la plate-forme, ou de la distance parcourue jusqu'à la plate-forme, au fil des jours (Figure 9B). A la fin de l'acquisition, le rat prendra un chemin direct jusqu'à la plate-forme. La latence est plus sensible aux problèmes sensorimoteurs, d'où l'intérêt de l'utilisation de la distance comme paramètre pour éviter un biais (Hodges, 1996 ; D'Hooge et coll., 2001).

Pour évaluer le souvenir de la localisation de la plate-forme, un **test de rétention** (*'probe trial'*) de 60 sec est effectué pendant lequel la plate-forme est retirée de la piscine. La piscine est alors divisée en quatre quadrants virtuels, et le temps passé dans chaque quadrant est analysé. Un rat ayant retenu la localisation de la plate-forme doit passer plus de 25% du temps dans le quadrant où celle-ci se trouvait pendant l'acquisition. D'autres paramètres peuvent être utilisés, tels que le nombre de passages effectués dans une zone virtuelle resserrée sur le centre de la plate-forme. Ceci peut apporter une notion de précision du souvenir. Enfin, afin de vérifier d'éventuels problèmes visuels, sensori-moteurs, ou de motivation, il est également possible d'utiliser une plate-forme visible (D'Hooge et coll., 2001).

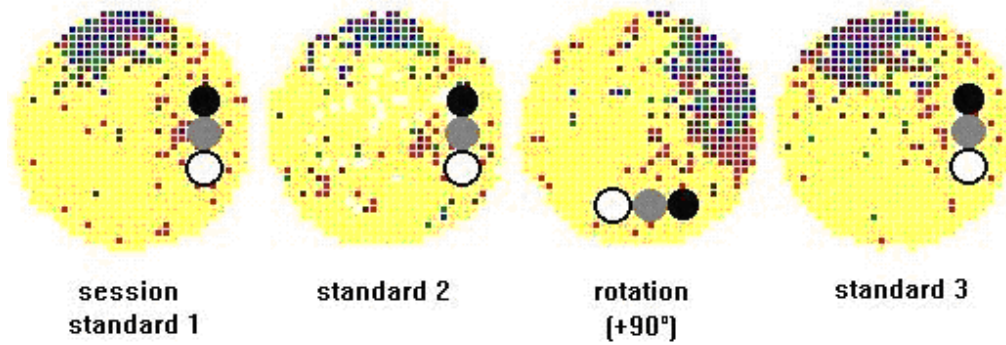
Le test de la piscine de Morris permet d'évaluer la mémoire à long terme ainsi que la mémoire de travail. En ce qui concerne la mémoire à long terme, on utilise un **protocole de mémoire de référence**. Dans ce cas, les informations acquises par le rat sont valables pour tous les essais de l'acquisition et donc pour toute la durée de l'expérience (Olton et coll., 1979). En effet, la localisation de la plate-forme ne change pas au fil des jours. En revanche, on peut également utiliser un **protocole de mémoire de travail**, dans lequel les informations acquises ne sont utiles que pour une partie de l'expérience. En effet, la localisation de la plate-forme est modifiée tous les jours ; le rat doit donc utiliser les informations acquises au premier essai de chaque jour pour retrouver la plate-forme.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées par le rat pour résoudre cette tâche : une stratégie 'praxique' ou égocentrique où l'animal apprend une séquence de mouvements qui lui permettent d'arriver à la plate-forme, une stratégie 'taxique' où l'animal utilise des indices visuels proximaux pour le guider vers la plate-forme, ou une stratégie spatiale allocentrique où l'animal utilise des indices distaux présents dans la pièce de test pour créer une carte spatiale de son environnement (Moghaddam et Bures, 1996 ; Paul et coll., 2009). Plusieurs stratégies peuvent être utilisées en même temps. Afin de minimiser les stratégies égocentriques et donc favoriser l'utilisation d'une représentation spatiale de l'environnement, l'animal est placé dans la piscine à des points de départs différents à chaque essai. A l'inverse, lorsque l'on veut minimiser l'utilisation des indices distaux, un rideau peut être placé autour de la piscine. Les rats peuvent également utiliser d'autres indices tels que les sons, la

luminosité, et les informations vestibulaires (McGauran et coll., 2005). D'autre part, l'apprentissage de la tâche peut être décomposé en une composante spatiale et une composante procédurale (Hodges, 1996 ; Baldi et coll. 2003). En effet, le rat va apprendre d'une part la localisation de la plate-forme (où chercher), mais de l'autre, il va également apprendre la stratégie la plus efficace pour la retrouver (comment chercher). Ainsi, au début de l'acquisition, un rat sera stressé et passera beaucoup de temps à longer les parois de la piscine ; c'est ce que l'on appelle la **thigmotaxie**. Au fil des essais, le rat délaissera les parois pour chercher plus au centre de la piscine et donc optimiser ses chances de retrouver la plate-forme. Nous verrons dans la dernière partie de ce chapitre comment cette tâche a pu être utilisée dans des modèles d'amnésie chez les rongeurs. Auparavant, nous allons nous intéresser aux liens qui existent entre l'hippocampe et la mémoire spatiale chez le Rat.

### 3.3 Carte cognitive et cellules de lieu

En 1948, Tolman fut le premier à avoir cumulé suffisamment de données pour affirmer que les rongeurs trouvaient la solution d'un labyrinthe non pas par un simple mécanisme de stimulus-réponse, mais plutôt parce qu'ils se représentaient leur environnement sous forme d'une carte spatiale, ou cognitive. Ce concept fut repris par O'Keefe et Nadel en 1978, après la découverte par O'Keefe et Dostrovsky, en 1971 chez le Rat, de cellules pyramidales de l'hippocampe dorsal dont l'activité était étroitement liée à la position du rat dans son environnement : ce sont les **cellules de lieu**. Récemment, elles ont également été découvertes chez l'Homme, avec des propriétés similaires à celles décrites chez les rats (Ekstrom et coll., 2003). Ces cellules s'activent lorsqu'un animal se trouve à un endroit précis de son environnement. L'espace dans lequel une cellule s'active est appelé le **champ d'activité**. Ces cellules de lieu se trouvent dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal, mais également dans l'hippocampe ventral, même si elles y sont moins nombreuses, avec un champ d'activité plus grand et dont l'activité est plus faible (Jung et coll., 1994 ; Poucet et coll., 1994). Dans un environnement fixe, chaque cellule de lieu a un champ d'activité stable dans le temps, et va y émettre des potentiels d'action indépendamment du comportement et de la direction de la tête du rat, ou du temps passé dans une certaine zone (Muller, 1996 ; Poucet et coll., 2003). Ainsi, lorsqu'une rotation de l'environnement est effectuée, par exemple en bougeant des indices de 90°, le champ d'activité suit cette rotation (Figure 10). Par ailleurs, une fois le champ d'activité créé (2-3 minutes suffisent), retirer un indice de l'environnement ne l'affectera pas (Eichenbaum et coll., 1999 ; Moser et coll., 2008).



**Figure 10** : Exemple de cellule de lieu enregistrée pendant 4 sessions consécutives. La zone colorée en bleu correspond au champ d'activité de la cellule, les pixels allant du bleu au violet représentant les potentiels d'action émis. Les cercles noirs, gris, et blancs représentent des objets servant d'indices spatiaux pour le rat. Lors de la 3<sup>ème</sup> session, une rotation des objets de 90° cause une rotation identique du champ d'activité. Image de <http://granon.club.fr/placec.html>.

Néanmoins, les cellules de lieu ne sont pas organisées de façon topographique puisque des cellules voisines ne vont pas forcément avoir des champs d'activité voisins (Muller et coll., 1996 ; Andersen et coll., 2007). D'autre part, l'activité des cellules de lieu dépend principalement de l'information visuelle présente dans l'environnement ; en son absence, d'autres informations sensorielles telles que les odeurs, ou des informations vestibulaires et proprioceptives peuvent être utilisées. En effet, des rats aveugles ont des champs d'activités stables tout à fait comparables à des rats témoins (Save et coll., 1998 ; Poucet et coll., 2003). Toutefois, l'existence même de ces cellules ne démontre pas leur rôle dans la mémoire spatiale ou la navigation. C'est pourquoi des études ont cherché à établir un lien fonctionnel entre les deux, en se basant sur l'idée qu'une détérioration des propriétés des cellules de lieu devrait altérer les performances spatiales d'un animal. Effectivement, lorsque le positionnement du champ d'activité n'est plus cohérent avec la tâche spatiale (suite à des rotations et autres manipulations de l'environnement), on observe une dégradation des performances avec une certaine désorganisation du comportement spatial des rats (Lenck-Santini et coll., 2001 ; 2002). De plus, cette baisse de performance se produit uniquement lorsque la tâche nécessite une navigation basée sur une représentation spatiale de l'environnement, et non pas lorsqu'il s'agit de naviguer vers une cible visible (Lenck-Santini et coll., 2002). De façon intéressante, l'activité des cellules de lieu est observée même lorsque les rats n'ont pas de tâche spatiale à accomplir. Ceci suggère qu'une représentation spatiale d'un environnement est créée par l'hippocampe 'quasi-automatiquement', mais qu'elle n'est cruciale que lorsqu'une navigation spatiale est requise. Ces données vont donc en faveur de la théorie de la carte cognitive qui prône que la fonction principale de

l'hippocampe est de créer et stocker ces cartes spatiales. Par ailleurs, ces observations sont renforcées par les résultats des études lésionnelles démontrant également l'importance de l'hippocampe en lui-même dans la mémoire spatiale chez le Rat, comme nous allons le voir à présent.

### 3.4 Validation du modèle du Rat

Le cas de H.M. a suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique et a encouragé les chercheurs à développer des modèles animaux d'amnésie, d'abord chez les singes puis chez les rongeurs, pour mieux comprendre l'implication de certaines structures dans la mémoire (Squire, 1992 ; Jarrard, 1995 ; Andersen et coll., 2007). Les études lésionnelles sont importantes dans le sens où l'on peut comparer les résultats avec ceux de patients amnésiques présentant des lésions similaires. Cependant, un cerveau lésé ne fonctionne pas de la même façon qu'un cerveau intact, notamment à cause de la réorganisation neuroanatomique qui peut survenir après une lésion et qui peut être à l'origine de mécanismes compensatoires (Martin et Ghez, 1999 ; Aggleton et Pearce, 2001). Il est donc important de compléter les études de lésions par des techniques d'inactivations fonctionnelles réversibles qui permettent réellement d'évaluer la nécessité d'une structure à un moment précis (Lomber, 1999).

Dès 1978, des études lésionnelles ont été réalisées chez le Rat dans une tâche de labyrinthe radial, et ont révélé l'importance de l'hippocampe dans cette tâche (Jarrard, 1978 ; Olton et coll., 1978). En 1981, Morris présenta un nouveau test évaluant la mémoire spatiale : la piscine de Morris. Les rats ayant subi une lésion de l'hippocampe présentaient de très mauvaises performances d'apprentissage et de rétention par rapport à des animaux ayant subi des lésions du cortex superficiel et à des témoins non opérés (Morris et coll., 1982). Ce résultat fut répliqué dans d'autres tâches hippocampo-dépendantes, telles que l'évitement de place (Cimadevilla et coll., 2000), ainsi que dans des tâches non spatiales comme la transmission sociale de préférence de nourriture (Bunsey et Eichenbaum, 1995) ; ceci est donc conforme à ce que l'on a pu voir chez l'Homme. De façon similaire, des lésions de l'amygdale chez le Rat n'ont eu aucun effet sur l'acquisition et la rétention dans une tâche de piscine de Morris (Squire, 1992 ; Mc Donald et coll., 2007). Ces observations ne contredisent donc pas les données obtenues chez les patients présentant des lésions de l'amygdale. Packard et McGaugh (1996) ont également été les premiers à observer une dissociation entre les structures impliquées dans la mémoire spatiale selon la stratégie utilisée. En effet, une inactivation de l'hippocampe avant le test de rétention, dans un labyrinthe en croix, induisait

une diminution des performances d'apprentissage de place (stratégie allocentrique), mais laissait les capacités d'apprentissage d'une réponse motrice intactes (stratégie égocentrique). A l'inverse, l'inactivation du noyau caudé affectait les performances d'apprentissage d'une telle réponse, mais non pas d'apprentissage de place, reflétant les résultats obtenus chez l'Homme en IRMf. Par ailleurs, une lésion de l'hippocampe affectait les performances des rats dans un labyrinthe en T lorsque la tâche nécessitait une stratégie allocentrique, mais pas lorsqu'une stratégie égocentrique était requise, suggérant comme chez l'Homme un rôle sélectif de l'hippocampe dans la mémoire spatiale allocentrique (Stringer et coll., 2005). Une autre dissociation fonctionnelle a été montrée, cette fois entre les structures intervenant dans les aspects spatiaux et procéduraux de la mémoire (Micheau et coll., 2004). En effet, les rats ayant subi une inactivation de l'hippocampe à la fin de l'apprentissage dans une tâche de piscine de Morris ne savaient plus où se trouvait la plate-forme, mais ils gardaient une bonne stratégie de recherche, reflétant l'intégrité de l'aspect procédural de la tâche, qui n'est donc pas géré par l'hippocampe, tout comme chez l'Homme.

Des études ont également montré que la taille de la lésion importait dans l'étendue des troubles mnésiques. Une lésion de 40% du tissu hippocampique a dégradé les performances de rétention dans la piscine de Morris. En revanche, cette lésion n'a pas affecté pour autant l'apprentissage d'une nouvelle tâche, ou le rappel d'une tâche apprise après la chirurgie (Moser et Moser, 1998). Il semblerait également que le niveau de performance dans le test de la piscine de Morris soit proportionnel au volume de l'hippocampe épargné, et ce peu importe l'hémisphère lésé (de Hoz et coll., 2005). De même, un apprentissage plus intense dans la piscine de Morris n'a pas été sensible aux lésions allant jusqu'à 80% du tissu hippocampique (de Hoz et coll., 2003). Ceci suggère donc que la mémoire spatiale serait encodée et récupérée par un réseau neuronal très distribué. Enfin, alors que nous avons vu précédemment que l'hippocampe postérieur chez l'Homme est plus activé que l'hippocampe antérieur au cours de tâches de mémoire spatiale, on observe également une différenciation fonctionnelle chez le Rat entre l'hippocampe dorsal et ventral, les lésions de l'hippocampe dorsal ayant le plus fort impact sur les performances (Moser et coll., 1993 ; 1998b ; Potvin et coll., 2006). Ces observations sont compatibles avec les travaux de Maguire et coll. (2000) menés chez l'Homme et présentés précédemment. Dans cette étude, l'hippocampe postérieur, qui est l'équivalent de l'hippocampe dorsal chez le Rat, avait un volume supérieur chez les chauffeurs de taxi comparativement aux sujets témoins, impliquant donc cette structure dans la mémoire spatiale. Au contraire, l'hippocampe antérieur, équivalent à l'hippocampe ventral du Rat, était plus petit chez les chauffeurs de taxi. Ces études, combinées à d'autres données

fonctionnelles, suggèrent que l'hippocampe postérieur/dorsal est plus impliqué que l'hippocampe antérieur/ventral dans la mémoire spatiale. Cette thèse étant focalisée sur la mémoire spatiale chez le Rat, nous nous sommes intéressés uniquement aux contributions fonctionnelles de l'hippocampe dorsal.

L'analogie entre les déficits mnésiques chez l'Homme et le Rat a donc validé l'utilisation de lésions hippocampiques chez le Rat comme modèle d'amnésie, et a ainsi permis d'approfondir les connaissances sur le fonctionnement de l'hippocampe, mais également sur les mécanismes sous-tendant la mémoire en général. On en sait à présent un peu plus sur les fonctions des différentes sous-régions de l'hippocampe. Par exemple, CA3 semble être impliqué dans l'encodage et la consolidation, mais pas dans la récupération d'un souvenir spatial (e.g. Florian et Roulet, 2004). Des études lésionnelles et pharmacologiques ont ainsi pu mettre à jour ces différentes phases que sont l'encodage, la consolidation et la récupération en constatant des effets différents selon le moment où l'intervention est réalisée. Contrairement à l'idée qu'une trace consolidée devenait immuable, il est maintenant clair que la trace mnésique peut repasser par une phase labile pendant laquelle elle est malléable et suite à laquelle elle peut être à nouveau stabilisée ou non, par un processus que l'on appelle la reconsolidation (Nader et Hardt, 2009). La découverte des cascades moléculaires impliquées dans la consolidation synaptique, et des systèmes de neurotransmission mis en jeu dans les processus mnésiques approfondissent nos connaissances fondamentales sur la mémoire, mais elles permettent également de les appliquer dans des perspectives cliniques. Ainsi, ces informations sont utiles pour créer des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer, par exemple, ou pour envisager des thérapies pharmacologiques jouant sur la reconsolidation pour minimiser des souvenirs ayant induit un stress post-traumatique. Ainsi, les études chez l'animal allant des systèmes de mémoire à la génétique contribuent à cette compréhension plus globale, mais il reste encore un long chemin à parcourir. Le travail de cette thèse n'est qu'une petite pierre apportée à l'édifice de notre compréhension de la mémoire et de ses dysfonctionnements. Le chapitre suivant sera consacré à une forme de consolidation dans le système de Mémoire à Long Terme, dont l'importance du rôle de l'hippocampe est au centre d'un débat depuis plusieurs décennies : la consolidation systémique.

## Chapitre 2 : La consolidation systémique

### 1. Théorie de Ribot et la neuropsychologie des patients amnésiques

#### 1.1 Gradient de Ribot

Nous avons vu précédemment que H.M. souffrait d'amnésie antérograde et rétrograde. Nous allons maintenant nous intéresser à cette seconde forme d'amnésie où la période de temps recouvrant les souvenirs oubliés est très variable. En 1881, Théodule Ribot propose que la progression de l'amnésie va toujours « du plus nouveau au plus ancien », une théorie baptisée le Gradient de Ribot. Celle-ci implique qu'une amnésie rétrograde est **temporellement graduée**, les souvenirs récents étant plus affectés que les souvenirs anciens.

#### 1.2 Amnésie rétrograde temporellement graduée

Le cas de H.M. était également d'une grande importance car il a remis 'au goût du jour' la théorie de Ribot. En effet, Scoville et Milner (1957) ont montré que H.M. souffrait d'amnésie rétrograde temporellement graduée. Il ne se souvenait pas d'événements récents précédant son intervention chirurgicale, mais pouvait se remémorer son enfance. Cette préservation de souvenirs anciens a également été retrouvée à des degrés variables chez des patients présentant des lésions similaires. Cette dissociation pourrait s'expliquer par une réorganisation spatio-temporelle de la trace mnésique au niveau des régions/sous-régions cérébrales, que l'on appelle la **consolidation systémique**. Néanmoins, on ne sait toujours pas précisément à l'heure actuelle quelles sont les structures impliquées dans cette réorganisation. L'hippocampe ne jouerait-il qu'un rôle temporaire dans le maintien et la récupération des souvenirs ? Plusieurs théories ont ainsi été élaborées pour tenter de répondre à cette question.

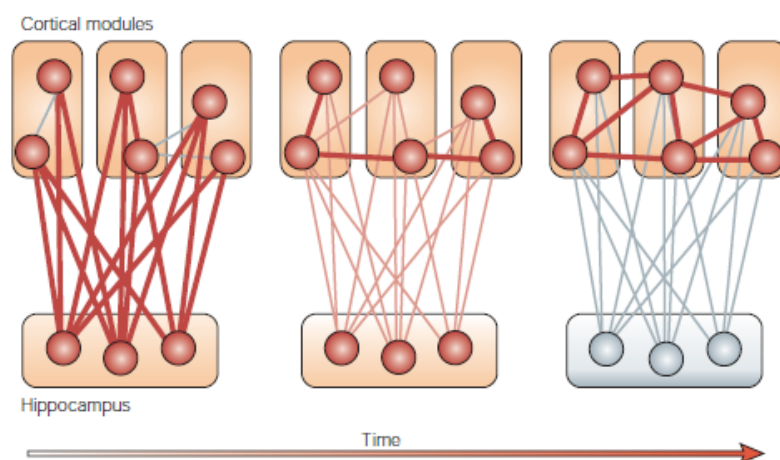
### 2. Théorie Standard de la Consolidation

#### 2.1 Définition

En 1971, Marr suggéra que l'hippocampe joue un rôle temporaire dans le maintien et la récupération d'une information. Pour lui, les événements du monde extérieur sont représentés par des profils d'activité dans les aires néocorticales, l'hippocampe ayant pour fonction de stocker ces représentations suffisamment longtemps pour qu'elles soient catégorisées et



stockées à plus long terme dans le néocortex. Cette idée fut reprise par la suite pour devenir la **Théorie Standard de la Consolidation**. D'après cette théorie, une information est encodée dans des réseaux neuronaux hippocampo-néocorticaux. Le stockage transitoire d'un souvenir s'effectue dans l'hippocampe grâce à la consolidation synaptique, mais un stockage plus permanent s'effectuerait plus graduellement pour intégrer le souvenir dans des réseaux néocorticaux préexistants. Ainsi, l'hippocampe aiderait d'abord à lier les différents éléments d'un événement présents dans le néocortex pour en faire une trace mnésique. Puis, avec le temps, les connexions cortico-corticales se renforceraient jusqu'à ce que la récupération du souvenir ne soit plus principalement dépendante de l'hippocampe, mais plutôt du néocortex (Figure 11 ; Alvarez et Squire, 1994 ; McClelland et coll., 1995 ; Squire et Alvarez, 1995 ; voir Frankland et Bontempi, 2005, pour une revue), et en particulier du cortex préfrontal médian comme nous le verrons ultérieurement. Les **souvenirs récents**, dépendants de l'hippocampe, seraient donc affectés par une amnésie rétrograde, contrairement aux **souvenirs anciens**, dépendants d'autres structures et ainsi épargnés, ce qui aboutirait à une amnésie rétrograde temporellement graduée.



**Figure 11** : Théorie Standard de la Consolidation (schéma de Frankland et Bontempi, 2005). Au fil du temps, les connexions cortico-corticales se renforcent, au détriment des connexions hippocampo-néocorticales.

### 2.2 Importance des connexions hippocampo-néocorticales

Les connexions hippocampo-néocorticales ont une importance fonctionnelle démontrée. En effet, l'un des mécanismes potentiels de la consolidation systémique est un processus itératif de réactivation de la trace mnésique dans l'hippocampe. Ceci amènerait à la répétition de profils d'activité neuronale liés au souvenir dans le néocortex et à son éventuelle stabilisation

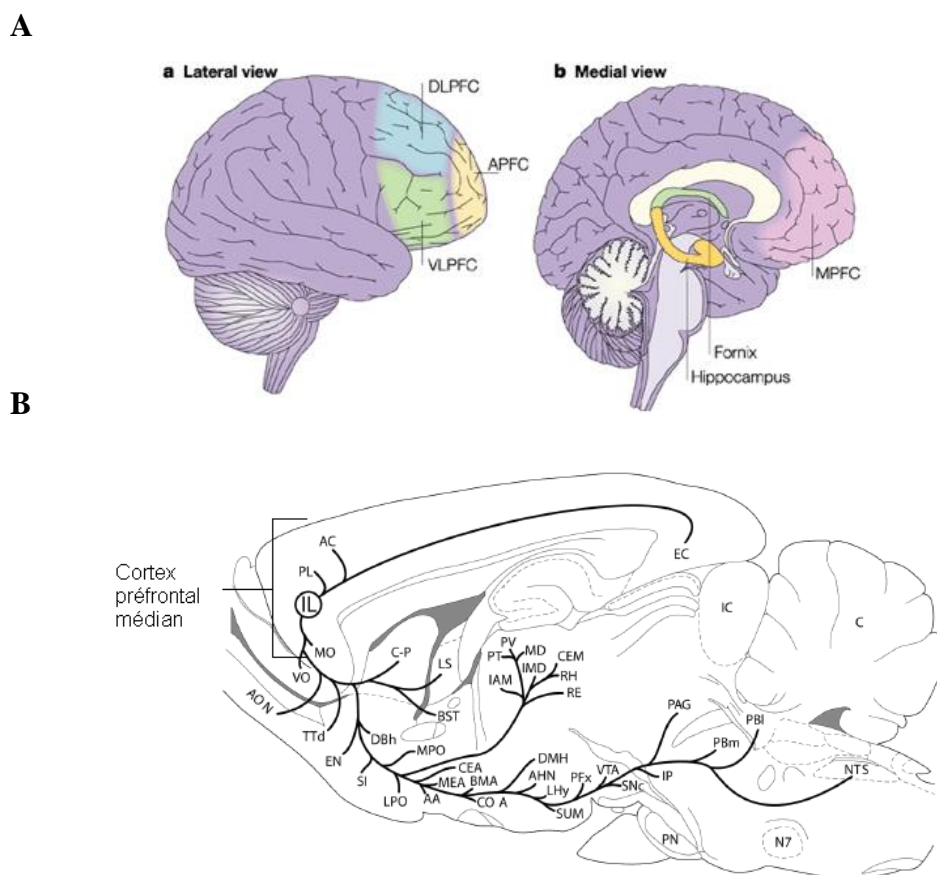
(Frankland et Bontempi, 2005). Cette réactivation peut se faire dans des situations dites ‘on-line’ (e.g. pendant une tâche mnésique), ou ‘off-line’ comme c’est le cas pendant le sommeil. En effet, plusieurs études ont montré que les profils d’activité neuronale associés à un apprentissage sont ‘rejoués’ pendant le sommeil chez l’Homme et le Rat, à la fois dans l’hippocampe et le néocortex (notamment le cortex préfrontal médian) à quelques secondes d’écart, impliquant ainsi les réseaux neuronaux hippocampo-néocorticaux (e.g. Siapas et Wilson, 1998 ; Maquet et coll., 2000). Cette communication est d’autant plus importante lorsque l’on sait que des modifications de la plasticité synaptique hippocampique peuvent avoir une incidence sur la formation de souvenirs anciens. Ainsi, la suppression de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) dans la région CA1, ou la surexpression d’une forme altérée de la protéine  $\alpha$ -CaMKII ( $\alpha$ -calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) dans l’hippocampe des souris, empêche la formation d’un souvenir ancien lorsque ces modifications sont réalisées 1 semaine après la fin de l’acquisition d’une tâche. Ceci n’est pas le cas si la suppression/surexpression se fait plusieurs semaines après la fin de l’acquisition (Shimizu et coll., 2000 ; Wang et coll., 2003). La réactivation répétée d’une trace hippocampique intacte est donc essentielle pour que cette trace soit consolidée dans les réseaux corticaux. De même, une plasticité corticale normale est impérative pour établir un souvenir ancien dans les réseaux cortico-corticaux. En effet, des souris mutantes  $\alpha$ -CaMKII<sup>+/-</sup>, présentant une altération de la Potentialisation à Long Terme (forme de plasticité synaptique) dans le cortex et non dans l’hippocampe, ont une détérioration des souvenirs anciens et non des souvenirs récents (Frankland et coll., 2001). Nous allons donc nous intéresser aux connexions hippocampo-préfrontales, directement impliquées dans la consolidation systémique.

### 2.3 Cortex préfrontal et connexions hippocampo-préfrontales

#### 2.3.1 Le cortex préfrontal

Le cortex préfrontal, chez l’Homme, est divisé en plusieurs régions : la région orbitale, latérale (divisée en deux sous-régions : dorsolatérale et ventrolatérale), et médiane (Figure 12A). Chez le Rat, il est moins développé et divisé en quatre régions : le cortex préfrontal médian (mPFC), ventral, latéral, et l’aire précentrale médiane (Figure 12B ; Heidbreder et Groenewegen, 2003 ; Simons et Spiers, 2003). Néanmoins, la connectivité est similaire chez les primates et le Rat. De façon générale, le cortex préfrontal joue un rôle dans l’attention, le contrôle viscéro-moteur, la planification et l’organisation d’une action à accomplir pour

atteindre un but précis, ainsi que dans la mémoire spatiale de travail (Floresco et coll., 1997 ; Fuster, 2001 ; Vertes, 2006). Dans cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement au cortex préfrontal latéral, qui a pour équivalence, chez le Rat, le cortex préfrontal médian (Heidbreder et Groenewegen, 2003 ; Uylings et coll., 2003). Cet intérêt s'explique par l'influence de ce cortex sur certains processus mnésiques et du fait de ses connexions avec l'hippocampe.



**Figure 12 :** A) Localisation du cortex préfrontal chez l'Homme (Simon et Spiers, 2003). DLPFC = Cortex Préfrontal Dorsolatéral ; APFC = Cortex Préfrontal Antérieur (équivalent du cortex orbital) ; VLPFC = Cortex Préfrontal Ventrolatéral ; MPFC = Cortex Préfrontal Médian. B) Localisation du cortex préfrontal médian chez le Rat (adapté de Vertes, 2006). AC = cortex cingulaire antérieur ; PL = cortex prélimbique ; IL = cortex infralimbique ; MO = cortex médio-orbital).

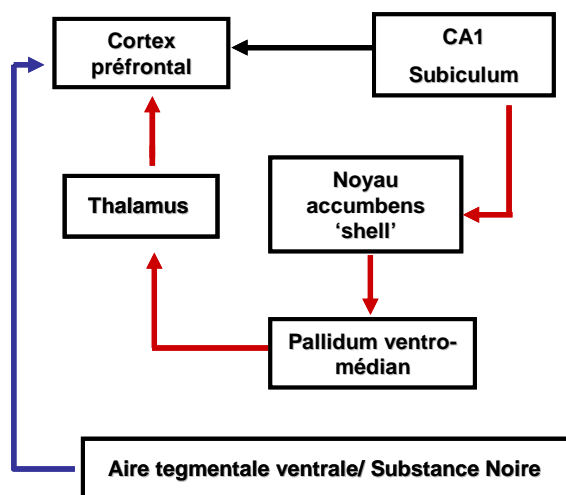
Des études menées chez le Rat ont montré que des lésions du mPFC causaient des déficits de performance dans une multitude de tâches spatiales telles que le labyrinthe radial ou la piscine de Morris (e.g. Joel et coll., 1997 ; Dias et Aggleton, 2000 ; Lacroix et coll., 2002 ; Hannesson et coll., 2004). Par exemple, dans une tâche de labyrinthe radial, des lésions du mPFC ont diminué la vitesse d'apprentissage, notamment à cause d'une baisse plus lente du nombre d'erreurs de mémoire de travail au fil des jours (le fait de revenir dans une branche

déjà visitée au cours d'un même essai), en comparaison avec les rats témoins (Joel et coll., 1997). Néanmoins, en fin d'apprentissage les performances des rats lésés étaient équivalentes à celles des rats témoins. De plus, les rats lésés ne montraient aucun déficit en ce qui concernait les aspects de mémoire de référence de la tâche (le fait d'entrer dans une branche non appâtée). Dans une tâche de piscine de Morris, les rats lésés avaient une performance équivalente à celle des témoins lors de l'apprentissage initial et du test de rétention, mais ces rats étaient plus lents lors de l'acquisition du '*reversal*' où le rat doit apprendre une nouvelle localisation de la plate-forme, ce qui demande une certaine flexibilité mentale (Lacroix et coll., 2002). Ces résultats suggèrent que le mPFC n'est pas nécessaire en soi au traitement et à la récupération des informations spatiales, mais plutôt à l'apprentissage des règles générales de la tâche à accomplir. Un déficit dans l'apprentissage de ces règles générales pourrait induire des erreurs de persévération apparentées aux erreurs de mémoire de travail citées précédemment, et être liées à un problème d'attention ou de flexibilité et de choix de stratégies, résultant en un déficit dans les tâches de mémoire de travail (Delatour et Gisquet-Verrier, 2000 ; Dias et Aggleton, 2000 ; Lacroix et coll., 2002). Cependant, tous ces travaux n'ont testé le rappel qu'à des délais assez courts après l'apprentissage. Il se pourrait que le mPFC joue un rôle dans la mémoire de référence à plus long terme, notamment dans la consolidation systémique. Nous allons donc à présent nous intéresser aux connexions hippocampo-préfrontales qui pourraient être impliquées dans ce processus.

### 2.3.2 Connexions hippocampo-préfrontales

Chez le Rat, il existe une connexion ipsilatérale directe et unilatérale entre l'hippocampe et le cortex préfrontal médian, constitué du cortex cingulaire antérieur (ACC), du cortex prélimbique et du cortex infralimbique (Heidbreder et Groenewegen, 2003 ; Vertes, 2004). Cette voie glutamatergique part de la région CA1/subiculum de l'hippocampe ventral et arrive au cortex prélimbique et au cortex médio-orbitale (Figure 13 ; Jay et coll., 1996 ; Laroche et coll., 2000 ; Thierry et coll., 2000). Il existe également une voie indirecte qui part également de l'hippocampe ventral mais passe par le 'shell' du noyau accumbens, le pallidum ventromédian, et le thalamus avant d'arriver au cortex prélimbique (Figure 13). L'activation de cette voie indirecte pourrait augmenter l'excitabilité des neurones du cortex préfrontal médian et ainsi faciliter l'influence de la voie directe (Thierry et coll., 2000 ; Vertes, 2006). Ces structures intermédiaires pourraient donc jouer un rôle non négligeable dans la consolidation systémique. Le cortex préfrontal médian, en revanche, ne projette pas directement vers l'hippocampe, mais il existe des connexions indirectes et bidirectionnelles

avec le cortex entorhinal et le cortex périrhinal (Laroche et coll., 2000 ; Heidbreder et Groenewegen, 2003 ; Uylings et coll., 2003). Il est également intéressant de noter l'influence des projections dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale vers le cortex préfrontal médian, qui pourraient également moduler la voie hippocampo-préfrontale directe (Figure 13 ; Jay et coll., 1996 ; Laroche et coll., 2000). Nous allons maintenant nous intéresser aux données étayant la Théorie Standard de la Consolidation.



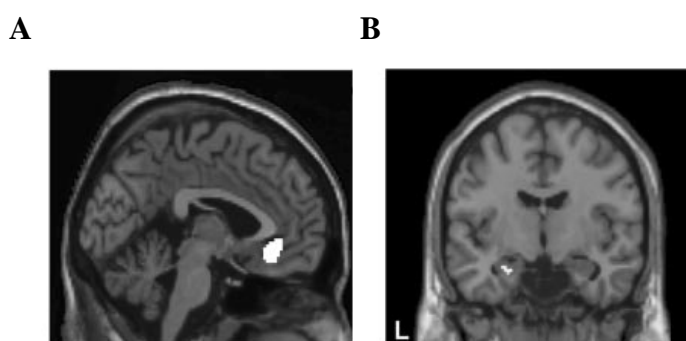
**Figure 13** : Connexions hippocampo-préfrontales directe (en noire) et indirecte (en rouge), et projection dopaminergique vers le cortex préfrontal (en bleu ; schéma adapté de Thierry et coll., 2000).

### 2.4 Théorie Standard de la Consolidation

#### 2.4.1 Données obtenues chez l'Homme

Les données provenant de patients amnésiques ont été les premières à suggérer un rôle temporaire de l'hippocampe, notamment avec le cas de H.M. dont l'amnésie rétrograde remontait à environ 11 ans avant son intervention chirurgicale. D'autres patients avec une atteinte du lobe temporal médian ont également vu leurs souvenirs autobiographiques anciens préservés, comme le montrent des études neuropsychologiques et des études en IRMf couplées à des questionnaires (Rempel-Clower et coll., 1996 ; Bayley et coll., 2003 ; Kirwan et coll., 2008). Les patients E.P. et K.C., souffrant de lésions massives du lobe temporal médian, sont d'un grand intérêt puisqu'ils peuvent parfaitement décrire comment naviguer d'un point à l'autre dans l'environnement dans lequel ils ont grandi (y compris utiliser des stratégies allocentriques si une route particulière est barrée), mais E.P. en est incapable lorsqu'il s'agit de son environnement actuel (Teng et Squire, 1999 ; Rosenbaum et coll., 2000). Il est également intéressant de voir que des patients souffrant de Mild Cognitive

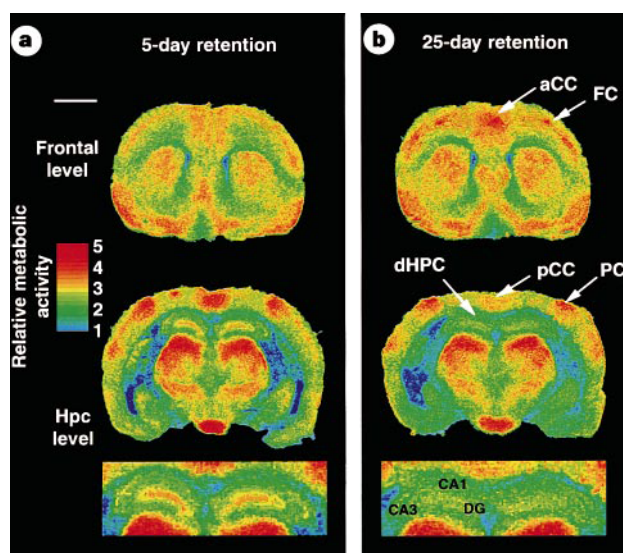
Impairment (MCI) présentent une détérioration des souvenirs récents alors que leurs souvenirs anciens sont intacts, et que les patients souffrant de la Maladie d'Alzheimer présentent une détérioration globale de la mémoire épisodique et sémantique, mais là aussi leurs souvenirs anciens sont mieux préservés que leurs souvenirs récents (Leyhe et coll., 2009). Ceci semble confirmer que la détérioration mnésique chez ces patients commence avec la détérioration de l'hippocampe. Par ailleurs, des études neuropsychologiques ou en IRMf se focalisant sur la mémoire sémantique ont montré que les souvenirs sémantiques anciens de patients amnésiques étaient préservés, contrairement aux souvenirs récents. De plus, l'activité du lobe temporal médian lors de la récupération de ces souvenirs chez des sujets sains diminuait avec le temps, contrairement à l'activité dans les lobes frontaux qui augmentait (Haist et coll., 2001 ; Douville et coll., 2005 ; Steinvorth et coll., 2005 ; Smith et Squire, 2009). Ceci semble indiquer que l'hippocampe aurait un rôle temporaire, au moins en ce qui concerne les souvenirs de nature sémantique. Pour en revenir aux souvenirs épisodiques, certaines données semblent montrer chez les sujets sains une plus grande activation de l'hippocampe lors du rappel de souvenirs récents par rapport à celui de souvenirs anciens (Niki et Luo, 2002 ; Piefke et coll., 2003). Cependant, à ce jour, une seule étude sur des souvenirs épisodiques a montré en IRMf chez des sujets sains un désengagement de l'hippocampe avec le temps avec en parallèle une augmentation de l'activité dans le cortex préfrontal, dans une tâche de reconnaissance d'items vus au laboratoire (Takashima et coll., 2006 ; Figure 14A et B). Le groupe de Takashima est d'ailleurs récemment allé plus loin, en montrant dès 24h, dans une tâche d'association entre un visage et un lieu, une diminution d'activité des connexions hippocampo-néocorticales accompagnée d'une augmentation de l'activité des connexions cortico-corticales, appuyant ainsi la Théorie Standard de la Consolidation (Takashima et coll., 2009).



**Figure 14** : Résultats d'IRMf montrant une augmentation de l'activité dans le cortex préfrontal ventromédian (A) et une diminution de l'activité dans l'hippocampe au cours du temps (B ; Takashima et coll., 2006).

2.4.2 Données sur les rongeurs

De nombreuses études sur les rongeurs employant des techniques et des tâches différentes se sont accumulées depuis les années '90, en espérant recréer chez ces animaux une amnésie rétrograde temporellement graduée. En effet, la plupart des études chez l'Homme évaluent la mémoire autobiographique des sujets dans une tâche qui est donc rétrospective, et sur laquelle les expérimentateurs n'ont pas vraiment de contrôle, sans parler une fois de plus de l'hétérogénéité des lésions des patients amnésiques. Winocur (1990) est le premier à avoir modélisé avec succès une amnésie rétrograde temporellement graduée chez le Rat, en utilisant des lésions de l'hippocampe effectuées plus ou moins récemment après l'apprentissage. Depuis, plusieurs études réalisant des lésions de l'hippocampe chez le Rat ou la Souris ont observé une atteinte des souvenirs récents et pas des souvenirs anciens, que ce soit dans des tâches de conditionnement (Kim et Fanselow, 1992 ; Anagostaras et coll., 1999), de transmission sociale de préférence de nourriture (Winocur et coll., 2001 ; Ross et Eichenbaum, 2006), ou de discrimination de contexte (Wang et coll., 2009). En ce qui concerne les tâches de nature spatiale, l'étude la plus influente est celle de Bontempi et coll. (1999). Ces auteurs ont utilisé une technique d'imagerie au 2-désoxyglucose qui permet de mesurer la consommation cérébrale locale de glucose, elle-même couplée à l'activité fonctionnelle cérébrale (Sokoloff et coll., 1977 ; Sokoloff, 1981).



**Figure 15** : La technique d'imagerie au 2-désoxyglucose montre une diminution de l'activité de l'hippocampe dorsal (dHPC), ainsi qu'une augmentation de l'activité dans le cortex cingulaire antérieur (aCC) à 25 jours (b) par rapport à 5 jours (a). Illustration de Bontempi et coll., 1999.

Les souris ayant appris une tâche dans un labyrinthe radial ont montré, lorsqu'elles étaient testées 5 ou 25 jours après la fin de l'acquisition, une diminution de l'activité métabolique de l'hippocampe avec le temps, et en parallèle une augmentation de l'activité métabolique de plusieurs aires néocorticales, notamment du cortex préfrontal médian (Figure 15), confirmant ainsi la Théorie Standard de la Consolidation.

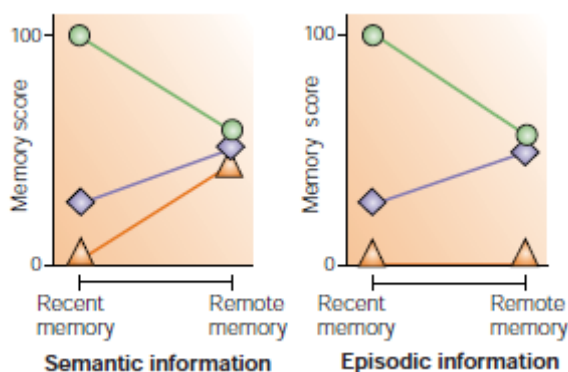
Depuis, d'autres méthodes telles que l'inactivation fonctionnelle réversible ou l'imagerie cellulaire (utilisant la visualisation de l'expression de gènes précoces tels que *c-fos*, *zif268*, ou *Arc* comme marqueurs d'activité neuronale) ont été utilisées pour tenter de répliquer ces résultats. Certaines études se sont focalisées uniquement sur l'hippocampe et ont montré une diminution de l'expression de certains marqueurs d'activité dans CA1 avec le temps (Hall et coll., 2001 ; Gusev et coll., 2005) ; d'autres se sont focalisées uniquement sur le cortex préfrontal médian (mPFC) dans des tâches de conditionnement et ont montré son implication dans la récupération d'un souvenir ancien (Blum et coll., 2006 ; Ding et coll., 2008). La plupart se sont néanmoins intéressées conjointement à l'hippocampe et au mPFC pour tenter de répliquer les résultats de Bontempi et coll. (1999) dans d'autres tâches ou avec d'autres techniques. Ainsi, ce fut le cas dans des tâches de conditionnement de peur ou de labyrinthe radial chez la Souris, où des données d'imagerie cellulaire couplée à des inactivations réversibles montrent bien un désengagement de l'hippocampe avec le temps au profit du mPFC, et plus particulièrement du cortex cingulaire antérieur (Frankland et coll., 2004 ; Maviel et coll., 2004). Chez le Rat, une étude de conditionnement a également montré ce profil après des lésions de l'hippocampe ou du mPFC (Takehara et coll., 2003). Des données récentes et très intéressantes ont montré, dans une tâche de la piscine de Morris chez le Rat, qu'une toxine (Ara-C) affectant les souvenirs anciens et non récents causait une réduction du nombre de dendrites et de leur densité dans le cortex cingulaire antérieur (ACC ; Li et coll., 2008). De même, une étude de conditionnement de peur chez la Souris a montré une diminution de la densité d'épines dendritiques dans CA1 avec le temps, avec en parallèle une augmentation dans l'ACC (Restivo et coll., 2009). Ces résultats montrent pour la première fois que la réorganisation au niveau des systèmes s'accompagne de changements au niveau des connexions au sein même des réseaux de neurones.



### 3. Théorie des Traces Multiples

#### 3.1 Définition

En 1997, Nadel et Moscovitch proposent une théorie alternative, la Théorie des Traces Multiples. En effet, selon eux, l'hippocampe est toujours nécessaire au maintien et à la récupération des souvenirs. Après chaque réactivation du souvenir, ce dernier serait ré-encodé et une trace supplémentaire serait créée dans l'hippocampe. Un souvenir ancien aurait donc plus de chance d'être récupéré, et donc d'être épargné lors d'une amnésie rétrograde, puisqu'il y aurait davantage de traces, d'où l'amnésie rétrograde temporellement graduée. Par ailleurs, alors que la Théorie Standard de la Consolidation s'étend globalement à la mémoire déclarative, la Théorie des Traces Multiples fait une distinction entre la mémoire épisodique et la mémoire sémantique (Figure 16). Pour la première, l'hippocampe a un rôle permanent dans la récupération des souvenirs, puisqu'ils sont riches en détails contextuels. En revanche, pour la mémoire sémantique, un souvenir perdrait en richesse contextuelle avec le temps et deviendrait plus général ou schématique (Nadel et Moscovitch, 1997 ; Moscovitch et coll., 2006). A ce moment là, le souvenir deviendrait dépendant du néocortex.

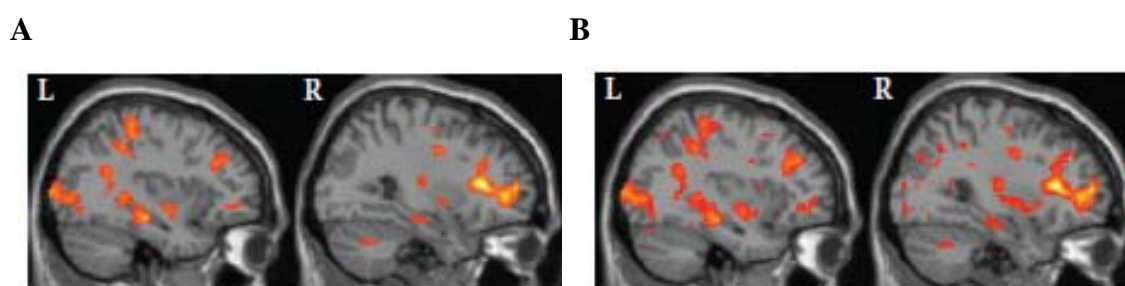


**Figure 16** : Prédiction de la Théorie des Traces Multiples pour des souvenirs sémantiques (gauche) et épisodiques (droite ; schéma de Frankland et Bontempi, 2005). L'hippocampe joue un rôle transitoire pour les souvenirs de nature sémantique, et un rôle permanent pour les souvenirs de nature épisodique. Les ronds représentent les sujets témoins avec un hippocampe intact, les triangles une lésion complète de l'hippocampe, et les losanges une lésion partielle de l'hippocampe.

#### 3.2 Données obtenues chez l'Homme

Peu d'études en IRMf ont pu montrer un désengagement de l'hippocampe avec le temps. Au contraire, la plupart des études chez l'Homme montrent qu'il n'y a aucun changement dans l'activité de l'hippocampe avec le temps lors de la récupération de souvenirs

autobiographiques, qu'ils soient récents ou anciens (Figure 17 ; Maguire et coll., 2001 ; Ryan et coll., 2001 ; Nadel et coll., 2007 ; Viard et coll., 2007 ; Viard et coll., 2009). Dans un cas, il y avait même une augmentation de l'activité de l'hippocampe avec le temps (Piolino et coll., 2004). Par ailleurs, les rares études étant focalisées sur le néocortex n'ont pu constater une augmentation de l'activité des aires néocorticales. En effet, la récupération de souvenirs autobiographiques a sollicité le néocortex de façon équivalente pour un souvenir récent ou ancien, ou, à l'opposé de ce qui est prédit par la Théorie Standard de la Consolidation, une diminution d'activité a été constatée pour certaines zones néocorticales (Maguire et coll., 2001 ; Woodard et coll., 2007).



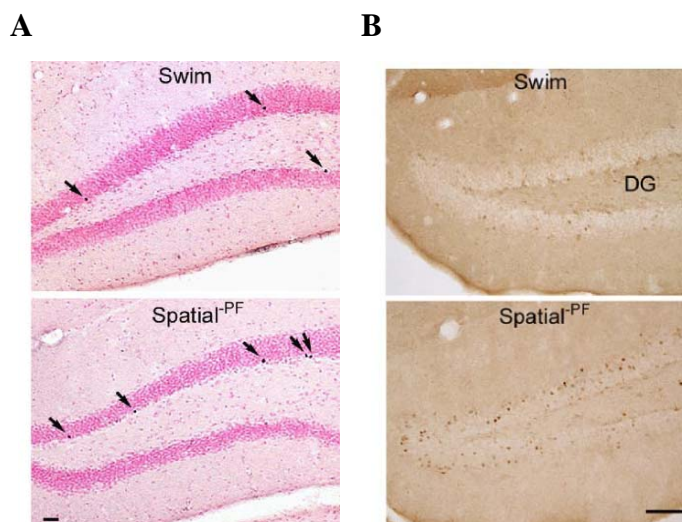
**Figure 17** : Résultats d'IRMf montrant des activations cérébrales suite au rappel de souvenirs autobiographiques récents (A) et anciens (B). Les profils d'activations sont identiques dans les deux cas (Nadel et coll., 2007).

En ce qui concerne les données obtenues chez des patients amnésiques, de nouvelles méthodologies pour évaluer les souvenirs autobiographiques anciens montrent que des patients dont on croyait les souvenirs anciens préservés présentent en fait un déficit, peu importe l'âge des souvenirs (Rosenbaum et coll., 2000 ; Moscovitch et coll., 2005 ; Steinvorh et coll., 2005 ; Gilboa et coll., 2006). C'est le cas notamment de H.M., E.P., et de K.C., dont les souvenirs anciens sont intacts lorsqu'il s'agit d'informations générales sur leur environnement ou leur voisinage, mais affectés lorsqu'il s'agit de souvenirs autobiographiques ou topographiques plus précis. Ceci conforte la Théorie des Traces Multiples selon laquelle l'hippocampe serait toujours nécessaire pour le rappel des souvenirs riches en détails. Par ailleurs, les données montrant qu'un souvenir de nature sémantique n'est plus dépendant de l'hippocampe au fil du temps ne sont pas non plus en contradiction avec cette théorie.

### 3.3 Données sur les rongeurs

La plupart des études effectuées chez les rongeurs qui étayaient la Théorie des Traces Multiples se sont focalisées sur l'hippocampe du Rat. En effet, une majorité d'entre elles ont réalisé des lésions de l'hippocampe après l'acquisition d'une tâche spatiale, le plus souvent dans la piscine de Morris (Bolhuis et coll., 1994 ; Sutherland et coll., 2001 ; Clark et coll., 2005a ; Clark et coll., 2005b ; Martin et coll., 2005) et le labyrinthe en croix (Winocur et coll., 2005a). Ces travaux ont mis en évidence une amnésie rétrograde mais non temporellement graduée. L'étude de Broadbent et coll. (2006) est particulièrement intéressante puisqu'elle était la première à avoir utilisé une technique d'inactivation réversible de l'hippocampe dorsal chez le Rat, dans la piscine de Morris. En effet, jusque-là, toutes les études utilisant cette tâche avaient été réalisées avec des lésions de l'hippocampe, dont j'ai souligné dans le chapitre précédent les limites en ce qui concerne l'extrapolation des données au fonctionnement normal de cette structure. Dans leur étude, Broadbent et coll. ont inactivé l'hippocampe dorsal quelques heures ou 30 jours après la fin de l'acquisition, et ont ainsi pu montrer que l'hippocampe était nécessaire à la récupération des souvenirs récents et anciens. Cependant, les auteurs ont utilisé une très forte dose de lidocaïne pour inactiver l'hippocampe, et il est possible que l'inactivation ait pu s'étendre à d'autres structures, biaisant ainsi les résultats.

En ce qui concerne des tâches non spatiales comme le conditionnement, la transmission sociale de préférence de nourriture, ou encore la discrimination visuelle (Lehmann et coll., 2007 ; Sutherland et coll., 2008 ; Epp et coll., 2008), des lésions de l'hippocampe à plusieurs délais post-acquisition n'ont pas non plus causé d'amnésie rétrograde temporellement graduée. En somme, dans toutes ces études sur des tâches spatiales ou non spatiales, les souvenirs anciens sont aussi affectés que les souvenirs récents suite à une lésion irréversible ou réversible de l'hippocampe dorsal, certaines études montrant également une corrélation entre la taille de la lésion et la sévérité de l'amnésie rétrograde. Récemment, des travaux très intéressants menés chez la Souris ont montré que des nouveaux neurones du gyrus denté étaient recrutés dans les réseaux hippocampo-néocorticaux impliqués dans la récupération d'un souvenir ancien dans une tâche de piscine Morris, suggérant donc que l'hippocampe reste toujours impliqué (Trouche et coll., 2009 ; Figure 18).



**Figure 18** : A) Nouvelles cellules granulaires adultes du gyrus denté chez des animaux témoins ('Swim') et des animaux dans la condition spatiale ('Spatial'), 30 jours après l'apprentissage d'une tâche de piscine de Morris. B) Marquage de la protéine Zif268 dans le gyrus denté de souris témoins ('Swim') et des souris dans la condition spatiale ('Spatial'), 30 jours après l'apprentissage (Trouche et coll., 2009).

Ceci est donc un argument supplémentaire en faveur de la Théorie des Traces Multiples. En revanche, aucune de ces expériences n'a réfuté la plus grande implication du mPFC dans le rappel des souvenirs anciens par rapport à celui des souvenirs récents. Cependant, peu d'investigations conjointes du rôle de l'hippocampe dorsal et du cortex préfrontal médian ont été réalisées.

#### 4. Théorie de Rudy

« Quand je suis là [au palais de la Mémoire], je fais comparaître tous les souvenirs que je veux. Certains s'avancent aussitôt ; d'autres après une plus longue recherche. Il faut, pour ainsi dire, les arracher à de plus obscures retraites. »

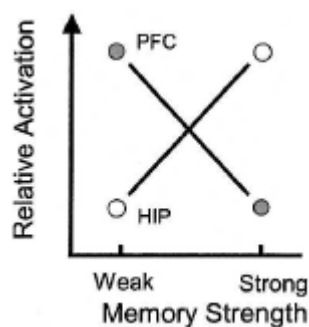
--- Saint Augustin, *Les Confessions*, Livre X, 4<sup>ème</sup> siècle

##### 4.1 Définition

Et si le rôle du cortex préfrontal médian était justement de « les arracher à de plus obscures retraites » ? En 2005, Rudy et coll. proposèrent une nouvelle interprétation des données acquises jusque là : le souvenir pourrait effectivement devenir dépendant du néocortex mais uniquement lorsqu'un effort supplémentaire est demandé pour le récupérer ; en d'autres termes, quand le souvenir est 'faible' ou dégradé (Figure 19). Le cortex préfrontal ne serait donc pas le lieu de stockage des souvenirs anciens, mais serait activé en réponse à une

difficulté d'accès à la trace mnésique n'ayant pas gagné un degré suffisant de précision ou ayant été en partie dégradée, peu importe son âge. Cette activation serait nécessaire pour 'booster' l'activité des régions comme l'hippocampe, où la trace serait stockée. Ceci pourrait expliquer les grandes disparités de résultats à la fois chez l'Homme et l'animal, l'âge et la force de la trace étant des facteurs le plus souvent confondus dans la plupart des études présentées.

En effet, chez l'Homme, certaines études ont souligné le fait que les souvenirs autobiographiques récents étaient vécus par les sujets comme plus détaillés ou plus forts que les souvenirs anciens (e.g. Ryan et coll., 2001 ; Niki et Luo, 2002 ; Piefke et coll., 2003 ; Piolino et coll., 2004). Chez les rongeurs, une partie des expériences montre chez les témoins une dégradation naturelle de la trace avec le temps (e.g. Winocur, 1990 ; Bolhuis et coll., 1994 ; Bontempi et coll., 1999 ; Clark et coll., 2005a ; Martin et coll., 2005 ; Lehmann et coll., 2007), qui reflète un oubli spontané. Une autre partie des études montre des souvenirs anciens non dégradés par rapport aux souvenirs récents (e.g. Hall et coll., 2001 ; Frankland et coll., 2004 ; Maviel et coll., 2004 ; Winocur et coll., 2005a ; Blum et coll., 2006 ; Teixeira et coll., 2006 ; Ding et coll., 2008 ; Wang et coll., 2009 ; Restivo et coll., 2009). Néanmoins, la Théorie de Rudy n'a pas été validée, très peu d'études s'étant intéressées à cette question au cours des quelques dernières années.

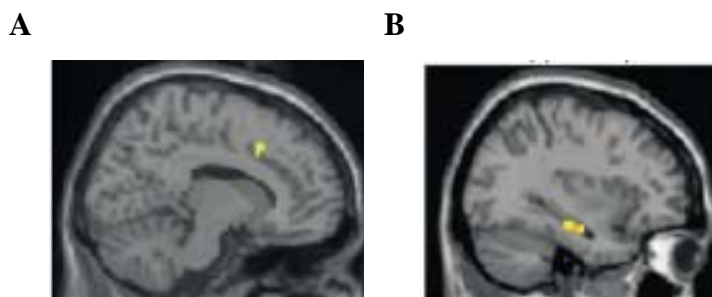


**Figure 19** : Prédications de la Théorie de Rudy (Rudy et coll., 2005). Un souvenir fort activera l'hippocampe (HIP) alors qu'un souvenir faible ou dégradé sollicitera le cortex préfrontal (PFC), indépendamment de l'âge du souvenir.

### 4.2 Données obtenues chez l'Homme et les rongeurs

La seule étude chez l'Homme s'étant particulièrement intéressée à la force du souvenir est celle de Bunge et coll. (2004), réalisée avant que Rudy et coll. ne proposent leur théorie alternative. Dans cette expérience en IRMf, les auteurs ont fait varier le nombre d'essais pour moduler la force des associations des stimuli visuels présentés. Lors du rappel, le cortex

cingulaire antérieur était plus activé pour les essais dont la force des associations était ‘faible’ que lorsqu’elle était ‘forte’ (Figure 20). De plus, une plus grande activité dans le cortex cingulaire antérieur (ACC) était corrélée à une plus faible activité dans l’hippocampe, étayant donc la Théorie de Rudy.



**Figure 20** : L’IRMf montre que le cortex cingulaire antérieur (A) était plus activé lors de la récupération d’associations faibles par rapport à celle d’associations fortes. L’hippocampe (B) était plus activé lors de la récupération d’associations fortes (Bunge et coll., 2004).

Chez les rongeurs, en revanche, aucune étude testant directement cette théorie n’a été publiée à ce jour. Cependant, il a été démontré que la force de la trace a un impact sur certains processus comme la reconsolidation (e.g. Suzuki et coll., 2004). Il en est donc peut être de même pour la consolidation systémique ou pour l’oubli spontané. Par ailleurs, des études ont montré que la dégradation de la trace pouvait se manifester par une généralisation de l’information, qui pourrait s’apparenter à une ‘sémantisation’, cette dernière impliquant des structures néocorticales (Riccio et coll., 1992 ; Biendekapp et Rudy, 2007 ; Winocur et coll., 2007). Dans ces études, les animaux apprennent une tâche dans un contexte précis, puis un test de rétention est effectué dans le même contexte ou dans un contexte différent. Alors que le niveau de performance ne semble pas se dégrader avec le temps dans le contexte d’apprentissage, les résultats dans le deuxième contexte montrent que les animaux ont généralisé l’information ; autrement dit, ils répondent au nouveau contexte comme ils le font par rapport au contexte d’apprentissage. Une pré-exposition au contexte d’apprentissage, rendant le souvenir plus fort, empêche ce processus de généralisation. Il semble donc important d’avoir plusieurs paramètres pour évaluer le degré de dégradation de la trace et ainsi avoir une interprétation plus juste des données. Sans cela, il est impossible d’évaluer l’impact précis de l’âge ou de la force de la trace dans la récupération des souvenirs. Par ailleurs, une étude a récemment montré que le mPFC était impliqué lors de la récupération d’un souvenir de nature spatiale lorsque les indices n’étaient que partiellement présents (Jo et coll., 2007). En effet, lors du test de rétention, suite à un apprentissage dans la piscine de

Morris avec un certain nombre d'indices distaux, les auteurs ont enlevé tous les indices de la pièce à l'exception d'un. La lésion du mPFC n'avait aucun effet sur la performance des rats lorsque tous les indices étaient présents. En revanche, la performance était nettement diminuée lorsque la majorité des indices avaient été enlevés. Par ailleurs, chez des rats non opérés, les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de la protéine c-Fos dans le mPFC uniquement lors de cette dernière situation. Cet appauvrissement du contexte au moment du rappel pourrait être assimilé à une dégradation de la trace mnésique, ce qui expliquerait la plus grande participation du mPFC dans cette situation, et serait donc en accord avec la Théorie de Rudy.

En conclusion, alors que certaines données sont clairement en faveur de la Théorie Standard de la Consolidation, d'autres sont plutôt en faveur de la Théorie des Traces Multiples. Il apparaît donc à l'heure actuelle que les choses demeurent quelque peu confuses en ce qui concerne la consolidation systémique. Par ailleurs, la Théorie de Rudy n'a pas encore été clairement évaluée à ce jour. C'est pour essayer de clarifier cette situation que nous avons choisi de travailler sur le Rat dans la tâche de la piscine de Morris en combinant plusieurs techniques d'investigation, dans l'optique de mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle d'un souvenir à caractère spatial.





# Matériel et Méthodes



## Matériel et Méthodes

### 1. Sujets

Toutes les études effectuées au cours de cette thèse ont été réalisées sur des rats mâles de souche Long Evans (Figure 21; provenance centre d'élevage R. Janvier, France) âgés de trois mois (pesant 250-300g) à leur arrivée au laboratoire. Cette souche de rats est très souvent utilisée dans des tâches de mémoire spatiale, et en particulier dans la piscine de Morris, du fait de leurs bonnes capacités cognitives et visuelles (D'Hooge et coll., 2001; Paul et coll., 2009).



**Figure 21** : Photo d'un rat de souche Long Evans ([www.life.illinois.edu](http://www.life.illinois.edu)).

A leur arrivée au laboratoire, les rats étaient placés dans des cages transparentes individuelles en Makrolon (46 x 26 x 15 cm). Une semaine plus tard, les rats étaient manipulés 1 min par jour pendant 5 jours pour se familiariser avec l'expérimentateur et la manipulation. Les pièces de stabulation et les salles de piscine de Morris étaient maintenues à température ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) et humidité ( $50\% \pm 10\%$ ) constantes, avec un cycle lumineux de 12h : 12h (période éclairée 7h-19h), et une ambiance sonore entretenue par une radio FM pendant la journée. Les rats disposaient d'eau et de nourriture *ad libitum* ; ils étaient testés pendant la phase diurne.

### 2. Piscines de Morris

Deux salles de piscine ont été utilisées au cours de cette thèse. Les dimensions et caractéristiques de la piscine sont identiques dans les deux pièces (160 cm de diamètre, 60 cm de hauteur), et l'eau ( $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) était opacifiée par l'ajout de lait en poudre. La salle dite 'standard' (Figure 22A) comprenait des indices distaux classiques (racs, tables, chaises, formes géométriques sur les murs), et les données ont été recueillies par le logiciel Noldus

(Ethovision) connecté à une caméra placée au dessus de la piscine. Cette pièce a été utilisée pour les Publications 2, 3 et 4. La deuxième salle a subi une transformation au cours de ma 1<sup>ère</sup> année de thèse. Avant les travaux, cette pièce était pauvre en indices distaux, d'où la dénomination 'Cue-Impoverished Context' ou CIC. Elle n'a été utilisée que dans la Publication 1. Après transformation, cette pièce était pourvue d'indices distaux très contrastés, dont plusieurs au plafond, d'où la nouvelle appellation 'Cue-Enriched Context' ou CEC (Figure 22B). C'est le logiciel Smart (Panlab) qui a recueilli les données. Cette salle restaurée a été utilisée dans les Publications 1, 2 et 3.

**A**



**B**



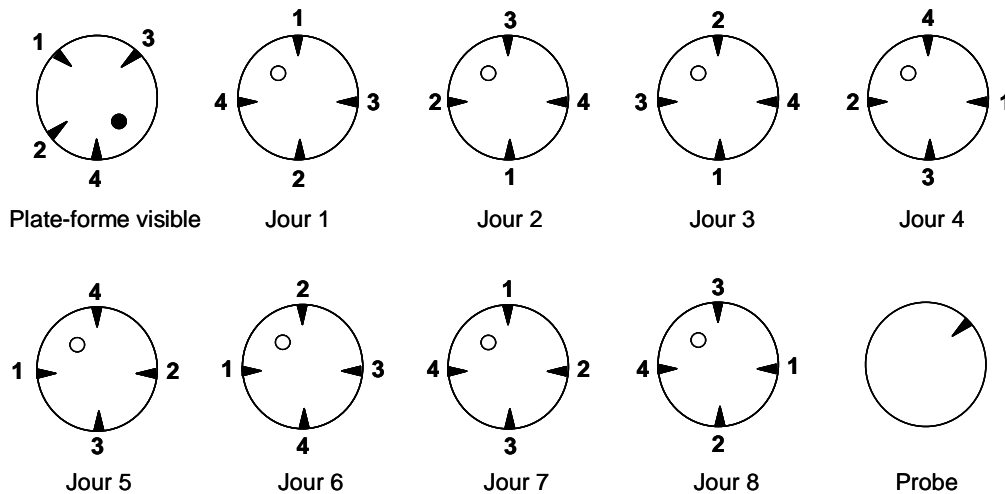
**Figure 22:** A) Photo du contexte 'standard'. B) Photo du 'Cue-Enriched Context'.

Le protocole utilisé était le même dans toutes les expériences présentées. Il consistait en 1 jour d'entraînement constitué de 4 essais consécutifs avec une plate-forme visible, afin d'habituer l'animal à monter sur une plate-forme dans la piscine. Les rats étaient ensuite entraînés pendant 6 ou 8 jours d'acquisition avec une plate-forme invisible, à raison de 4 essais par jour. Le nombre de jours était augmenté pour les animaux ayant subi une intervention chirurgicale (Publications 3 et 4), leur performance de rétention se dégradant plus rapidement avec le temps, surtout chez les rats implantés avec une canule dans l'hippocampe dorsal (observations personnelles).

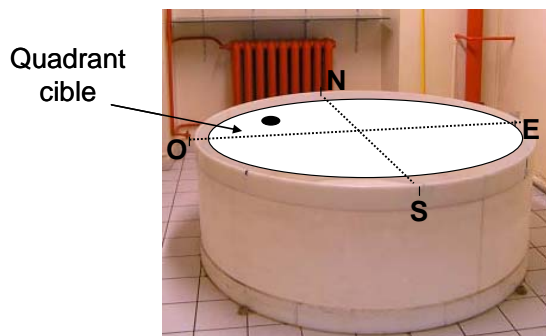
Pour ces essais d'acquisition, le rat était placé dans la piscine à un point de départ différent pour chaque essai, face à la paroi, et disposait de 60 sec pour trouver la plate-forme (voir le protocole, Figure 23A). Si l'animal ne trouvait pas la plate-forme lorsque le temps était écoulé, il était guidé vers la plate-forme par l'expérimentateur. Les rats restaient 10 sec sur la plate-forme avant que l'expérimentateur ne lance l'essai suivant. La distance parcourue

jusqu'à la plate-forme était utilisée comme paramètre de mesure pendant l'acquisition. La rétention était ensuite évaluée 5 ou 25 jours après la fin de l'acquisition, délais identiques à ceux utilisés dans l'étude de Bontempi et coll. (1999) chez la Souris. Pour cela, un test de rétention ('*probe trial*') de 60 sec, pour lequel la plate-forme était retirée de la piscine, était réalisé.

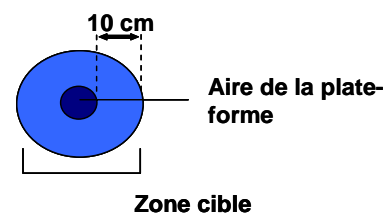
A



B



C



**Figure 23 :** A) Protocole de mémoire de référence utilisé au cours de la thèse, pour 6 ou 8 jours d'acquisition. Le cercle noir représente la plate-forme visible, et le cercle blanc la plate-forme invisible. Les triangles noirs représentent les points de départ des rats. B) Piscine divisée en quatre quadrants virtuels, dont le quadrant cible où se trouve la plate-forme pendant l'acquisition. C) Zone virtuelle (zone cible ou '*Target area*') correspondant à l'aire de la plate-forme ('*Platform area*') élargie d'un anneau de 10 cm.

Le temps passé dans chacun des quatre quadrants virtuels (Figure 23B) était alors utilisé pour calculer le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible ou l'indice de rétention ('*Accuracy Ratio*'). Ce dernier correspond au rapport entre le triple du temps passé dans le

quadrant cible divisé par la somme du temps passé dans les 3 autres quadrants. Un indice de 1 reflète une performance équivalente au hasard. Ceci permet d'avoir une seule valeur indiquant la préférence du rat pour le quadrant cible par rapport aux autres quadrants. Le nombre de passages effectués dans une zone virtuelle de 10 cm centrée autour de la plate-forme (zone cible ou '*Target area*' ; Figure 23C), ainsi que la distance parcourue dans cette zone cible ont été utilisés comme indices de précision du souvenir et de persévérance, respectivement.

### 3. Inactivations fonctionnelles réversibles

#### 3.1 Mise au point des inactivations

##### 3.1.1 Choix de la technique et de la lidocaïne

Comme cela est expliqué dans l'introduction, les inactivations réversibles présentent certains avantages par rapport aux lésions. En effet, le caractère réversible des inactivations permet, par exemple, d'éviter toute mise en place de circuits de compensation. Il permet également d'agir sur une étape particulière du processus mnésique (encodage, consolidation, rappel) et donc d'étudier la nécessité fonctionnelle d'une région lors de l'étape du processus qui nous intéresse. C'est pour ces raisons que nous avons choisi de réaliser des inactivations de l'hippocampe dorsal et du mPFC plutôt que des lésions. Il existe deux types d'inactivations : pharmacologiques et cryogéniques. La plupart des études actuelles utilisent des inactivations pharmacologiques, les techniques cryogéniques étant surtout utilisées pour des structures de surface (Lomber, 1999 ; Martin et Ghez, 1999) ; nous avons donc choisi de réaliser une inactivation pharmacologique. Le choix de la drogue utilisée pour inactiver ces structures est essentiel, puisque l'étendue et la durée de l'inactivation varient en fonction de la substance utilisée. Ainsi, les anesthésiques locaux tels que la lidocaïne ou la tétrodotoxine (TTX), bloquent les canaux Na<sup>+</sup> et donc les potentiels d'action, à la fois dans les corps cellulaires et les fibres de passage (Lomber, 1999 ; Malpeli, 1999). Le muscimol, agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, est plus sélectif, provoquant une hyperpolarisation des neurones aboutissant à l'inactivation, et agissant uniquement sur les corps cellulaires. D'autre part, alors que la lidocaïne a une durée d'action relativement courte (15-60 min), les effets de la TTX et du muscimol peuvent durer jusqu'à 24h, selon le volume et la vitesse d'injection (Lomber, 1999 ; Malpeli, 1999 ; Martin et Ghez, 1999 ; Boehnke et Rasmusson, 2001). Dans une étude précédente du laboratoire (Pereira de Vasconcelos et coll., 2006 ; voir l'Annexe), nous avons comparé les effets de l'inactivation de l'hippocampe dorsal avec de la lidocaïne ou de la TTX

dans une tâche sensorimotrice, en vérifiant l'étendue des inactivations par une technique d'imagerie au 2-désoxyglucose. La lidocaïne avait pour avantages d'avoir des effets métaboliques limités à l'hippocampe dorsal et de ne pas affecter les capacités sensorimotrices de l'animal. Ceci contrastait avec la TTX, qui non seulement provoquait des déficits de coordination motrice, mais avait une action très étendue, réduisant le métabolisme du glucose jusqu'au côté controlatéral à l'injection, et affectant de manière importante le cortex adjacent et le thalamus du côté ipsilatéral. Nous avons donc décidé d'utiliser la lidocaïne dans cette thèse.

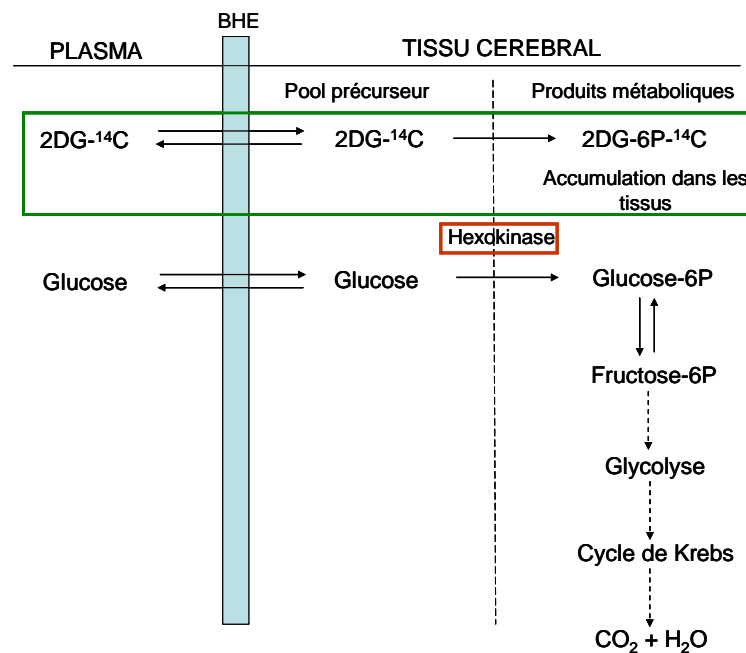
### 3.1.2 Validation avec l'imagerie au 2-désoxyglucose

Dans un premier temps, nous avons validé les coordonnées stéréotaxiques pour implanter des canules guides dans l'hippocampe dorsal et le mPFC, en utilisant du bleu de méthylène. Puis, nous avons validé la dose de lidocaïne à utiliser pour inactiver ces structures. Nous avons montré précédemment qu'une dose de 10 µg/µl dans l'hippocampe dorsal permettait d'obtenir une diminution du métabolisme du glucose d'environ 20% au niveau du site d'injection, sans affecter le métabolisme des régions voisines. Cette dose était, par ailleurs, suffisante pour induire un déficit de performance au moment du rappel dans la piscine de Morris (Pereira de Vasconcelos et coll., 2006 ; voir l'Annexe). Cependant, nous avons décidé de tester des doses plus élevées (20 et 40 µg/µl), également couramment utilisées dans la littérature (Maviel et coll., 2004 ; Frankland et coll., 2004 ; Teixeira et coll., 2006), et susceptibles de permettre d'obtenir une inactivation de plus forte intensité. De plus, nous avons évalué l'étendue de l'inactivation non seulement au niveau de l'hippocampe dorsal, mais également du mPFC, par l'imagerie au 2-désoxyglucose (2DG ; Publication 3). En effet, dans la plupart des études, les inactivations réversibles sont réalisées sans pour autant vérifier l'étendue spatiale et/ou temporelle des effets fonctionnels des inactivations, qui, si ils sont insuffisants ou s'ils s'étendent à d'autres structures, peuvent biaiser les résultats comportementaux ou en fausser l'interprétation.

La technique d'imagerie fonctionnelle au 2-désoxyglucose permet de mesurer la consommation cérébrale locale de glucose, et donc l'activité fonctionnelle cérébrale (Sokoloff et coll., 1977 ; Sokoloff, 1981). Cette technique repose sur le fait que le glucose est le seul substrat du métabolisme énergétique cérébral chez l'adulte ; ainsi, toute modification du métabolisme énergétique se traduit par une modification de l'utilisation de glucose, et réciproquement. Néanmoins, le glucose marqué au <sup>14</sup>C ne peut pas être utilisé pour quantifier l'utilisation locale de glucose, car il est converti trop rapidement en CO<sub>2</sub> (Figure 24). Le 2-

désoxyglucose (2DG), en revanche, est un analogue structural du glucose qui n'en diffère que par le remplacement d'un groupement hydroxyle sur le deuxième atome de carbone par un atome d'hydrogène. Ainsi, son métabolisme est identique à celui du glucose jusqu'au moment où le 2DG atteint une étape de la glycolyse où sa structure empêche son métabolisme.

Le glucose et le 2DG entrent donc en compétition pour le transporteur au niveau de la barrière hémato-encéphalique et pénètrent dans le pool de précurseur cérébral (Figure 24). A ce stade, le glucose et le 2DG entrent de nouveau en compétition pour l'hexokinase, première enzyme dans la voie métabolique du glucose, phosphorylant le glucose en glucose-6-phosphate (G-6P), et le 2DG en 2DG-6-phosphate (2DG-6P). Alors que le G-6P poursuit son métabolisme en étant converti par la phosphohexose-isomérase en fructose-6-phosphate, le 2DG-6P ne peut pas être isomérisé en raison de sa différence structurale et se retrouve donc piégé dans le tissu cérébral. En utilisant du 2DG marqué au  $^{14}\text{C}$ , on peut ainsi évaluer la quantité de 2DG-6P- $^{14}\text{C}$  qui varie en fonction du métabolisme des régions cérébrales étudiées.



**Figure 24** : Métabolisme du glucose et du 2-DG marqué au  $^{14}\text{C}$ . 6P = 6-phosphate ; BHE = Barrière hémato-encéphalique.

En effet, les connaissances sur les propriétés biochimiques du glucose et du 2DG ont permis de créer un modèle théorique basé sur 3 compartiments (Figure 24) : 1) le compartiment plasmatique, où le glucose et le 2-DG marqué au  $^{14}\text{C}$  (2DG- $^{14}\text{C}$ ) sont présents ; leur concentration peut être déterminée par des prélèvements sanguins, 2) le compartiment



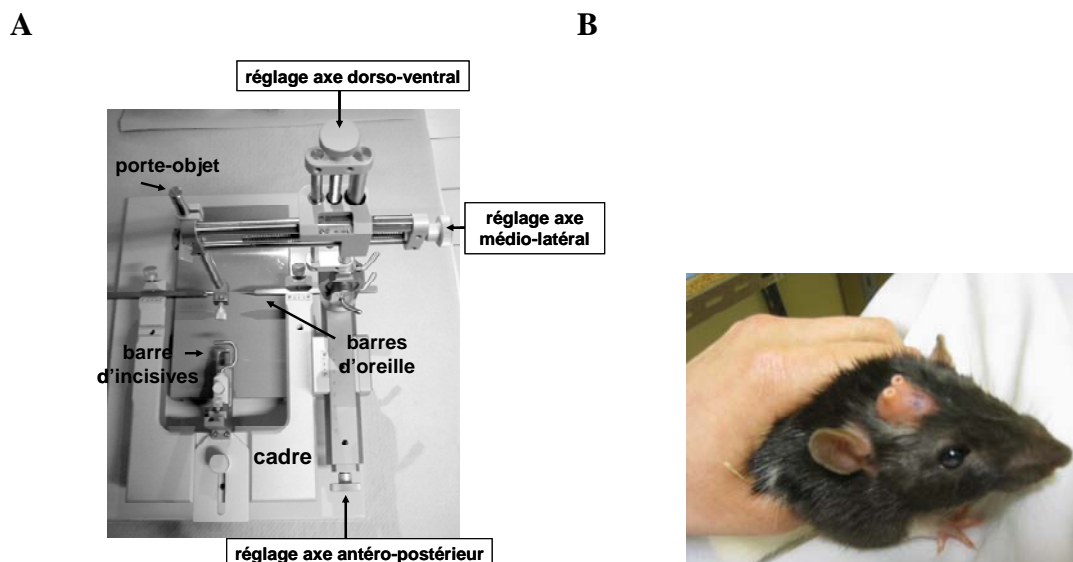
cérébral des précurseurs, qui s'équilibre avec le compartiment plasmatique peu après l'injection de 2DG-<sup>14</sup>C, et 3) le compartiment des produits métaboliques, où est piégé le 2DG-6P-<sup>14</sup>C. La quantification de l'utilisation cérébrale locale de glucose avec ce modèle dépend alors de plusieurs hypothèses :

- Le débit sanguin cérébral, le taux de transport du glucose et du 2DG-<sup>14</sup>C entre le plasma et le tissu cérébral, et les concentrations de 2DG-<sup>14</sup>C, glucose, glucose-6P et 2DG-6P-<sup>14</sup>C doivent être homogènes dans une région cérébrale spécifique.
- Le 2DG-<sup>14</sup>C et le 2DG-6P-<sup>14</sup>C doivent être présents à l'état de traces, c'est-à-dire que leurs concentrations dans le sang et/ou les tissus doivent être quantitativement négligeables et pharmacologiquement inactives.
- Le métabolisme glucidique doit être stable : la concentration plasmatique de glucose, le taux d'utilisation cérébrale locale de glucose et les concentrations des intermédiaires de la voie de la glycolyse doivent être constants tout au long de l'expérience.
- Les concentrations de 2DG-<sup>14</sup>C et du glucose dans les capillaires plasmatiques doivent être à peu près égales à leur concentration artérielle.

Cependant, la quantification de l'utilisation cérébrale locale de glucose selon l'équation opérationnelle de la méthode (Sokoloff et coll., 1977) nécessite plusieurs prélèvements sanguins artériels tout au long de la durée de l'expérience, soit 45 min, afin de mesurer les concentrations plasmatiques de traceur radioactif et de glucose. Ceci étant incompatible avec nos conditions expérimentales, les animaux étant placés dans un champ ouvert afin de se déplacer librement, nous avons utilisé une approche semi-quantitative. Ainsi, nous avons, à partir de la teneur en <sup>14</sup>C plasmatique et de la glycémie mesurées sur le sang récupéré à 45 min au moment du sacrifice, rapporté les concentrations tissulaires en <sup>14</sup>C à une activité spécifique plasmatique de 10<sup>5</sup> dpm/μmol. Pour réduire les variations de marquage radioactif tissulaire qui ne seraient pas liées aux conditions expérimentales, comme la dose de lidocaïne ou la structure, la concentration absolue de <sup>14</sup>C de chaque aire cérébrale d'intérêt a été divisée par la radioactivité mesurée dans le genou du corps calleux de chaque rat. Cette approche semi-quantitative est considérée comme une mesure relative de l'activité métabolique et a été validée dans de nombreuses situations (e.g. Bontempi et coll., 1999 ; Miyamoto et coll., 2000 ; voir également Duncan et Stumpf, 1991, pour une revue). Le protocole détaillé de cette technique se trouve dans la Publication 3.

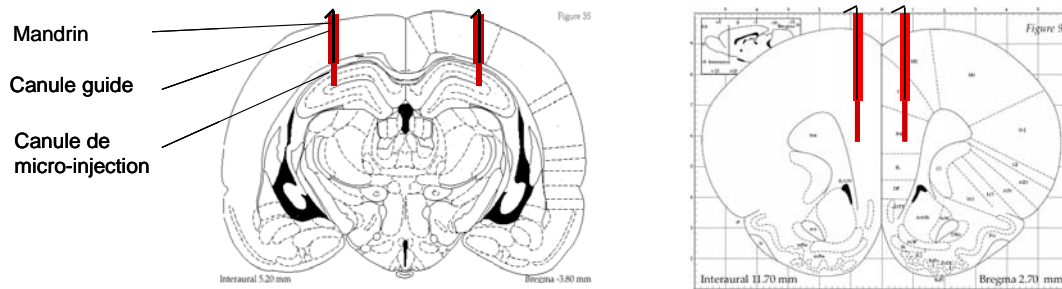
### 3.2 Protocole des implantations de canules

Afin d'injecter la lidocaïne directement dans l'hippocampe dorsal ou le mPFC, nous avons implanté des canules guides de façon bilatérale au niveau de ces structures (Publication 3). Les rats étaient anesthésiés avec un mélange de kétamine (6,38 mg/kg, Rompun, 2%) et de xylazine (0,85 mg/kg, Imalgène 500) par injection intra-péritonéale. Les rats recevaient également une injection intra-musculaire d'antibiotique (Benzylpenicillin 0,3ml/rat). L'animal était ensuite placé dans un cadre stéréotaxique (Figure 25A), et recevait une injection intracutanée de xylocaïne (0.1 ml/rat) au niveau du scalp. Après incision du scalp et perforation de la boîte crânienne à l'aide d'une fraise dentaire, trois vis de maintien étaient placées dans les os du crâne. Deux canules guides (12 mm de longueur; 0,4 mm de diamètre externe; 0,28 mm de diamètre interne) étaient ensuite implantées aux coordonnées (en mm) calculées par rapport au point de référence Bregma et à la dure mère (Paxinos et Watson, 1998) : AP (antéro-postérieur) = -3,80 ; ML (médio-latéral) = +/- 2,40 ; DV (dorso-ventral) = -2,20 pour les animaux implantés dans l'hippocampe dorsal; AP = +2,70 ; ML = +/- 0,70 ; DV = -3,20 pour les animaux implantés dans le cortex préfrontal médian. Les canules guides étaient maintenues en place par du ciment dentaire (Figure 25B). Elles étaient ensuite entourées d'un cylindre en plastique pour les protéger de chocs, et un mandrin était placé dans chaque canule pour en éviter l'obstruction (Figure 26).



**Figure 25** : A) Cadre stéréotaxique. B) Photo d'un rat avec une implantation de canules dans l'hippocampe dorsal.

Les rats étaient ensuite placés sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil, puis ils étaient ramenés dans leur cage. Les animaux bénéficiaient d'une période de récupération d'au moins 7 jours avant le début des tests comportementaux, et étaient manipulés quotidiennement afin de s'assurer de leur état de santé et de vérifier la présence des mandrins. Tout mandrin perdu était ainsi remplacé afin d'empêcher l'obstruction de la canule guide.



**Figure 26** : Schémas représentant le placement des mandrins, des canules guides, et des canules de micro-injection dans l'hippocampe dorsal (gauche) et le cortex préfrontal médian (droite), les canules de micro-injection dépassant les canules guides de 1 mm (planches de Paxinos et Watson, 1998).

### 3.3 Protocole des inactivations

#### 3.3.1 Habituation

Tout au long de l'acquisition de la tâche de piscine de Morris, la mobilité des mandrins était vérifiée, et les rats étaient habitués à la contention pendant 10 sec avant de passer en piscine. En effet, lors de l'injection précédant le test de rétention, le rat devait rester immobile pendant plusieurs minutes afin de ne pas tordre les canules d'injection. De plus, ceci est une situation de stress pour le rat, qui doit donc y être habitué. Cette habituation consistait à poser le rat sur une serviette, l'arrière-train maintenu dans la paume de la main de l'expérimentateur avec deux doigts situés sur les omoplates du rat (Figure 27). Le rat était ainsi maintenu calmement et fermement (sans trop le serrer), tout en lui laissant une certaine mobilité de la tête. Cinq jours avant le test de rétention, les rats étaient habitués à une contention de plus en plus longue. Le premier jour, le rat était ainsi maintenu pendant 30 sec. Le jour suivant, les mandrins étaient retirés des canules guides et placés dans une solution d'éthanol (70%), le rat était maintenu en contention pendant 1 min et les mandrins étaient remis en place. Les troisième et quatrième jours étaient identiques, mais avec une contention d'1 min 30 et 2 min, respectivement. La veille du test de rétention, les mandrins étaient retirés et le rat recevait une micro-injection bilatérale de PBS (Phosphate Buffer Solution) filtré (1  $\mu$ l / 90 sec) suivi de 30

sec de temps de diffusion avant de retirer les canules d'injection et remettre les mandrins. Ceci permettait à l'animal de s'habituer au dispositif des micro-injections et à toute la procédure.



**Figure 27** : Photo du dispositif d'injection avec un rat en position de contention.

### 3.3.2 Dispositif et protocole des micro-injections

Le jour du test de rétention, une micro-injection bilatérale de lidocaïne (40 mg de lidocaïne dans 1 ml de PBS filtré) ou de PBS filtré était réalisée 10 min avant le passage du rat en piscine. Ce temps a été choisi comme compromis pour minimiser le stress lié à la procédure d'injection, sans toutefois dépasser le temps d'action maximum de la lidocaïne (entre 15-60 min ; mes observations personnelles m'ont conduites à penser qu'avec nos paramètres d'injection, la durée maximale d'action était plus proche des 15 min). Les mandrins étaient retirés et des canules de micro-injection (dépassant de 1 mm les canules guides) étaient insérées dans les canules guides (Figure 27). L'autre extrémité des canules de micro-injection était reliée par un cathéter en polyéthylène à une seringue Hamilton (10  $\mu$ l), elle-même connectée à une pompe de micro-injection (CMA/100 ; Figure 27). L'ensemble du dispositif seringue-cathéter-canule était préalablement rempli d'eau ultra pure pour vérifier l'étanchéité du dispositif d'injection. Une petite bulle d'air (0,2  $\mu$ l) était ensuite intercalée entre l'eau et la substance à injecter. Ceci permettait en particulier de vérifier que l'injection se faisait correctement, la bulle d'air devant se déplacer avec l'injection. Les rats recevaient alors une micro-injection bilatérale de lidocaïne ou de PBS (1  $\mu$ l / 90 sec), suivie d'une période de diffusion de 30 sec. Les canules de micro-injection étaient ensuite retirées et les mandrins replacés avant que les rats ne soient remis dans leur cage en attendant le test en piscine.

## 4. Techniques histologiques et immunohistochimiques

### 4.1 Euthanasie des rats et prélèvement des cerveaux

A la fin des tests comportementaux (Publications 3 et 4), les rats subissaient l'injection d'une dose létale de pentobarbital sodique (150 mg/kg). Dans le cas d'un marquage de c-Fos, les rats étaient euthanasiés 90 min après le test de rétention. Une perfusion intra-cardiaque était alors réalisée avec 60 ml de paraformaldéhyde (PAF, 4%) dissous dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) à 4°C afin de fixer les tissus. Les cerveaux étaient ensuite extraits de la boîte crânienne, placés dans le même fixateur à 4°C pendant 2h, puis transférés dans une solution de saccharose (20%, 4°C). Quarante-huit heures plus tard, les cerveaux étaient congelés dans de l'isopentane à -40°C puis conservés à -80°C.

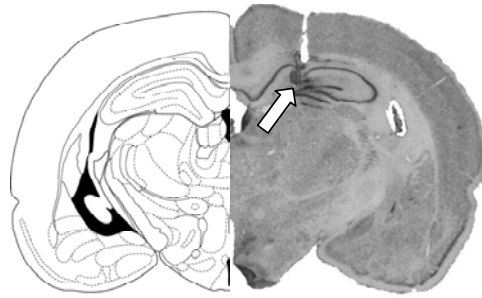
### 4.2 Coupes au cryostat

Pour les expériences d'inactivations (Publication 3), des coupes coronales de 30 µm de l'hippocampe dorsal et du cortex préfrontal médian étaient réalisées à l'aide d'un cryostat (Frigocut 2800), et récoltées sur des lames gélatinées, puis séchées à température ambiante. Ces coupes étaient destinées à une coloration au violet de Crésyl qui allait permettre de vérifier les sites d'injection.

Pour l'immunohistochimie, des coupes coronales de 50 µm étaient réalisées et récoltées dans une solution de cryoprotection, et conservées à -20°C.

### 4.3 Coloration au violet de Crésyl

Cette coloration est réalisée avec un colorant qui marque les composés acides des cellules, et en particulier les noyaux (Sirkin, 1983). Après rinçage, les lames étaient placées dans une solution constituée de violet de Crésyl (Sigma), d'eau, d'acétate de sodium et d'acide acétique, chauffée à 55°C, puis les coupes étaient rincées dans des bains d'eau ultra pure avant d'être déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 95%). Les coupes étaient ensuite décolorées dans un bain d'alcool/acide avant d'être placées à nouveau dans des bains d'alcool (95%, 100%) puis dans un bain de solvant (LMR). Pour finir, les lames étaient montées sous lamelle dans un milieu d'inclusion (Eukitt). Une fois sèches, les lames étaient observées au microscope optique pour vérifier la localisation des implantations des canules guides et des sites d'injection (Figure 28).

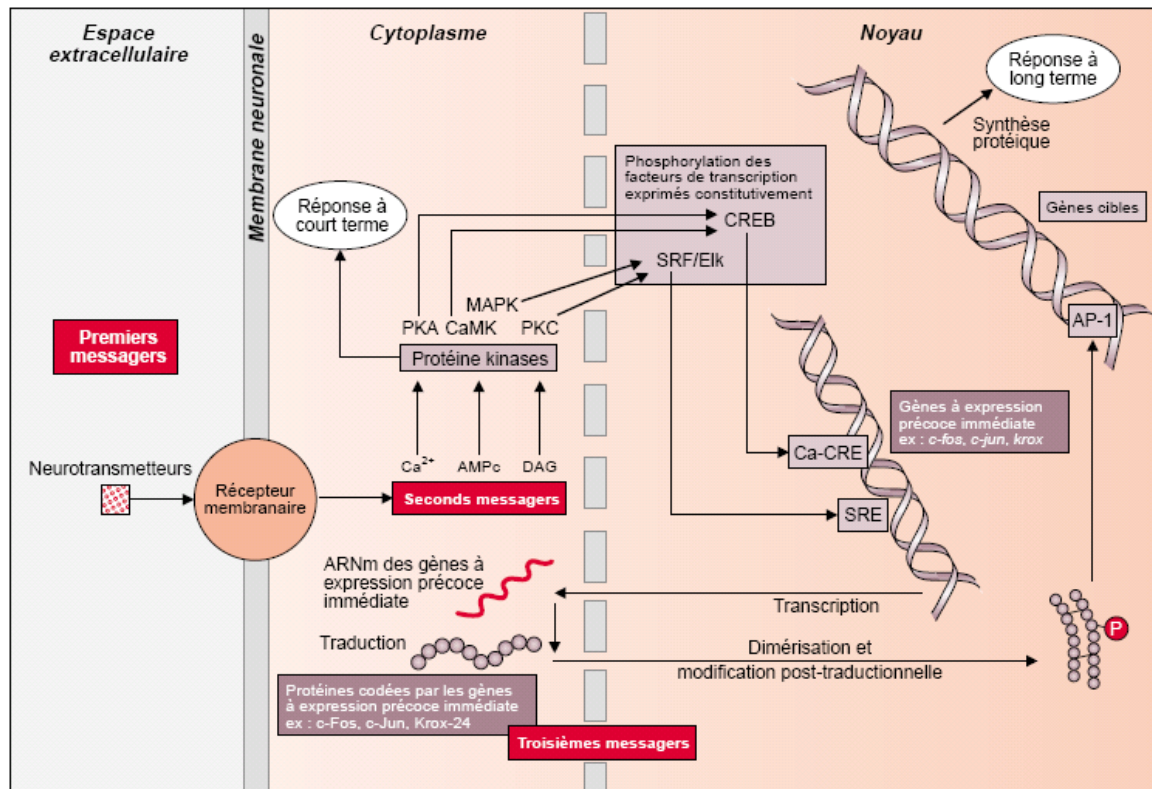


**Figure 28** : Exemple de coloration au violet de Crésyl (droite de la coupe coronale) montrant l'implantation de la canule dans l'hippocampe dorsal. La flèche blanche indique le site d'injection, au niveau de la gliose.

#### 4.4 Immunohistochimie de la protéine c-Fos

##### 4.4.1 Principe de l'utilisation de *c-fos* comme marqueur d'activité neuronale

Le gène précoce *c-fos* est souvent utilisé comme marqueur d'activité neuronal. En effet, *c-fos* est un proto-oncogène agissant comme facteur de transcription pour des gènes en aval (Hughes et Dragunow, 1995 ; Teather et coll., 2005 ; Kubik et coll., 2007). Les gènes précoces comme *c-fos* ou *zif268* sont rapidement induits suite à une stimulation cellulaire. Une activité neuronale telle qu'un potentiel d'action ou la liaison d'un neurotransmetteur sur son récepteur déclenche une cascade cellulaire impliquant des seconds messagers, comme le  $\text{Ca}^{2+}$ , et l'activation de protéines kinases. Ceci mènera à la phosphorylation de CREB (cAMP Response-Binding Protein), induisant une transcription de gènes précoces tels que *c-fos*, suivie d'une traduction des protéines correspondantes (Figure 29). Certaines études ont d'ailleurs montré l'importance de la protéine c-Fos dans la plasticité synaptique, notamment lors de la consolidation synaptique (Herrera et Roberston, 1996 ; Teather et coll., 2005 ; Kubik et coll., 2008). L'utilisation des gènes précoces permet donc de visualiser post-mortem les zones cérébrales activées pendant la tâche mnésique testée.



**Figure 29** : Mécanismes de l'expression des gènes précoces tels que *c-fos* (schéma de Buritova et Besson, 1999).

L'avantage de cette technique d'imagerie cellulaire est qu'elle ne nécessite ni chirurgie ni procédures stressantes comme les micro-injections cérébrales. D'autre part, elle permet de se focaliser sur plusieurs régions cérébrales en même temps. Nous nous intéressons initialement à la fois aux niveaux de *c-Fos* mais également à ceux de *Zif268*. En effet, le niveau basal de *c-Fos* est relativement faible, et ne permet donc pas d'observer la diminution d'activité dans une structure, contrairement à *Zif268* qui présente un niveau basal plus important (Hughes et Dragunow, 1995 ; Herrera et Robertson, 1996 ; Buritova et Besson, 1999). Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre au point le marquage de *Zif268* au cours de cette thèse, l'anticorps donnant un marquage non spécifique.

Cette technique présente cependant quelques limites. En effet, de plus en plus d'études utilisent conjointement l'imagerie cellulaire et les inactivations réversibles (e.g. Frankland et coll., 2004 ; Maviel et coll., 2004) car l'imagerie cellulaire ne permet pas en soi d'affirmer qu'une structure est nécessaire à la tâche en question, d'où l'utilisation combinée avec une technique d'inactivation réversible qui donne un aspect fonctionnel aux résultats. Par ailleurs, le désavantage majeur de l'utilisation de gènes précoces comme *c-fos* est le fait que l'activité neuronale visualisée n'est pas forcément spécifique aux processus mnésiques. En effet, le stress, le temps d'exposition aux stimuli et les processus de navigation, par exemple, peuvent



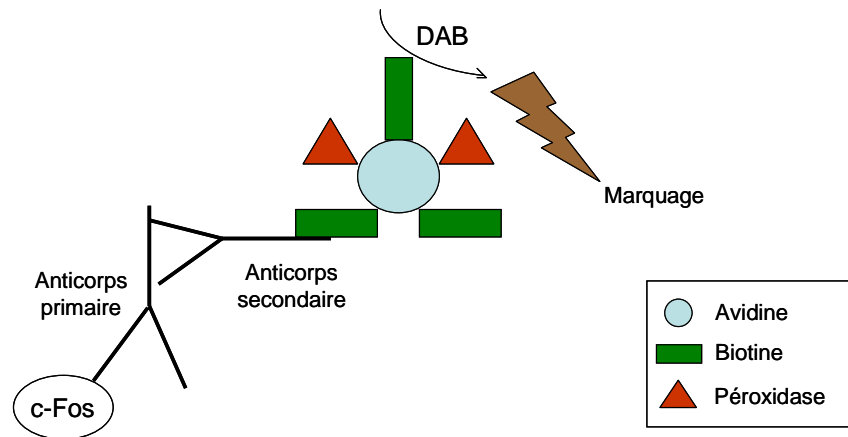
être responsables d'une augmentation de l'expression de c-Fos dans certaines régions cérébrales (Shires et Aggleton, 2008). Il est donc indispensable d'utiliser des groupes témoins appropriés, même si le groupe témoin idéal reste utopique, particulièrement en piscine de Morris. Nous avons ainsi utilisé 3 groupes témoins (voir Publication 3). Les rats 'Home Cage' étaient des rats manipulés régulièrement qui n'ont pas été testés en piscine de Morris. Ceci nous a permis d'obtenir le niveau basal de c-Fos dans nos deux contextes. Afin de contrôler l'activation due aux processus de navigation nous avons utilisé deux conditions. La condition 'Plate-forme visible' consistait à utiliser une plate-forme visible qui changeait de localisation à chaque essai, afin d'éviter tout apprentissage spatial. La condition 'Rideau' était identique à la condition 'Plate-forme visible' mais un rideau entourait la piscine afin d'empêcher tout encodage spatial 'incident'. Cette dernière situation s'est ainsi révélée être la condition la plus appropriée.

#### 4.4.2 Protocole d'immunohistochimie de c-Fos

La technique d'immunohistochimie de c-Fos existait déjà au laboratoire, mais pour des cerveaux perfusés à l'acide picrique et des coupes réalisées au vibratome. Afin d'être utilisable dans des conditions similaires pour les expériences d'inactivations et de c-Fos, nous avons donc mis au point une technique pour des cerveaux perfusés de façon 'classique' (PAF, 4%) et des coupes au cryostat. Trois coupes par structure (hippocampe dorsal, mPFC) et par rat étaient sélectionnées pour l'immunohistochimie et placées dans les puits de plaques de microtitration avec 250 µl de PBS contenant 0,02% de merthiolate. Toutes les étapes de ce protocole se sont déroulées sous agitation lente à température ambiante et à volume constant. Les coupes flottantes étaient d'abord rincées trois fois au PBS merthiolate pendant 10 min avant que les sites antigéniques aspécifiques ne soient saturés avec du sérum d'âne (Abcys, S 2170-100 ; dilué à 5% dans du PBS contenant 0,5% de Triton X-100, un diluant qui perméabilise les membranes et permet donc une meilleure pénétration des différents réactifs) pendant 1h. Les coupes étaient ensuite incubées une nuit à température ambiante avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine c-Fos (anticorps polyclonal de lapin SC-52, Santa Cruz, USA), dilué au 1/4000<sup>ème</sup> dans du PBS Triton. Le lendemain, les coupes étaient rincées trois fois au PBS merthiolate avant d'être incubées 1h avec l'anticorps secondaire (anticorps biotinylé de chèvre anti-lapin 111-065-144, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) dilué au 1/ 500<sup>ème</sup> dans du PBS Triton. Après trois nouveaux rinçages au PBS merthiolate, les coupes étaient incubées dans l'obscurité pendant 45 min avec le complexe



avidine-biotine-peroxidase (Kit 'Elite' ABC Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA) dilué au 1/500<sup>ème</sup>. Les coupes étaient ensuite rincées deux fois dans du PBS merthiolate et une fois dans du tampon TRIS (TBS 0,6%, pH 7.6), avant de révéler le marquage avec du 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Kit DAB, SK 4100, Vector Laboratories ; Figure 30).



**Figure 30** : Etapes de l'immunohistochimie de la protéine c-Fos. DAB = diaminobenzidine.

La réaction était neutralisée 6 min plus tard par du PBS merthiolate. Après trois derniers rinçages de 10 min au PBS merthiolate, les coupes étaient montées sur des lames gélatinées avant d'être séchées à l'étuve (37°C) pendant 24h. Les lames étaient alors rincées dans de l'eau ultra pure puis les coupes étaient déshydratées en les plaçant dans des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 95%, 100%). Les lames étaient ensuite placées dans le solvant LMR avant d'être montées sous lamelles dans un milieu d'inclusion (Eukitt). La quantification du nombre de cellules c-Fos-positives a été effectuée de façon semi-automatique sur le logiciel ImageJ (en utilisant un critère de seuillage de la densité de coloration des noyaux) sur la base de photos prises au microscope optique (grossissement x 40) dans les régions CA1, CA3, et le gyrus denté pour l'hippocampe dorsal, et dans le cortex cingulaire antérieur (ACC), le cortex prélimbique (PL) et le cortex infralimbique (IL) pour le mPFC.



# Résultats



---

## Publication 1 :

# Validation du protocole

Derrière cette première publication se cache l'histoire de la validation du protocole mis au point pendant les premiers mois de cette thèse. Après avoir validé un protocole de mémoire de référence dans une première salle de piscine, le contexte 'standard', j'ai utilisé, pour des raisons pratiques, une autre pièce de test, nommée par la suite CIC (Cue-Impoverished Context), m'attendant à retrouver les mêmes résultats que dans le contexte 'standard'. Or, les performances de rétention se sont révélées différentes et parfois incohérentes, par rapport à la salle 'standard'. C'est ce qui a motivé la transformation de cette pièce, rebaptisée par la suite CEC (Cue-Enriched Context). Cependant, alors que les performances de rétention observées étaient à présent cohérentes, il est apparu une différence majeure entre le CEC et la salle 'standard' : à 25 jours, la trace mnésique dans le CEC n'était pas dégradée, contrairement à ce qui était observé dans le contexte 'standard'. Nous avons exploité cette différence dans certaines des expériences présentées par la suite.

Cette publication fait donc l'objet de la comparaison des performances des rats dans le CIC et le CEC sur la base d'un protocole classique de mémoire de référence, les 2 contextes étant différents au niveau de la proéminence des indices distaux. Il est important de noter que l'effet de la proéminence des indices distaux sur la qualité de la trace mnésique est très peu répertorié dans la littérature, et n'avait jamais été exploré pour des souvenirs anciens. Pendant l'acquisition, la performance des rats est légèrement meilleure dans le CEC, même si elle devient équivalente en fin d'acquisition dans les 2 configurations de la salle. Lors du test de rétention, en analysant le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible, on note que la performance dans le CIC se dégrade de façon significative avec le temps, contrairement au CEC où elle reste stable. Avec des paramètres supplémentaires pour évaluer la précision du souvenir, on s'aperçoit que la trace mnésique créée dans le CIC était déjà de moins bonne qualité à 5 jours post-acquisition, comparée à celle du CEC. Cette expérience a donc révélée l'importance de la proéminence des indices distaux dans l'apprentissage et la mémoire à long terme dans une tâche de piscine de Morris, et permet d'insister sur la nécessité d'utiliser plusieurs paramètres pour évaluer la rétention dans cette tâche.



## Brief Report

## Environmental cue saliency influences the vividness of a remote spatial memory in rats

Joëlle Lopez, Anne Pereira de Vasconcelos, Jean-Christophe Cassel\*

LINC, UMR 7191, CNRS-Université Louis Pasteur, IFR 37 Neurosciences, GDR CNRS 2905, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France

Received 11 January 2008; revised 6 February 2008; accepted 6 February 2008

Available online 18 March 2008

### Abstract

The Morris water maze is frequently used to evaluate the acquisition and retrieval of spatial memories. Few experiments, however, have investigated the effects of environmental cue saliency on the strength or persistence of such memories after a short vs. long post-acquisition interval. Using a Morris water maze, we therefore tested in rats the effect of the saliency of distal cues on the vividness of a recent (5 days) vs. remote (25 days) memory. Rats trained in a cue-enriched vs. a cue-impoverished context showed a better overall level of performance during acquisition. Furthermore, the probe trials revealed that the rats trained and tested in the cue-impoverished context (1) spent less time in the target quadrant at the 25-day delay, and (2) swam shorter distances in the target area, with fewer crossings at both 5- and 25-day delays, as compared to their counterparts trained and tested in the cue-enriched context. Thus, the memory trace formed in the cue-enriched context shows better resistance to time, suggesting an implication of cue saliency in the vividness of a spatial memory.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Cues; Recent memory; Remote memory; Morris water maze; Rat

The Morris water-maze is one of the most frequently-used tasks to evaluate spatial memory in rodents. In this task, animals have to form an allocentric representation of their environment and learn the location of a hidden platform by using distal cues in the experimental room as the main strategy (Morris, 1981; Morris, 1984; O'Keefe & Nadel, 1978). The stability of these cues is crucial for accurate retention. For example, rotation of the cues or of the pool causes rotation in searching strategy (Hamilton, Akers, & Weisend, 2007; McGauran, Harvey, Cunningham, Craig, & Commins, 2004). Furthermore, it seems that a minimal number of cues is necessary for accurate retention, at least in the case of recent memory (Fenton, Arolfo, Nerad, & Bures, 1994). So far, few studies have investigated the effect of different types of cues on the strength of a memory, especially when evaluated after a long post-acquisition interval. In the Morris water-maze task, the

long-term retention of spatial memories is often described as poor (Kubie, Sutherland, & Muller, 1999; Mumby, Astur, Weisend, & Sutherland, 1999; Sutherland et al., 2001). Indeed, some authors have reported trace degradation for remote memory, tested between 25 days and 14 weeks post-acquisition (Bolhuis, Stewart, & Forrest, 1994; Bontempi, Laurent-Demir, Destrade, & Jaffard, 1999; Clark, Broadbent, & Squire, 2005; Martin, de Hoz, & Morris, 2005). Others, however, did not find any difference in retention performance between short (1 day) and long (30 days) post-acquisition delays (Broadbent, Squire, & Clark, 2006; Teixeira, Pomedli, Maei, Kee, & Frankland, 2006).

Several studies have successfully tested methods to attenuate spontaneous forgetting, using more extensive training during the acquisition phase, discrete trials for each session of acquisition, or contextual re-exposure before the retrieval test (eg. Genoux et al., 2002; Gisquet-Verrier & Alexinsky, 1986; Sara, 2000; Whishaw, 1998). To evaluate whether overly-salient cues could contribute

\* Corresponding author. Fax: +33 390 241 958.

E-mail address: [jean-christophe.cassel@linc.u-strasbg.fr](mailto:jean-christophe.cassel@linc.u-strasbg.fr) (J.-C. Cassel).

to attenuate trace degradation, we trained rats in a cue-impooverished vs. a cue-enriched context, and subsequently tested them for retrieval in their training context after a 5-day vs. 25-day post-acquisition delay.

Forty-seven 3 months-old male Long-Evans rats (250–300 g) were housed individually in quiet facilities, under a 12 h light-dark cycle (light on at 7:00 h) with free access to food and water. All experiments were performed in accordance with the rules and guidelines of the European Committee Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (personal authorization licenses No. 67–215 for J.-C.C. and No. 67–7 for A.P.V; other author under the formers' responsibility). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used to a reasonable amount regarding statistical constraints.

The characteristics of the water-maze task (pool diameter of 160 cm) have been described previously (Pereira de Vasconcelos et al., 2006). The cue-impooverished context (CIC) consisted of a grey room (5.55 m × 3.16 m × 2.80 m) with the pool at its center, surrounded by a few geometrical shapes on the walls, and additional visual cues such as tables, racks, etc (Fig. 1A). The room was illuminated by two neon lamps on the ceiling just above the NW and SW quadrants of the pool. The cue-enriched context (CEC) consisted of the same room with geometrical shapes painted black on white walls, in addition to other parts of the room painted black, orange, or white, and to the additional visual cues present in the CIC (Fig. 1B). In addition, one of the neon lamps was switched off, and black stripes were painted on the ceiling.

The first training day consisted of a 4-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, 1 cm above the water surface, painted black, in the center of the SE quadrant). Then, using a different platform location (center of the NW quadrant), the rats were given 4 successive daily training (or acquisition) trials over 6 consecutive days, during which they learned the location of a hidden platform. For each trial, the rat was released into the pool, facing the wall from one of four starting points (north, south, east or west). Release occurred in a random order. Animals were allowed a maximum of 60 s to find the platform, on each trial and every day. Once the rat had climbed onto the platform, it was allowed to stay there for 10 s before being removed and gently placed at the next starting point. If the rat did not find the platform on time, it was gently guided to the platform by the experimenter. It was allowed to stay on the platform for 10 s before the next trial was started. One group was then tested for retention 5 days post-acquisition (recent memory:  $n_{CIC} = 12$ ,  $n_{CEC} = 11$ ), while the other one was tested 25 days post-acquisition (remote memory,  $n_{CIC} = 12$ ,  $n_{CEC} = 12$ ), after randomization according to the rats' acquisition performances. For the probe trial, the platform was removed and the animals were allowed 60 s to swim.

The first variable taken into account for the probe trial was the percent time spent in the target quadrant, values

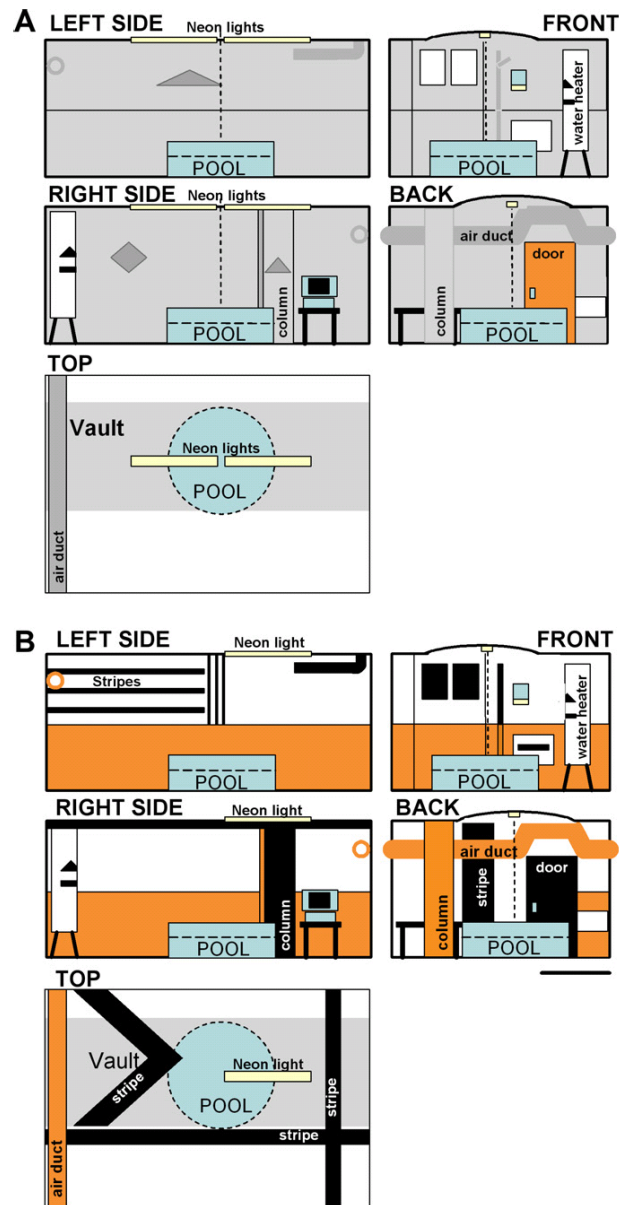


Fig. 1. Drawings representing different views of (A) the cue-impooverished context (CIC) and (B) the cue-enriched context (CEC). Scale bar = 1 m.

close to 25% (i.e., 15 s) corresponding to a random distribution of swim patterns over the four quadrants, thus accounting for absence of retention. The number of times each animal entered an area (referred to as the target area) corresponding to the size of the platform enlarged by an annulus of 10 cm (total diameter of 31 cm) was also recorded and used as an index for precision of the memory. The total distance swum in the target area was also taken into account.

To analyze the acquisition performances, we used a 3-way ANOVA considering Delay (5d, 25d), Saliency (CIC, CEC), and Day (1, 2, 3, 4, 5, 6) as factors. A Delay (5d,



25d) × Saliency (CIC, CEC) ANOVA was used to analyze probe trial performance. When appropriate, multiple comparisons using the Newman–Keuls multiple range test were run; threshold for significance was set at  $P < 0.05$ . Student's  $t$  tests were used to compare the % time spent in the target quadrant to chance (i.e., 25%).

The data for the acquisition period are shown in Fig. 2. A Delay (5 d, 25d) × Saliency (CIC, CEC) × Day (1, 2, ..., 6) ANOVA showed no overall Delay effect ( $F(1,43) < 1$ , ns) and no significant interaction, regardless of the order ( $F(1,43)$  or  $F(5,215) < 1$ , ns), accounting for comparable acquisition performances across groups. The overall Day effect, which was significant ( $F(5,215) = 40.6$ ,  $P < 0.001$ ), reflected progressive learning of the platform location (Fig. 2A). The significant Saliency effect ( $F(1,43) = 5.7$ ,  $P < 0.05$ ) was due to an overall distance that was significantly shorter in the CEC groups than in the CIC ones (Fig. 2B). It is noteworthy, however, that on day 6, performance levels were comparable among all groups.

The data for the probe trials are shown in Fig. 3. A Delay × Saliency ANOVA of the percent time spent in the target quadrant (Fig. 3A) showed a significant effect of Delay ( $F(1,43) = 4.0$ ,  $P < 0.05$ ) and of the Delay × Saliency interaction ( $F(1,43) = 6.5$ ,  $P < 0.05$ ), but no significant effect of Saliency ( $F(1,43) = 3.2$ , ns). A multiple comparisons' analysis revealed that rats tested at the 25-day delay in the CIC spent significantly less time in the target quadrant than those of the three other groups ( $P < 0.05$ ). In all groups, however, the average percent time spent in the target quadrant was significantly above chance (25%), reflecting retention of the platform's location (Student's  $t$  test,  $P < 0.01$ ).

The ANOVA of the number of crossings in the target quadrant (Fig. 3B) showed a significant effect of Saliency ( $F(1,43) = 57.4$ ,  $P < 0.001$ ), with a significantly higher number of crossings in the CEC than in the CIC. There

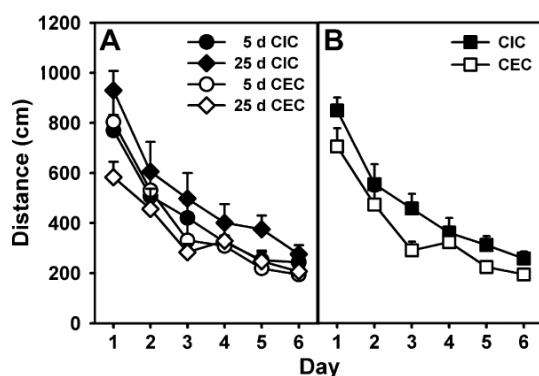


Fig. 2. (A) Average (+SEM) distances to reach the platform during water maze acquisition in the rats to be tested for retrieval in a probe trial at a 5-day or a 25-day post-acquisition delay, in the CIC or CEC. All rats were tested on a daily basis of 4 successive trials during 6 consecutive days. (B) Average (+SEM) distances to reach the platform during water maze acquisition for the CIC and CEC groups.

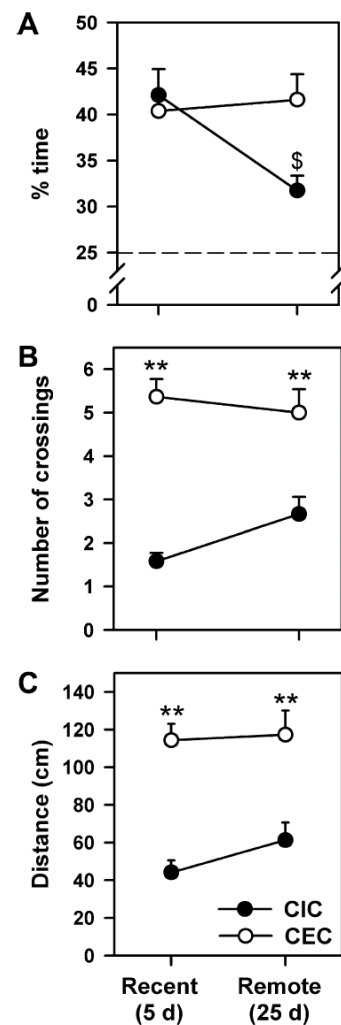


Fig. 3. Average (+SEM) performance for the probe trial, after a 5-day (Recent) or a 25-day (Remote) post-acquisition delay. Performance is expressed as (A) the percent time spent in the target quadrant, (B) the number of crossings in the target area, and (C) the distance swum in the target area. The dashed line in (A) represents random performance. Significantly different from all the other groups:  $^{\$}P < 0.05$ . Significantly different from the CIC:  $^{**}P < 0.01$ .

was no significant Delay effect ( $F(1,43) < 1$ , ns) or Saliency × Delay interaction ( $F(1,43) = 3.2$ , ns).

A 2-way ANOVA of the distance swum in the target area also revealed a significant effect of Saliency ( $F(1,43) = 42.7$ ,  $P < 0.001$ ), with rats in the CEC swimming a longer distance in the target area than rats in the CIC (Fig. 3C). There was no significant Delay effect ( $F(1,43) < 1$ , ns) or Saliency × Delay effect ( $F(1,43) < 1$ , ns).

Although the overall level of performance during acquisition was better for the CEC rats than for the CIC ones, performances were equivalent in all groups at the end of the acquisition. Depending on the variable considered, performance for retention, however, did differ across groups. In fact, trace degradation, as measured by the percent time



spent in the target quadrant, only occurred in the CIC at the 25-day post-acquisition delay. When taking into account other variables, such as the number of crossings and the distance swum in the target area, performance was clearly better in the CEC than in the CIC, even at the 5-day post-acquisition delay. Indeed, at this delay, rats seemed to retain the quadrant in which the platform had been located during acquisition, regardless of the cue saliency, but those trained in the CIC were much less precise when searching for the former platform's location than rats trained in the CEC. These observations imply that a weaker or less precise memory was formed in the CIC.

Several studies have investigated the effect of different types of cues on spatial memory learning in the Morris water maze. However, most of them compared the use of distal vs. proximal cues (Carman, Booze, Snow, & Mactutus, 2003), pool or distal cues' rotation (Hamilton et al., 2007; McGauran et al., 2004), or different colors or shapes of intra-maze cues (Jones, Pearce, Davies, Good, & McGregor, 2007). Few data, however, are available concerning the saliency of extra-maze cues. Champagne, Dupuy, Rochford, and Poirier (2002) showed better performance in mice in the acquisition and retention of a recent memory (24 h) with training in presence of salient extra-maze cues, compared to diffuse or no extra-maze cues' paradigms. The present study therefore shows for the first time that the saliency of extra-maze cues may contribute to prevent degradation of performance over time. This is a crucial point for investigations of recent vs. remote memories, particularly when studying the roles of cerebral structures that could be differentially involved in recent vs. remote memories (e.g., Frankland & Bontempi, 2005 for review), or differentially engaged in ambiguous situations when retrieval is more effortful (Rudy, Biedenkapp, & O'Reilly, 2005).

Our data also point to the importance of selecting the appropriate variables accounting for retention performance in the probe trial. Indeed, if one considers the number of crossings and the distance swum in the target area, there is a clear-cut difference between both contexts as soon as 5 days post-acquisition. This suggests that as soon as 5 days after the acquisition in the CIC, precision of the memory was below that of rats trained and tested in the CEC, even though all rats did indeed remember in which quadrant the platform was located. Riccio, Ackil, and Burch-Vernon (1992) suggested that spontaneous forgetting can be due to generalization, i.e., over a long period of time, animals fail to remember the particular characteristics of the situation (eg. distal cues) but retain information about what to do (procedural memory; search inside the quadrants). This could explain the memory degradation found at the 25-day post-acquisition delay. In addition, the poorly-salient cues in the CIC could have induced an ambiguous situation causing even a recent memory to be degraded. The percent time spent in the target quadrant may therefore not be a sufficient parameter in evaluating memory retention, and additional consideration of variables such as the number of crossings or the distance swum

in the target area may contribute to get a better idea of the strength and/or precision of a memory trace.

In conclusion, our data point to the importance of saliency of distal cues in a water-maze task as regards the strength and/or precision of a recent vs. remote spatial memory. They might also help to understand why time-dependent trace degradation is found in some experiments using a Morris water-maze task, and not in others.

### Acknowledgments

The authors are grateful to O. Bildstein, D. Egesi, and G. Edomwonyi for outstanding care of the animal colonies.

This research has been supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-NEURO-027-04), the ULP, the CNRS, and by a personal Ph.D. fellowship for J. Lopez from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

### References

- Bolhuis, J., Stewart, C., & Forrest, E. (1994). Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum. *Quarterly Journal of Experimental Psychology B*, *47*, 129–150.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., & Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*, *400*, 671–675.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2006). Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learning and Memory*, *13*, 187–191.
- Carman, H. M., Booze, R. M., Snow, D. M., & Mactutus, C. F. (2003). Proximal versus distal cue utilization in preweanling spatial localization: The influence of cue number and location. *Physiology & Behavior*, *79*, 157–165.
- Champagne, D., Dupuy, J. B., Rochford, J., & Poirier, J. (2002). Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: Analysis of learning strategies in three versions of the task. *Neuroscience*, *114*, 641–654.
- Clark, R. E., Broadbent, N. J., & Squire, L. R. (2005). Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus*, *15*, 260–272.
- Fenton, A., Arolfo, M., Nerad, L., & Bures, J. (1994). Place navigation in the Morris water maze under minimum and redundant extra-maze cue conditions. *Behavioral and Neural Biology*, *62*, 178–189.
- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*, 119–130.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., & Mansuy, I. M. (2002). Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, *418*, 970–975.
- Gisquet-Verrier, P., & Alexinsky, T. (1986). Does contextual change determine long-term forgetting? *Animal Learning and Behaviour*, *14*, 349–358.
- Hamilton, D. A., Akers, K. G., & Weisend, M. P. (2007). How do room and apparatus cues control navigation in the Morris water task? Evidence for distinct contributions to a movement vector. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *33*, 100–114.
- Jones, P. M., Pearce, J. M., Davies, V. J., Good, M. A., & McGregor, A. (2007). Impaired processing of local geometric features during navigation in a water maze following hippocampal lesions in rats. *Behavioral Neuroscience*, *121*, 1258–1271.
- Kubie, J. L., Sutherland, R. J., & Muller, R. U. (1999). Hippocampal lesions produce a temporally graded retrograde amnesia on a dry version of the Morris swimming task. *Psychobiology*, *27*, 313–330.

- Martin, S., de Hoz, L., & Morris, R. (2005). Retrograde amnesia: Neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia*, *43*, 609–624.
- McGauran, A.M., Harvey, D., Cunningham, L., Craig, S., & Commins, S. (2004). Retention of cue-based associations in the water maze is time-dependent and sensitive to disruption by rotating the starting position. *Behavioral Brain Research*, *151*, 255–266.
- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning & Motivation*, *12*, 239–260.
- Morris, R. G. M. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *27*, 41–59.
- Mumby, D. G., Astur, R. S., Weisend, M. P., & Sutherland, R. J. (1999). Retrograde amnesia and selective damage to the hippocampal formation: Memory for places and object discriminations. *Behavioral Brain Research*, *106*, 97–107.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford, England: Clarendon Press.
- Pereira de Vasconcelos, A., Klur, S., Muller, C., Cosquer, B., Lopez, J., Certa, U., & Cassel, J. C. (2006). Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: A comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. *Neuroscience*, *141*, 1649–1663.
- Riccio, D. C., Ackil, J., & Burch-Vernon, A. (1992). Forgetting of stimulus attributes: Methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychological Bulletin*, *112*, 433–445.
- Rudy, J. W., Biedenkapp, J. C., & O'Reilly, R. C. (2005). Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: An alternative view. *Learning and Memory*, *12*, 445–446.
- Sara, S. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*, *7*, 73–84.
- Sutherland, R. J., Weisend, M. P., Mumby, D., Astur, R. S., Hanlon, F. M., Koerner, A., Thomas, M. J., Wu, Y., Moses, S. N., Cole, C., Hamilton, D. A., & Hoising, J. M. (2001). Retrograde amnesia after hippocampal damage: Recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus*, *11*, 27–42.
- Texeira, C. M., Pomedli, S. R., Maci, H. R., Kee, N., & Frankland, P. (2006). Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *Journal of Neuroscience*, *26*, 7555–7564.
- Whishaw, I. Q. (1998). Place learning in hippocampal rats and the path integration hypothesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *22*, 209–220.

## Publication 2 :

# Evolution qualitative de la trace mnésique avec le temps

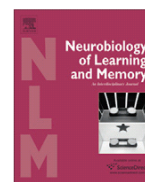
L'un des objectifs de cette thèse était d'évaluer d'éventuelles différences qualitatives entre une trace mnésique récente et une trace ancienne. Ceci n'avait pas encore été exploré, et semblait intéressant dans le cadre de la consolidation systémique. Pour cela, nous avons utilisé un protocole classique d'apprentissage de la tâche de la piscine de Morris, suivi d'une extinction. Dans un protocole d'extinction classique, plusieurs tests de rétention sont réalisés et le rat va se désintéresser progressivement de l'endroit où était localisée la plate-forme, ce qui se traduit par une diminution du temps passé dans le quadrant cible (Lattal et coll., 2003 ; Prados et coll., 2003).

Dans le contexte 'standard', nous avons tout d'abord réalisé trois essais d'extinction (équivalents aux tests de rétention) espacés de 24h, et ce à partir de 5 ou 25 jours post-acquisition. La première constatation générale était une dégradation de la trace mnésique à 25 jours, que l'on peut qualifier d'oubli spontané/naturel (voir Sara, 2000, pour une revue). En ce qui concerne l'extinction, alors que les performances obtenues avec un souvenir récent (5 jours) ont suivi un profil d'extinction classique, soit une diminution progressive du temps passé dans le quadrant cible, les performances de rappel du souvenir ancien (25 jours) ont suivi un profil inverse, avec une augmentation graduelle du temps passé dans le quadrant cible. Nous avons donc cherché à savoir si ce phénomène pouvait être dû à un simple effet de '*reminding*' (le fait de remettre l'animal dans un contexte auquel il n'a pas été exposé depuis un certain temps), en réalisant cette fois-ci trois essais d'extinction consécutifs. Les résultats de la 1<sup>ère</sup> expérience n'ont pas été retrouvés avec ce protocole, réfutant cette interprétation. Enfin, puisque la trace mnésique à 25 jours était dégradée par rapport à celle de 5 jours, il est possible que le degré de dégradation de la trace ait pu jouer un rôle dans le phénomène observé. Dans la Publication 1, nous avons vu que les performances dans le CEC restaient stables dans le temps. Nous avons donc utilisé le protocole initial d'extinction dans cet autre contexte, et observé une extinction classique à la fois pour le souvenir récent et le souvenir ancien. Ces résultats suggèrent donc que l'âge et la force de la trace ont un impact sur certains processus mnésiques comme l'extinction.



Contents lists available at ScienceDirect

## Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynlme](http://www.elsevier.com/locate/ynlme)

## Differential sensitivity of recent vs. remote memory traces to extinction in a water-maze task in rats

Joëlle Lopez, Anne Pereira de Vasconcelos, Jean-Christophe Cassel \*

Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7191, Université Louis Pasteur – CNRS, IFR 37 Neurosciences, GDR CNRS 2905, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 April 2008

Revised 26 May 2008

Accepted 27 May 2008

Available online 23 June 2008

## Keywords:

Extinction

Rat

Recent memory

Remote memory

Morris water maze

## ABSTRACT

Extinction has mostly been studied in conditioning paradigms, more sparsely in spatial tasks, and never as a function of the age of a spatial memory. Using rats, we compared the time-course of extinction of a recent (5 days) vs. remote (25 days) spatial memory in a water maze, over three probe trials. When the trials were set 24 h apart, performance in the remote memory group was significantly worse on the first probe trial and significantly better on the third probe trial, as compared to the recent memory group, thereby showing differences between cognitive operations underlying recent vs. remote memory extinction. In contrast, when trials were given consecutively, both groups showed a similar profile of extinction. Furthermore, in a room with overly-salient cues providing a strong remote memory trace, no difference between groups was observed when the spaced extinction paradigm was used. These results might be related to a balance between reconsolidation and extinction processes occurring after a first retrieval experience, of which the outcome may depend on the extinction protocol, and on the age and strength of a memory.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Extinction is one of the most fundamental concepts in experimental psychology and learning theory (Bouton, 1994; Pavlov, 1927). It is defined as the “decrease in the amplitude and frequency of a conditioned response when the conditioned stimulus that elicits it is repeatedly non-reinforced” (see Myers & Davis, 2002, for review). Extinction does not reflect forgetting due to obliteration of the original engram, but rather “new learning” in which the new association of the conditioned stimulus with absence of the reinforcer comes to control behavior. This process is also characterized by phenomena such as spontaneous recovery, renewal, and rapid reacquisition over repeated reinforced trials (Bouton, Westbrook, Corcoran, & Maren, 2006; Rescorla, 2004, for reviews). Using various conditioning paradigms, data from the literature have shown that the ability of the retrieval protocol to initiate extinction might depend on several factors.

Thus, Eisenberg, Kobil, Berman, and Dudai (2003) proposed that the excitatory original CS-US trace and an inhibitory or new CS-noUS trace may compete for the control of behavior. The outcome of this competition would depend in part on the intensity of the original training, the number and/or duration of extinction trials, and the kinetics of extinction. If the original training is highly robust and/or the number and duration of extinction trials is too

small, the “inhibitory” or CS-noUS trace may not gain appreciable control of behavior and may then induce reconsolidation (see Berman, Hazvi, Stehberg, Bahar, & Dudai, 2003; Eisenberg et al., 2003; Nader, 2003; Nader, Schafe, & Ledoux, 2000; Pedreira & Maldonado, 2003; Suzuki et al., 2004).

In addition, the type of task, the learning situation and the kind of learning system engaged might account for reconsolidation versus extinction processes after non-reinforced trials (Nader, 2003; Nader et al., 2000).

Likewise, the age of a memory (i.e., the delay between training and onset of extinction) might have an impact on processes underlying extinction. For instance, Myers, Ressler, and Davis (2006) found in a fear conditioning task in rats that memories extinguished at short delays (10 min or 1 h post-acquisition) showed little or no renewal, reinstatement and spontaneous recovery, while, consistent with the inhibitory learning mechanism of extinction, a moderate to strong renewal, reinstatement and spontaneous recovery were observed at the delays of 24 and 72 h. Also, Rescorla (2004) showed in an appetitive conditioning task in rats significantly less spontaneous recovery for the longer delay (8 days) than for the shorter one (1 day), and concluded that there was some fading with the passage of time in the effectiveness of what was learned in extinction, while little or no change over time occurred for the original learning.

Recently, in rodents, spontaneous recovery and renewal were also observed in the Morris water maze, thereby validating the general principles of extinction in a spatial task (Lattal, Mullen, &

\* Corresponding author. Fax: +33 390 241 958.

E-mail address: [Jean-christophe.cassel@linc.u-strasbg.fr](mailto:Jean-christophe.cassel@linc.u-strasbg.fr) (J.-C. Cassel).



Abel, 2003; Prados, Manteiga, & Sansa, 2003). Since then, however, extinction procedures in a spatial task have been used in only a few studies (Morris et al., 2006; Suzuki et al., 2004), and none has yet investigated if spatial memory extinction could depend upon the age of a memory.

Because in a variety of situations memories consolidated at the system level might involve other structures than the hippocampus such as the prefrontal cortex, as opposed to recent memories that depend upon an engagement of the hippocampus (Bontempi, Laurent-Demir, Destrade, & Jaffard, 1999; Maviel, Durkin, Menzaghi, & Bontempi, 2004; but see Teixeira, Pomedli, Maei, Kee, & Frankland, 2006), it can be hypothesized that, beside their different neuroanatomical substrates, processes underlying such memories might be different. Indeed, according to the standard theory of consolidation, the hippocampus has a time-limited role in the storage of memories, with an engagement of the neocortex, and more particularly the prefrontal cortex, for the retrieval of remote memories, once they are consolidated at the system level (Dudai, 2004; Frankland & Bontempi, 2005; McGaugh, 2000; Squire & Alvarez, 1995). Because research on extinction may contribute to our understanding of brain processes and mechanisms by which internal representations are established to control behavior (Berman et al., 2003), we wondered if remote spatial memories would follow the same extinction kinetics as recent ones.

Thus, to address the question of the influence of age of a spatial memory on extinction processes, we used two extinction procedures (spaced or massed) and two rooms (standard distal cues or overly-salient distal cues) in rats that had learned the location of a platform in a water maze, starting 5 days (recent memory) or 25 days (remote memory) post-acquisition. For the first time in a spatial task, our results suggest that processes involved in the extinction of a recent memory (which undergoes a classical profile of extinction) might be different from those involved in extinction of a remote memory (which undergoes some “refreshment” in the spaced extinction protocol), with the strength of the trace also playing a role in the outcome of these processes.

## 2. Experiment 1: spaced extinction

This experiment was an initial investigation of the possible importance of age of a spatial memory in the processes underlying extinction. Thus, using two training-onset of extinction intervals, i.e. either 5 days (recent memory) or 25 days (remote memory) in a Morris water maze, we tested the effects of 3 non-reinforced probe trials, each 24 h apart, with a fourth one 10 days later to see if there was spontaneous recovery. The question of interest was whether performance would be different in the two age groups, considering that a recent memory is not yet consolidated at the system level and could still depend on the hippocampus, whereas a consolidated remote memory may engage neocortical areas. This experiment actually consisted of two separate identical studies performed at several months' interval, the second one aiming at replicating our initial data (1st experiment: 21 rats with  $n_{\text{recent}} = 11$  and  $n_{\text{remote}} = 10$ ; 2nd experiment: 22 rats with  $n_{\text{recent}} = 11$  and  $n_{\text{remote}} = 11$ ). As no significant difference was found between both experiments (data not illustrated), the results were pooled.

### 2.1. Methods

#### 2.1.1. Animals and apparatus

All experiments were performed in 3 month-old male Long-Evans rats (250–300 g) in accordance with the rules and guidelines of the European Committee Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (references for personal authorization licenses are n°67–7 for A.PdV.

and n°67–215 for J-C.C.; the other author under the formers' responsibility). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used to a reasonable amount regarding statistical constraints. Animals were housed individually in quiet facilities, under a 12 h light–dark cycle (light on at 7:00 h) with free access to food and water.

The water maze consisted of a circular pool (diameter 160 cm; height 60 cm) filled to half its' height with water (21 °C) made opaque by addition of powdered milk. The experimental room contained several different extra-maze cues (standard distal cues) such as contrasted geometrical shapes on the walls, tables, racks, etc. (see Lopez, Pereira de Vasconcelos, & Cassel, 2008 for details), and the illumination was provided by a neon lamp placed 1.80 m above the center of the pool.

#### 2.1.2. Experimental paradigms

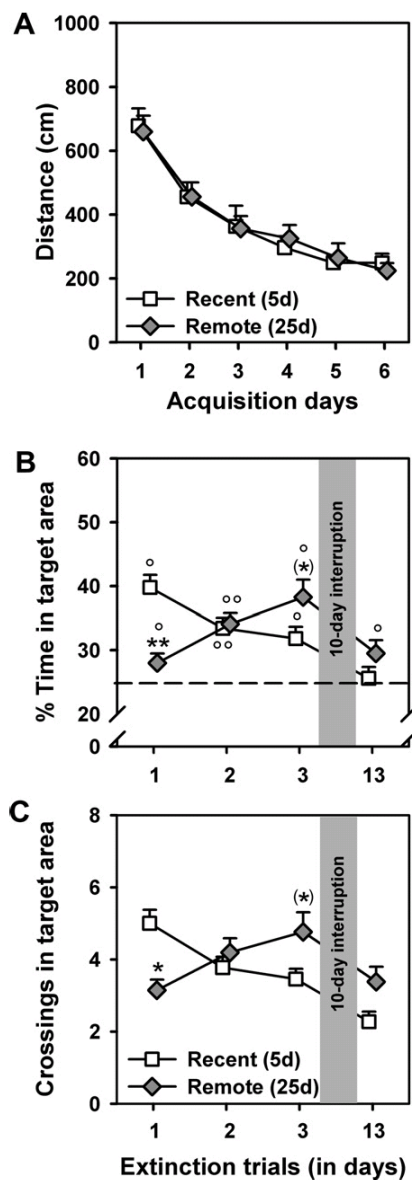
The first training day consisted of a 4-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, 1 cm above the water surface, painted black). Then, using a different platform location, the rats were given 4 successive daily training (or acquisition) trials over 6 consecutive days, during which they learned the location of a hidden platform. For each trial, the rat was released into the pool, facing the wall from one of four starting points (north, south, east or west). Release occurred in a random order. Animals were allowed a maximum of 60 s to find the platform, on each trial and every day. Once the rat had climbed onto the platform, it was allowed to stay there for 10 s before being removed and gently placed at the next starting point. If the rat did not find the platform on time, it was gently guided to the platform by the experimenter. It was allowed to stay on the platform for 10 s before the next trial was started. One group was then tested for retention 5 days post-acquisition, while the other one was tested 25 days post-acquisition, after randomization according to the rats' acquisition performances. These delays were chosen according to Bontempi et al. (1999), who also assessed functional correlates of recent vs. remote spatial memory, although in mice and in another spatial task. The three first probe trials (extinction trials) were separated from each other by a 24 h delay. The fourth probe trial was separated from the third one by a 10-day delay, in order to see if spontaneous recovery occurred. For each probe trial, the platform was removed and all rats were given 60 s to swim. At the end of the trial, rats were removed from the pool at a random location. They were dried with a towel and returned to their cages, placed under a lamp for 1 min, and then back onto the holding rack. The first variable taken into account was the percent time spent in the target quadrant, values close to 25%/quadrant (i.e., 15 s) corresponding to a random distribution of swim patterns, and thus accounting for absence of retention. The number of times each animal entered the target area, corresponding to the size of the platform enlarged by an annulus of 10 cm, was also recorded and used as an index for precision of the memory.

#### 2.1.3. Statistical analyses

To analyze the acquisition performances, we used a 2-way ANOVA considering Delay (5 d, 25 d) and Day (1, 2, 3, 4, 5, 6) as factors. A 2-way ANOVA with Delay (5 d, 25 d) and Extinction trial (1, 2, 3, 4) as factors was performed to analyze extinction trial performances. When appropriate, multiple comparisons using the Newman–Keuls multiple range test (Winer, 1971) were run, with a significance level taken at  $p < .05$ . Student's *t* tests were also run to compare the % time spent in the target quadrant to the value corresponding to chance (i.e., 25%).

## 2.2. Results

The data for the acquisition period are shown in Fig. 1A. A Delay (5 d, 25 d)  $\times$  Day (1, 2, ..., 6) ANOVA showed no overall Delay effect



**Fig. 1.** (A) Average (+SEM) distances of the 4 daily trials to reach the platform during water-maze acquisition in the rats to be tested for retrieval in a first probe trial at either a 5-day (open squares, recent) or 25-day post-acquisition delay (greyish diamonds, remote). There were no significant differences between the two groups. (B and C) Average (+SEM) performances in the extinction trials in the rats tested after a 5-day (open squares, recent) or 25-day (greyish diamonds, remote) post-acquisition delay. Performance is expressed as (B) the percent time spent in the target quadrant (the dashed line corresponds to random performance) and (C) the number of times rats crossed the target area. Significantly different from the “recent” group: \*\* $p < .001$ , \* $p < .01$ . Tendency to differ from the “recent” group: (\*). Significantly different from random, i.e., 25%: † $p < .05$ , †† $p < .01$ .

( $F(1,41) < 1$ , ns) and no significant Delay  $\times$  Day interaction ( $F(5,205) < 1$ , ns), accounting for comparable acquisition performances in both groups. The overall Day effect, however, was significant ( $F(5,205) = 34.9$ ,  $p < .001$ ), reflecting the progressive and significant reduction of the distances to reach the platform from day to day, and thereby learning of the platform location.

The data for the probe trials are shown in Fig. 1. A 2-way ANOVA of the percent time spent in the target quadrant (Fig. 1B), considering Delay (5d,25d) and Extinction trial (1,2,3,4) as factors, showed a significant effect of Extinction trial ( $F(3,164) = 6.1$ ,

$p < .001$ ) and of the Delay  $\times$  Extinction trial interaction ( $F(3,164) = 8.7$ ,  $p < .001$ ); the overall Delay effect was not significant ( $F(1,164) < 1.0$ , ns). Post-hoc analyses revealed that the Extinction trial effect was due to performances that were significantly weaker on trials 3 and 4 than on trial 1 ( $p < .05$  and  $p < .001$ , respectively), and significantly weaker on trial 4 than on trial 2 ( $p < .05$ ), in the recent memory group. Also, performance was significantly better on trial 3 than on trial 1 ( $p < .01$ ), and significantly worse on trial 4 than on trial 3 in the remote memory group ( $p < .05$ ). The significant interaction was due to performances that, in the remote memory group, were significantly worse on the first probe trial ( $p < .001$ ) and tended to be better on the third one ( $p = .086$ ), as compared to the recent memory group. It is also noteworthy that, in both groups, the average percent time spent in the target quadrant was significantly different from random (25%) on the three first probe trials ( $p < .01$  or  $p < .05$ ). After the 10-day interruption, performance differed from random only in the remote memory group ( $p < .05$ ).

The Delay  $\times$  Extinction trial ANOVA of the number of crossings in the target area (Fig. 1C) showed a significant effect of Extinction trial ( $F(3,164) = 5.5$ ;  $p < .01$ ), and of the Delay  $\times$  Extinction trial interaction ( $F(3,64) = 7.7$ ,  $p < .001$ ), but revealed no effect of Delay ( $F(1,164) < 1$ , ns). Post-hoc analyses revealed that the Extinction trial effect was due to performances that were significantly weaker on trials 3 and 4 than on trial 1 ( $p < .05$  and  $p < .001$ , respectively), and significantly weaker on trial 4 than on trial 2 ( $p < .05$ ) in the recent memory group. Also, performance was significantly better on trial 3 than on trial 1 ( $p < .05$ ), and tended to be worse on trial 4 than on trial 3 in the remote memory group ( $p = .063$ ). The significant interaction effect was due to performances that, in the remote memory group, were significantly worse on the first probe trial ( $p < .01$ ) and tended to be better on the third one ( $p = .060$ ), as compared to the recent memory group. Performances therefore accounted for rapid extinction of recent memory, but not of remote memory, for which there was a progressive improvement over the first three trials, before degradation after the 10-day interruption.

### 3. Experiment 2: massed extinction

The results of Experiment 1 suggest that with a spaced extinction paradigm, performance over the three first probe trials appears to depend on the age of the memory. At the 5-day delay, three probe trials, each set 24 h apart, induced extinction as expected. However, when starting at the 25-day delay, the procedure induced improvement of performance over the three probe trials. The goal of Experiment 2 was therefore to verify whether these results could be replicated using another extinction paradigm, i.e., one session of three consecutive probe trials. Indeed, at 25 days, the improvement of performance between the 1st and 2nd probe trials might be due to a reminding effect, as previously shown with old memories showing time-dependent degradation (Deweer & Sara, 1984). The massed extinction paradigm used in this second experiment was designed to clarify this point.

#### 3.1. Methods

##### 3.1.1. Animals and apparatus

Twenty-three 3 month-old male Long-Evans rats (250–300 g) were used in this study. They were kept in the same conditions as in Experiment 1, and were tested in the same water-maze with standard distal cues.

##### 3.1.2. Experimental paradigms

All procedures were identical to those used in Experiment 1 for the acquisition, with  $n = 12$  in the recent memory group, and  $n = 11$



in the remote memory group. In this experiment, one session of three consecutive probe trials (inter-trial interval = 10–15 s) was performed on the same day, each probe having a different starting point. As there was no spontaneous recovery in our experimental conditions (due to incomplete extinction after three trials, as shown in Experiment 1), the fourth trial was dropped from the experimental paradigm.

### 3.1.3. Statistical analyses

The statistical analyses performed were identical to those of Experiment 1. In addition, 1-way ANOVAs using Delay as a factor were run when appropriate.

### 3.2. Results

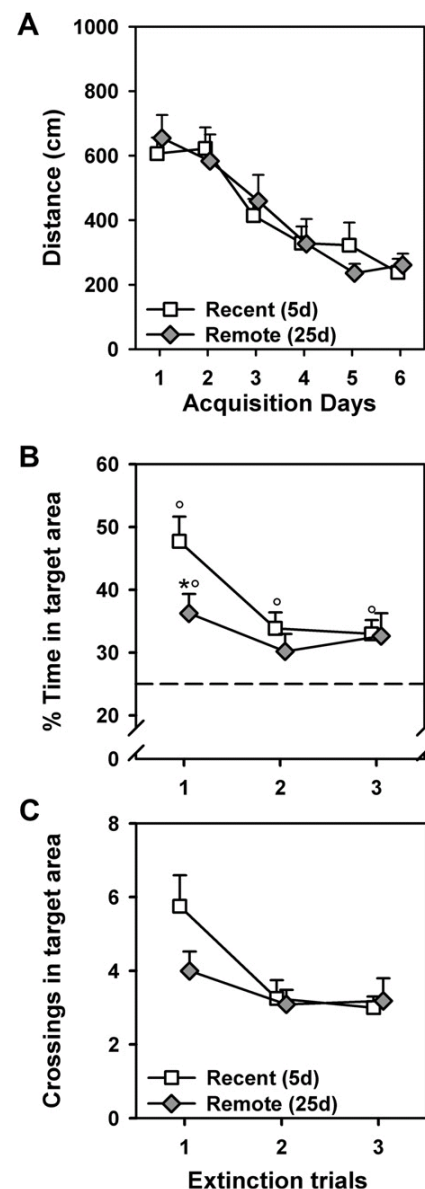
The data for the acquisition period are shown in Fig. 2A. As in our first experiment, a Delay (5 d, 25d) × Day (1, 2, ..., 6) ANOVA showed no overall Delay effect ( $F(1, 21) < 1$ , ns) and no significant Delay × Day interaction ( $F(5, 105) < 1$ , ns), accounting for comparable acquisition performances in both groups. The overall Day effect, however, was significant ( $F(5, 105) = 19.5$ ,  $p < .001$ ), reflecting the progressive and significant reduction of the distances to reach the platform from day to day, and thereby learning of the platform location.

The data for the probe trials are shown in Fig. 2. The 2-way ANOVA of percent time spent in the target quadrant (Fig. 2B) using Delay (5d, 25d) and Extinction trial (1, 2, 3) as factors showed a significant effect of Delay ( $F(1, 63) = 4.2$ ,  $p < .05$ ) and of Extinction trial ( $F(1, 63) = 6.5$ ,  $p < .01$ ), but not of the Delay × Extinction trial interaction ( $F(2, 63) = 1.7$ , ns). The significant Delay effect was due to performance of rats of the recent memory group being significantly higher than that of rats of the remote memory group, on the first probe trial ( $F(1, 21) = 5.2$ ,  $p < .05$ ). The significant Extinction trial effect was due to performances decreasing significantly between trials 1 and 2 ( $p < .01$ ), and trials 1 and 3 ( $p < .01$ ) in the recent memory group. The percent time spent in the target quadrant was significantly different from random (25%) for both groups on all probe trials ( $p < .01$  or  $p < .05$ ), except for trials 2 and 3 of the 25-day delay group who showed only a tendency to differ from random ( $p = .0926$  and  $p = .0618$ , respectively).

The Delay × Extinction trial ANOVA for number of crossings (Fig. 2C) also showed a significant Extinction trial effect ( $F(2, 63) = 6.5$ ,  $p < .01$ ), but no significant Delay or Delay × Extinction trial interaction effects ( $F(1, 63) = 1.6$ , ns;  $F(2, 63) = 1.7$ , ns, respectively). The significant Extinction trial effect was due to a decrease in performance in the recent memory group between trials 1 and 2, and 1 and 3 ( $p < .01$ ). There was also a tendency for rats in the recent memory group to show better performance than the remote memory group on the first extinction trial ( $p = .099$ ).

## 4. Experiment 3: room with overly-salient cues

In Experiment 1, we showed that a spaced extinction procedure induced different profiles of performance for a recent (5 days) vs. remote (25 days) memory. Furthermore, Experiment 2 showed that a massed extinction paradigm did not produce the same results, making it unlikely that a reminder effect could explain the results of Experiment 1. As in this initial experiment the remote memory group showed some degradation of performance on the first probe trial, as compared to the recent memory group, it is therefore of interest to investigate whether the strength of the memory trace could influence extinction processes. Experiment 3 was therefore designed to strengthen acquisition in order to obtain a similar retention performance at 5 and 25 days. In order to do this, we used a room with overly-salient distal cues in which we



**Fig. 2.** (A) Average (+SEM) distances of the 4 daily trials to reach the platform during water-maze acquisition in the rats to be tested for retrieval in a first probe trial at either a 5-day (open squares, recent) or 25-day post-acquisition delay (greyish diamonds, remote). There were no significant differences between the two groups. (B and C): average (+SEM) performances in the extinction trials in the rats tested after a 5-day (open squares, recent) or 25-day (greyish diamonds, remote) post-acquisition delay. Performance is expressed as (B) the percent time spent in the target quadrant (the dashed line corresponds to random performance) and (C) the number of times rats crossed the target area. Extinction trials 1, 2 and 3 were given consecutively. Significantly different from the “recent” group: \* $p < .05$ . Significantly different from random, i.e., 25%:  $p < .05$ .

previously showed no time-dependent degradation of performance for remote memory, assessed 25 days post-acquisition (Lopez et al., 2008).

### 4.1. Methods

#### 4.1.1. Animals and apparatus

Twenty-three 3 month-old male Long-Evans rats (250–300 g) were used in this study, and were maintained in the same condi-

tions as in Experiments 1 and 2. Groups consisted of  $n = 11$  in the recent memory group, and  $n = 12$  in the remote memory group. The experiment was performed in another room with an identical water maze, but with overly-salient extra-maze cues. These consisted of well contrasted geometrical shapes painted black on white walls, in addition to other parts of the room painted black, orange, or white, and to the additional visual cues that were present (tables, racks, etc.). Black stripes were also painted on the ceiling (see Lopez et al., 2008, for detailed descriptions).

4.1.2. Experimental paradigms

All procedures (acquisition and spaced extinction protocol) were identical to those used in Experiment 1.

4.1.3. Statistical analyses

The statistical analyses performed were identical to those of Experiment 2.

4.2. Results

The data for the acquisition period are shown in Fig. 3A. As in the two other experiments, a Delay (5d,25d)  $\times$  Day (1,2,...,6) ANOVA showed no overall Delay effect ( $F(1,21) < 1$ , ns) and no significant Delay  $\times$  Day interaction ( $F(5,105) < 1$ , ns), accounting for comparable acquisition performances in both groups. The overall Day effect, however, was significant ( $F(5,105) = 21.4$ ,  $p < .001$ ), reflecting the progressive and significant reduction of the distances to reach the platform from day to day, and thereby learning of the platform location.

The data for the probe trials are shown in Fig. 3. A 2-way ANOVA of percent time spent in the target quadrant (Fig. 3B), with Delay and Extinction trial as factors, revealed a significant effect of Extinction trial ( $F(2,63) = 9.4$ ,  $p < .001$ ), but no significant effect of Delay or of Delay  $\times$  Extinction trial interaction ( $F(1,63) < 1$ , ns;  $F(2,63) < 1$ , ns; respectively). The Extinction trial effect was due to performance decreasing significantly between trials 1 and 2, and 1 and 3 in both the recent memory ( $p < .01$  for both) and the remote memory groups ( $p < .05$  for both). Furthermore, performance significantly differed from random on trials 1 and 2 for the recent memory group ( $p < .001$  and  $p < .05$ , respectively), and on trials 1 and 3 for the remote memory group ( $p < .001$  and  $p < .05$ , respectively). There was a tendency for performance to differ from random on trial 3 for the recent memory group ( $p = .081$ ).

The 2-way ANOVA for number of crossings (Fig. 3C) revealed a significant effect of Extinction trial ( $F(2,63) = 7.8$ ,  $p < .001$ ), but no effect of Delay or of the Delay  $\times$  Extinction trial interaction ( $F(1,63) < 1$ , ns;  $F(2,63) < 1$ , ns; respectively). The Extinction trial effect was due to performances decreasing significantly between trials 1 and 2, and 1 and 3 for the recent memory group ( $p < .001$  for both).

5. Discussion

In the present study, we used two extinction procedures to test to what extent the extinction of a recent memory might be different from that of a remote memory, the underlying idea being that a trace yet unconsolidated at the system level might have been easier to extinguish than a consolidated one (see Frankland & Bontemp, 2005, for a review). We used only three extinction trials, and thus less than in previous studies using a water-maze task (e.g., Morris et al., 2006; Prados et al., 2003; Schulz, Topic, de Souza Silva, & Huston, 2004), because we wanted to minimize the risk of inducing a state of behavioral despair (Schulz et al., 2004). In doing so with a spaced extinction protocol (Experiment 1), we found that rats tested at the 5-day post-acquisition delay showed a decreasing

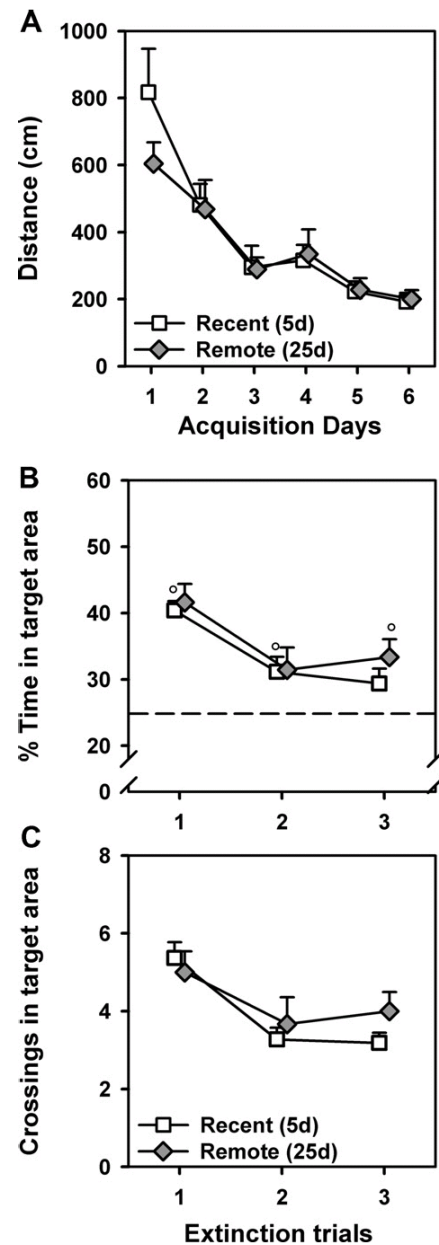


Fig. 3. (A) Average (+SEM) distances of the 4 daily trials to reach the platform during water-maze acquisition in a room with overly-salient cues, in the rats to be tested for retrieval in a first probe trial at either a 5-day (open squares, recent) or 25-day post-acquisition delay (greyish diamonds, remote). There were no significant differences between the two groups. (B and C) Average (+SEM) performances in the extinction trials in the rats tested after a 5-day (open squares, recent) or 25-day (greyish diamonds, remote) post-acquisition delay, in a room with overly-salient cues. Performance is expressed as (B) the percent time spent in the target quadrant (the dashed line in the top figure corresponds to random performance) and (C) the number of times rats crossed the target area. Significantly different from random, i.e., 25%; \* $p < .05$ . There were no significant differences between the two groups.

search consistency towards the target quadrant. Such results reflect the initial phase of extinction during which animals show new learning consisting in disregarding the original memory (for review see Bouton, et al., 2006; Myers & Davis, 2002). In contrast, rats tested at the 25-day delay exhibited growing search consistency towards the former location of the platform over the 2nd



and 3rd extinction trials, suggesting that a remote spatial memory may show some resistance to extinction, at least when a spaced extinction procedure is used.

It is possible that for the remote memory, the representation of the testing context was somewhat degraded, causing performance deterioration on the first probe trial. The increase in performance observed between extinction trials 1 and 2 could therefore be due to a reminding effect. Indeed, with old memories, contextual cue reminders were shown to improve memory retrieval, whereas non-reminded rats exhibited spontaneous forgetting (Gisquet-Verrier & Alexinsky, 1986; Gisquet-Verrier, Dekeyne, & Alexinsky, 1989; Sara, 2000a for a review). This effect was related to conditioned arousal facilitating attention and sensory processing of incoming information during retrieval. However, to be efficient, the context reminder had to be given seconds to minutes before the test, an interval of 1 h causing no such facilitation (Deweer & Sara, 1984). Thus, in Experiment 1, the interval of 24 h between the first two extinction trials might be too long to consider the first trial as a contextual cue-reminder. In addition, when the three probe trials were given consecutively (Experiment 2), both groups showed a similar profile of performance, tending towards extinction. There was no increase in performance on the 2nd extinction trial for the rats tested at the 25-day delay, as would have been expected with a reminder effect.

An alternative hypothesis to account for the difference between recent and remote memory in Experiment 1 would be that after the first extinction trial there is a balance between extinction and reconsolidation of the trace that could shift in favor of extinction (weakening of the expression of the original memory) in the case of a recent memory, and in favor of reconsolidation (stabilization of the original memory) in the case of a remote memory. This idea is strengthened by the fact that in Experiment 2, the extinction trials were given consecutively and thus did not allow sufficient time for a reconsolidation process to occur, thereby explaining the absence of differences between the recent and the remote memory groups. There is some evidence that upon non-reinforced retrieval, consolidated memories may re-enter into a vulnerable state and may then undergo a new stabilization process, referred to as reconsolidation, in order to become lasting or to update information of a previous memory trace (eg. Nader et al., 2000; Roriguez-Ortiz, Garcia-DeLa Torr, Benavidez, Ballesteros M.A., & F., 2008; Sara, 2000a; Sara, 2000b). In some occasions, this phenomenon may induce an enhancement in performance (Frenkel, Maldonado, & Delorenzi, 2005; Tronson, Wiseman, Olausson, & Taylor, 2006). It has also been shown in various conditioning paradigms that the non-reinforced exposure to the learned stimulus results in two competing behavioral phenomena: extinction or reconsolidation. The process that prevails and dominates subsequent behavior is determined in part by the duration or repetition of re-exposure, a brief retrieval triggering reconsolidation processes, and long or repeated retrieval leading to extinction (e.g., Dudai, 2004; Dudai, 2006; Suzuki et al., 2004; see also Eisenhardt & Menzel, 2007, for review). Likewise, the duration of extinction trials was shown to be an important factor in determining whether the original memory or the extinction memory became susceptible to amnesia (Briggs & Riccio, 2007; Power, Berlau, McGaugh, & Steward, 2006; Suzuki et al., 2004). Thus, our results clearly demonstrate in rats that spatial memory retrieval can induce two opposite processes, as previously shown in mice by Suzuki et al. (2004). In addition, we now show that operations underlying the formation of a new memory ("platform no longer there") that competes with the original one ("platform should be there") are different depending on whether the original memory is recent or remote. Based on some aspects of the standard theory of consolidation, it is tempting to speculate that a yet unconsolidated spatial memory at the system level (recent memory), still engaging the hippocam-

pus, is more sensitive to extinction than a consolidated trace (remote memory) whose retrieval might depend additionally on extrahippocampal structures (see Frankland & Bontempi, 2005, for review; Texeira et al., 2006).

Furthermore, it has been shown that initiation of these two competing processes, i.e., extinction and reconsolidation, might also depend on the strength of the reactivated trace (Dudai, 2004; Eisenberg et al., 2003; Nader, 2003; Suzuki et al., 2004). An alternative hypothesis could therefore involve the strength of the memory to be retrieved rather than only its age. In the remote memory system, extinction might be more difficult to achieve due to trace ambiguity resulting from time-dependent degradation. This degradation, also called spontaneous forgetting (Sara, 2000a, for review), might be responsible for the rats' inability to attribute the failure to find the platform to its actual absence, and to integrate this new information. Such a contingency supposes an unambiguous knowledge of the platform location, and thus a clearly interpretable trace, as may have been the case in rats tested for recent memory. Thus, reconsolidation might occur after retrieval when a trace has undergone time-dependent degradation. This hypothesis is in line with Rudy's group's theoretical alternative to the standard theory of consolidation, in which the prefrontal cortex is not a site where remote memories are actually stored, but a structure engaged when, subsequently to time-dependent degradation, memory traces become weaker and more difficult to retrieve (Biedenkapp & Rudy, 2007; Rudy, Biedenkapp, & O'Reilly, 2005). This is also in agreement with Suzuki et al. (2004)'s results showing in a conditioning paradigm that a stronger memory (as may be the case of a recent memory) is more resistant to a reconsolidation blocking agent than a weaker memory (as may be the case of a remote memory). The results of Experiment 3, carried out in a room with overly-salient cues, indicate that with a stronger trace at the 25-day delay, showing no time-dependent degradation, there is no increase in performance after the 1st extinction trial, and extinction follows the same time-course as that of the recent memory group. Nevertheless, while Suzuki et al. (2004) suggest that reconsolidation of a spatial memory is initiated by one probe trial, and that subsequent extinction relies on probe trial repetition, our present data show that the picture could be even more complicated, as the extinction procedure for a remote memory might favor a reconsolidation process, at least with a spaced extinction paradigm and under the condition of partial memory degradation. Further studies are therefore needed to progress on the role of age vs. strength of a memory trace in the balance between reconsolidation and extinction of a spatial memory.

## Acknowledgments

The authors are grateful to O. Bildstein, O. Egesi and G. Edomwony for excellent care of animal colonies. This research has been supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-NEURO-027-04), the ULP, the CNRS, and by a personal Ph.D. fellowship for J. Lopez from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## References

- Berman, D. E., Hazvi, S., Stehberg, J., Bahar, A., & Dudai, Y. (2003). Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: Behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery. *Learning & Memory*, *10*, 16–25.
- Biedenkapp, J. C., & Rudy, J. W. (2007). Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: Implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. *Learning & Memory*, *14*, 200–203.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., & Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature*, *400*(6745), 671–675.
- Bouton, M. E. (1994). Conditioning, remembering, and forgetting. *Journal of experimental Psychology ABP*, *20*, 219–231.

- Bouton, M. E., Westbrook, R. F., Corcoran, K. A., & Maren, S. (2006). Contextual and temporal modulation of extinction: Behavioral and biological mechanisms. *Biology Psychiatry*, *60*(4), 352–360.
- Briggs, J. F., & Riccio, D. C. (2007). Retrograde amnesia for extinction: Similarities with amnesia for original acquisition memories. *Learning & Behavior*, *35*(3), 131–140.
- Deweer, B., & Sara, S. J. (1984). Background stimuli as a reminder after spontaneous forgetting: Role of duration of cueing and cueing-test interval. *Animal Learning and Behavior*, *12*, 238–247.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review Psychology*, *55*, 51–86.
- Dudai, Y. (2006). Reconsolidation: The advantage of being refocused. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*, 174–178.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D. E., & Dudai, Y. (2003). Stability of retrieved memory: Inverse correlation with trace dominance. *Science*, *301*, 1102–1104.
- Eisenhardt, D., & Menzel, R. (2007). Extinction learning, reconsolidation and the internal reinforcement hypothesis. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*, 167–173.
- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Review Neuroscience*, *6*(2), 119–130.
- Frenkel, L., Maldonado, H., & Delorenzi, A. (2005). Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: An outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *European Journal of Neuroscience*, *22*, 1757–1766.
- Gisquet-Verrier, P., & Alexinsky, T. (1986). Does contextual change determine long-term forgetting? *Animal Learning and Behavior*, *14*(4), 349–358.
- Gisquet-Verrier, P., Dekeyne, A., & Alexinsky, T. (1989). Differential effects of several retrieval cues over time: Evidence for time-dependent reorganization of memory. *Animal Learning and Behavior*, *17*(4), 394–408.
- Lattal, K. M., Mullen, M. T., & Abel, T. (2003). Extinction, renewal, and spontaneous recovery of a spatial preference in the water maze. *Behavioral Neuroscience*, *117*(5), 1017–1028.
- Lopez, J., Pereira de Vasconcelos, A., & Cassel, J. C. (2008). Environmental cue saliency influences the vividness of a remote spatial memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *90*, 285–289.
- Maviel, T., Durkin, T. P., Menzaghi, F., & Bontempi, B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science*, *305*(5680), 96–99.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory—A century of consolidation. *Science*, *287*(5451), 248–251.
- Morris, R. G., Inglis, J., Ainge, J. A., Olverman, H. J., Tulloch, J., Dudai, Y., & Kelly, P. A. (2006). Memory reconsolidation: Sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*, *50*(3), 479–489.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, *36*(4), 567–584.
- Myers, K. M., Ressler, K. J., & Davis, M. (2006). Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learning & Memory*, *13*(2), 216–223.
- Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends in Neuroscience*, *26*(2), 65–72.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Ledoux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, *406*, 722–726.
- Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned reflexes. An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. London, UK: Oxford University Press.
- Pedreira, M. A., & Maldonado, H. (2003). Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*, *38*, 863–869.
- Power, A. E., Berlau, D. J., McGaugh, J. L., & Steward, O. (2006). Anisomycin infused into the hippocampus fails to block “reconsolidation” but impairs extinction: The role of re-exposure duration. *Learning & Memory*, *13*(1), 27–34.
- Prados, J., Manteiga, R. D., & Sansa, J. (2003). Recovery effects after extinction in the Morris swimming pool navigation task. *Learning and Behavior*, *31*(3), 299–304.
- Rescorla, R. A. (2004). Spontaneous recovery varies inversely with the training–extinction interval. *Learning & Behavior*, *32*(4), 401–408.
- Roriguez-Ortiz, C. J., Garcia-DeLa Torre, P., Benavidez, E., Ballesteros, M. A., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*, 352–359.
- Rudy, J. W., Biedenkapp, J. C., & O’Reilly, R. C. (2005). Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: An alternative view. *Learning & Memory*, *12*(5), 445–446.
- Sara, S. J. (2000a). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning & Memory*, *7*, 73–84.
- Sara, S. J. (2000b). Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nature Review Neuroscience*, *1*, 212–213.
- Schulz, D., Topic, B., de Souza Silva, M. A., & Huston, J. P. (2004). Extinction-induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: A possible model for depression? *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(2), 128–141.
- Squire, L. R., & Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: A neurobiological perspective. *Current Opinion Neurobiology*, *5*(2), 169–177.
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., de Souza Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, *24*(20), 4787–4795.
- Teixeira, C. M., Pomedli, S. R., Maei, H. R., Kee, N., & Frankland, P. (2006). Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *Journal of Neuroscience*, *26*(29), 7555–7564.
- Tronson, N. C., Wiseman, S. L., Olausson, P., & Taylor, J. R. (2006). Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nature Neuroscience*, *9*, 167–169.
- Winer, B. J. (1971). *Statistical principles in experimental design*. New York: McGraw Hill.

## Publication 3 (article soumis) :

### Interactions hippocampo-préfrontales

Dans la mesure où l'âge et la force de la trace sont souvent des facteurs confondus, et qu'ils pourraient chacun avoir un impact et/ou interagir sur la réorganisation spatio-temporelle d'une trace mnésique, il semblait pertinent d'évaluer les interactions hippocampo-néocorticales en fonction de ces deux paramètres, et ceci dans le contexte des différentes théories sur la consolidation systémique et de la Théorie de Rudy. Afin de démontrer que le mPFC est effectivement uniquement impliqué dans la récupération d'une trace dégradée, il y a deux méthodes possibles. La première est de moduler les protocoles d'acquisition pour obtenir soit une trace mnésique récente dégradée soit une trace ancienne non dégradée, afin de comparer les structures impliquées dans le rappel du souvenir. La deuxième méthode consiste à utiliser un seul et même protocole et à faire varier le degré de dégradation de la trace en modifiant les indices présents dans la pièce de test. Au travers des publications précédentes, nous avons justement constaté que le même protocole dans les deux salles de piscine utilisées, le contexte 'standard' et le CEC, permettait d'obtenir des performances différentes lors de la rétention. Dans le contexte 'standard' on note une dégradation de la trace avec le temps, alors que dans le CEC, il n'y a aucune dégradation de la trace à 25 jours post-acquisition. Les conditions étaient donc réunies pour tester en particulier la Théorie de Rudy.

Pour cela nous avons d'abord employé une technique d'imagerie cellulaire avec le gène précoce *c-fos*, utilisé comme marqueur d'activité neuronale, afin de mesurer l'activité de l'hippocampe dorsal et du mPFC pendant la récupération d'un souvenir récent vs. ancien dans les deux contextes. Les résultats montrent qu'il y a effectivement une activité différente selon le degré de dégradation de la trace mnésique ancienne. En effet, l'hippocampe dorsal et le cortex cingulaire antérieur sont plus fortement activés pendant la récupération d'une trace ancienne que pendant celle d'une trace récente, et cela uniquement dans le CEC où il n'y a pas de dégradation de la trace. Le rôle important de ces deux régions a été confirmé par l'expérience d'inactivation fonctionnelle réversible de l'hippocampe dorsal ou du mPFC à 5 ou 25 jours post-acquisition dans le CEC. Dans cette 2<sup>ème</sup> expérience, l'inactivation de l'hippocampe affecte les performances aux deux délais, alors que l'inactivation du mPFC

affecte les performances uniquement à 25 jours. Ces données ne valident donc pas la Théorie de Rudy et n'étayent pas non plus complètement la Théorie Standard ou la Théorie des Traces Multiples. En revanche, ces résultats montrent pour la première fois l'influence de l'interaction entre l'âge et la qualité de la trace mnésique sur les structures impliquées dans le rappel.

**BEHAVIORAL/SYSTEMS/COGNITIVE NEUROSCIENCE**

**Contextual cue saliency modulates cortical recruitment during spatial remote memory retrieval in rats.**

Abbreviated title: Impact of cue saliency on systems consolidation.

Joëlle Lopez<sup>a</sup>, Anne Pereira de Vasconcelos<sup>a</sup>, Karin Herbeaux<sup>a</sup>, Brigitte Cosquer<sup>a</sup>, Michel Engeln<sup>a</sup>, Christophe Muller<sup>a</sup>, Christine Lazarus<sup>a</sup>, Christian Kelche<sup>a</sup>, Bruno Bontempi<sup>b</sup>, Jean-Christophe Cassel<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, FRE 3289 Université de Strasbourg/CNRS, IFR 37 des Neurosciences, GDR CNRS 2905 Neuromem, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France

<sup>b</sup> CNIC, CNRS UMR 5228, Université de Bordeaux 1, Avenue des Facultés Bâtiment B2, 33405 Talence Cedex

Correspondence should be addressed to:

Dr Jean Christophe Cassel

LINC, FRE 3289 UdS/CNRS

12 rue Goethe

F-67000 Strasbourg

France

Tel. xx 33 3 68 85 19 52

Fax. xx 33 3 68 85 19 58

E-mail: jean-christophe.cassel@linc.u-strasbg.fr

**Figures:** 15 (+ 2 in Supplemental material)

**Tables:** 0 (+ 5 tables in Supplemental material)

**Text pages:** 32 (+5 in Supplemental material)

**# words in Abstract:** 250

**# words in Introduction:** 500

**# words in Discussion:** 1499

**Keywords:** Cortex – Hippocampus – Rat – Remote memory – Retrieval – Water maze

## **Acknowledgements**

The authors are grateful to O. Bildstein, D. Egesi, and G. Edomwonyi for their assistance in animal care. The authors acknowledge Dr. Astrid Nehlig for providing all facilities necessary for running the metabolic study. This research was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-NEURO-027-04), the UdS, the CNRS, the INSERM and a 3-year Ph.D. fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche awarded to J.Lopez.

**Abstract**

Reorganization of hippocampal-cortical networks occurs as memories mature over time, a process known as systems consolidation. Accordingly, recently-acquired memories dependent on the hippocampus become additionally (or exclusively) dependent on extra-hippocampal structures, including the prefrontal cortex which is thought to be crucial for remote memory expression. Whether the status of existing knowledge in the cortex modulates the dynamics of hippocampal-cortical interactions remains unclear. Here we examined whether contextual cue saliency during training influences involvement of cortical structures upon remote memory retrieval. Using c-Fos imaging, we compared neuronal activation in the hippocampus and the medial prefrontal cortex (mPFC) after recent (5-days) or remote (25-days) spatial memory retrieval in a water-maze task, in a standard (STC) or a cue-enriched (CEC) context. Rats tested in the CEC showed no time-dependent memory degradation, unlike rats tested in the STC. In the CEC, the hippocampus exhibited increased c-Fos expression upon remote memory retrieval, unlike in the STC where no such time-dependent change was observed. Furthermore, increased c-Fos expression was found in the anterior cingulate cortex after remote but not recent memory retrieval in the CEC. Consistent with c-Fos imaging, reversible inactivations in the CEC revealed that the hippocampus was necessary at both delays, whereas the mPFC was only recruited for remote memory retrieval. While confirming that neuronal circuits supporting spatial memory consolidation are reorganized in a time-dependent manner, our findings further indicate that mPFC recruitment is dependent on the quality of the memory, and thus on the conditions in which memories are formed and subsequently recalled.

## Introduction

Hippocampal damage results in anterograde and temporally-graded retrograde amnesia, older memories being typically better preserved than recent ones (Squire et al., 2001). When a memory ages, it is thought that after its initial dependence on the hippocampus, it undergoes a system-level consolidation process, by which progressive strengthening of cortical connections provides support to its storage and retrieval (Frankland and Bontempi, 2005). The idea of a time-limited role of the hippocampus in consolidation and retrieval – the so-called standard theory of consolidation (Squire and Alvarez, 1995) – is compatible with the temporally-graded retrograde amnesia observed in patients with medial temporal lobe damage (e.g., Squire et al., 2001) and with findings in animals (e.g., Anagnostaras et al., 1998; Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004, Teixeira et al., 2006). Not all results, however, support this view. In rodents, post-acquisition hippocampal lesions or inactivations may disrupt both recent and remote memory retrieval (e.g., Broadbent et al., 2006; Clark et al., 2005a; Epp et al., 2008; Martin et al., 2005; Winocur et al., 2005), thus supporting the multiple trace theory (e.g., Nadel et al., 2001) which favors a permanent involvement of the hippocampus. The divergence between these two theories could partly be explained by a functional peculiarity of the hippocampus in the treatment of richly-contextualized information. Thus, the hippocampus might remain a crucial actor for expression of context-rich information, no matter how old the memory is (e.g., Moscovitch et al., 2006). However, Wang et al. (2009) recently showed that retrieving a precise richly-contextualized fear memory does not necessarily require the hippocampus. Another point of debate concerns the role of the neocortex during the retrieval of remote memories. Is it engaged as the locus of remote memories or because it is essential for efficient activation of a memory having lost details or strength (Rudy et al., 2005)? Interestingly, according to Rudy et al., retrieving a weak memory would require a prefrontal cortex-triggered boost. One way to test this idea would consist in comparing cortical activation during recent memory retrieval in animals subjected to different levels of training associated with different memory strengths. If Rudy et al. are correct, the strongest cortical activation should be observed in animals given the least training. Another plausible strategy would consist in training animals to identical levels of acquisition in environments enabling comparable recent memory performance, but resulting later on in a differential degradation of remote memory performance. We recently reported that cue saliency in the acquisition context influences the vividness of a remote spatial memory (Lopez et al., 2008a). Building herein upon these findings, we compared the hippocampus and medial prefrontal cortex's patterns of activation using c-Fos imaging following recent vs. remote memory retrieval in rats having learned a water-maze spatial task, either in a cue-enriched context (CEC: no degradation of performance with time), or in a standard one (STC: time-dependent trace degradation). We



then adopted a targeted pharmacological approach to inactivate one or the other structure during recent or remote memory retrieval in the CEC.

## Results

### **Experiment 1: Recent and remote memory performance in cue-enriched vs. standard contexts**

In a previous experiment (Lopez et al., 2008a), we found that the saliency of distal cues influenced the vividness of remote memory of a platform location in a water maze. The experiment was carried out in two steps, starting with cue-impoverished conditions and, after completely repainting the room, switching to cue-enriched ones (CEC). In the CEC, no time-dependent degradation of the remote memory trace was observed. This contrasted with previous experiments in our laboratory, carried out in a different room with standard cues (STC), and in which time-dependent degradation of the memory trace occurred (see Lopez et al., 2008b). This experiment was therefore designed to confirm the different performances found in these two water-maze contexts (STC and CEC), in order to perform the currently reported brain imaging experiment in two environments in which the memory trace evolved differently with time.

### **Methods**

#### *Animals and apparatus*

Forty male Long-Evans rats (3 months-old, 250-300g) were housed individually in quiet facilities, under a 12 h light-dark cycle (light on at 7:00h), with free access to food and water. All experiments were performed in accordance with the rules and guidelines of the European Committee Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (personal authorization licenses n°67-215 for J-C.C. and n°67-7 for A.P.V; other authors under the formers' responsibility). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used to a reasonable amount regarding statistical constraints.

The characteristics of the water-maze task (pool diameter of 160 cm) have been described previously (Pereira de Vasconcelos et al., 2006), as well as the cued-enriched context (CEC) in which the experiment took place (Lopez et al., 2008a). It is illustrated in Figures 1A and B. The standard context (STC) consisted of an identical water-maze and room size, but with less salient distal cues (racks, tables, chairs, geometrical shapes on the walls), as shown in Figures 1C and D.



**Figure 1:** Different views of the standard (STC; **A** and **B**) and cue-enriched (CEC; **C** and **D**) contexts in which rats were trained over 6 days and then tested for a probe trial 5 or 25 days after the end of spatial acquisition. From about the centre of the water maze, **A** is a South-Eastern view and **B** a North-Eastern view of the STC. **C** is a South-Western view and **D** a North-slightly Eastern view of the CEC.

### *Experimental paradigm*

The experimental paradigm was identical for both contexts. The first training day consisted of a 4-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, 1 cm above the water surface, painted black, in the center of the SE quadrant). Then, using a different platform location (center of the NW quadrant), the rats were given 4 successive daily training (or acquisition) trials over 6 consecutive days, during which they learned the location of a hidden platform. For each trial, the rat was released into the pool, facing the wall from one of four starting points (north, south, east or west). Release occurred in a random order. Animals were allowed a maximum of 60 s to find the platform, on each trial and every day. Once the rat had climbed onto the platform, it was allowed to stay there for 10 s before being removed and gently placed at the next starting point. If the rat did not find the platform on time, it was gently guided to the platform by the experimenter. It was allowed to stay on the platform for 10 s before the next trial was started. The distance travelled before reaching the platform was computed by a videotracking system (Ethovision, Noldus, Netherlands for the STC; Smart, Panlab, Spain for the CEC). One group was then tested for retention 5 days post-acquisition (recent memory,  $n = 10$  in each context), while the other one was tested 25 days post-acquisition (remote memory,  $n = 10$  in each context), after randomization according to the rats' acquisition performances. For the probe trial, the platform was removed and the animals were allowed 60 s to swim. An accuracy ratio (see Koenig et al., 2008), based on the time spent in the target quadrant ( $T_{QT}$ ) multiplied by 3, divided by the sum of the total time

spent in the other three quadrants ( $T_{Q1}$ ,  $T_{Q2}$ ,  $T_{Q3}$ ), was used to evaluate retention. The number of crossings in the target area, corresponding to the size of the platform enlarged by a 10 cm wide annulus, were analyzed and used as an index of memory precision.

### *Statistical analyses*

A 2-way ANOVA considering Delay (5 days, 25 days) and Day (1 to 6) as factors was performed to analyze the acquisition data. For the probe trial, a 2-way ANOVA using Delay and Context as factors was used to analyze the accuracy ratios and the number of crossings, and one-sample  $t$  tests were used to determine if the accuracy ratio differed from chance (i.e., from 1.0). The Newman-Keuls multiple range test (Winer, 1971) was used to perform multiple comparisons, using  $p < 0.05$  for significance.

## Results

### *Acquisition*

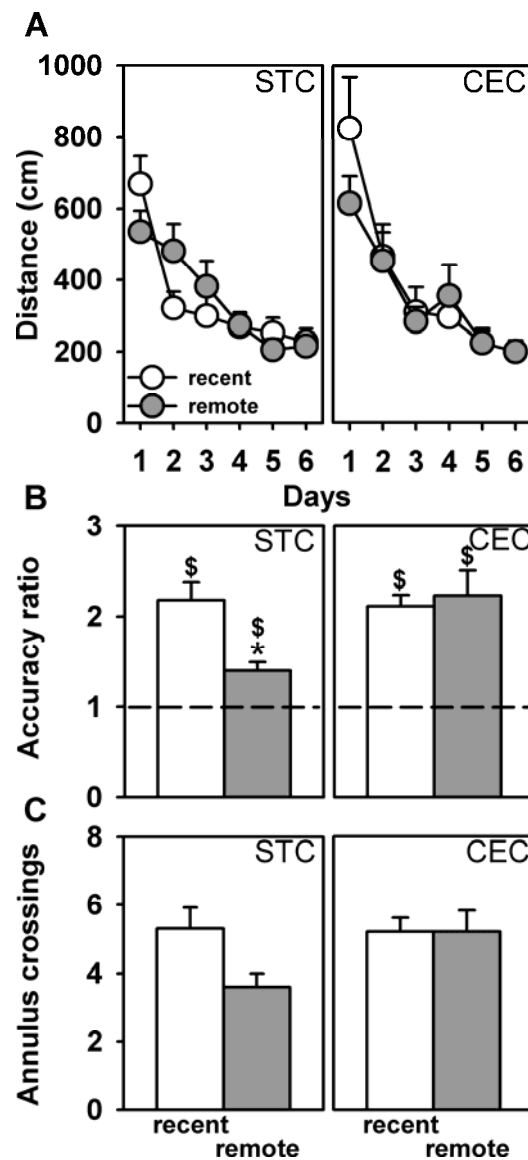
Performance during acquisition of the task is shown in Figure 2A. All groups showed improvement over days (Day effect:  $F_{(5, 180)} = 33.2$ ;  $p < 0.001$ ), reflecting learning of the platform location. No significant differences were found between training contexts ( $F_{(1,36)} < 1$ , ns) or delay groups ( $F_{(1,36)} < 1$ , ns), and none of the interactions showed a significant effect (Context x Delay:  $F_{(1,36)} < 1$ , ns; Day x Context:  $F_{(5,180)} = 1.08$ , ns; Day x Delay:  $F_{(5,180)} = 2.15$ , ns; Day x Context x Delay:  $F_{(5,180)} < 1$ , ns).

### *Probe trials*

Probe trial performance is illustrated in Figures 2B and 2C. A significant Context effect was found for the accuracy ratios ( $F_{(1, 36)} = 4.3$ ,  $p < 0.05$ ), rats spending significantly more time in the target quadrant in the CEC than in the STC. There was also a tendency for a Delay effect ( $F_{(1, 36)} = 3.2$ ;  $p = 0.08$ ), and the Context x Delay interaction was significant ( $F_{(1, 36)} = 5.9$ ;  $p < 0.05$ ). Indeed, rats tested 25 days post-acquisition in the STC spent significantly less time in the target quadrant than rats tested at the 5 day post-acquisition delay in the same context ( $p < 0.05$ ), and than rats tested in the CEC regardless of the delay (5 days:  $p < 0.01$ ; 25 days:  $p < 0.05$ ). In the CEC, no difference in performance was found between the 2 delays. Nevertheless, all mean accuracy ratios were significantly above chance (STC 5 days:  $t_{(9)} = 6.1$ ,  $p < 0.001$ ; STC 25 days:  $t_{(9)} = 4.2$ ,  $p < 0.01$ ; CEC 5 days:  $t_{(9)} = 9.0$ ,  $p < 0.001$ ; CEC 25 days:  $t_{(9)} = 4.5$ ,  $p < 0.01$ ), reflecting memory of the platform's location in all groups.

Regarding the mean number of crossings in the target area (Figure 2C), no significant effect was found, whether for the Delay ( $F_{(1,36)} = 2.61$ , ns.) or Context factors ( $F_{(1,36)} = 2.03$ , ns.), or

for the Delay x Context interaction ( $F_{(1,36)} = 2.61$ , ns.). It is nevertheless noteworthy that performance in the STC rats tested 25 days post-acquisition was weaker than that found in their counterparts tested 5 days post-acquisition. Thus, while all rats could remember the platform's location, probe trial performance was degraded in the STC at the 25-day delay; such degradation was not found in the CEC.



**Figure 2: A)** Average distances to reach the platform during water-maze acquisition in the rats subsequently tested for retrieval in a probe trial at a 5-day or a 25-day post-acquisition delay, in a standard context (STC) or in a cued-enriched context (CEC). **B)** Average performance for the probe trial, after a 5-day or a 25-day post-acquisition delay. Performance is expressed as the accuracy ratio (thrice the time spent in the target quadrant divided by the sum of the time spent in each of the three other quadrants; random performance (dashed line) = 1.0). **C)** Number of crossings in the target area during the probe trial.

**Experiment 2: Patterns of c-Fos activation after retrieval of a recent vs. remote memory trace in cue-enriched vs. standard contexts**

This imaging experiment was designed to compare c-Fos expression patterns in the hippocampus and medial prefrontal cortex during recent and remote memory retrieval in the two different contexts.

**Methods**

*Animals and apparatus*

Eighty-two male Long-Evans rats (3 months-old, 250-300g) were housed in the same conditions as in Experiment 1.

*Experimental paradigms*

Hidden platform condition (Hidden):

The water-maze characteristics and procedures were the same as those of Experiment 1. Rats were handled regularly to minimize stress on the day of the probe trial. Rats were then tested in a probe trial after a 5 (recent memory:  $n_{STC} = 8$ ,  $n_{CEC} = 11$ ) or 25 (remote memory:  $n_{STC} = 9$ ,  $n_{CEC} = 13$ ) day post-acquisition delay.

Cued visible platform condition (Visible):

The first training day was identical to that of the Hidden group. For the next six days, the rats were given 4 successive daily training trials during which they had to swim to the visible platform whose location changed after each trial. One group was then tested 5 days post-acquisition (recent memory,  $n_{STC} = 7$ ,  $n_{CEC} = 7$ ), while the other one was tested 25 days post-acquisition (remote memory,  $n_{STC} = 8$ ,  $n_{CEC} = 7$ ), after randomization according to the rats' acquisition performances. For this test session to be as close as possible to the probe trial's conditions, the visible platform was located where the hidden platform used to be for the Hidden group, and rats were released from the same starting point. Rats were handled regularly to minimize stress on the day of the probe trial.

Curtain condition (Curtain):

Training and testing were identical to that of the Visible group, but a plain shower curtain surrounded the pool in order to prevent any access to environmental cues and thus incidental encoding of spatial information. One group was tested 5 days post-acquisition (recent memory,  $n = 8$ ), while the other one was tested 25 days post-acquisition (remote memory,  $n = 7$ ), after randomization according to the rats' acquisition performances. Rats were handled regularly to minimize stress on the day of the probe trial.

Home Cage condition (HC):

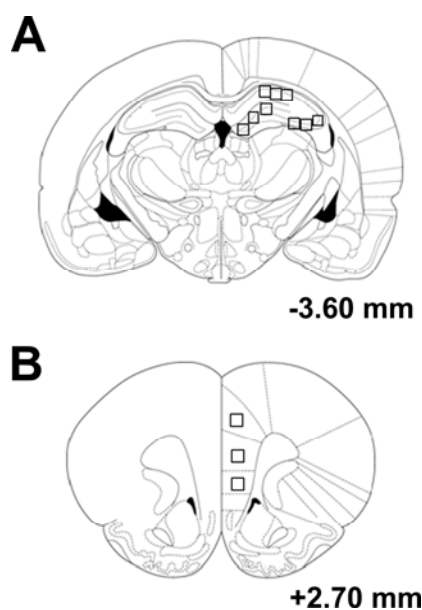
Rats were handled regularly, including the day preceding sacrifices. Half of the rats were sacrificed at the same time as the rats from the recent memory groups ( $n_{STC} = 3$ ,  $n_{CEC} = 5$ ), and the other half at the same time as the rats from the remote memory groups ( $n_{STC} = 3$ ,  $n_{CEC} = 5$ ).

#### *Histology and c-Fos immunohistochemistry*

Ninety minutes after the end of behavioral testing, rats received an overdose of sodium pentobarbital (200 mg/kg, ip), were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA, in 0.1M PBS; 4°C), and the brains were post-fixed for 2h (4% PFA) before cryoprotection for 48h (at 4°C) in a 20% sucrose solution (in PBS). The brains were then snap-frozen (isopentane, -40°C) and kept at -80°C. Fifty-micrometer coronal sections of the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus were made (Reichert Jung cryostat, Frigocut 2800), and the free-floating sections were prepared for immunohistochemistry. An anti-Fos primary rabbit polyclonal antibody (1:4000, Rabbit anti-Fos polyclonal IgG; Santa Cruz, USA) was used, as well as a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:500, Biotin-SP-conjugated affiniPure Goat anti-rabbit IgG; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Staining was revealed with the avidin-biotin peroxidase method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) coupled to diaminobenzidine. Quantitative analysis of Fos-positive nuclei was performed, blind to the experimental conditions, in the CA1, CA3, and Dentate Gyrus (DG) for the dorsal hippocampus (-3.60 to -3.80mm from Bregma; Figure 3A), and in the anterior cingulate cortex (ACC), prelimbic cortex (PL), and infralimbic cortex (IL), for the medial prefrontal cortex (+3.20 to +2.70 mm from Bregma; Figure 3B) as defined by the Paxinos and Watson brain atlas (1998). Images of each region were obtained using a microscope (Olympus: Vanox AHB3; x 40 objective) equipped with a digital camera. For each animal, Fos-positive nuclei were counted bilaterally, using the Image J processing system, in 3 consecutive sections of the regions of interest, before being averaged.

#### *Statistical analyses*

The statistical analyses performed for the behavioral data were identical to those of Experiment 1. For the c-Fos quantification, a 1-way ANOVA was performed for each region using Group (STC 5days Hidden, STC 25days Hidden, STC 5days Visible, STC 25days Visible, CEC 5days Hidden, CEC 25days Hidden, CEC 5days Visible, CEC 25days Visible) as a factor. Due to heterogeneity of the variances, all data were square root transformed before the ANOVAs were performed. One-sample t-tests were also used to compare values with the Curtain condition (ie. 100%).



**Figure 3:** Schematic coronal sections of the dorsal hippocampus (A) and medial prefrontal cortex (B), showing the regions in which c-Fos expression was quantified. The anteriority level of each section is given in mm according to Bregma (Paxinos and Watson, 1998).

## Results

### *Acquisition of the hidden platform's location*

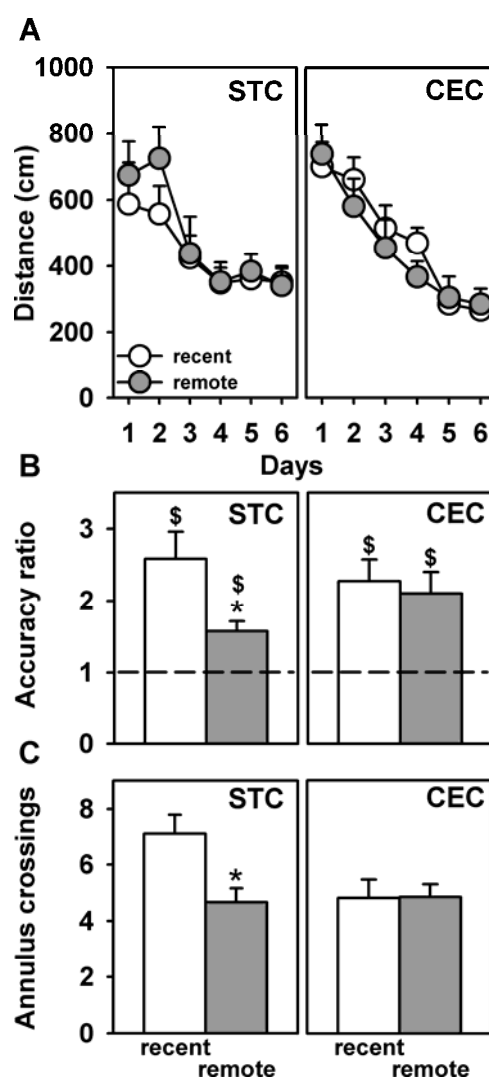
Spatial acquisition of the task is illustrated in Figure 4A. All groups showed improvement over days ( $F_{(5, 185)} = 20.7$ ;  $p < 0.001$ ), reflecting learning of the platform location. No significant differences were found between training contexts ( $F_{(1,37)} < 1$ , ns.) or delay groups ( $F_{(1,37)} < 1$ , ns.), and no significant interaction effects were observed (Context x Delay:  $F_{(1,37)} < 1$ , ns.; Day x Context:  $F_{(5,185)} = 1.15$ , ns.; Day x Delay:  $F_{(5,185)} < 1$ , ns.; Day x Context x Delay:  $F_{(5,185)} < 1$ , ns.). Performance recorded in both control groups (Visible and Curtain conditions) are shown as supplemental data (Figure S1 A and B).

### *Probe trial*

The mean accuracy ratios are illustrated in Figure 4B, and representative swim tracks from each context group at each delay are shown in Figure 5. The ANOVA showed no significant effect of Context ( $F_{(1,37)} < 1$ , ns) and no significant Context x Delay interaction ( $F_{(1,37)} = 1.95$ , ns). A significant Delay effect was found ( $F_{(1, 37)} = 3.89$ ,  $p < 0.05$ ), rats having a tendency to spend significantly more time in the target quadrant at the 5 day-delay. Nevertheless, all mean accuracy ratios were significantly above chance (STC 5 days:  $t_{(7)} = 4.2$ ,  $p < 0.01$ ; STC 25 days:  $t_{(8)} = 4.0$ ,  $p < 0.01$ ; CEC 5 days:  $t_{(11)} = 4.8$ ,  $p < 0.001$ ; CEC 25 days:  $t_{(12)} = 3.7$ ,  $p < 0.01$ ), reflecting memory of the platform's location for all groups.

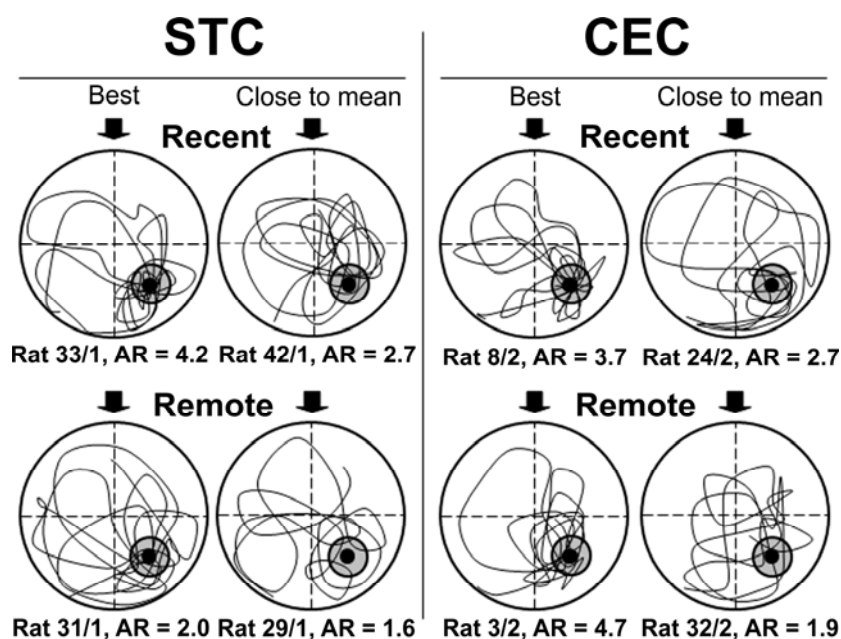
The mean number of crossings in the target area is shown in Figure 4C. The analysis of variance showed a tendency effect of Context ( $F_{(1,37)} = 3.45$ ,  $p = 0.071$ ), as well as a

significant effect of Delay ( $F_{(1,37)} = 4.50$ ;  $p < 0.05$ ). Rats tended to cross the platform more often at the 5-day delay ( $p = 0.08$ ). Furthermore, a significant Context x Delay interaction was found ( $F_{(1,37)} = 4.71$ ;  $p < 0.05$ ). Indeed, rats tested in the STC at the 5-day delay crossed the target area significantly more often than their counterparts tested at the 25-day delay or than both groups of rats tested in the CEC ( $p < 0.01$  for CEC 25 days, and  $p < 0.05$  for all other groups). Among these three groups, there were no significant differences. As was the case in Experiment 1, all rats remembered the platform's location, but probe trial performance was degraded at the 25-d delay for rats trained and tested in the STC; such time-dependent trace degradation was not observed in the CEC.



**Figure 4:** **A)** Average distances to reach the platform during water-maze acquisition in the rats subsequently tested for retrieval in a probe trial at a 5-day or a 25-day post-acquisition delay, in a standard context (STC) or in a cued-enriched context (CEC). **B)** Average performance for the probe trial, after a 5-day or a 25-day post-acquisition delay. Performance is expressed as the accuracy ratio (thrice the time spent in the target quadrant divided by the sum of the time spent in each of the three other quadrants; random performance (dashed line) = 1.0). **C)** Number of crossings in the target area during the probe trial.





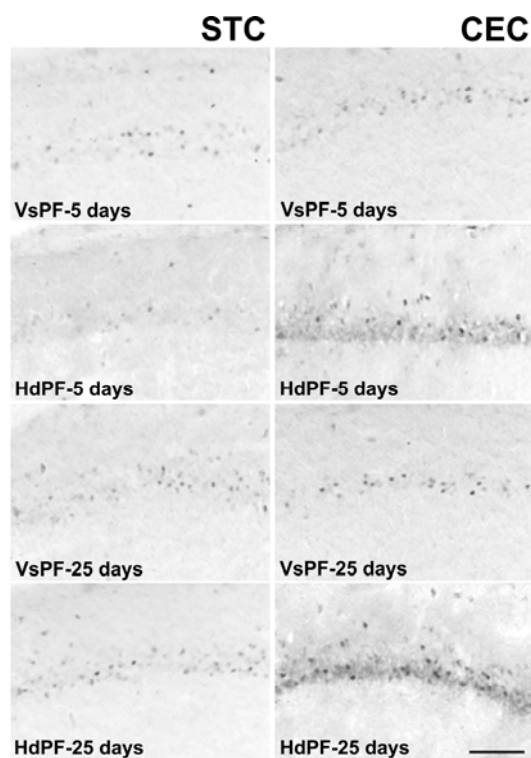
**Figure 5:** Swim tracks recorded during the probe trial from rats trained and tested in the standard (STC) or the cue-enriched (CEC) context after a 5-day (recent) or a 25-day (remote) post-acquisition delay. The tracks were taken from the rats that showed the best (Best) performance (as deduced from the highest accuracy ratio, AR) and from those whose performance was closest to the group mean (Close to mean), in each context and for each post-acquisition delay. Indication left to the AR value refers to the identity of each rat.

#### *Quantitative analysis of c-Fos expression patterns*

Typical examples of c-Fos expression patterns in the different testing conditions are shown in separate figures for CA1 and the ACC (Figures 6 and 8; see Figure S2 in the Supplemental material for Home Cage and Curtain conditions). Before any analysis, all data were normalized with respect to those of rats tested in the Curtain condition (see Tables S1, S2, S3, S4 in Supplemental material for absolute values). In rats that never experienced the water maze (Home Cage condition), the level of c-Fos expression was most often below (occasionally close to, but never exceeding) that found in rats trained in the Curtain condition. A 3-way ANOVA considering Control Experience (Home Cage, Curtain), Delay (5 and 25 days) and Region (CA1, CA3, DG, ACC, PL and IL) as factors revealed a significant overall effect of Control Experience ( $F_{(1,38)} = 6.9, p < 0.05$ ). Indeed, rats trained in the Curtain condition showed higher overall c-Fos expression levels than their Home Cage counterparts (in average +25 %). No significant effect of Delay ( $F_{(1,38)} = 2.3, ns$ ), Region ( $F_{(5,190)} < 1.0, ns$ ), or of any of the interactions ( $F_{(1,38)}$  or  $F_{(5,190)} < 1.3, ns$ ) was found.

For further analysis, data from the Home Cage condition were no longer considered, and those from the Curtain condition were used as the reference for normalization of c-Fos expression levels observed in the CEC and the STC, for both the Visible and Hidden platform conditions. A Context x Condition (Hidden, Visible) x Delay x Region ANOVA showed

significant effects of Context ( $F_{(1,60)} = 6.1, p < 0.05$ ), Condition ( $F_{(1,60)} = 8.2, p < 0.01$ ) and Delay ( $F_{(1,60)} = 7.5, p < 0.01$ ). Overall activation patterns were significantly higher in the CEC (vs. STC), in the Hidden (vs. Visible) condition and at the 25-day (vs. 5-day) delay. A significant interaction effect was also found between Context and Condition ( $F_{(1,60)} = 7.7, p < 0.01$ ). Indeed, overall activation patterns were significantly higher in the CEC in the Hidden condition than in the Visible one and than in the STC (at least +112%) regardless of Condition, the latter three conditions not being different from each other. A significant Context x Delay interaction was also found, rats tested at the 25-day delay in the CEC showing at least a 92% increase of overall c-Fos expression, as compared to rats tested at the 5-day delay in the CEC or to either delay in the STC. An overall effect of Region was also found ( $F_{(5,300)} = 9.1, p < 0.001$ ), c-Fos activation being significantly stronger in the ACC than in any of the 5 other regions ( $p < 0.01$  at least), and significantly weaker in CA3 than in any of the other regions ( $p < 0.05$  at least). Activation was also significantly lower in the PL than that in the IL ( $p < 0.05$ ). Regional activation during the memory retrieval task was dependent on both Context and Condition, but not on the post-acquisition delay, as the Region x Condition x Context interaction was significant ( $F_{(5,300)} = 8.8, p < 0.001$ ), unlike the Region x Condition x Context x Delay interaction ( $F_{(5,300)} = 1.4, ns$ ). To refine the analysis, we then focused on each region.



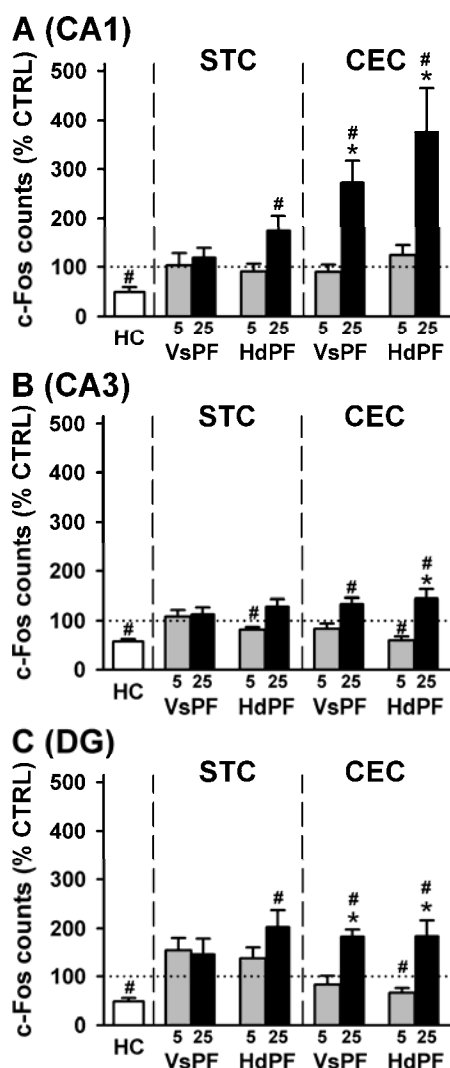
**Figure 6:** Typical examples of c-Fos expression patterns, as observed in the CA1 region of the hippocampus of rats tested in the standard (STC) or cue-enriched (CEC) contexts during retrieval of a recent (5 days post-acquisition) or a remote (25 days post-acquisition) memory. The scale bar represents 100 $\mu$ m.

*Dorsal Hippocampus: CA1 region*

The data expressed in % Curtain controls are illustrated in Figure 7A. A one-way ANOVA using Group (STC 5days Hidden, STC 25days Hidden, STC 5days Visible, STC 25days Visible, CEC 5days Hidden, CEC 25days Hidden, CEC 5days Visible, CEC 25days Visible) as factor revealed an overall Group effect ( $F_{(7,60)} = 6.09$ ;  $p < 0.0001$ ). Indeed, c-Fos expression was higher in rats tested at the 25-day delay in the CEC Hidden condition than in those tested at the 5-day delay ( $p < 0.01$  for all groups), regardless of Context or Condition, and than in those tested in the STC 25days Hidden condition ( $p < 0.05$ ). However, no significant difference was found with the c-Fos expression of rats tested in the CEC 25days Visible condition ( $p > 0.05$ ). In the STC, no difference was found between the two delays, regardless of Condition ( $p > 0.05$ ). Furthermore, c-Fos expression of rats tested at the 25-day delay was significantly higher than that of the Curtain controls in the Hidden condition of both contexts (STC:  $t_{(8)} = 2.32$ ,  $p < 0.05$ ; CEC:  $t_{(12)} = 4.11$ ,  $p < 0.01$ ), and in the CEC Visible condition ( $t_{(5)} = 4.14$ ,  $p < 0.01$ ). The other groups did not differ significantly from the Curtain condition ( $p > 0.05$ ). Thus, a significant difference in c-Fos expression pattern was observed between the two contexts.

*Dorsal Hippocampus: CA3 region*

The data expressed in % Curtain controls are shown in Figure 7B. The 1-way ANOVA showed a significant Group effect ( $F_{(7,60)} = 5.34$ ;  $p < 0.0001$ ). Post-hoc analyses revealed that c-Fos expression of rats tested in the CEC Hidden condition was significantly higher at the 25-day delay than at the 5-day delay ( $p < 0.01$ ). No such difference was observed in the STC ( $p > 0.05$ ). There also tended to be greater c-Fos expression in rats tested in the CEC Visible condition at the 25-day delay than in those tested at the 5-day delay ( $p = 0.09$ ). No significant difference was found between the 5days Hidden and Visible conditions or between the 25days Hidden and Visible conditions, regardless of Context ( $p > 0.05$  for all groups). In addition, c-Fos expression in rats tested in the CEC 25days Hidden and Visible conditions was significantly higher than in rats tested in the Curtain condition (Hidden:  $t_{(12)} = 2.23$ ,  $p < 0.05$ ; Visible:  $t_{(5)} = 2.84$ ,  $p < 0.05$ ). In contrast, c-Fos expression was significantly lower in rats tested in the 5days Hidden condition in both contexts (STC:  $t_{(7)} = -3.22$ ,  $p < 0.05$ ; CEC:  $t_{(10)} = -5.22$ ,  $p < 0.001$ ) than in rats tested in the Curtain condition. The other groups did not differ significantly from the Curtain controls ( $p > 0.05$ ). A significant difference in c-Fos expression pattern was therefore observed between the two contexts.



**Figure 7:** Quantitative analysis of c-Fos-positive nuclei in the dorsal hippocampus after retrieval in a water-maze task in a standard (STC) or a cued-enriched (CEC) context. Data are expressed as a percentage of Curtain controls. HC = Home Cage condition; VsPF = Visible condition; HdPF = Hidden condition. Significantly different from the Curtain condition: #  $p < 0.05$  (t-test: average vs. 100%); significantly different from the 5 days group of the same condition: \*  $p < 0.05$ .

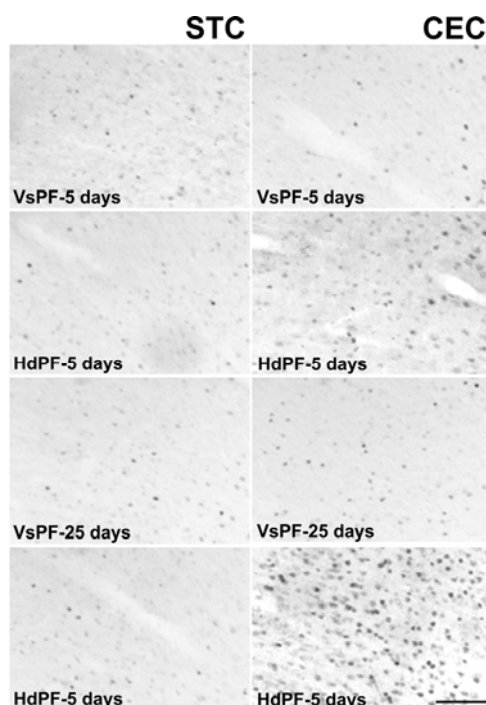
#### *Dorsal Hippocampus: DG region*

Figure 7C represents the data expressed in % Curtain controls. A significant overall Group effect was found ( $F_{(7,60)} = 3.92$ ;  $p < 0.01$ ). Further analysis showed a significantly higher level of c-Fos expression in rats tested in the CEC at the 25-day delay than at the 5-day delay, regardless of Condition ( $p < 0.05$  for both). This was not the case for c-Fos expression levels of rats tested in the STC ( $p > 0.05$  for both conditions). Furthermore, no significant difference was found between the 5days Hidden and Visible conditions, or between the 25days Hidden and Visible conditions, regardless of Context ( $p > 0.05$  for all groups). In addition, c-Fos expression was significantly higher in rats tested at the 25-day delay in both conditions of the CEC (Hidden:  $t_{(12)} = 2.19$ ,  $p < 0.05$ ; Visible:  $t_{(5)} = 5.96$ ,  $p < 0.01$ ), and in the Hidden condition

of the STC ( $t_{(8)} = 3.01$ ,  $p < 0.05$ ) than in Curtain controls. In contrast, c-Fos expression was significantly lower in rats tested at the 5-day delay in the Hidden condition of the CEC ( $t_{(10)} = -3.54$ ,  $p < 0.01$ ) than in Curtain controls. The other groups did not differ significantly from the Curtain controls ( $p > 0.05$ ). Thus, a significant difference in c-Fos expression pattern was found between the two contexts.

*Medial Prefrontal Cortex: ACC region*

The data, expressed in % Curtain controls, is illustrated in Figure 9A. A significant overall Group effect was found ( $F_{(7,60)} = 12.5$ ;  $p < 0.0001$ ). Indeed, c-Fos expression in rats tested in the CEC 25days Hidden condition was significantly higher than in any other group ( $p < 0.01$  for CEC 5days Hidden condition;  $p < 0.001$  for all other groups). Apart from rats tested in the CEC 25days Hidden condition, c-Fos expression levels of rats tested in the CEC 5days condition was significantly higher than in all other rats tested in all other conditions ( $p < 0.05$  for all). No other significant differences were found between groups. Furthermore, rats tested in the CEC Hidden conditions had c-Fos expression levels significantly higher than that of Curtain controls (5-day delay:  $t_{(10)} = 5.55$ ,  $p < 0.001$ ; 25-day delay:  $t_{(12)} = 5.85$ ,  $p < 0.0001$ ). The other groups did not differ significantly from the Curtain controls ( $p > 0.05$ ). A significant difference in c-Fos expression pattern was therefore observed between the two contexts.



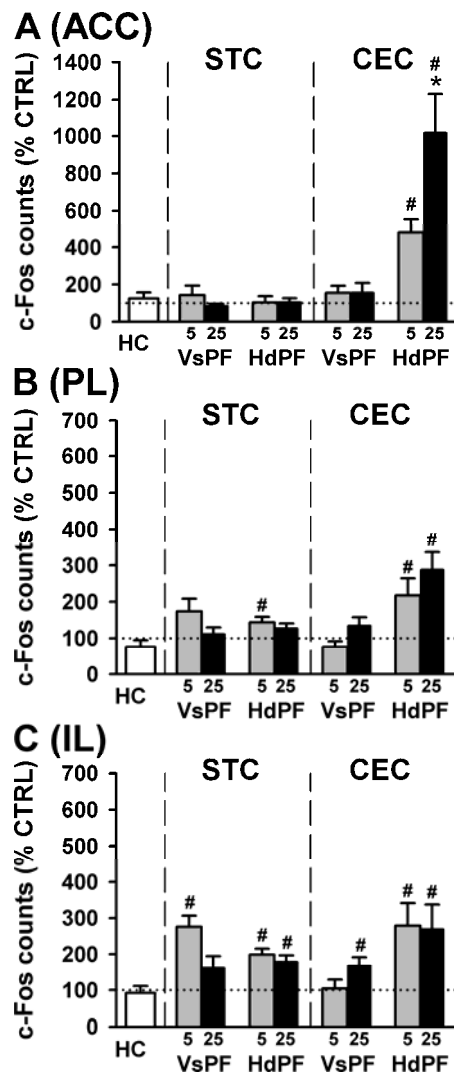
**Figure 8:** Representative examples of c-Fos expression patterns as observed in the anterior cingulate cortex of rats tested in the standard (STC) or cue-enriched (CEC) contexts during retrieval of a recent (5 days post-acquisition) or a remote (25 days post-acquisition) memory. The scale bar represents 100 $\mu$ m.

*Medial Prefrontal Cortex: PL region*

The data expressed in % Curtain controls are shown in Figure 9B. The ANOVA revealed a significant overall Group effect ( $F_{(7,60)} = 3.59$ ;  $p < 0.01$ ). No significant difference in c-Fos expression was found between delays, regardless of Context or condition ( $p > 0.05$ ). Furthermore, no significant difference was found between the 5days Hidden and Visible conditions, or between the 25days Hidden and Visible conditions, regardless of Context ( $p > 0.05$ ), though rats tested in the CEC 25days Hidden condition tended to have greater c-Fos expression than rats tested in the CEC 25days Visible condition ( $p = 0.08$ ). Furthermore, in the CEC, only rats tested in the Hidden conditions had c-Fos expression levels significantly higher than that of Curtain control rats (5-day delay:  $t_{(10)} = 2.31$ ,  $p < 0.05$ ; 25-day delay:  $t_{(12)} = 4.22$ ,  $p < 0.01$ ). In the STC, only rats tested in the Hidden condition at the 5-day delay had c-Fos expression levels significantly higher than that of Curtain control rats ( $t_{(7)} = 2.85$ ,  $p < 0.05$ ; though a tendency was found for rats tested at the 25-day delay, with  $p = 0.09$ ). The other groups did not differ significantly from the Curtain controls ( $p > 0.05$ ). Thus, no significant difference in c-Fos expression pattern was observed between the two contexts.

*Medial Prefrontal Cortex: IL region*

Figure 9C represents the data expressed in % Curtain controls. The ANOVA showed no overall significant Group effect ( $F_{(7,60)} = 1.47$ ;  $p > 0.05$ ). Nevertheless, all groups of rats had c-Fos expression levels that were significantly higher than that of Curtain controls (STC 5days Hidden:  $t_{(7)} = 7.03$ ,  $p < 0.001$ ; STC 25days Hidden:  $t_{(8)} = 4.72$ ,  $p < 0.01$ ; CEC 5days and 25days Hidden:  $t_{(10)} = 3.09$  and  $t_{(12)} = 2.08$  respectively,  $p < 0.05$  for both ; STC 5days Visible:  $t_{(6)} = 6.81$ ,  $p < 0.001$ ; CEC 25days Visible:  $t_{(5)} = 2.60$ ,  $p < 0.05$ ), except for rats tested in the STC 25days Visible condition and in the CEC 5days Visible condition ( $p > 0.05$ ). Thus, no significant difference in c-Fos expression was found between the two contexts.



**Figure 9:** Quantitative analysis of c-Fos-positive nuclei in the medial prefrontal cortex after retrieval in a water-maze task in a standard (STC) or a cued-enriched environment (CEC). Data are expressed as a percentage of Curtain controls. HC = Home Cage condition; VsPF = Visible condition; HdPF = Hidden condition. Significantly different from the Curtain condition: #  $p < 0.05$  (t-test: average vs. 100%); Significantly different from the 5 days group of the same condition: \*  $p < 0.05$ .

---

### **Experiment 3: 2-deoxyglucose (2DG) uptake after intrahippocampal or intracortical lidocaine infusion**

Using 2DG autoradiography, this experiment aimed at characterizing the extent of lidocaine-induced inactivation of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, and at selecting an appropriate dose for subsequent behavioral experiments.

#### **Methods**

##### *Animals*

Thirty-eight male Long-Evans rats (3 months-old, 250-300g) were housed in the same conditions as in Experiments 1 and 2.

##### *Surgery*

Rats were implanted bilaterally with intrahippocampal infusion devices under a combination of ketamine (6,38 mg/kg, i.p.) and xylazine (0,85mg/kg, i.p.) anesthesia. One stainless steel guide cannula (external diameter 0.4 mm) was stereotaxically implanted within each dorsal hippocampus using the following coordinates in mm according to Paxinos and Watson (1998): AP: -3.8 (from Bregma), ML: +/- 2.4 (from midline), DV: -2.2 (from dura), or within each medial prefrontal cortex (prelimbic cortex) using the following coordinates in mm according to Paxinos and Watson (1998): AP: +2.7 (from Bregma), ML: +/- 0.7 (from midline), DV: -3.2 (from dura). The incisor bar was placed at -3.3 mm for both guide cannulae implantations. Preliminary studies using methylene blue infusions (1 $\mu$ L of a 2% solution) showed that these coordinates enabled appropriate location of the infusion sites as well as diffusion of the dye in the dentate gyrus and CA1 (not illustrated) in hippocampus-implanted rats, and in the anterior cingulate, prelimbic and infralimbic cortices in prefrontal-implanted rats (not illustrated). Each guide cannula was kept in place by acrylic dental cement tightly fixed to the skull by stainless steel screws. At the end of surgery, after the cement had dried, a stainless steel mandrel (0.28 mm in diameter) was placed into the guide cannulae. After surgery, the rats were allowed to recover from the anesthesia under a warm lamp (for 20-30 min) before being placed back into their home cage. All rats were given a 7-day recovery period before the 2DG experiment.

##### *Intrahippocampal and intracortical infusions*

Before the beginning of the experiment, the rats were habituated to being manipulated, as they would be for infusions, over 5 consecutive days (they were held on the experimenter's lap, the mandrels were removed, placed in a 70% ethanol solution, and placed back into the guide cannulae after a 30 s to 2 min interval). For the experiment, the rats were gently



restrained by hand, the mandrels were removed, and an infusion needle (external diameter 0.28 mm) was inserted into the guide cannulae. The tip of each infusion needle protruded 1.0 mm beyond the tip of the guide cannulae into the hippocampal or prefrontal cortex parenchyma. The other needle tip was connected to a 10  $\mu$ L Exmire syringe by polyethylene tubing. Using a microinjection pump (CMA/100), lidocaine hydrochloride (Lido; Sigma, Saint-Louis, USA), 2 and 4% in PBS (i.e., 20 and 40  $\mu$ g/ $\mu$ L) was infused unilaterally (1.0  $\mu$ L over 90 s), the other side being infused concomitantly with PBS. Controls received a bilateral infusion of PBS. At the completion of infusion, the needle was left in place for 30 s before it was slowly removed and the mandrels were placed back into the guide cannulae.

### *2-deoxyglucose autoradiography*

The day before the experiment, a femoral vein was catheterized with polyethylene tubing (Clay Adams, PE50) under ketamine/xylazine anesthesia (same doses as those used for guide cannulae implantations). In order to have free access to the catheter without disturbing the rat's movements, the catheter was threaded under the skin, up to the back through a small opening in the skin. A loop was made with the end of the catheter and put into the animal's back, right under the skin. The animals were allowed to recover from surgery under a warm lamp, and then, in their home cage, for 17-24h before the experiment was started. Five min after the intrahippocampal or intracortical infusion of PBS, 20 or 40  $\mu$ g Lido (either on the left or on the right side), [ $^{14}$ C]2DG (13.6 MBq/kg, specific activity 2.0 GBq/mmol, 53.0 mCi/mmol, NEN, Perkin Elmer, life Sciences, Mechelen, BE) was injected to the rats as a single iv pulse. Thus, six groups of 5 to 7 subjects were constituted: two groups infused with bilateral PBS injections in either the hippocampus (PBS-DHip, n=6) or the prefrontal cortex (n=5, PBS-mPFC), two groups with 20  $\mu$ g Lido infused unilaterally in either the hippocampus (n=7, Lido20-DHip) or the prefrontal cortex (n = 6, Lido20-mPFC), and two groups infused with 40  $\mu$ g Lido in either the hippocampus (n=7, Lido40-DHip) or the prefrontal cortex (n=7, Lido40-mPFC). At least two rats from each Lido dose and structure condition received the infusion in the left side, the other ones being infused in the right one. During the 45 min following the 2DG injection, the freely-moving rats were placed in a circular open field (50 cm high, 90 cm in diameter), and every 10 min an object was added to (substituted for another one or displaced in) the open field to stimulate the rats' overall arousal and thus their cerebral metabolism (objects were pebbles and plastic bowls). Approximately 45 min after the 2DG injection, the rats were decapitated after an iv injection of pentobarbital (12 mg in 0.2 ml). Brains were rapidly removed, snap-frozen in isopentane (-40°C) and stored at -80°C in plastic bags until sectioning.

At the time of sacrifice, a mixture of arterial and venous blood flowing from the decapitated body was collected. Blood samples were immediately centrifuged and the plasma

concentration of [ $^{14}\text{C}$ ]2DG was determined by liquid scintillation counting on 20- $\mu\text{l}$  samples. Plasma glucose concentration was measured on 5- $\mu\text{l}$  samples using ACCU CHEK strips (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

The frozen brains were cut into 20- $\mu\text{m}$  coronal sections at  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  in a cryostat. Sections were picked up on glass coverslips, dried on a hot plate ( $60^{\circ}\text{C}$ ) and autoradiographed on Kodak Biomax MR-1 films along with [ $^{14}\text{C}$ ]methyl methacrylate standards calibrated for their  $^{14}\text{C}$  concentrations in brain tissue. Adjacent sections were collected and stained with cresyl violet for verification of the placement of the infusion sites.

The autoradiographs were then analyzed by densitometry using a computerized image-processing system (Biocom 500, Les Ulis, France) without knowledge of animal treatment. Tissue  $^{14}\text{C}$  concentrations reflecting local cerebral 2DG uptake were determined from the optical densities of the autoradiograms and from a calibration curve obtained from the calibrated standards. Optical densities were assessed bilaterally: **i**) in hippocampus-infused rats, in the anterior (close to the infusion site, at about  $-3.14$  and  $-3.8$  mm to Bregma) and the posterior (distant from the infusion site, at about Bregma  $-5.6$  mm) region of the dorsal hippocampus, as well as in regions surrounding the infusion site in hippocampus-infused animals such as the overlying parietal cortex and the underlying laterodorsal thalamus (at about Bregma  $-3.8$  mm), and also in the ventral hippocampus (at about Bregma  $-5.6$  mm), **ii**) in prefrontal cortex-infused rats, in the prelimbic and the infralimbic cortices (close to the infusion site), in the anterior cingulate cortex, as well as in the primary and secondary motor cortices (at about Bregma  $+2.7$  mm).

Tracer concentrations in brain regions were reported to a plasma [ $^{14}\text{C}$ ]2DG specific activity of  $10^5$  dpm/ $\mu\text{mol}$  for each animal. The exact quantification of local cerebral glucose utilization normally requires collection of several blood samples along the 45-min period of the 2DG experiment (Sokoloff et al., 1977). We considered that such an approach was not compatible with our open field free running conditions. Therefore, we used an alternative semi-quantitative approach, also used by others (for a review, see Duncan and Stumpf, 1991), and discussed in more detail by Pereira de Vasconcelos et al. (2006).

### *Statistical analyses*

For analysis of blood glucose and 2DG levels, we used a one-way ANOVA with 6 levels (Group: PBS-DHip, Lido20-DHip, Lido40-DHip, PBS-mPFC, Lido20-mPFC and Lido40-mPFC), followed by a Newman-Keuls multiple comparison procedure test when appropriate, with a significance level taken at  $p < 0.05$ .

Relative  $^{14}\text{C}$  concentrations were determined in 6 and 5 brain structures in hippocampus- and prefrontal cortex-implanted rats, respectively. The data were analyzed for each group, using a three-way ANOVA considering the following factors: Treatment (PBS, Lido20, Lido40),

Side (ipsilateral, contralateral), and Structure (the different structures of interest). Then, for each target region, and for each side (either the inactivated one or the contralateral control one), data were analyzed using a one-way ANOVA, considering Treatment as the factor, with three levels: PBS, Lido20, Lido40. When appropriate, multiple comparisons were performed using a Newman-Keuls test, with a significance level fixed at  $p < 0.05$ .

## Results

### *General observations*

The intrahippocampal or intracortical infusion of Lido, at either 20 or 40  $\mu\text{g}$ , did not induce any overt change in general behavior (e.g., locomotor activity, movement coordination...) during the following 2 h. No sign of ataxia could be observed as previously shown with lower doses of Lido (Pereira de Vasconcelos et al., 2006), and there was no obvious sign of hyperactivity as described after hippocampectomy (e.g., Teitelbaum and Milner, 1963).

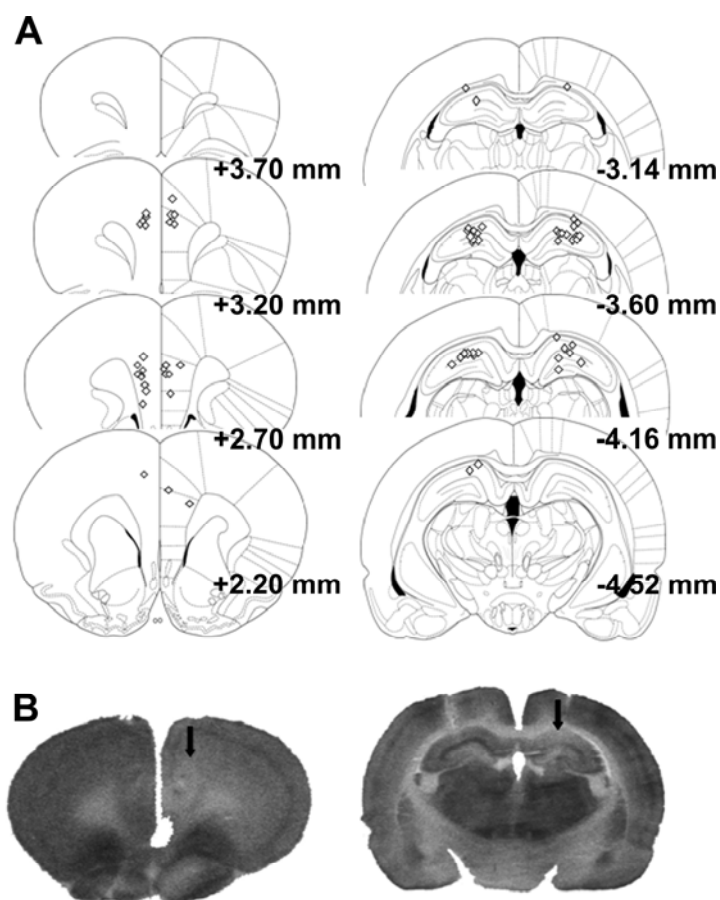
### *Histology*

The infusion sites were examined under light microscopy by an experimenter who was unaware of the experimental treatment of the rats. The infusion sites from all rats were reported on corresponding plates of the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1998) and are shown in Figure 10. In rats subjected to intrahippocampal infusions, almost all infusion sites were found to be localized in the anterior pole of the dorsal hippocampus, for most between -3.60 and -4.16 mm from Bregma. In rats subjected to infusions into the prefrontal cortex, almost all sites of infusion were found to be localized within the prelimbic and infralimbic cortices, between +2.7 mm and +3.2 mm from Bregma. Three rats were discarded from the statistical analyses because of inappropriate infusion sites.

### *Blood glucose and 2-deoxyglucose levels*

The plasma glucose concentrations measured at the end of the 2DG experiment ranged between 9.1 and 10.2  $\mu\text{mol/ml}$ . The mean blood glucose values  $\pm$  SEM in  $\mu\text{mol/ml}$  were:  $9.5 \pm 0.2$  in the PBS-DHip group,  $10.2 \pm 0.3$  in the PBS-mPFC group,  $9.9 \pm 0.4$  in the Lido20-DHip group,  $10.1 \pm 0.5$  in the Lido20-mPFC group,  $9.1 \pm 0.7$  in the Lido40-DHip group,  $9.8 \pm 0.4$  in the Lido40-mPFC group. Analysis of variance showed no significant Group effect ( $F_{(1,28)} = 2.02$ ,  $p = 0.106$ ). The mean values  $\pm$  SEM of plasma specific activity of [ $^{14}\text{C}$ ]2DG in  $\text{dpm}/\mu\text{mol}$  were:  $14176 \pm 778$  in the PBS-DHip group,  $15713 \pm 1127$  in the PBS-mPFC group,  $12277 \pm 764$  in the Lido20-DHip group,  $14238 \pm 1103$  in the Lido20-mPFC group,  $17642 \pm 1325$  in the Lido40-DHip group, and  $12751 \pm 883$  in the Lido40-mPFC group. The ANOVA revealed a significant Group effect on the [ $^{14}\text{C}$ ]2DG specific activity ( $F_{(1,28)} = 4.33$ ,  $p <$

0.01), due to a significantly higher activity in the Lido40-DHip group, as compared with either the Lido20-DHip or the Lido40-mPFC groups ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively).



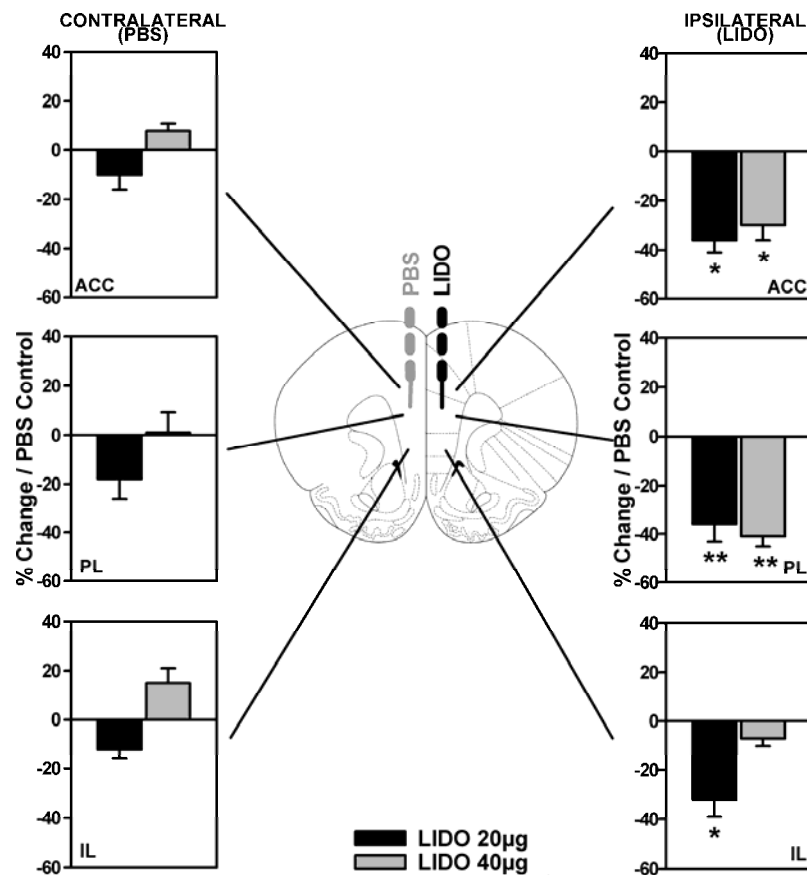
**Figure 10:** Schematic representation **(A)** of the infusion sites on coronal sections through the prefrontal cortex (left) and the dorsal hippocampus (right) of all rats in which the metabolic effects of unilateral infusions of 20 or 40  $\mu\text{g}$  Lido (combined with a contralateral infusion of an equivalent volume of PBS) or of bilateral infusions of PBS on 2DG uptake were assessed. Coordinates are given in mm from Bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each infusion site is represented by an open diamond, the centre of which corresponds to the tip of the infusion needle. **(B)** Examples of 2DG autoradiograms taken at the level of the prefrontal cortex (left) and the dorsal hippocampus (right) of rats subjected to a Lido infusion on the right side and a concomitant infusion of PBS on the left side. Note the decreased 2DG labelling in the area of Lido infusion of the prefrontal cortex and of the dorsal hippocampus (see arrow).

#### Metabolic data

##### *Effects of a Lido infusion into the prefrontal cortex (Table S5, Figure 11)*

Absolute values are shown in Table S5 (see supplemental data). Relative changes in and close to the target area are shown in Figure 11. The three-way ANOVA of the relative 2DG uptake values revealed a significant effect of Treatment ( $F_{(2,28)} = 3.36$ ,  $p < 0.05$ ), of Side

( $F_{(1,28)} = 6.66$ ,  $p < 0.05$ ) and of both following interactions: Structure x Treatment ( $F_{(8,112)} = 5.78$ ,  $p < 0.001$ ) and Structure x Side ( $F_{(4,112)} = 3.85$ ,  $p < 0.01$ ).



**Figure 11:** Average relative changes of 2DG metabolism in the anterior cingulate (top, ACC), prelimbic (middle, PL) and infralimbic (bottom, IL) cortex after an iv injection of 2DG 5 min following the intracortical infusion of PBS (left side) and 20 or 40 µg of Lido (right side). For each rat, the relative variation was calculated as follows: respecting the brain side and the structure, each absolute 2DG uptake value (nCi/g) was expressed as a percent change from the absolute 2DG uptake value found in rats infused bilaterally with PBS. Thus, a negative variation corresponds to a decrease of 2DG uptake. Significantly different from the same side in the control PBS group: \*  $p < 0.05$ .

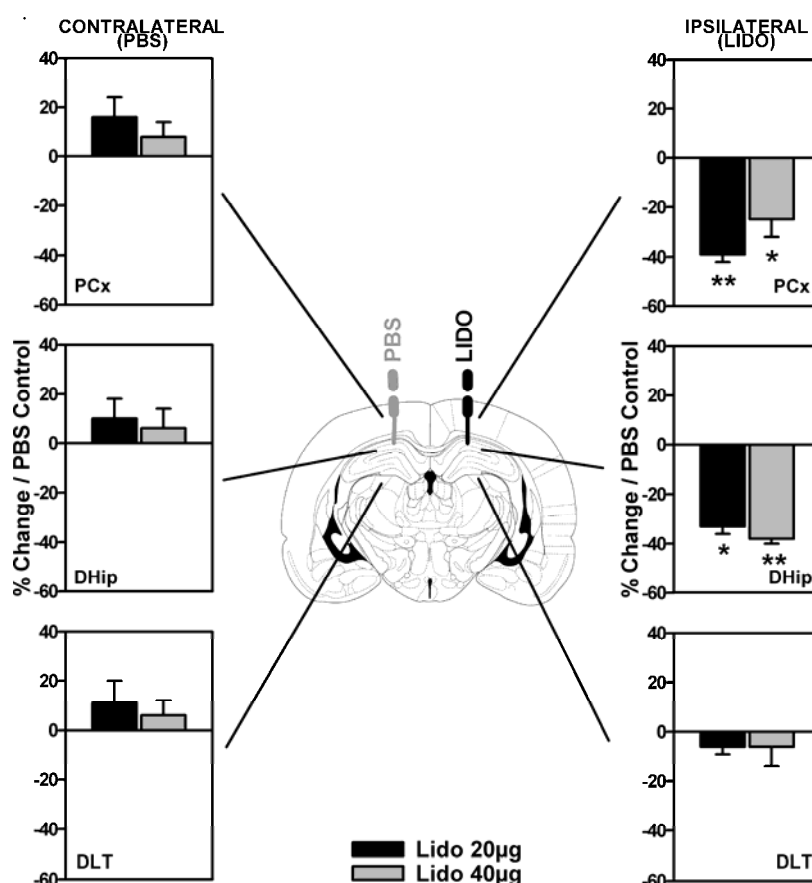
Concerning the infusion side, the one-way ANOVA showed a significant effect of Lido in the anterior cingulate cortex ( $F_{(2,14)} = 5.46$ ,  $p < 0.05$ ), the decrease in glucose metabolism in the Lido20-mPFC and Lido40-mPFC groups (-36 and -30% respectively) being significant as compared to the same side in the PBS-mPFC group ( $p < 0.05$ ). There was also a significant effect of Lido in the infralimbic cortex ( $F_{(2,14)} = 4.06$ ,  $p < 0.05$ ), a significant metabolic decrease being detected in the Lido20-mPFC group, as compared to the same side of PBS-mPFC (-32%,  $p < 0.05$ ). Finally, in the prelimbic cortex ipsilateral to Lido infusion, there was a significant effect of the drug ( $F_{(2,14)} = 6.88$ ,  $p < 0.01$ ), a significant decrease in glucose metabolism being found in both the Lido20-mPFC and Lido40-mPFC rats (-36% and -41%,  $p$

< 0.01, respectively), as compared to PBS-mPFC rats. In all other structures ipsilateral to the Lido infusion side, no significant effect of the drug could be evidenced.

On the contralateral side, the ANOVA showed a significant effect of Treatment only in the primary motor cortex ( $F_{(2,14)} = 4.39$ ,  $p < 0.05$ ), with a significant 2DG uptake decrease in the Lido20-mPFC group (-16%,  $p < 0.05$ ), as compared to the same side in the Lido40-mPFC group. In all other contralateral brain areas no significant effect of Lido was found.

*Effects of a Lido infusion in the dorsal hippocampus (Table S5, Figure 12)*

Absolute values are shown in Table S5 (see supplemental data). Relative changes in and close to the target area are shown in Figure 12. The three-way ANOVA of the relative 2DG uptake values revealed a significant effect of Side ( $F_{(1,30)} = 10.5$ ,  $p < 0.01$ ), of Structure ( $F_{(5,150)} = 56.4$ ,  $p < 0.001$ ) and of the following interactions: Structure x Treatment ( $F_{(10,150)} = 2.90$ ,  $p < 0.01$ ), Structure x Side ( $F_{(5,150)} = 7.55$ ,  $p < 0.001$ ) and Structure x Treatment x Side ( $F_{(10,150)} = 4.34$ ,  $p < 0.001$ ).



**Figure 12:** Average relative changes of 2DG metabolism in the parietal cortex (top, PCx), dorsal hippocampus (middle, DHip) and dorsolateral thalamus (bottom, DLT) after an iv injection of 2DG 5 min following the intrahippocampal infusion of PBS (left side) and 20 or 40 µg of Lido (right side). For each rat, the relative variation was calculated as described in the caption of Figure 11. Significantly different from the same side in the control PBS group: \*  $p < 0.05$ .

The one-way ANOVA showed a significant effect of Lido in the dorsal hippocampus, at both Bregma -3.14 and Bregma -3.8 mm ( $F_{(2,15)} = 14.04$ ,  $p < 0.001$ ;  $F_{(2,15)} = 4.37$ ,  $p < 0.05$ , respectively), due to a significant 2DG uptake decrease at both anteriority levels in the Lido20-DHip rats (-19% and -33%,  $p < 0.05$ , respectively) and in the Lido40-DHip rats (-38%,  $p < 0.001$ ; -33%,  $p < 0.05$ , respectively), compared with the same side of PBS-DHip rats. There was also a significant effect in the parietal cortex ipsilaterally to the Lido infusion ( $F_{(2,15)} = 6.75$ ,  $p < 0.01$ ), with a significant metabolic decrease in Lido20-DHip and Lido40-DHip rats as compared to PBS-DHip rats (-39% and -25%,  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). In all other brain areas ipsilateral to the Lido infusion, no significant effects of the Treatment (PBS, Lido 20, Lido 40) were observed.

On the contralateral side, the ANOVA failed to detect any significant effect of Treatment among PBS-, Lido20, or Lido40 groups, whether in the hippocampus or in the other surrounding brain regions.

### **Experiment 4: hippocampal/prefrontal inactivation during recent vs. remote memory**

This experiment aimed at assessing the effects of hippocampal or prefrontal cortex pharmacological inactivation on recent vs. remote memory retrieval in the Morris water-maze task.

#### Methods

##### *Subjects, surgery and intrahippocampal or intracortical infusions*

Strain, sex and age of the subjects ( $n = 96$ ), surgeries for guide cannulae implantations and Lido infusion procedures were the same as in Experiment 3. Water-maze training was started after a post-surgical recovery period of at least 10 days.

##### *Apparatus*

This study took place in the CEC, described previously. The water-maze characteristics and procedures were the same as those of Experiments 1 and 2.

##### *Experimental paradigm*

Training was identical to that of Experiments 1 and 2, though two additional days of acquisition were performed to compensate for the effects of surgery (personal observations), for a total of 8 days of training.

One group was then tested for retention 5 days post-acquisition (recent memory, Lido DHip  $n = 12$ ; PBS DHip  $n = 11$ ; Lido mPFC  $n = 12$ ; PBS mPFC = 13), while the other one was tested

25 days post-acquisition (remote memory, Lido DHip n = 13; PBS DHip n = 13; Lido mPFC n = 13; PBS mPFC = 9), after randomization according to the rats' acquisition performances. The day preceding the probe trial, all rats were infused bilaterally with PBS to familiarize them with the procedure. For the probe trial, the platform was removed and the animals were allowed 60 s to swim. Lido (40 µg/µL) or PBS was infused bilaterally (1µl/90s) in the dorsal hippocampus or in the mPFC 10 min before the probe trial. The accuracy ratio was used to evaluate retention, and the number of crossings in the target area were analyzed and used as an index of memory precision.

### *Histology*

Histological verifications of the infusion sites were performed exactly as in Experiment 3.

### *Statistical analyses*

For analyses of water-maze performance during acquisition trials, an ANOVA based on a between-within subjects design was used, considering four factors: Treatment (PBS, Lido), Structure (DHip, mPFC), Delay (5d, 25d), and Day (1to 8). The analysis of the probe trial performances consisted of a 1-way ANOVA for each structure that considered Group (Lido 5days, PBS 5days, Lido 25days, PBS 25 days) as a factor. In addition, the accuracy ratios found in each group were compared to the value of 1, corresponding to random search patterns, using a student t-test. When appropriate, multiple comparisons were run using the Newman-Keuls multiple range test, with a significance level taken at  $p < 0.05$ .

## Results

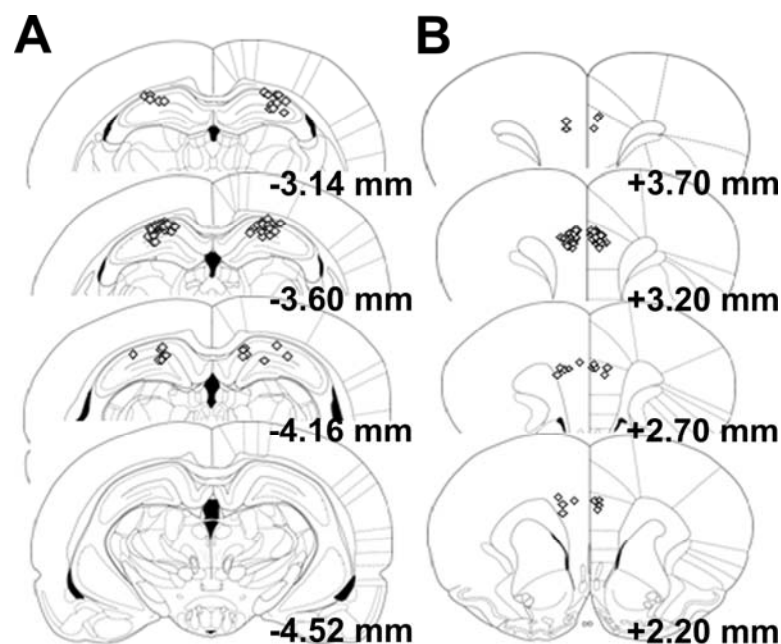
### *Histology*

The injection sites and their variability were comparable to those found in Experiment 3, whether for the hippocampus or the prefrontal cortex (Figure 13). Eleven rats infused in the hippocampus (3 at the 5-day delay; 8 at the 25-day delay) and ten other ones infused in the prefrontal cortex (5 at the 5-day delay; 5 at the 25-day delay) were discarded because of inappropriate infusion sites.

### *Acquisition*

The data are shown in Figure 14A. The Treatment (PBS, Lido) x Structure (DHip, mPFC) x Day (1, ...,8) ANOVA showed a significant overall Day effect ( $F_{(7,469)} = 71.8$ ,  $p < 0.001$ ), which was due to the progressive and significant reduction of the distances to reach the platform. Absence of significant Treatment ( $F_{(1,67)} < 1$ , ns), Delay ( $F_{(167)} < 1$ , ns) and Structure ( $F_{(1,67)} = 2.49$ , ns) effects, as well as of any of the interactions between the different factors ( $p > 0.05$  for all), indicated that there was no major a priori acquisition bias among groups.





**Figure 13:** Schematic representation of the infusion sites on coronal sections through the dorsal hippocampus (**A**) and the medial prefrontal cortex (**B**) of rats tested in the water maze. Coordinates are given in mm from Bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each infusion site is represented by an open diamond, the centre of which corresponds to the tip of the infusion needle.

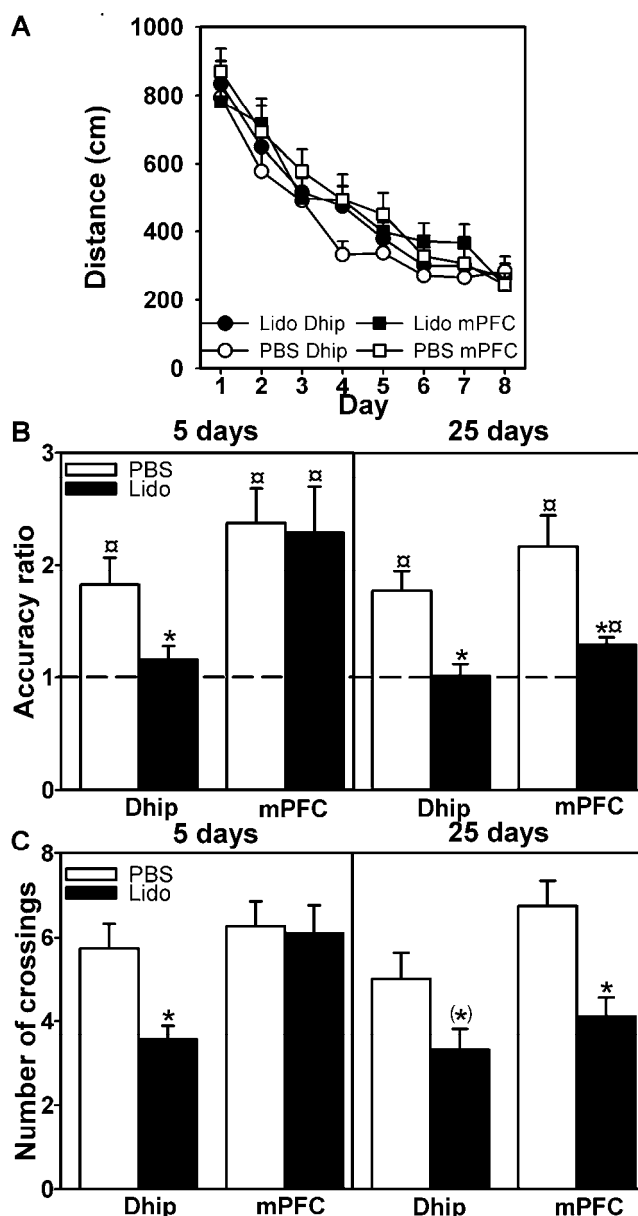
#### *Probe trial*

##### *Effects of Lido inactivation of the hippocampus*

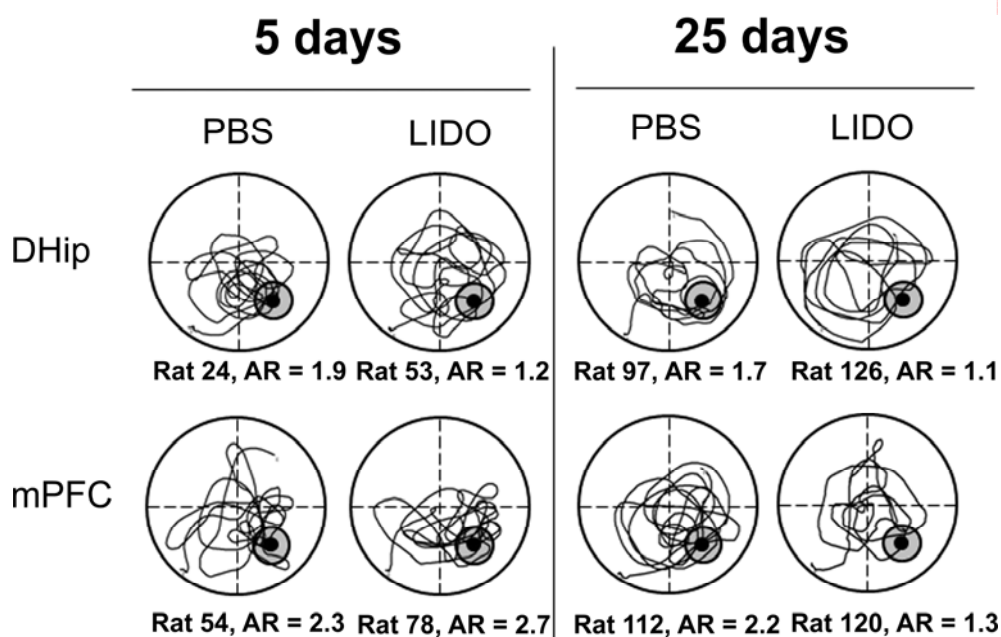
The data for the accuracy ratios are shown in Figure 14B. The 1-way ANOVA for accuracy ratios in rats infused in the hippocampus showed a significant effect of Group ( $F_{(3,34)} = 5.61$ ,  $p < 0.01$ ). Indeed, rats infused with Lido spent significantly less time in the target quadrant than rats infused with PBS, regardless of the delay ( $p < 0.05$  for both). Student *t* tests further showed that performance of rats infused with Lido did not differ significantly from chance, regardless of the delay (5 days:  $t_{(8)} = 1.4$ ,  $p > 0.05$ ; 25 days:  $t_{(9)} = 0.10$ ,  $p > 0.05$ ), unlike rats infused with PBS (5 days:  $t_{(10)} = 3.4$ ,  $p < 0.01$ ; 25 days:  $t_{(7)} = 4.4$ ,  $p < 0.01$ ). It is also noteworthy that in rats infused with PBS, no time-dependent degradation of performance occurred ( $p > 0.05$ ). The ANOVA for the number of crossings (Figure 14C) revealed a significant Group effect ( $F_{(3,34)} = 4.89$ ,  $p < 0.01$ ), rats infused with Lido crossing the target area significantly less often than rats infused with PBS at the 5-day delay, and tending to do so at the 25-day delay ( $p = 0.08$ ). As for accuracy ratios, no time-dependent degradation of performance was observed in PBS rats ( $p < 0.05$ ). The swimming paths of rats in the different groups are illustrated in Figure 15.

*Effects of Lido inactivation of the medial prefrontal cortex*

The data for the accuracy ratios are shown in Figure 14B. Analysis of the accuracy ratios showed a significant Group effect ( $F_{(3,33)} = 2.89$ ,  $p < 0.05$ ), rats infused with Lido at the 25-day delay spending significantly less time in the target quadrant than those infused with PBS ( $p < 0.05$ ). No significant difference was observed between rats infused with Lido or PBS at the 5-day delay ( $p > 0.05$ ). Student t-tests showed that the rats' performances were significantly different from chance in all groups, regardless of the delay (5 days Lido:  $t_{(8)} = 3.2$ ,  $p < 0.05$ ; 5 days PBS:  $t_{(10)} = 4.5$ ,  $p < 0.01$ ; 25 days Lido:  $t_{(8)} = 4.5$ ,  $p < 0.01$ ; 25 days PBS:  $t_{(7)} = 4.2$ ,  $p < 0.01$ ), even though performance of rats infused with Lido at the 25-day delay was weaker than that of all other groups (Lido 5 days and PBS 5 days:  $p < 0.05$ ; PBS 25 days:  $p = 0.08$ ). It is also noteworthy that in PBS rats, no time-dependent degradation of performance occurred ( $p > 0.05$ ). The data for number of crossings is illustrated in Figure 14C. The ANOVA revealed a significant effect of Treatment ( $F_{(3,33)} = 3.85$ ,  $p < 0.05$ ), rats infused with Lido at the 25-day delay crossing the target area significantly less often than rats in any other group ( $p > 0.05$  for all). In addition, no significant difference was observed between rats infused with Lido or PBS at the 5-day delay ( $p > 0.05$ ), and PBS rats did not show any time-dependent degradation ( $p > 0.05$ ). The swimming paths of rats in the different groups are illustrated in Figure 15.



**Figure 14:** **A)** Average distances to reach the platform during water-maze acquisition in the rats to be tested for retrieval in a probe trial after Lido or PBS infusions at a 5 or 25-day post-acquisition delay. All rats were tested on a daily basis of 4 trials during 8 consecutive days. There were no significant differences between the 4 groups. **B)** Average performance for the probe trial after a 5-day (left) or 25-day (right) post-acquisition delay expressed as an accuracy ratio. The dashed line represents random performance. **C)** Average number of crossings for the probe trial after a 5-day (left) or 25-day (right) post-acquisition delay. Significantly different from the PBS group: \*  $p < 0.05$ . Tendency to differ from the PBS group: (\*)  $p = 0.08$ . Significantly different from 1 (random):  $\alpha p < 0.05$ .



**Figure 15:** Representative swim tracks of rats tested in the water maze in the different conditions.

## Discussion

This study shows that the hippocampus is involved in spatial memory retrieval, regardless of its age (5 or 25 days), which is consistent with previous findings (e.g. Clark et al., 2005a; Broadbent et al., 2006; Lehmann et al., 2007; Sutherland et al., 2008). However, the medial prefrontal cortex (mPFC), and more particularly the anterior cingulate cortex (ACC), was specifically involved in remote memory retrieval in the cue-enriched context (CEC). Indeed, the c-Fos imaging data revealed an increase in neuronal activation in the ACC at the 25-day delay in comparison with the 5-day delay. This increase can be linked to the retrieval of spatial memory information, as no such change was seen in the Visible condition, and as lidocaine infused in the mPFC before the probe trial impaired performance only at the 25-day delay. That the mPFC be involved only for remote memory retrieval is coherent with the standard theory of consolidation and previous studies in both spatial memory (Bontempi et al., 1999; Maviel et al., 2004; Teixeira et al., 2006) and contextual fear or trace eyeblink conditioning (Frankland et al., 2004; Takehara et al., 2003). Furthermore, there seems to be a consensus in the literature about the involvement of the ACC in remote memory retrieval, unlike for the other subregions of the mPFC, ie. the prelimbic (PL) and infralimbic (IL) areas. Indeed, Frankland et al. (2004) reported that lidocaine infused in the PL had no effect on contextual fear conditioning performance, regardless of the delay. This is similar to our results where c-fos expression in the PL did not change with time, reinforcing Frankland et

al.'s suggestion that the ACC is a critical node in the cortical network supporting remote memory retrieval. However, Frankland et al. (2004) also showed that c-Fos and Zif 268 expression was greater for remote memories in all 3 subregions of the mPFC, just like Maviel et al. (2004)'s study in a radial arm maze. These differences may be due to the type of task (fear conditioning vs. water maze) or to the species used (mice vs. rats). The standard theory of consolidation also predicts a progressive disengagement of the hippocampus with time (Frankland and Bontempi, 2005), which is not reflected in our results. On the contrary, the c-fos data in the CEC indicated an increased activity in the CA1 region of the hippocampus at the 25-day delay, as compared to the 5-day delay. While certain studies using a lesion or inactivation approach identified a role for the hippocampus regardless of the delay (eg. Clark et al., 2005 a and b, Broadbent et al., 2006), investigations using c-Fos, Zif268 or Arc/Arg3 imaging usually show less activity in CA1 for remote memory expression (Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; Gusev et al., 2005), or equivalent levels of activity for both delays (Teixeira et al., 2006). In addition, no lesion or inactivation study to date has been able to show a disengagement of the hippocampus in the water-maze task (Clark et al., 2005 a,b; Broadbent et al., 2006; Teixeira et al., 2006), including our inactivation study showing memory impairment regardless of the delay. This could be in favor of the multiple trace theory, according to which the hippocampus remains necessary for retrieval of precise contextual information regardless of the age of the memory (Nadel and Moscovitch, 1997). Alternatively, the time-independent involvement of the hippocampus in the water maze may be due to constant updating of navigation processes necessary to perform well in this complex spatial task (continuous integration of idiothetic and allothetic information), and not to a specific role in remote memory retrieval (Clark et al., 2007; Teixeira et al., 2006). In human imaging studies, results also vary as far as activity of the hippocampus is concerned. Some fMRI studies investigating recall of autobiographic memories find no change in activity of the hippocampus with time (Maguire et al., 2001; Nadel et al., 2007). This contrasts with Takashima et al. (2006)'s fMRI study in which hippocampal activity decreased over time. Interestingly, Piolino et al. (2004) found greater hippocampal activation for recall of remote autobiographic memories in a PET study, which they explain by a re-encoding phenomenon. This supports the multiple trace theory suggesting that for each reactivation of a memory, a new trace is created in the hippocampus. This could therefore explain, in the present study, the increased c-Fos expression in CA1 during remote memory retrieval in the CEC.

Concerning the other hippocampal subregions, c-Fos expression patterns in CA3 was similar to that of CA1, ie. greater expression during remote than during recent memory retrieval in the CEC, though to a lesser degree. The CA3 region of the hippocampus has been suggested to play a role in spatial arbitrary associations, spatial pattern completion and separation (Gilbert and Brushfield, 2009), but very few studies have looked at the

involvement of CA3 in remote memory retrieval. Ross and Eichenbaum (2006) found in a social transmission of food preference task that activity in CA3 does not vary with retrieval delay, and Florian and Roulet (2004) showed that CA3 was involved in acquisition and consolidation of a water-maze task but not in retrieval, though only recent memory was tested. However, if indeed a re-encoding phenomenon is responsible for the increased activity in CA1 during remote memory retrieval, considering the involvement of CA3 in encoding and its projections to CA1, this could also explain the increased activity in CA3. Along the same lines, the DG's c-Fos expression pattern was also similar, to a lesser degree, to that of CA1. The DG is involved in pattern separation during encoding (Treves et al., 2008), and its connexions with CA3 could provide an explanation for an increased activity during remote memory retrieval in this study.

Aside from the c-Fos results obtained in the Hidden condition, it is noteworthy to comment on those obtained in the Visible condition. Indeed, for the hippocampus, c-fos expression patterns in rats tested in the Visible condition mirror those of rats tested in the Hidden condition, especially in the CEC. This implies rats incidentally encoded spatial information during the acquisition, as previously suggested (Packard and McGaugh, 1996; Guzowski et al., 2001). This idea is reinforced by the fact that this mirror pattern is not observed in the different mPFC subregions. Furthermore, in the Curtain condition, where all spatial cues are eliminated, no such mirror pattern is observed. This underlines the importance of having appropriate controls when using such imaging techniques (see Shires et al., 2008). Indeed, most water-maze c-Fos studies use a Home Cage and/or a free swimming control, the latter one raising stress levels as compared to the testing condition. Even though swimming to a visible platform does not match the swim experience of the testing condition, our Curtain condition seemed the most appropriate as far as spatial memory processes were concerned. What is most interesting in this study, however, is the difference in c-Fos patterns obtained in the two contexts, mostly for CA1 and the ACC. Indeed, for these regions, c-Fos activity is globally strongest in the CEC, where there is no time-dependent trace degradation. Furthermore, in the STC, there are no differences between the c-Fos patterns observed at the 5 and 25-day delays, in contrast with what is seen in the CEC. Rudy et al. (2005) postulated that the mPFC is not the site of remote memory storage, but is rather involved in mediating effortful recall of memories, regardless of their age. According to this assumption, it could therefore be expected that a memory that has undergone degradation with time, and thus is weakened, would solicit the mPFC more than a strong, non-degraded memory. However, none of the mPFC subregions were markedly solicited in the STC, where the memory suffered from time-dependent degradation. Our study therefore indicates that the involvement of the mPFC in memory retrieval is dependent on the quality of a memory, but is recruited for non-degraded remote memories rather than for degraded ones. Indeed, in

addition to the type of task (e.g. fear conditioning, spatial memory), the type of spatial memory test (e.g. radial maze, water maze) and the type of approach (reversible vs. permanent lesions, imaging), one of the reasons for which the data in the literature are sometimes conflicting could be time-dependent trace degradation, which varies across studies. For example, Bontempi et al. (1999), Clark et al. (2005a), and Lehmann et al. (2007) observed such degradation of memory over time, unlike Frankland et al. (2004), Maviel et al. (2004), Broadbent et al. (2006), and Teixeira et al. (2006), to cite only some of them. This variation can complicate interpretations of data in favor or against one of the two main systems consolidation theories.

In conclusion, this study does not support or eliminate either the standard consolidation theory or the multiple trace theory, but instead shows that recruitment of certain brain structures, and more particularly the prefrontal cortex, during remote memory retrieval, may depend on the quality of the memory and thus on the conditions in which memories are formed and subsequently recalled.

**References**

- Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS (1999) Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within subjects examination. *J Neurosci* 19(3): 1106-1114.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400 (6745): 671-675.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13(2): 187-191.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2007) The hippocampus and spatial memory: findings with a novel modification of the water maze. *J Neurosci* 27(25): 6647-6654.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005a) Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15(2): 260-272.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005b) Impaired remote spatial memory after hippocampal lesions despite extensive training beginning early in life. *Hippocampus* 15(3): 340-346.
- Duncan GE, Stumpf WE (1991) Brain activity patterns: assessment by high resolution autoradiographic imaging of radiolabeled 2-deoxyglucose and glucose uptake. *Prog Neurobiol* 7: 365-382.
- Epp J, Keith JR, Spanswick SC, Stone JC, Prusky GT, Sutherland RJ (2008) Retrograde amnesia for visual memories after hippocampal damage in rats. *Learn Mem* 15: 214-221.
- Florian C, Rouillet P (2004) Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res* 154: 365-374.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6(2): 119-130.
- Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304(5672): 881-883.
- Gilbert PE, Brushfield AM (2009) The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioural assessment. *Prog Neur Psychopharm Biol Psy* (in press).
- Gusev PA, Cui C, Alkon DL, Gubin AN (2005) Topography of Arc/arg3.1 mRNA expression in the dorsal and ventral hippocampus induced by recent and remote spatial memory: dissociation of CA3 and CA1 activation. *J Neurosci* 25: 9384-9397.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos* and *zif268*. *J Neurosci* 21(14): 5089-5098.



- Koenig J, Cosquer B, Cassel JC (2008) Activation of septal 5-HT<sub>1A</sub> receptors alters spatial memory encoding, interferes with consolidation, but does not affect retrieval in rats subjected to a water-maze task. *Hippocampus* 18(1): 99-118.
- Lehmann H, Lacanilao S, Sutherland RJ (2007) Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. *Eur J Neurosci* 25: 1278-1286.
- Lopez J, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2008a) Environmental cue saliency influences the vividness of a remote spatial memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90: 285-289.
- Lopez J, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2008b) Differential sensitivity of recent vs. remote memory traces to extinction in a water-maze task in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90: 460-466.
- Martin SJ, de Hoz L, Morris RGM (2005). Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* 43: 609-624.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305(5680): 96-99.
- Moscovitch N, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS (2006) The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 16: 179-190.
- Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7: 217-227.
- Nadel L, Bohbot V (2001) Consolidation of memory. *Hippocampus* 11: 56-60.
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65-72.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, Cosquer B, Lopez J, Certa U, Cassel JC (2006) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: a comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. *Neuroscience* 141: 1649-1663.
- Piolino P, Giffard-Quillon G, Desgranges B, Chételat G, Baron JC, Eustache F (2004) Re-experiencing old memories via hippocampus: a PET study of autobiographical memory. *NeuroImage* 22: 1371-1383.
- Ross RS, Eichenbaum H (2006) Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *J Neurosci* 26(18): 4852-4859.

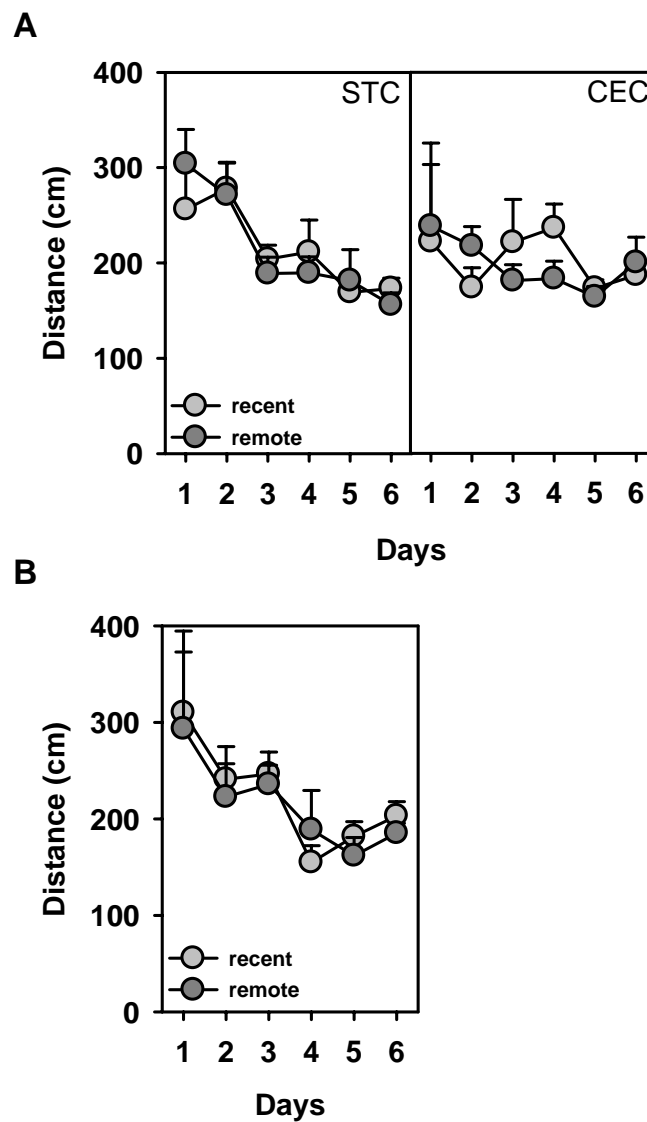
- Rudy JW, Biedenkapp JC, O'Reilly RC (2005) Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: an alternative view. *Learn Mem* 12(5): 445-446.
- Shires KL, Aggleton JP (2008) Mapping immediate-early gene activity in the rat after place-learning in a water-maze: the importance of matched control conditions. *EJN* 28:982-996.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [<sup>14</sup>C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28: 897-916.
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5: 169-177.
- Squire LR, Clark RE, Knowlton BJ (2001) Retrograde amnesia. *Hippocampus* 11(1): 50-55.
- Sutherland RJ, O'Brien J, Lehmann H (2008) Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. *Hippocampus* 18: 710-718.
- Takashima A, Petersson KM, Rutters F, Tendolkar I, Jensen O, Zwarts MJ, McNaughton BL, Fernandez G (2006) Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study. *PNAS* 103(3): 756-761.
- Takehara K, Kawahara S, Kirino Y (2003) Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci* 23(30): 9897-9905.
- Teitelbaum H, Milner P (1963) Activity changes following partial hippocampal lesions in rats. *J Comp Physiol Psychol* 56: 284-289.
- Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* 26(29): 7555-7564.
- Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI (2008) What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154: 1155-1172.
- Wang S-H, Teixeira CM, Wheeler AL, Frankland PW (2009) The precision of remote context memories does not require the hippocampus. *Nat Neurosci* 12(3): 253-255.
- Winer BJ (1971) *Statistical principles in experimental design*. New York: McGraw Hill.
- Winocur G, Moscovitch M, Caruana DA, Binns MA (2005) Retrograde amnesia in rats with lesions to the hippocampus on a test of spatial memory. *Neuropsychologia* 43: 1580-1590.

Supplemental data

Results

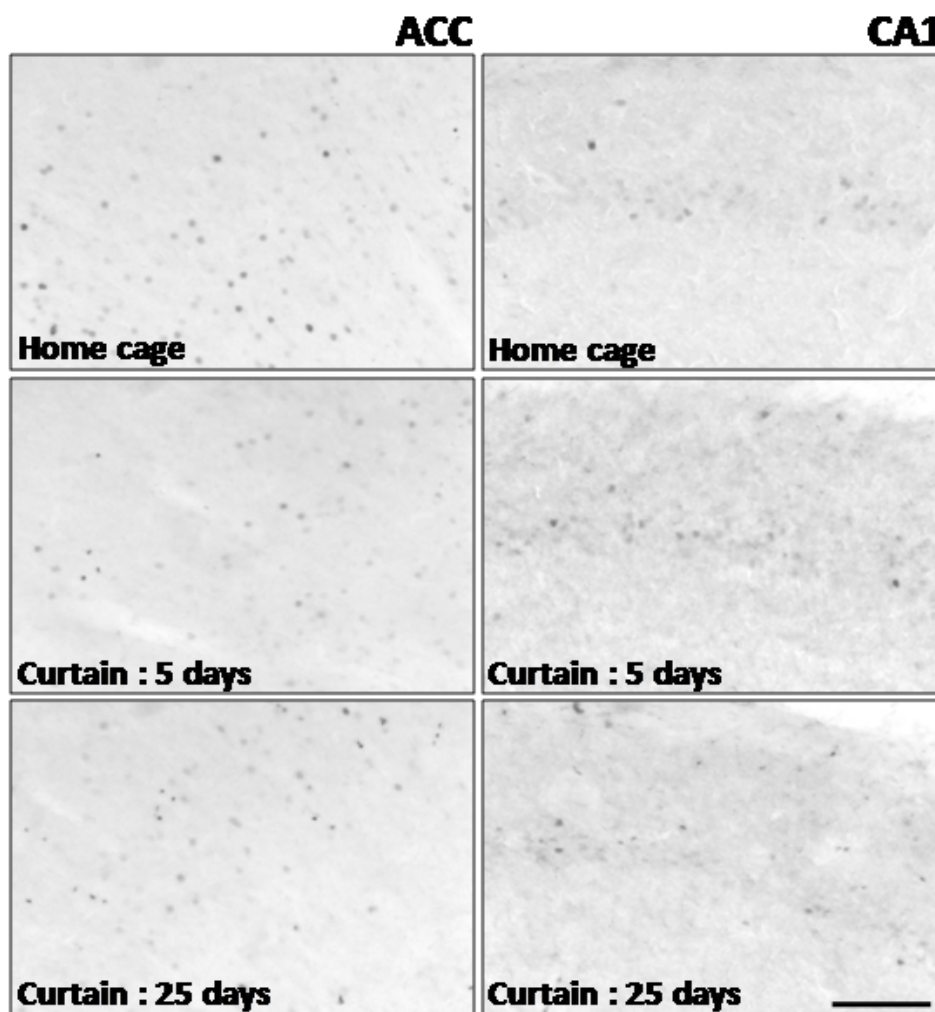
Experiment 2

Figure S1



**Figure S1:** Average (+ SEM) distances to reach the platform during water-maze acquisition in the rats tested in the Visible condition (**A**) in the standard context (STC) or the cued-enriched context (CEC), and in the Curtain condition (**B**).

Figure S2



**Figure S2:** Typical examples of c-Fos expression patterns, as observed in the anterior cingulate cortex (ACC) and in the CA1 region of the hippocampus of rats tested in the Home Cage and Curtain conditions. The scale bar represents 100  $\mu$ m.

**Table S1: Mean number of c Fos-positive neurons ( $\pm$  SEM) in the hippocampus and medial prefrontal cortex of rats tested in the Curtain condition at the 5 (recent) and 25-day (remote) retention delays.**

<b>Region</b>	<b>Recent</b>	<b>Remote</b>
<b>CA1</b>	3.73 $\pm$ 0.74	2.55 $\pm$ 0.76
<b>CA3</b>	5.82 $\pm$ 0.42	4.20 $\pm$ 0.53
<b>DG</b>	4.21 $\pm$ 0.41	2.76 $\pm$ 0.85
<b>ACC</b>	3.71 $\pm$ 0.77	3.99 $\pm$ 1.69
<b>PL</b>	11.6 $\pm$ 1.39	13.8 $\pm$ 2.47
<b>IL</b>	8.12 $\pm$ 1.38	10.8 $\pm$ 3.18

DG = Dentate gyrus ; ACC = Anterior cingulate cortex ; PL = Prelimbic cortex ; IL = Infralimbic cortex

**Table S2: Mean number of c Fos-positive neurons ( $\pm$  SEM) in the hippocampus and medial prefrontal cortex of rats in the Home Cage condition at the 5 (recent) and 25-day (remote) retention delays in the STC and the CEC.**

<b>Region</b>	<b>STC</b>	<b>CEC</b>
<b>CA1</b>	0.77 $\pm$ 0.23	1.89 $\pm$ 0.37
<b>CA3</b>	1.96 $\pm$ 0.36	3.33 $\pm$ 0.25
<b>DG</b>	1.67 $\pm$ 0.46	1.60 $\pm$ 0.32
<b>ACC</b>	1.33 $\pm$ 0.29	6.70 $\pm$ 1.88
<b>PL</b>	2.49 $\pm$ 0.69	14.3 $\pm$ 3.06
<b>IL</b>	4.36 $\pm$ 0.80	11.4 $\pm$ 2.90

DG = Dentate gyrus ; ACC = Anterior cingulate cortex ; PL = Prelimbic cortex ; IL = Infralimbic cortex ; STC = Standard Context ; CEC = Cue-enriched Context

**Table S3: Mean number of c Fos-positive neurons ( $\pm$  SEM) in the hippocampus and medial prefrontal cortex of rats tested in the Hidden condition at the 5 (recent) and 25-day (remote) retention delays in the STC and the CEC.**

<b>Region</b>	<b>Recent STC</b>	<b>Remote STC</b>	<b>Recent CEC</b>	<b>Remote CEC</b>
<b>CA1</b>	3.39 $\pm$ 0.58	4.44 $\pm$ 0.78	4.63 $\pm$ 0.77	9.56 $\pm$ 2.30
<b>CA3</b>	4.76 $\pm$ 0.31	5.40 $\pm$ 0.64	3.51 $\pm$ 0.44	6.06 $\pm$ 0.81
<b>DG</b>	5.83 $\pm$ 0.95	5.59 $\pm$ 0.92	2.78 $\pm$ 0.41	5.07 $\pm$ 0.90
<b>ACC</b>	3.86 $\pm$ 1.24	4.14 $\pm$ 0.88	16.2 $\pm$ 3.22	42.8 $\pm$ 9.00
<b>PL</b>	16.7 $\pm$ 1.79	17.5 $\pm$ 1.96	25.3 $\pm$ 5.40	39.8 $\pm$ 7.43
<b>IL</b>	16.2 $\pm$ 1.31	19.3 $\pm$ 2.00	22.6 $\pm$ 5.09	27.6 $\pm$ 7.89

DG = Dentate gyrus ; ACC = Anterior cingulate cortex ; PL = Prelimbic cortex ; IL = Infralimbic cortex ; STC = Standard Context ; CEC = Cue-enriched Context

**Table S4: Mean number of c Fos-positive neurons ( $\pm$  SEM) in the hippocampus and medial prefrontal cortex of rats tested in the Visible condition at the 5 (recent) and 25-day (remote) retention delays in the STC and the CEC.**

<b>Region</b>	<b>Recent STC</b>	<b>Remote STC</b>	<b>Recent CEC</b>	<b>Remote CEC</b>
<b>CA1</b>	3.85 $\pm$ 0.92	3.04 $\pm$ 0.51	3.35 $\pm$ 0.56	6.95 $\pm$ 1.14
<b>CA3</b>	6.32 $\pm$ 0.76	4.75 $\pm$ 0.61	4.87 $\pm$ 0.62	5.62 $\pm$ 0.53
<b>DG</b>	6.54 $\pm$ 1.05	4.05 $\pm$ 0.92	3.48 $\pm$ 0.78	5.05 $\pm$ 0.40
<b>ACC</b>	5.31 $\pm$ 1.91	3.32 $\pm$ 0.55	6.05 $\pm$ 1.57	6.75 $\pm$ 1.90
<b>PL</b>	20.3 $\pm$ 4.02	15.5 $\pm$ 2.64	11.4 $\pm$ 3.68	18.2 $\pm$ 2.78
<b>IL</b>	22.4 $\pm$ 2.51	17.3 $\pm$ 3.66	12.3 $\pm$ 4.09	16.8 $\pm$ 2.53

DG = Dentate gyrus ; ACC = Anterior cingulate cortex ; PL = Prelimbic cortex ; IL = Infralimbic cortex ; STC = Standard Context ; CEC = Cue-enriched Context

**Table S5: Effects of intrahippocampal- or intracortical infusion of LIDO on local cerebral glucose utilization.**

Structures	Side	Intrahippocampal infusion		
		PBS	LIDO 20	LIDO 40
<b>Hippocampus and surrounding areas</b> Antero-dorsal hippocampus (1)	I	236 ± 20	191 ± 5*	146 ± 5**
	C	238 ± 29	289 ± 24	272 ± 23
Antero-dorsal hippocampus (2)	I	290 ± 35	195 ± 10*	194 ± 28*
	C	265 ± 35	291 ± 20	281 ± 21
Postero-dorsal hippocampus	I	256 ± 26	288 ± 14	311 ± 15
	C	292 ± 31	276 ± 8	332 ± 14
Ventral hippocampus	I	243 ± 18	253 ± 10	255 ± 12
	C	264 ± 24	261 ± 18	278 ± 10
Laterodorsal thalamus	I	362 ± 31	340 ± 11	340 ± 27
	C	355 ± 36	393 ± 30	378 ± 21
Parietal cortex	I	329 ± 36	200 ± 9*°	247 ± 23
	C	334 ± 37	386 ± 26	361 ± 20
<b>Intracortical infusion</b>				
<b>Prefrontal cortex and surrounding areas</b> Anterior cingulate cortex, area 1	I	332 ± 42	213 ± 15*	231 ± 21*
	C	337 ± 30	302 ± 21	364 ± 11
Prelimbic cortex	I	356 ± 46	227 ± 26*	210 ± 16*
	C	353 ± 48	289 ± 27	356 ± 28
Infralimbic cortex	I	334 ± 46	227 ± 24*°	310 ± 9
	C	360 ± 37	288 ± 12	376 ± 20
Motor cortex, primary area	I	299 ± 22	269 ± 22	308 ± 18
	C	291 ± 19	293 ± 13°	347 ± 14
Motor cortex, secondary area	I	296 ± 28	231 ± 23	270 ± 23
	C	288 ± 30	296 ± 14	354 ± 28

Values, expressed in nCi/g tissu, represent means ± SD of the 5-6 animals/group.

(1) Bregma -3.14 mm, (2) Bregma -3.8 mm.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , statistically significant differences from the same side in the PBS group (Newman-Keuls test).

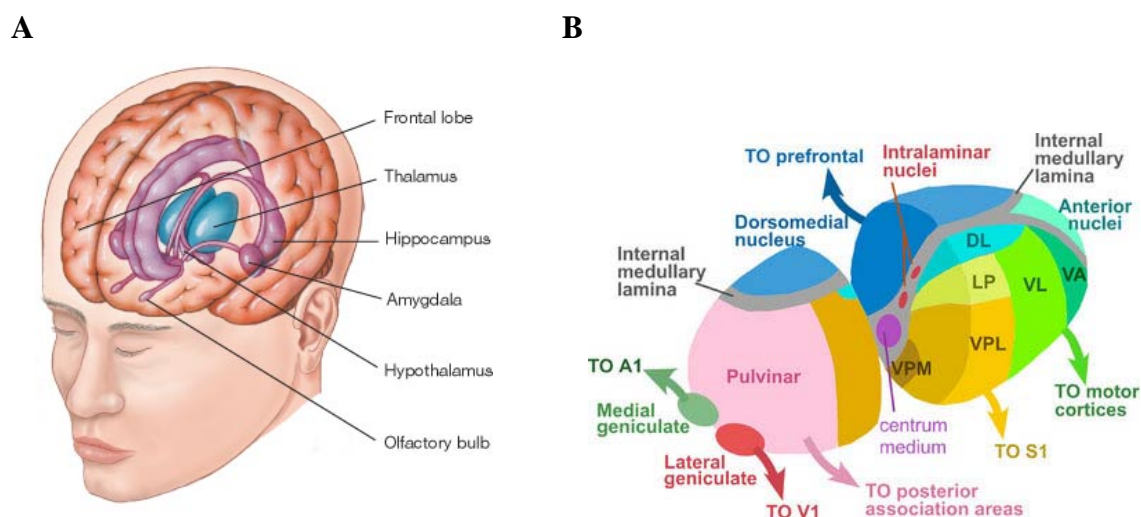
°  $P < 0.05$ , statistically significant differences from the same side in the LIDO 40 µg group (Newman-Keuls test).

Abbreviations: I, ipsilateral; C, contralateral

## Publication 4 :

### Autres structures impliquées dans la consolidation systémique

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe une voie hippocampo-préfrontale indirecte qui implique plusieurs structures, dont le thalamus (Figure 31A). Cette structure bilatérale fait partie du diencephale et a pour fonction principale de relayer des informations sensorielles, motrices, et limbiques, et de participer à la régulation de la conscience, du sommeil, et de la vigilance. Le thalamus est constitué de plusieurs agrégats de noyaux, séparés par la lame médullaire interne en 3 groupes majeurs: les noyaux antérieurs, les noyaux médians, et les noyaux latéraux. Il existe également des noyaux intralaminaires dans la lame médullaire interne (Figure 31B). Ces agrégats de noyaux ont des fonctions différentes, qui ne sont pas encore bien établies. Néanmoins, les lésions de certains noyaux thalamiques sont impliquées dans une forme d'amnésie, appelée 'diencephalique', qui ressemble fort aux amnésies antérogrades et rétrogrades développées après des lésions du lobe temporal médian (voir Aggleton et Brown, 1999, pour une revue).



**Figure 31 :** A) Localisation du thalamus dans le cerveau ([cwx.prenhall.com](http://cwx.prenhall.com)). B) Différents noyaux thalamiques ([scholarpedia.org](http://scholarpedia.org)) ; dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux noyaux antérieurs, aux noyaux intralaminaires et à la partie latérale du noyau médiodorsal.

Le thalamus faisant notamment partie de la voie hippocampo-préfrontale indirecte et jouant un rôle dans la mémoire, il pourrait donc être un bon candidat pour participer à la



consolidation systémique, mais ceci n'avait jamais été étudié auparavant. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux noyaux thalamiques antérieurs (ATN) et aux noyaux intralaminaires/latéraux (ILN/LT) de par leur connectivité différente et la dissociation fonctionnelle décrite dans la littérature. En effet, une lésion des ATN, qui ont de fortes connexions avec l'hippocampe, affecte les performances mnésiques dans des tâches hippocampo-dépendantes. En revanche, une lésion des ILN/LT, qui ont des connexions avec le cortex préfrontal, affecte les performances dans des tâches dépendantes de ce cortex (e.g. Mitchell et Dalrymple-Alford, 2006 ; Wolff et coll., 2008).

Dans cette publication, nous avons donc cherché à savoir si ces noyaux thalamiques étaient différemment impliqués dans la récupération d'une trace mnésique récente *vs.* ancienne. Pour cela, nous avons réalisé des lésions des ATN ou ILN/LT puis soumis nos rats à un apprentissage en piscine de Morris dans le contexte 'standard', avec un test de rétention réalisé 5 ou 25 jours post-acquisition. Un déficit d'acquisition a été observé dans le groupe de rats ATN, qui explique que ce groupe n'ait pas montré de rétention de la localisation de la plate-forme, et ce peu importe le délai. En revanche, le groupe ILN/LT n'a montré aucun déficit d'apprentissage, mais nous avons constaté un déficit de rétention uniquement à 25 jours post-acquisition. Ces résultats suggèrent donc pour la première fois une possible implication du thalamus, et plus particulièrement des ILN/LT, dans la consolidation systémique et/ou dans la récupération d'une trace ancienne.

## Brief Communications

# The Intralaminar Thalamic Nuclei Contribute to Remote Spatial Memory

Joëlle Lopez,<sup>1</sup> Mathieu Wolff,<sup>2</sup> Lucas Lecourtier,<sup>1</sup> Brigitte Cosquer,<sup>1</sup> Bruno Bontempi,<sup>2</sup> John Dalrymple-Alford,<sup>3</sup> and Jean-Christophe Cassel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, Université de Strasbourg, Institut Fédératif de Recherche 37 des Neurosciences, Groupement de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique 2905 Neuromem, F-67000 Strasbourg, France, <sup>2</sup>Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5228, Université de Bordeaux 1, F-33405 Talence Cedex, France, and <sup>3</sup>Van der Veer Institute for Parkinson's and Brain Research and Department of Psychology, University of Canterbury, Christchurch 8140, New Zealand

Recent studies have shown that the anterior (ATN) and lateral thalamic nuclei (including the intralaminar nuclei; ILN/LT) play different roles in memory processes. These nuclei have prominent direct and indirect connections with the hippocampal system and/or the prefrontal cortex and may thus participate in the time-dependent reorganization of memory traces during systems-level consolidation. We investigated whether ATN or ILN/LT lesions in rats influenced acquisition and subsequent retrieval of spatial memory in a Morris water maze. Retrieval was assessed with a probe trial after a short (5 d, recent memory) or a long (25 d, remote memory) postacquisition delay. The ATN group showed impaired acquisition compared with the Sham controls and ILN/LT groups, which did not differ during acquisition, and exhibited no preference for the target quadrant during the recent or remote memory probe trials. In contrast, probe trial performance in rats with ILN/LT lesions differed according to the age of the memory, with accurate spatial retrieval for the recent memory probe trial but impaired retrieval during the remote memory one. These findings confirm that ATN but not ILN/LT lesions disrupt the acquisition of spatial memory and provide new evidence that the ILN/LT region contributes to remote memory processing. Thus, the lateral thalamus may modulate some aspects of remote memory formation and/or retrieval during the course of systems-level consolidation.

## Introduction

The anterior (ATN) and intralaminar (ILN) thalamic nuclei have been increasingly implicated as key regions in human diencephalic amnesia (Aggleton and Brown, 1999; Gold and Squire, 2006). In rats, ATN lesions produce spatial and nonspatial deficits that are similar to those observed after hippocampal damage (Warburton and Aggleton, 1999; Van Groen et al., 2002; Wolff et al., 2006), and the functional link between these two structures is supported by disconnection studies (Warburton et al., 2001; Henry et al., 2004). In contrast, lesions that include the rostral ILN (i.e., the paracentral, central lateral, and anterior central medial nuclei) and the adjacent lateral mediodorsal thalamic nuclei (ILN/LT lesions) impair performance in tasks that reflect prefrontal cortex function, but have little influence on the acquisition of allocentric spatial memory unless these lesions encroach onto the adjacent ATN (Savage et al., 1997; Bailey and Mair, 2005;

Mitchell and Dalrymple-Alford, 2005; Mitchell and Dalrymple-Alford, 2006; Wolff et al., 2008).

Although the ATN and the ILN differ in their influence on the acquisition of allocentric spatial memory tasks, it is not known whether either region influences consolidation and retrieval of remote spatial memory, which is important for a fuller understanding of their role in memory processes. Both diencephalic regions have prominent neural connections with the prefrontal cortex, especially the medial prefrontal cortex (Berendse and Groenewegen, 1991; Van der Werf et al., 2002), which has been strongly implicated in the expression of remote memory (Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; Teixeira et al., 2006). We therefore tested the hypothesis that ILN/LT lesions have little impact on spatial memory acquisition in the Morris water maze, yet impair the expression of remote (25 d), but not recent (5 d), spatial memory. While hippocampal dysfunction impairs consolidation in some tasks (Maviel et al., 2004), it fails to spare retention of spatial memory in the water maze (Broadbent et al., 2006), and ATN lesions have similarly failed to spare preoperatively trained spatial memory in this task (Warburton et al., 1999). To confirm the unique influence of ILN/LT lesions, we therefore contrasted the effects of ILN/LT and ATN lesions on performance in recent and remote memory tests after training in a Morris water maze.

## Materials and Methods

**Animals and surgery.** The study adhered to the regulations specified by the European Committee Council Directive of November 24, 1986 (86/

Received Nov. 21, 2008; revised Jan. 22, 2009; accepted Feb. 10, 2009.

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-NEURO-027-04), the University Louis Pasteur (J.D.-A.), the Centre National de la Recherche Scientifique, a 3 year fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (J.L.), and the Fondation pour la Recherche Médicale (M.W.). We are grateful to O. Bildstein, D. Egesi, and G. Edomwonyi for their assistance in animal care, and to Dr. Rodrigue Galani for his help regarding the electronic figure formats.

Correspondence should be addressed to Dr. Jean-Christophe Cassel, Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. E-mail: jean-christophe.cassel@llnc.u-strasbg.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5576-08.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/293302-05\$15.00/0

609/EEC) and the French Department of Agriculture (authorization n°67-215 for J.-C.C.). Fifty-nine male Long–Evans rats, 3 months old at the time of surgery, were used. They were housed individually in a quiet room, under a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 A.M.) with *ad libitum* access to food and water. For surgery, they were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p., 20 min after atropine, 0.22 mg/kg, i.p.) and secured in a stereotaxic frame (incisor bar –7.5 mm). ATN and ILN/LT lesions were made via slow infusions of sub-microliter volumes of *N*-methyl-D-aspartate (supplemental Fig. S1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). ATN lesions targeted the anterodorsal, anteromedial, and anteroventral thalamic nuclei, while ILN/LT lesions included the centrolateral, paracentral, rostral central medial, and the lateral/paralamellar mediodorsal nuclei. The latter were included because this subregion of the mediodorsal nucleus has similar prefrontal cortex connections to those of the ILN (Mitchell and Dalrymple-Alford, 2005). The sham-operated controls (SHAM) had the infusion needle lowered to either the ATN or ILN/LT coordinates.

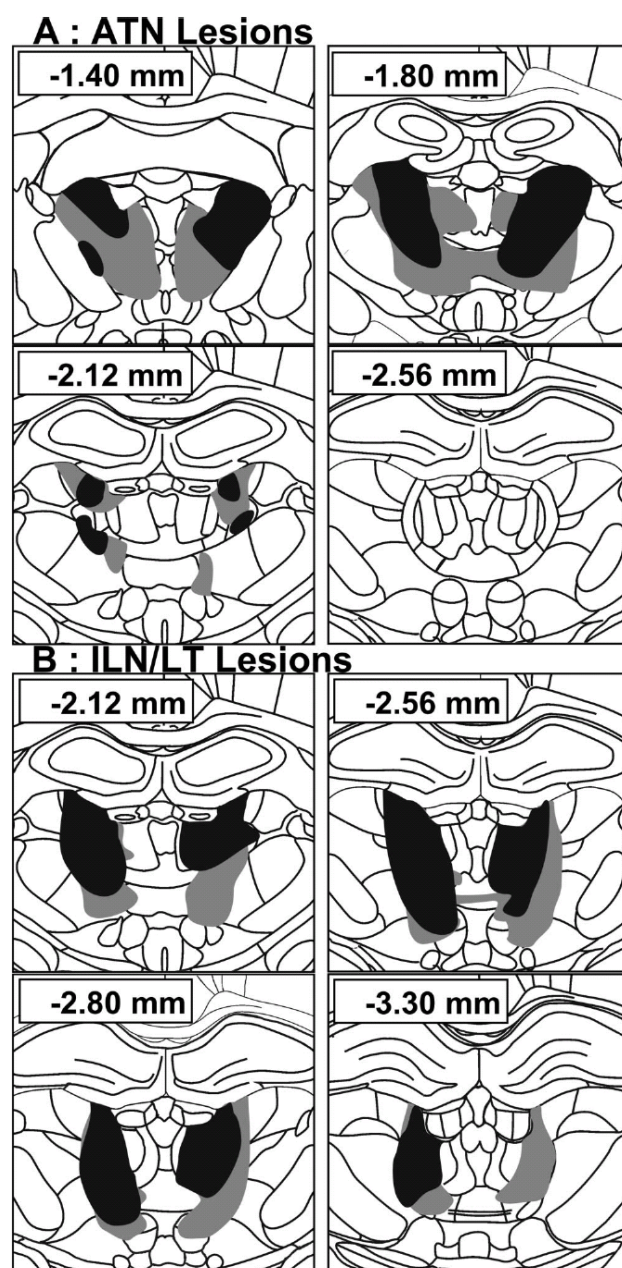
After a 10 d recovery period, the rats first received counterbalanced spatial training on Packard and McGaugh's (1992) two water-maze tasks, which both used visual cues that signaled the varying placement of a hidden platform in one task, but could not be used to identify the fixed platform in the second task. Neither lesion group was impaired on the visual discrimination task, ruling out any nonmnemonic effects of the thalamic lesions on water maze performance. The ILN/LT group was also unimpaired on the spatial task whereas the ATN group showed a marked deficit (data not shown). The current study on recent and remote memory was conducted 2 months later, but in a different water maze placed in a new room with different spatial cues.

**Spatial testing in the Morris water maze.** The specifications of the water maze and the testing procedures have been described previously (Pereira de Vasconcelos et al., 2006). The first part of training was a four trial session using a visible platform located in the South-East quadrant of the pool, starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool. The rats were then given four successive acquisition trials per day (intertrial interval, 10–15 s), starting randomly from each of the four cardinal points from the edge of the pool, for eight consecutive days to learn the location of a platform hidden 1 cm below the water surface in the North-West quadrant. The distance traveled before reaching the platform was computed by a videotracking system (Ethovision, Noldus).

At the end of acquisition, rats from each group were allocated randomly to one of two treatment subgroups and then tested for retention in a probe trial administered either 5 d (recent memory,  $n_{ATN} = 11$ ,  $n_{ILN/LT} = 11$ ,  $n_{SHAM} = 9$ ) or 25 d postacquisition (remote memory,  $n_{ATN} = 10$ ,  $n_{ILN/LT} = 10$ ,  $n_{SHAM} = 8$ ). The platform was removed and all rats were released from the North-East start point and given 60 s to swim. The primary retention measure was the accuracy ratio (Koenig et al., 2008) calculated as follows: time spent in the target quadrant ( $T_{QT}$ ) multiplied by 3 and divided by the time spent in the other three quadrants ( $T_{Q1}$ ,  $T_{Q2}$ ,  $T_{Q3}$ ). The number of crossings in the target area, corresponding to the size of the platform enlarged by a 10 cm wide annulus, was analyzed and used as an index of memory precision. Heading vectors were also examined, defined as the deviation (in degrees) of the initial swim segment of the first 25 cm of a linear swim direction relative to the platform's position.

**Histology.** Rats received an overdose of sodium pentobarbital (200 mg/kg, i.p.) and were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (in 0.1 M PBS; 4°C). Brains were postfixed for 2 h in the same fixative before cryoprotection for 48 h (at 4°C) in a 20% sucrose solution (in 0.1 M PBS). The brains were then snap-frozen in isopentane at –40°C and kept at –80°C until coronal sections (30  $\mu$ m thick) were made (Reichert Jung cryostat, Frigocut 2800). Estimation of thalamic damage based on cresyl-stained sections was done as described previously (Mitchell and Dalrymple-Alford, 2005) (supplemental Fig. S2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Additional hippocampal sections were stained for acetylcholinesterase (AChE) histochemistry to check whether the lesion procedure had altered the cholinergic innervation of the hippocampus (supplemental Fig. S3, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

**Statistical analyses.** Performance during acquisition was evaluated using a three-way repeated measure ANOVA (day: 1–8; lesion: ATN, ILN/LT,



**Figure 1.** Schematic representation of the smallest (black) and largest (gray) thalamic lesions. **A**, Anterior thalamic nuclei group (ATN). **B**, Intralaminar nucleus/lateral thalamic lesion group (ILN/LT). Numbers (in mm) indicate the distance of each section from bregma (according to Paxinos and Watson, 1998).

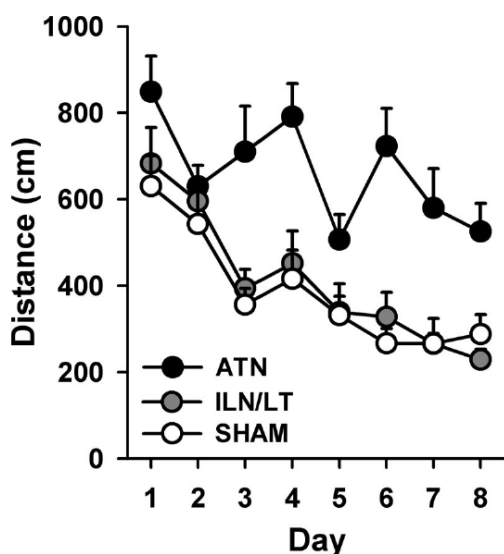
SHAM; delay: 5 and 25 d). Effects of lesions on retention in each probe trial were analyzed using a one-way ANOVA as well as one-sample *t* tests to compare the accuracy ratios with chance (i.e., from 1.0). *Post hoc* comparisons used the Newman–Keuls multiple range test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## Results

### Placement and extent of the lesions

Figure 1 shows the largest and smallest ATN and ILN/LT lesions in the rats that were included in the behavioral analyses (representative pictures shown in supplemental Fig. S4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Five ATN (two from the 5 d group, three from the 25 d group) and three ILN/LT





**Figure 2.** Effects of thalamic lesions on the acquisition of the hidden version of the water-maze task. Mean ( $\pm$ SEM) distances to reach the platform are shown for the ATN, ILN/LT and SHAM groups. ATN rats were impaired.

rats (two from the 5 d group, one from the 25 d group) had insufficient damage to the targeted area (<50%) and were discarded from the analyses. Final sample sizes were as follows: 5 d group,  $n_{ATN} = 9$ ,  $n_{ILN/LT} = 9$ ,  $n_{SHAM} = 9$ ; 25 d group,  $n_{ATN} = 7$ ,  $n_{ILN/LT} = 9$ ,  $n_{SHAM} = 8$ .

No significant differences in the extent of the ATN and ILN/LT lesions were found between the 5 and 25 d delay groups [ $F < 1$ , nonsignificant (n.s.) for either lesion]. The damage was comparable to previous work (Mitchell and Dalrymple-Alford, 2006; Wolff et al., 2008) and highly specific to the ATN or ILN/LT, with minimal damage to the alternate target or other adjacent thalamic nuclei. In the retained 16 ATN rats, there was a median of 75.8% damage (range, 50.0–94.5%) to the ATN, and only 9.9% damage (range, 1.3–29.4%) to the ILN/LT region and 3.8% damage (range, 0.6–13.7%) to the remaining mediodorsal region [lesions of this latter region can induce memory impairments; Mitchell and Dalrymple-Alford (2005)]. In the retained 18 ILN/LT rats, there was a median of 63.7% damage (range, 50.8–74.3%) to the ILN/LT, and only 3.3% damage (range: 0.0–20.0%) to the ATN and 22.2% damage (range, 5.2–33.5%) to the mediodorsal region. Damage to other thalamic structures was minimal (supplemental Fig. S5, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material). ILN/LT lesions had no significant effect on hippocampal AChE staining while ATN lesions marginally affected the ventral hippocampus (supplemental Fig. S6, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

**Acquisition of the hidden version of the water maze task**

Spatial acquisition of the three groups (ATN, ILN/LT, and SHAM) is shown in Figure 2. While all groups showed improvement over days ( $F_{(7,322)} = 18.5$ ;  $p < 0.001$ ; delay  $\times$  lesion  $\times$  day interaction:  $F_{(14,322)} < 1$ , n.s.), there was a main effect of lesion ( $F_{(2,46)} = 13.8$ ;  $p < 0.001$ ), with ATN rats swimming significantly longer distances to reach the platform than both the ILN/LT and SHAM groups, which did not differ ( $p > 0.20$ ). Despite reducing their mean path lengths during acquisition, the ATN group’s performance remained impaired at the end of acquisition.

**Probe trials**

*Recent memory (5 d delay)*

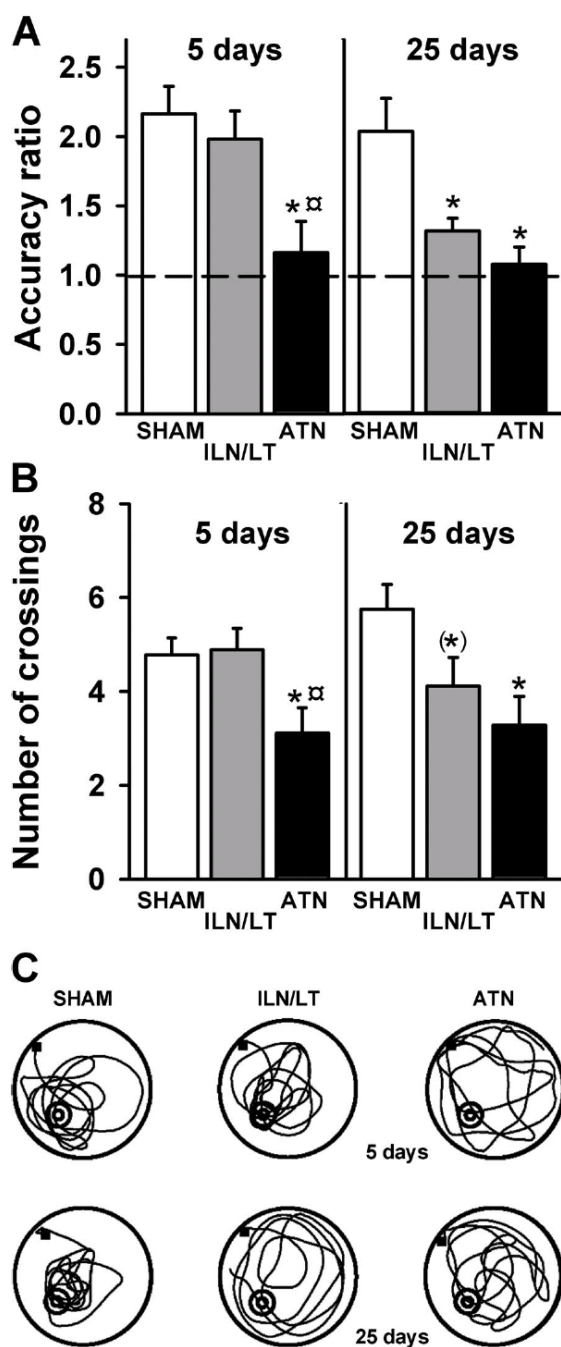
The mean accuracy ratios during the recent probe trial are shown in Figure 3A (left). There was a significant lesion effect ( $F_{(2,24)} = 6.5$ ;  $p < 0.01$ ), with the ATN group spending significantly less time in the target area compared with ILN/LT and SHAM groups ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively), which did not differ significantly. For ATN rats, this accuracy ratio was not significantly different from 1.0 (chance level,  $t_8 < 1.0$ ). In the two other groups, however, this ratio was significantly higher than 1.0 (ILN/LT:  $t_8 = 4.9$ ,  $p < 0.01$ ; SHAM:  $t_8 = 5.8$ ,  $p < 0.01$ ), showing good recall of the platform’s location. There was also a significant Lesion effect in terms of the number of crossings over the target area ( $F_{(2,24)} = 4.7$ ;  $p < 0.05$ ) as the ATN rats crossed the target area significantly less frequently than the rats of the other two groups ( $p < 0.05$  for both comparisons) (Fig. 3B, left). These differences in search strategies were visible in the swim paths (Fig. 3C, top part). Analysis of the heading vectors (SHAM:  $37.4^\circ \pm 11.1$ ; ATN:  $47.1^\circ \pm 7.8$ ; ILN/LT:  $55.7^\circ \pm 7.7$ ) showed no significant group effect ( $F_{(2,24)} = 1.16$ , n.s.). Finally, there were no significant differences among groups regarding thigmotaxic behavior, assessed by measuring the percentage time spent within a 10 cm annulus from the pool’s border ( $F_{(2,24)} < 1.0$ , n.s.) (supplemental Fig. S7, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

*Remote memory (25 d delay)*

The mean accuracy ratios during the remote probe trial are shown in Figure 3A (right). There was a significant main effect of lesion ( $F_{(2,21)} = 8.6$ ;  $p < 0.01$ ), which was due to both the ATN and ILN/LT groups spending significantly less time in the target area compared with SHAM rats ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively). The accuracy ratio of the ATN group was again not significantly different from chance ( $t_6 < 1.0$ ), unlike that of the SHAM group ( $t_7 = 3.9$ ,  $p < 0.01$ ). More importantly, the ILN/LT group also showed a poor level of preference for the correct quadrant, although the accuracy ratio was slightly, but significantly, above chance ( $t_8 = 3.5$ ,  $p < 0.01$ ). There was also a significant lesion effect for the number of crossings in the target area ( $F_{(2,21)} = 4.4$ ;  $p < 0.05$ ). ATN rats crossed this area significantly less frequently ( $p < 0.05$ ) than SHAM rats (Fig. 3B, right). While the ILN/LT rats did not differ from ATN rats on this measure ( $p > 0.20$ ), their reduced tendency to cross the target area just failed to reach significance when compared with SHAM rats ( $p = 0.062$ ). These differences in search strategies were reflected in the swim paths exhibited by the three groups (Fig. 3C, bottom). Analysis of the heading vectors (SHAM:  $36.5^\circ \pm 8.0$ ; ATN:  $46.6^\circ \pm 5.6$ ; ILN/LT:  $58.3^\circ \pm 9.4$ ) showed no significant Group effect ( $F_{(2,21)} = 2.01$ ;  $p = 0.16$ ). Analysis of the thigmotaxic behavior revealed no significant differences among groups ( $F_{(2,21)} = 2.6$ ;  $p = 0.1$ ) (supplemental Fig. S7, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material).

**Discussion**

Consistent with previous findings, this study shows that ILN/LT lesions did not affect acquisition of a spatial memory task or its recent retrieval assessed 5 d after the end of acquisition (Mitchell and Dalrymple-Alford, 2005; 2006; Wolff et al., 2008) (but see Mair et al., 1998; Gibb et al., 2006). In contrast, ILN/LT lesions dramatically impaired performance during the remote memory probe trial. Since these lesions did not affect AChE activity in the hippocampus, it is highly unlikely that the observed impairment was due to an alteration in cholinergic innervation of the hippocampal region. The selective detrimental effect of ILN/LT lesions on remote memory expression suggests a role for the ILN/LT in the processing of remote spatial memory. In contrast,



**Figure 3.** Effects of thalamic lesions on recent and remote spatial memory. **A**, Mean ( $\pm$ SEM) accuracy ratio for the probe trial in the three subgroups tested after a 5 d (left) or a 25 d (right) postacquisition delay. Performance is expressed as the accuracy ratio (see Materials and Methods; dashed line: chance). Significantly different from SHAM: \* $p < 0.01$ . Significantly different from ILN/LT:  $\#p < 0.05$ . **B**, Mean ( $\pm$ SEM) number of crossings in the target area for the probe trial, at the 5 d (left) and 25 d (right) postacquisition delays. Significantly different from SHAM: \* $p < 0.05$ . Tendency to differ from SHAM: ( $\#$ ) $p = 0.062$ . Significantly different from ILN/LT:  $\#p < 0.05$ . **C**, Representative swim paths in each thalamic group during the 5 d (recent memory, upper part) and 25 d (remote memory, lower part) probe trials. The black square indicates the starting point. The position of the platform during acquisition is marked in the lower left quadrant. At both delays, SHAM rats remembered the spatial position of the platform and concentrated their searches in the target quadrant where the platform was located. In contrast, ATN lesions affected spatial exploration at both delays while ILN/LT rats were impaired only during the remote probe trial.

ATN rats were severely impaired at all stages of spatial memory testing (acquisition and retrieval), thus confirming the crucial role played by the ATN in the acquisition of spatial information (Byatt and Dalrymple-Alford, 1996; Aggleton et al., 1996; Bailey and Mair, 2005; Mitchell and Dalrymple-Alford, 2005, 2006; Wolff et al., 2008).

This study provides the first evidence of a selective role of the ILN/LT in the processing of remote spatial memory. The observed remote memory impairment could be explained by the disconnection of the ILN/LT from the anterior cingulate cortex, a subdivision of the medial prefrontal cortex thought to be actively involved in remote memory processing. Indeed, neuronal inactivation of the medial prefrontal cortex impairs retrieval of remote but not recent spatial (Maviel et al., 2004) or contextual fear memories (Frankland et al., 2004). Whether the prefrontal cortex contributes to memory storage per se or exerts a more executive role in integrating and coordinating memory retrieval from other distributed cortical sites remains uncertain (Simons and Spiers, 2003; Frankland and Bontempi, 2005). Consequently, by disrupting prefrontal activity of hippocampal-cortical interactions during the course of the memory consolidation process, ILN/LT lesions may have prevented the formation of memories at the cortical level and/or affected retrieval processes. The ILN/LT also projects to the striatum (Lacey et al., 2007), but it is unlikely that an alteration of this striatal pathway might explain our observed remote memory deficit given the marginal role played by the striatum in either the acquisition or consolidation of place learning (Packard et al., 2001). A procedural memory impairment is equally unlikely as this form of memory is typically very robust and its alteration is likely to cause thigmotaxic behavior, which was not observed here in the lesioned rats.

According to the standard consolidation theory, a memory trace is initially encoded within hippocampal-neocortical networks but extrahippocampal structures such as the prefrontal cortex are thought to become increasingly important over time (Frankland and Bontempi, 2005). The hippocampal-prefrontal pathways are therefore essential for the time-dependent reorganization of memory traces. One of these pathways connects the hippocampus directly to the medial prefrontal cortex, originating from the CA1 region of the hippocampus and the subiculum, and terminating in the prelimbic cortex (Thierry et al., 2000). There are, however, indirect pathways in which thalamic nuclei act as relay stations. Indeed, Groenewegen et al. (1999) described two circuits which are organized into corticostriatal loops, that are themselves connected to the hippocampus. The first circuit starts in the CA1 and the subiculum, and projects to the shell of the nucleus accumbens and to the medial part of the ventral pallidum. These structures in turn project partly to the central medial and paracentral nuclei (part of the ILN/LT aggregate), which then project to the medial prefrontal cortex (Montaron et al., 1996; Groenewegen et al., 1999; Thierry et al., 2000). The second circuit, also starting in the hippocampus, projects toward the core of the nucleus accumbens and then to the dorsomedial part of the substantia nigra *pars reticulata*, before innervating these same thalamic nuclei as well as the medial prefrontal cortex (Montaron et al., 1996; Groenewegen et al., 1999; Thierry et al., 2000). These pathways could thus modulate the direct hippocampal-prefrontal pathway that is important for spatial memory processing (Thierry et al., 2000; Floresco and Grace, 2003; Wang and Cai, 2008) and might represent a necessary feedback for remote spatial memory processing.

Due to similarities between the effects of hippocampal and ATN lesions, we also sought to examine the involvement of the ATN in the



retrieval of recent and remote memory. Just like hippocampal lesions, we found that ATN lesions disrupted the acquisition of the hidden version of the water maze task. Such a deficit confirms previous findings obtained in both a radial maze (Aggleton et al., 1996) and a Morris water maze (Warburton and Aggleton, 1999; Van Groen et al., 2002; Wolff et al., 2008). Given their poor acquisition, it was not surprising that ATN rats performed at chance level during the recent and remote probe trials. While cholinergic innervation of the dorsal hippocampus was not affected, it is noteworthy that AChE staining was mildly reduced in the ventral hippocampus of ATN rats (supplemental Fig. S6, available at [www.jneurosci.org](http://www.jneurosci.org) as supplemental material), although it is not clear whether this change represents a functional or unintended structural consequence of the ATN lesion. It is unlikely that weaker cholinergic function accounted for the observed acquisition deficit found in ATN rats, as an almost complete cholinergic denervation of the hippocampus has little effect on spatial tasks (Lehmann et al., 2002; Parent and Baxter, 2004).

In conclusion, this study shows that the ILN/LT region plays a selective role in spatial memory processing. While ILN/LT lesions did not interfere with either the acquisition of spatial memory or with its recent expression (5 d delay), we provide evidence that they selectively impaired expression of spatial remote memory by interfering with its formation and/or retrieval (25 d delay). This suggests that the ILN/LT region represents a critical component of an extrahippocampal network involved in the time-dependent reorganization of spatial memory during the course of systems-level memory consolidation.

## References

- Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22:425–444; discussion 444–489.
- Aggleton JP, Hunt PR, Nagle S, Neave N (1996) The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. *Behav Brain Res* 81:189–198.
- Bailey KR, Mair RG (2005) Lesions of specific and non-specific thalamic nuclei affect prefrontal cortex-dependent aspects of spatial working memory. *Behav Neurosci* 119:410–419.
- Berendse HW, Groenewegen HJ (1991) Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience* 42:73–102.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13:181–191.
- Byatt G, Dalrymple-Alford JC (1996) Both anteromedial and anteroventral thalamic lesions impair radial-maze learning in rats. *Behav Neurosci* 110:1335–1348.
- Floresco SB, Grace AA (2003) Gating of hippocampal-evoked activity in prefrontal cortical neurons by inputs from the mediodorsal thalamus and ventral tegmental area. *J Neurosci* 23:3930–3943.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130.
- Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304:881–883.
- Gibb SJ, Wolff M, Dalrymple-Alford JC (2006) Odour-place paired-associate learning and limbic thalamus: comparison of anterior, lateral and medial thalamic lesions. *Behav Brain Res* 172:155–168.
- Gold JJ, Squire LR (2006) The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learn Mem* 13:699–710.
- Groenewegen HJ, Galis-de Graaf Y, Smeets, WJ (1999) Integration and segregation of limbic cortico-striatal loops at the thalamic level: an experimental tracing study in rats. *J Chem Neuroanat* 16:167–185.
- Henry J, Petrides M, St-Laurent M, Sziklas V (2004) Spatial conditional associative learning: effects of thalamo-hippocampal disconnection in rats. *Neuroreport* 15:2427–2431.
- Koenig J, Cosquer B, Cassel JC (2008) Activation of septal 5-HT1A receptors alters spatial memory encoding, interferes with consolidation, but does not affect retrieval in rats subjected to a water-maze task. *Hippocampus* 18:99–118.
- Lacey CJ, Bolam JP, Magill PJ (2007) Novel and distinct operational principles of intralaminar thalamic neurons and their striatal projections. *J Neurosci* 27:4374–4384.
- Lehmann O, Bertrand F, Jeltsch H, Morer M, Lazarus C, Will B, Cassel JC (2002) 5,7-DHT-induced hippocampal 5-HT depletion attenuates behavioural deficits produced by 192 IgG-saporin lesions of septal cholinergic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 15:1991–2006.
- Mair RG, Burk JA, Porter MC (1998) Lesions of the frontal cortex, hippocampus, and intralaminar thalamic nuclei have distinct effects on remembering in rats. *Behav Neurosci* 112:772–792.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96–99.
- Mitchell AS, Dalrymple-Alford JC (2005) Dissociable memory effects after medial thalamus lesions in the rat. *Eur J Neurosci* 22:973–985.
- Mitchell AS, Dalrymple-Alford JC (2006) Lateral and anterior thalamic lesions impair independent memory systems. *Learn Mem* 13:388–396.
- Montaron MF, Deniau JM, Menetrey A, Glowinski J, Thierry AM (1996) Prefrontal cortex inputs of the nucleus accumbens-nigro-thalamic circuit. *Neuroscience* 71:371–382.
- Packard MG, McGaugh JL (1992) Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav Neurosci* 106:439–446.
- Packard MG, Vecchioli SF, Schroeder JP, Gasbarri A (2001) Task-dependent role for dorsal striatum glutamate receptors in memory. *Learn Mem* 8:96–103.
- Parent MB, Baxter MG (2004) Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* 11:9–20.
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, Ed 4. San Diego: Academic.
- Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, Cosquer B, Lopez J, Certa U, Cassel JC (2006) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: a comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. *Neuroscience* 141:1649–1663.
- Savage LM, Sweet AJ, Castillo R, Langlais PJ (1997) The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rat. *Behav Brain Res* 82:133–147.
- Simons JS, Spiers HJ (2003) Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nat Rev Neurosci* 4:637–648.
- Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of spatial memory. *J Neurosci* 26:7555–7564.
- Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampoprefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411–419.
- Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res Rev* 39:107–140.
- van Groen T, Kadish I, Michael Wyss J (2002) Role of the anterodorsal and anteroventral nuclei of the thalamus in spatial memory in the rat. *Behav Brain Res* 132:19–28.
- Wang GW, Cai JX (2008) Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic cortical circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90:365–373.
- Warburton EC, Aggleton JP (1999) Differential deficits in the Morris water maze following lesions of the anterior thalamus and fornix transection. *Behav Brain Res* 98:27–38.
- Warburton EC, Baird A, Morgan A, Muir JL, Aggleton JP (2001) The conjoint importance of the hippocampus and anterior thalamic nuclei for allocentric spatial learning: evidence from a disconnection study in the rat. *J Neurosci* 21:7323–7330.
- Wolff M, Gibb SJ, Dalrymple-Alford JC (2006) Beyond spatial memory: the anterior thalamus and memory for the temporal order of a sequence of odor cues. *J Neurosci* 26:2907–2913.
- Wolff M, Gibb SJ, Cassel JC, Dalrymple-Alford JC (2008) Anterior but not intralaminar thalamic nuclei support allocentric spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 90:71–80.

**Supplemental material**

**The intralaminar thalamic nuclei contribute to remote spatial memory**

**Lopez et al.**

**S1. Supplementary Table : Methodology used for NMDA lesions.** The lesions of the anterior (ATN) and lateral (ILN/LT) thalamic nuclei were performed according to the stereotaxic coordinates (in mm), infusion volumes and infusion rates provided in the following table.

	ATN		ILN/LT		
	Ant	Post	Ant	Ant	Post
<b>AP coordinates for B–L distance (mm)</b>			<b>AP coordinates for B–L distance (mm)</b>		
<b>0.60–0.63</b>	–2.2	–2.0	–3.1	–3.1	–3.5
<b>0.64–0.66</b>	–2.3	–2.1	–3.2	–3.2	–3.6
<b>0.67–0.72</b>	–2.4	–2.2	–3.3	–3.3	–3.7
<b>ML distance</b>	±1.5	±0.8	±1.3	±1.3	±1.3
<b>DV distance</b>	–4.5	–4.5	–5.4	–5.6	–5.5
<b>Volume (µl, 0.12 M)</b>	0.9	1.1	0.6	0.6	0.6
<b>Infusion rate (µl/min)</b>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

AP: anterior-posterior distance from bregma; Ant: Anterior; coordinates varied in line with individual rat’s bregma-lambda (B-L) distances; ATN: anterior thalamic nuclei comprising the anterodorsal, anteromedial, and anteroventral thalamic nuclei; DV: dorsal-ventral distance from dura; ILN/LT: lateral medial thalamic nuclei comprising the intralaminar nuclei (centrolateral, paracentral, and rostral central medial nuclei) and lateral mediodorsal thalamic nuclei (lateral and paralamellar nuclei); ML: medial-lateral distance from midline; Post: posterior; coordinates varied in line with individual rat’s bregma-lambda (B-L) distances..

**S2. Supplementary methods : Assessment of lesion extent.** Serial sections throughout the thalamus were stained with cresyl violet to visualize the lesion placement and extent. Two of the authors (M.W. and L.L.), blind to the experimental conditions, evaluated the lesions. Lesions were drawn using the relevant plates of a rat brain atlas (Paxinos & Watson, 1998) and replicated on electronic copies of the atlas so that automated pixel counts of the thalamic nuclei in the target regions could be used to estimate lesion volumes by factoring in the distances provided by the atlas. Collapse of areas surrounding the ATN and ILN/LT lesions and variation in the angle of sections required a conventional visual, rather than a direct image, analysis. As in previous experiments, acceptable lesions were defined as having more than 50% bilateral damage to the intended area (i.e., ATN or ILN/LT), but no

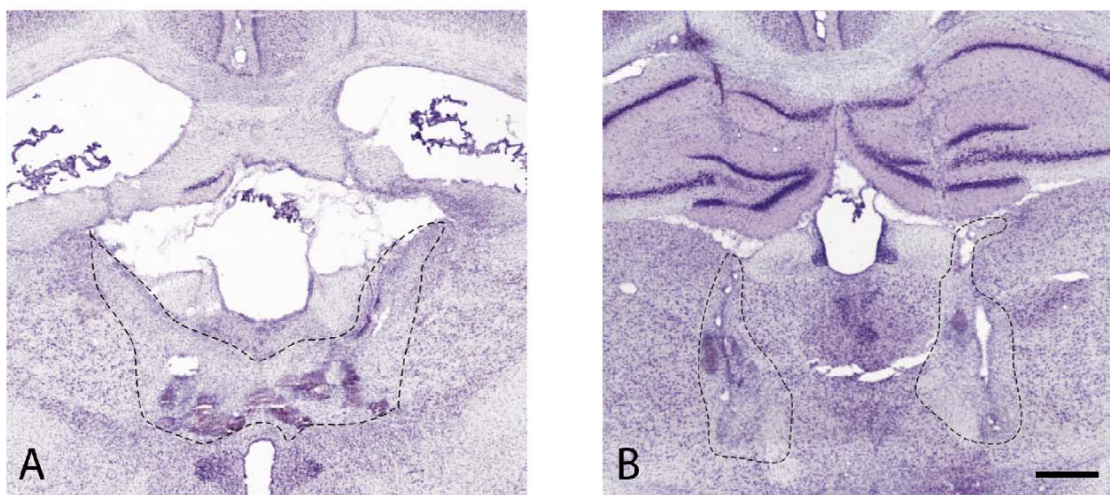


more than 40% damage to the alternate target region (for details, see Mitchell and Dalrymple-Alford, 2005; Wolff et al., 2008).

**S3. Supplementary methods : Quantification of acetylcholinesterase (AChE) activity.**

AChE activity was revealed by histochemistry (Koelle, 1954) on 30- $\mu$ m thick coronal sections. Ethopropazine (0.3 mM; Sigma, Saint-Louis, USA) was used to block nonspecific cholinesterases, and acetylthiocholine iodide (4 mM; Sigma) was used as the substrate. Optical density (OD) of the AChE reaction products was quantified in each left and right anterior-dorsal hippocampus (-2.80 mm from Bregma), left and right posterior-dorsal hippocampus (-3.60 mm from Bregma), and left and right ventral hippocampus (-4.80 mm from Bregma; see Traissard et al., 2007). The background OD for each rat was obtained from the corpus callosum, which displays almost no AChE-positive reaction products, and this measure was subtracted from all hippocampal measures prior to analysis. One ATN rat (25-day delay) and two Sham control (5-day delay) rats had to be discarded from this analysis due to unreliable staining (a few dark spots within the otherwise normally stained hippocampus in the ATN rat, and a lack of any normal staining on all sections of one Sham rat and tissue damage in the regions of interest for the second Sham rat).

**S4. Supplementary Figure : Illustration of the lesion extents.** Photomicrographs showing representative examples of the extent of ATN and ILN/LT lesions on brain sections stained with cresyl violet. **(A)** ATN lesion. **(B)** ILN/LT lesion. Scale bar = 500  $\mu$ m



**S5. Supplementary Text : Damage to other thalamic structures.** Damage to thalamic structures other than the ATN and ILN/LT, including midline nuclei, was generally minimal to modest, with the exception of the interanteromedial nucleus (ATN rats: median, 23.5%,



range: 1.7-90.3%; ILN/LT rats: median, 0.0%, range: 0.0-35.8 %) and the parataenial nucleus (ATN rats: median, 34.4%, range: 9.9-70.8%; ILN/LT rats: median, 0.0 %, range: 0.0-25.0%). Little damage occurred to the laterodorsal nucleus: ATN rats, 5.9% (range: 1.4-13.2%) and ILN/LT rats, 4.7 % (range: 0.2-18.4%). The median damage was always < 1.0% in both groups for each of the following: paraventricular and posterior paraventricular nuclei, anterior paraventricular nucleus, reuniens nucleus, and rhomboid nuclei (with a maximum value of just below 20.0% for the anterior paraventricular nucleus in both groups).

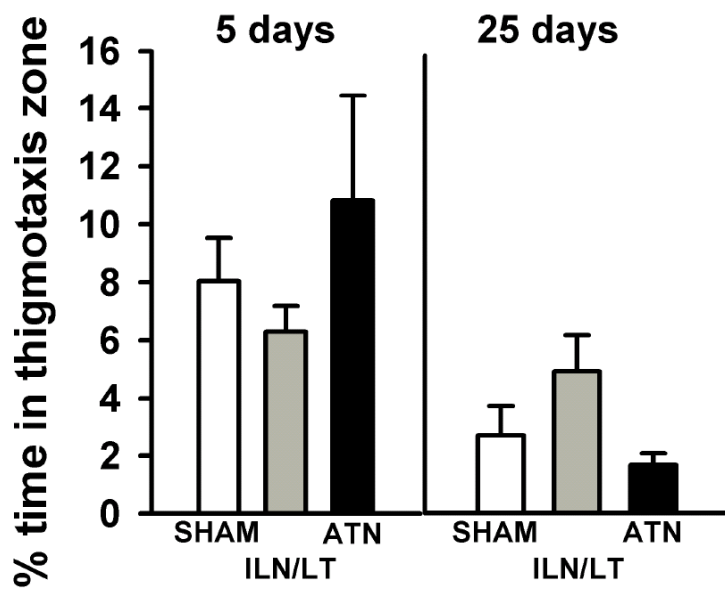
**S6. Supplementary Table : Quantitative analysis of AChE reaction products.** Optical density (OD) measurements ( $\pm$  SEM) obtained from coronal sections of rats tested at the 5 and 25-day retention delays in each lesion group (ATN, ILN/LT).

	ant DH 5d	ant DH 25d	post DH 5d	post DH 25d	VH 5d	VH 25d
<b>ATN</b>	82.6 $\pm$ 7.2	82.6 $\pm$ 7.7	75.3 $\pm$ 10.1	83.3 $\pm$ 9.9	69.4 $\pm$ 8.5	86.8 $\pm$ 13.1
<b>ILN/LT</b>	86.3 $\pm$ 8.6	86.3 $\pm$ 8.0	91.6 $\pm$ 10.2	96.4 $\pm$ 9.9	93.9 $\pm$ 8.1	99.5 $\pm$ 8.6

For each region of interest, OD measurements in the hippocampus are expressed as % of change versus optical density values obtained from SHAM controls rats. OD measurements revealed no significant differences between the right and left hemispheres whatever the hippocampal region assessed, so the values of both hemispheres were pooled. ant DH, anterior dorsal hippocampus; post DH, posterior dorsal hippocampus; VH, ventral hippocampus. ILN/LT lesions had no significant effect on hippocampal AChE staining ( $F < 1$  for all comparisons). ATN lesions marginally affected the ventral hippocampus ( $F_{(2,42)} = 3.1$ ;  $P = 0.053$ ), but there was no effect of Delay ( $F_{1,42} = 1.05$ ; ns) or Lesion x Delay interaction ( $F_{2,42} < 1$ ; ns). Post-hoc analyses revealed that overall, the ATN group had lower OD values in the ventral hippocampus than the ILN/LT group ( $P < 0.05$ ). Statistics indicated here are from ANOVAs.

**S7. Supplementary Figure : Effects of thalamic lesions on thigmotaxic behavior.**

Thigmotaxic behavior during the probe trial was analyzed by measuring the percent time the animals spent swimming in the peripheral region of the pool (i.e., the area within 10 cm of the wall). This percentage remains typically high over training when rats do not use effective search strategies and ignore the possibility of escaping from the water by climbing onto the platform. This was not the case after thalamic lesions since the average time spent by the lesioned animals in the peripheral region of the pool was low (largest mean value < 11 %). ANOVAs revealed no significant group differences during either the recent ( $F_{2,24} < 1.0$ ; ns) or remote probe trials ( $F_{2,21} < 1.0$ ; ns).



**References**

Koelle GB (1954) The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 100: 211-235.

Mitchell AS, Dalrymple-Alford JC (2005) Dissociable memory effects after medial thalamus lesions in the rat. *Eur J Neurosci* 22: 973-985.

Wolff, M, Gibb, SJ, Cassel, JC, Dalrymple-Alford, JC (2008) Anterior but not intralaminar thalamic nuclei support allocentric spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 90(1):71-80.

# Discussion générale

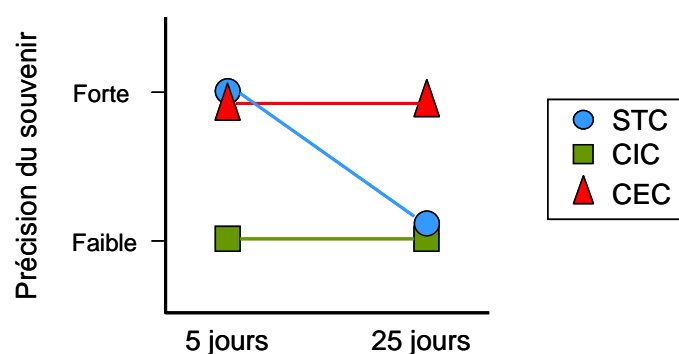


## Discussion générale

### 1. Synthèse des résultats principaux

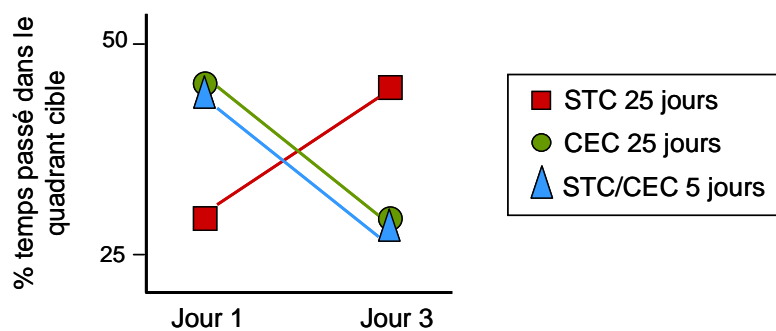
Cette thèse avait pour objectif d'étudier les interactions hippocampo-préfrontales dans le cadre de la consolidation systémique d'un souvenir spatial, en confrontant nos résultats aux différentes théories qui se proposent d'expliquer la réorganisation spatio-temporelle d'une trace mnésique. Nous nous sommes également intéressés à la nature d'une trace mnésique ancienne par rapport à celle d'une trace récente, et avons testé l'implication de différents noyaux thalamiques dans cette consolidation systémique. A travers toutes ces expériences, nous avons constaté :

1) **L'importance de la proéminence des indices distaux dans la rétention à long terme d'un souvenir spatial dans la piscine de Morris.** Nous avons mis en évidence, et ce pour la première fois, le rôle des indices distaux dans la qualité de la trace mnésique à long terme dans cette tâche (Figure 32), et nous avons montré la nécessité d'utiliser plusieurs paramètres de mesure (pourcentage de temps passé dans le quadrant cible, nombre de passages et distance parcourue dans la zone cible) dans la piscine de Morris afin de mieux évaluer la qualité du souvenir rappelé. Par ailleurs, ces résultats sont d'autant plus importants que nous avons ultérieurement utilisé cette caractéristique pour 'jouer' sur le degré de dégradation d'une trace mnésique en fonction du temps, et ceci en faisant varier le contexte du test. Ainsi, à partir d'un même protocole, le contexte 'standard' permet d'obtenir un souvenir ancien partiellement dégradé, alors que le contexte riche en indices (Cue-Enriched Context ou CEC) permet d'obtenir une trace non dégradée à très long terme.



**Figure 32** : Résumé des résultats concernant la qualité de la trace mnésique récente et ancienne dans chacun des trois contextes utilisés au cours de cette thèse. STC = contexte 'standard' ; CIC = Cue-Impoverished Context ; CEC = Cue-Enriched Context.

2) **Une dynamique d’extinction différente selon l’âge et le degré de dégradation de la trace mnésique, qui suggère une altération de la nature du souvenir en fonction de ces deux facteurs.** En effet, une trace récente suit un profil d’extinction classique, alors qu’une trace ancienne partiellement dégradée se renforce graduellement, probablement à la suite d’un processus de reconsolidation. Une trace ancienne non dégradée, en revanche, suit le même profil d’extinction qu’une trace récente (Figure 33). Ceci suggère que la nature de la trace mnésique pourrait évoluer avec le temps, selon la qualité de celle-ci (trace dégradée vs. non dégradée). Le degré de dégradation du souvenir pourrait ainsi être un facteur clé dans l’issue de certains processus mnésiques tels que l’extinction.



**Figure 33 :** Résumé des résultats sur la dynamique d’extinction d’une trace récente et d’une trace ancienne. STC = contexte ‘standard’ ; CEC = Cue-Enriched Context.

3) **La plus forte implication de l’hippocampe dorsal et du cortex cingulaire antérieur dans la récupération d’une trace ancienne que dans celle d’une trace récente, et ceci uniquement dans des conditions où le souvenir ne se dégrade pas avec le temps.** Les données d’imagerie cellulaire couplées à l’inactivation fonctionnelle réversible dans le CEC montrent en effet que l’hippocampe est toujours impliqué dans la récupération des souvenirs spatiaux, alors que le cortex préfrontal médian, et plus particulièrement le cortex cingulaire antérieur, n’est nécessaire que pour le rappel d’un souvenir ancien. En revanche, les résultats de l’imagerie cellulaire dans le contexte ‘standard’ montrent que le mPFC est peu, voire n’est pas impliqué dans la récupération d’un souvenir spatial, qu’il soit récent ou ancien, alors que la trace ancienne y est partiellement dégradée. Ces résultats nuancent pour le moins la Théorie de Rudy, et ne sont en accord parfait avec aucune des deux théories principales (à savoir la Théorie Standard de la Consolidation et la Théorie des Traces Multiples). Cependant, ces résultats mettent en avant l’importance de la qualité de la trace mnésique dans la participation des structures à la consolidation systémique et au rappel des souvenirs de nature spatiale.

4) **La participation des noyaux intralaminaires/latéraux du thalamus dans la consolidation systémique et/ou dans la récupération d'une trace ancienne.** En effectuant des lésions des noyaux thalamiques antérieurs (ATN) ou des noyaux thalamiques intralaminaires/latéraux (ILN/LT) avant l'apprentissage d'une tâche de piscine de Morris, nous avons confirmé l'importance des ATN dans l'apprentissage d'une telle tâche, sans pour autant parvenir à évaluer leur rôle dans la récupération des souvenirs quel que soit le délai, faute d'acquisition suffisante. En revanche, la lésion des ILN/LT n'a eu aucune incidence sur l'apprentissage, mais elle a affecté la performance des rats lors du rappel d'un souvenir ancien. De plus, cette lésion n'a eu aucun effet sur le rappel d'un souvenir récent. Ceci confirme donc la participation de plusieurs structures extra-hippocampiques à la consolidation systémique, et montre pour la première fois que des structures extra-corticales pourraient également intervenir.

Pour résumer, ces résultats indiquent une réorganisation spatio-temporelle d'un souvenir de nature spatiale qui implique plusieurs structures cérébrales. Néanmoins, les données dans leur ensemble ne sont pas pleinement compatibles avec l'une ou l'autre des théories actuelles sur la consolidation systémique. Les parties suivantes seront consacrées à la discussion des résultats en rapport avec ces théories.

## 2. Effets de l'âge et de la dégradation de la trace

Avec le temps, les souvenirs peuvent se dégrader et devenir plus difficilement accessibles; c'est ce que l'on appelle l'oubli naturel ou 'spontané' (Sara, 2000). Sur le plan expérimental, cet oubli peut être atténué par des protocoles d'apprentissages plus poussés, avec un plus grand nombre d'essais ou de jours d'acquisition, mais également par un apprentissage utilisant des essais discrets plutôt que consécutifs, ou encore par une ré-exposition au contexte juste avant le test de rétention (Gisquet-Verrier et Alexinsky, 1986 ; Whishaw, 1998 ; Genoux et coll., 2002). Peu d'études, en revanche, se sont intéressées à une éventuelle incidence de la prééminence des indices distaux présents dans le contexte d'apprentissage (une seule à notre connaissance : Champagne et coll., 2002), et aucune n'a abordé cette question dans le cadre d'une rétention à très long terme. Pour la première fois, nous avons montré que la prééminence des indices distaux dans une tâche de piscine de Morris est déterminante dans la résistance au temps d'une trace ancienne (Publication 1). En effet, une plus grande

proéminence des indices, comme dans le CEC, permet de compenser totalement l'oubli spontané qui intervient dans le contexte 'standard' (STC), et permet ainsi d'obtenir une trace non dégradée à très long terme (25 jours). D'autre part, ceci se fait sans changer le protocole d'acquisition et sans utiliser une ré-exposition au contexte d'apprentissage avant le test de rétention, ce qui permet donc d'effectuer des comparaisons adéquates entre les deux contextes (STC *vs.* CEC). Par ailleurs, la majorité des études effectuées avec la piscine de Morris (82 % des études effectuées entre 2004 et 2006, d'après Maei et coll., 2009) n'utilisent qu'un seul paramètre pour évaluer la rétention, le plus souvent le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible (58 % des études ; Maei et coll., 2009). Nous avons clairement montré que ce paramètre n'était pas suffisant pour évaluer correctement la qualité d'un souvenir. En effet, en comparant les performances dans le CIC et le CEC (Publication 1), le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible à 5 jours dans le CIC reflétait des performances compatibles avec un souvenir non ou peu dégradé. Or, en analysant le nombre de passages effectués dans la zone cible ainsi que la distance parcourue dans cette zone, deux indices de précision du rappel, nous avons pu détecter un manque de précision du souvenir, indiquant une plus faible qualité de la trace mnésique dans le CIC comparativement au CEC. Il est donc essentiel d'utiliser plusieurs paramètres afin d'évaluer correctement le niveau de rétention des animaux, d'autant plus que les travaux de cette thèse montrent que la qualité du souvenir est un facteur important lors de la consolidation systémique.

Que ce soit chez l'Homme ou les rongeurs, la plupart des études sur la consolidation systémique n'ont pas pris en compte le degré de dégradation de la trace. En conséquence, et de façon plus visible dans les études sur les rongeurs, alors que dans certaines expériences les animaux manifestent un oubli spontané avec le temps (e.g. Winocur, 1990 ; Bolhuis et coll., 1994 ; Bontempi et coll., 1999 ; Clark et coll., 2005a ; Martin et coll., 2005), dans d'autres, ils ne présentent aucune dégradation de la trace mnésique avec le temps (e.g. Frankland et coll., 2004 ; Maviel et coll., 2004 ; Winocur et coll., 2005a ; Blum et coll., 2006 ; Teixeira et coll., 2006). Or, Rudy et coll. ont suggéré en 2005 que la force ou le degré de dégradation de la trace déterminait le niveau de participation du cortex préfrontal médian dans la récupération d'un souvenir, peu importe son âge. L'âge et le niveau de dégradation de la trace étant des facteurs souvent confondus, ceci complique l'interprétation des données. En effet, les résultats obtenus sont-ils bien en rapport avec la consolidation systémique, ou seraient-ils uniquement liés à l'aspect qualitatif de la trace mnésique, comme le suggère la Théorie de Rudy ? L'âge et la force de la trace agiraient-ils ensemble, ou le degré de dégradation de la trace mnésique suffirait-il à impliquer le mPFC ? La quasi-totalité des expériences effectuées jusque-là sur la



consolidation systémique n'a pas contrôlé et séparé ces 2 facteurs. Cependant, les problèmes techniques de ce début de thèse nous ont justement permis d'élaborer deux conditions expérimentales où le même protocole est utilisé mais où la trace ancienne diffère dans son degré de dégradation en fonction du contexte d'acquisition et de rappel.

Ainsi, l'utilisation du contexte 'standard' a permis de mettre en évidence les effets de la dégradation d'une trace dans certains processus mnésiques comme l'extinction, en comparaison avec le CEC (Publication 2). En effet, nous voulions savoir si la réorganisation spatio-temporelle d'une trace mnésique, via la consolidation systémique, altérerait la qualité du souvenir, voire changeait la nature de la trace mnésique. Cette question, restée jusque là inexplorée, apparaît intéressante puisque dans certaines études en IRMf chez l'Homme, les sujets décrivent leurs souvenirs anciens comme étant moins riches en détails que leurs souvenirs récents. Riccio et ses collaborateurs (1992) mentionnent que la dégradation d'un souvenir peut se manifester par une généralisation de l'information suite à l'oubli de certains attributs des stimuli présents dans l'environnement. Ce principe de généralisation, repris par Biedenkapp et Rudy (2007), pourrait s'apparenter à une 'sémantisation'. En effet, avec le temps, une trace mnésique pourrait ainsi devenir plus schématique, voire 'sémantisée', et donc moins flexible face à de nouvelles situations. On pourrait alors émettre l'hypothèse selon laquelle la consolidation systémique pourrait mener à cette 'sémantisation', et donc modifier la nature de la trace mnésique. Ceci est d'autant plus important que, d'après Nadel et Moscovitch (1997) et leur Théorie des Traces Multiples, le rappel des souvenirs sémantiques impliquerait le néocortex.

D'ordinaire, un souvenir de type déclaratif a pour particularité d'être suffisamment flexible pour nous permettre d'effectuer des inférences dans de nouvelles situations. Ainsi, on utilise ce que l'on a appris par le passé pour s'adapter à une situation différente, mais dont le contexte est similaire. L'extinction est un processus surtout étudié dans des tâches de conditionnement, et n'a été que récemment validé dans la piscine de Morris (Lattal et Abel, 2003 ; Prados et coll., 2003). Ce processus correspond à un nouvel apprentissage (Rescorla et coll., 2004 ; Bouton et coll., 2006) qui se fait dans un contexte familier, puisque, dans la piscine de Morris, le rat doit apprendre à ne plus chercher la plate-forme à l'endroit où elle se trouvait lors de l'acquisition. Nous avons ainsi utilisé un protocole d'extinction (3 essais à 24h d'intervalle chacun), dans le contexte 'standard', en nous demandant si un souvenir ancien (autrement dit un souvenir consolidé au niveau systémique) avait une dynamique d'extinction différente de celle d'un souvenir récent (Publication 2). Les résultats montrent une différence

qualitative entre un souvenir récent et un souvenir ancien. En effet, alors qu'une trace récente suit un profil d'extinction classique (une diminution progressive des performances traduisant un désintérêt graduel pour le quadrant où se trouvait la plate-forme), une trace ancienne semble résister davantage à ce processus d'extinction. De façon intéressante, non seulement le souvenir ancien résiste à l'extinction, mais de plus, les performances s'améliorent de jour en jour. En utilisant un autre protocole d'extinction, constitué de trois essais consécutifs, nous avons observé cette fois-ci une dynamique d'extinction classique de la trace ancienne, ce qui nous a permis d'éliminer la possibilité que ce phénomène soit dû à la simple ré-exposition au contexte d'apprentissage (effet de '*reminding*' ; Gisquet-Verrier et Alexinsky, 1986). En effet, pour améliorer les performances, la ré-exposition au contexte doit être effectuée au plus tard 1 h avant le test de rétention (Sara, 2000), ce qui n'était pas le cas dans notre protocole d'extinction initial (24h entre chaque essai).

Il pourrait alors s'agir de reconsolidation, à savoir une re-stabilisation de la trace mnésique nécessitant une nouvelle synthèse protéique, suite à la réactivation d'un souvenir, et qui peut également renforcer la trace mnésique rappelée (Nader et coll., 2000 ; Nader, 2003 ; Frenkel et coll., 2005). Ceci est d'autant plus probable que plusieurs études ont montré que la durée et la nature des essais d'extinction, ainsi que la force de la trace mnésique, sont des facteurs déterminants dans l'issue d'un processus d'extinction ou de reconsolidation d'un souvenir (Dudai, 2004 ; Dudai, 2006 ; Suzuki et coll., 2004 ; Eisenhardt et Menzel, 2007). Or, dans le cas d'un souvenir ancien non dégradé, testé dans le CEC avec le protocole d'extinction initial (24h entre chaque essai), aucune amélioration des performances n'est observée. Au contraire, le souvenir ancien suit une dynamique d'extinction similaire à celle du souvenir récent. Ceci renforce l'idée qu'une reconsolidation ait pu avoir lieu dans le contexte 'standard' de notre expérience initiale. Afin de le confirmer, il faudrait utiliser dans ce dernier contexte un inhibiteur de synthèse protéique, comme l'anisomycine, et l'administrer à la fin du premier test de rétention (à 25 jours) alors que le souvenir vient d'être réactivé. Si une amnésie est observée lors du test de rétention le lendemain, au lieu d'une amélioration des performances, il sera possible de conclure que le renforcement de la trace observée dans le contexte 'standard' dans l'expérience initiale était bien dû à un phénomène de reconsolidation.

Cette différence qualitative observée entre un souvenir récent et un souvenir ancien reflète-t-elle pour autant un véritable changement dans la nature de la trace mnésique avec le temps? En effet, la dynamique d'extinction est différente selon l'âge et le degré de dégradation du souvenir. Il est possible qu'un souvenir puisse subir une sorte de 'sémantisation' ou de

schématisation avec le temps en s'appauvrissant de certains détails contextuels, comme le suggèrent quelques auteurs, et qu'il puisse ainsi devenir dépendant du néocortex (Rosenbaum et coll., 2001 ; Meeter et Murre, 2004 ; Winocur et coll., 2005a, 2005b). Ceci pourrait expliquer le fait que les souvenirs anciens préservés chez certains patients amnésiques (suite à une atteinte hippocampique) soient pauvres en détails contextuels (Rosenbaum et coll., 2000 ; Steinvorth et coll., 2005 ; Gilboa et coll., 2006), et que les sujets sains d'expériences en IRMF décrivent leurs souvenirs anciens comme étant moins détaillés ou moins forts que leurs souvenirs récents (Ryan et coll., 2001 ; Niki et Luo, 2002 ; Piefke et coll., 2003 ; Piolino et coll., 2004). Chez les rongeurs, certains auteurs ont d'ailleurs montré une généralisation/schématisme de l'information avec le temps (Biedenkapp et Rudy, 2007 ; Winocur et coll., 2007). Néanmoins, dans notre étude, l'âge du souvenir ne semble pas seul responsable d'un changement dans la nature de la trace mnésique, puisque lors de l'expérience réalisée dans le CEC, le souvenir ancien n'était pas dégradé, et suivait pourtant la même dynamique d'extinction que celle d'un souvenir récent. Ainsi, nos données suggèrent que la consolidation systémique en soi ne provoquerait pas de changement dans la nature de la trace mnésique. En revanche, le degré de dégradation de la trace, ou l'interaction entre l'âge et la dégradation de la trace pourrait altérer la nature du souvenir dans la piscine de Morris. On pourrait s'attendre à ce qu'une 'sémantisation' de l'information dans cette tâche se traduise par une bonne capacité pour le rat à localiser correctement l'emplacement approximatif de la plate-forme, manifestant cela par une préférence marquée pour le quadrant cible, mais avec une moins bonne précision et donc un faible nombre de passages dans la zone cible. C'est d'ailleurs ce que nous avons observé dans le CIC en comparaison avec le CEC (Publication 1). Toutefois, ceci n'ayant pas été observé dans le contexte 'standard' dans nos expériences sur l'extinction (Publication 2), nous ne pouvons pas vraiment conclure à une 'sémantisation' de l'information. Néanmoins, nous pourrions vérifier si une généralisation de l'information a eu lieu, sans qu'il n'y ait eu pour autant de dégradation observable de la trace mnésique. En effet, en s'inspirant des protocoles de généralisation utilisés par Biedenkapp et Rudy (2007) ou Winocur et coll. (2007), on pourrait par exemple procéder à un apprentissage de piscine de Morris dans le CEC, puis effectuer un test de rétention à 5 ou 25 jours soit dans le contexte initial, soit dans un contexte modifié par le retrait de certains indices distaux du CEC, par exemple. Si les performances de rappel sont meilleures dans le contexte initial que dans le contexte altéré, alors il n'y aura pas eu de généralisation de l'information. Si, en revanche, les performances sont équivalentes dans les deux contextes, l'information aura été généralisée, et il pourrait alors s'agir d'une 'sémantisation' du souvenir.

Il reste cependant une question cruciale à évoquer : les résultats obtenus sont-ils dus à l'interaction entre l'âge et le degré de dégradation d'un souvenir, ou de façon prédominante au degré de dégradation ou à la fragilité de la trace mnésique, indépendamment de son âge ? Afin de déterminer l'effet spécifique du degré de dégradation de la trace, il serait intéressant de renouveler notre expérience d'extinction dans le contexte 'standard' en ayant mis au point un protocole d'acquisition qui permette d'obtenir une trace récente partiellement dégradée. Si le degré de dégradation de la trace est le seul facteur à intervenir, nous devrions alors observer à 5 jours une amélioration progressive des performances avec les essais d'extinction. Si tel n'était pas le cas, il faudrait alors conclure que c'est l'interaction de ces 2 facteurs (l'âge et le degré de dégradation de la trace) qui est responsable de l'issue de la dynamique d'extinction ou de ce qui semble être une reconsolidation. Dans tous les cas, nous verrons dans la partie suivante de cette discussion que le degré de dégradation de la trace est également un facteur déterminant dans l'engagement ou le désengagement de certaines structures cérébrales au cours du rappel d'un souvenir ancien, nous permettant ainsi d'obtenir de nouveaux éléments de réponse pour alimenter le débat sur la consolidation systémique, en particulier par rapport à la Théorie de Rudy.

### 3. Rôles du cortex préfrontal médian et de l'hippocampe dorsal dans la consolidation systémique d'un souvenir spatial

#### 3.1 Le cortex préfrontal médian

Plusieurs théories s'opposent sur le rôle du cortex préfrontal médian (mPFC) dans la récupération des souvenirs anciens. D'après la Théorie Standard de la Consolidation, à l'échelle des systèmes, le mPFC est impliqué uniquement dans la récupération des souvenirs **anciens**, qu'ils soient épisodiques ou sémantiques (voir Frankland et Bontempi, 2005, pour une revue). Au contraire, la Théorie des Traces Multiples stipule que le mPFC est impliqué dans la récupération de souvenirs **anciens**, certes, mais **sémantiques** uniquement (Nadel et Moscovitch, 1997). Enfin, la Théorie de Rudy propose que le mPFC ne serait pas le lieu de stockage des souvenirs anciens, mais interviendrait plutôt dans le rappel de souvenirs **faibles/dégradés, peu importe leur âge**, en stimulant l'activité de l'hippocampe où seraient stockés les souvenirs (Rudy et coll., 2005). Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence le rôle du mPFC dans la récupération d'un souvenir spatial ancien, au moins dans des conditions où le souvenir n'est pas dégradé (Publication 3). Les données de l'imagerie du

gène précoce *c-fos* montrent en effet dans le CEC une plus forte activité du cortex cingulaire antérieur (ACC) à 25 jours qu'à 5 jours, et ce uniquement lors du rappel d'un souvenir spatial (la condition 'Plate-forme invisible' ; HdPF), les autres conditions ('Plate-forme visible', 'Rideau') n'induisant pas d'activation du mPFC. La nécessité du mPFC lors du rappel d'un tel souvenir a d'ailleurs été confirmée dans nos expériences d'inactivation réversible par la lidocaïne. Ces résultats sont donc plutôt en accord avec la Théorie Standard de la Consolidation, et confirment plusieurs études ayant étudié le rôle du mPFC, et plus particulièrement de l'ACC, dans le rappel d'un souvenir ancien, que ce soit chez les rongeurs dans des tâches spatiales (labyrinthe radial : Bontempi et coll., 1999 ; Maviel et coll., 2004 ; piscine de Morris : Teixeira et coll., 2006) ou de conditionnement (Takehara et coll., 2003 ; Frankland et coll., 2004 ; Ding et coll., 2008), ou chez l'Homme dans des études en IRMf (Takashima et coll., 2006 ; 2009 ; Smith et Squire, 2009). Bien que la connexion hippocampo-préfrontale directe se termine dans le cortex prélimbique (PL ; Laroche et coll., 2000 ; Thierry et coll., 2000), nos données de c-Fos indiquent que cette sous-région du mPFC semble être impliquée, mais à un moindre degré, lors du rappel d'un souvenir spatial, et ce de façon similaire pour un souvenir récent et ancien dans la piscine de Morris. C'est d'ailleurs également le cas du cortex infralimbique (IL). En utilisant des inactivations réversibles avec de la lidocaïne, Frankland et coll. (2004) ont montré préalablement chez des souris confrontées à un conditionnement de peur, que le cortex prélimbique n'était pas essentiel au rappel d'un souvenir récent ou ancien. Néanmoins, les mêmes auteurs ont observé une plus grande expression de c-Fos et de Zif268 dans le cortex prélimbique et infralimbique lors du rappel d'un souvenir ancien par rapport à un souvenir récent. De même, Maviel et coll. (2004) ont montré chez des souris, cette fois dans un labyrinthe à cinq branches, une plus forte expression de c-Fos et de Zif268 dans les trois sous-régions du mPFC (ACC, PL, IL) lors du rappel d'un souvenir ancien par rapport à un souvenir récent. Cependant, ces auteurs n'ont pas inactivé le PL pour évaluer sa nécessité lors du rappel. Il se pourrait donc que, malgré son activation mise en évidence par une technique d'imagerie fonctionnelle, le PL ne soit pas essentiel au rappel du souvenir ancien. La différence constatée avec nos résultats de c-Fos pourrait alors être due au type de tâche utilisée (piscine de Morris vs. labyrinthe) ainsi qu'à l'espèce (Rat vs. Souris). Cependant, il semble y avoir un consensus sur le rôle prédominant de l'ACC dans le rappel d'un souvenir ancien, peu importe la tâche ou l'espèce. Cette sous-région du mPFC reçoit des projections du PL (Heidbreder et Groenewegen, 2003) et est ainsi bien située pour recevoir les informations de la voie hippocampo-préfrontale directe. Ces données corroborent donc une partie de la Théorie Standard de la Consolidation, stipulant une

plus grande implication du néocortex avec le temps. Néanmoins, la Théorie des Traces Multiples suggère que le mPFC serait nécessaire uniquement pour le rappel de souvenirs anciens sémantiques. On pourrait ainsi se demander si nos résultats pourraient faire l'objet d'une interprétation allant dans ce sens. Ceci semble peu probable puisque, dans notre étude menée dans le CEC, le mPFC était fortement impliqué lors du rappel d'un souvenir ancien, alors que ce souvenir n'était pas dégradé, et qu'il apparaissait au contraire assez précis (et donc non schématisé), comme le montre le nombre de passages effectués dans la zone cible. Le mPFC ne serait donc pas impliqué uniquement dans la récupération d'un souvenir sémantique comme le propose la Théorie des Traces Multiples.

L'originalité de cette étude est d'avoir comparé l'implication des structures dans le rappel des souvenirs dans deux contextes (CEC et STC) qui différaient par le niveau de dégradation de la trace ancienne au moment du rappel. Ceci nous a ainsi permis de confronter nos observations à la Théorie de Rudy qui stipule une plus forte implication du mPFC lors du rappel d'un souvenir dégradé. Or, non seulement nous avons pu mettre en évidence la nécessité du mPFC lors du rappel d'un souvenir non dégradé (dans le CEC), mais en plus nous n'avons pas observé d'activité importante du mPFC lors du rappel d'une trace dégradée dans le STC. En effet, dans le contexte 'standard', le niveau d'expression de c-Fos dans le mPFC était équivalent pour un souvenir récent non dégradé et un souvenir ancien partiellement dégradé, quelle que soit la sous-région étudiée. Ces résultats ne sont donc pas en accord avec la Théorie de Rudy. Néanmoins, ils montrent, et ce pour la première fois, que le degré de dégradation de la trace est un facteur clé dans le recrutement des structures qui participeront au rappel du souvenir spatial ancien. Ceci est d'autant plus important que, jusque là, le degré de dégradation de la trace, variable dans toutes les études sur les souvenirs anciens, n'a pas été intégré dans l'interprétation des données. Il faudrait à présent confirmer l'importance de ce facteur dans d'autres tests tels que le labyrinthe radial ou le conditionnement de peur au contexte.

Par ailleurs, il est intéressant de souligner une différence dans l'activité des sous-régions du mPFC entre les deux contextes. Alors que les niveaux d'activité de c-Fos dans le CEC et le STC étaient similaires au niveau du PL et de l'IL, l'expression de c-Fos dans l'ACC était extrêmement hétérogène entre les deux contextes, avec une expression de c-Fos beaucoup plus marquée dans le CEC. Ceci confirme le rôle spécifique de l'ACC dans le rappel du souvenir ancien non dégradé.

### 3.2 L'hippocampe dorsal

Le rôle de l'hippocampe dans le maintien des souvenirs est au coeur des théories sur la consolidation systémique. Alors que la Théorie Standard de la Consolidation stipule un désengagement progressif de l'hippocampe avec le temps, la Théorie des Traces Multiples suggère que l'hippocampe est nécessaire au rappel d'un souvenir riche en détails contextuels, quel que soit son âge. Dans cette thèse, nous avons montré, grâce aux données c-Fos et aux effets de l'inactivation par la lidocaïne, que l'hippocampe dorsal était nécessaire à la récupération des souvenirs dans une tâche de piscine de Morris, et ce quel que soit l'âge de ces souvenirs. De plus, les résultats c-Fos ont mis en évidence une plus grande participation de l'hippocampe dorsal lors du rappel d'un souvenir ancien par rapport à celui d'un souvenir récent.

Le fait que, dans le CEC, l'hippocampe reste nécessaire à la récupération d'une trace mnésique confirme des données provenant de tâches spatiales (piscine de Morris : Bolhuis et coll., 1994 ; Sutherland et coll., 2001 ; Clark et coll., 2005a et b ; Martin et coll., 2005 ; Broadbent et coll., 2006 ; labyrinthe en croix : Winocur et coll., 2005), de discrimination visuelle (Epp et coll., 2008), ou de conditionnement (Lehmann et coll., 2007 ; Sutherland et coll., 2008), et corroborent ainsi la Théorie des Traces Multiples, au détriment de la Théorie Standard, qui stipule un désengagement de l'hippocampe avec le temps. Il est cependant intéressant de noter que la grande majorité des données allant dans le sens de la Théorie des Traces Multiples provient d'études effectuées avec le test de la piscine de Morris chez le Rat. Certains auteurs pensent en effet que cette tâche pourrait être un cas particulier du fait de sa complexité, induisant la nécessité pour l'animal d'intégrer continuellement des informations allocentriques et égocentriques afin de faire une mise au point constante sur sa position dans son environnement (Clark et coll., 2005a ; Teixeira et coll., 2006 ; Clark et coll., 2007). Ces informations étant gérées par l'hippocampe, les lésions irréversibles ou réversibles de l'hippocampe affecteraient les capacités de navigation de l'animal et ne pourraient donc pas permettre de montrer un éventuel désengagement de cette structure spécifiquement au niveau mnésique. Cependant, dans notre étude, cet aspect navigationnel de la tâche ne provoquerait pas une plus grande activation de l'hippocampe à 25 jours par rapport à 5 jours, comme le suggèrent les données issues du marquage de l'expression de c-Fos. On peut donc émettre l'hypothèse que l'implication de l'hippocampe à ce délai soit due spécifiquement au rappel de la localisation de la plate-forme.

La plus grande implication de l'hippocampe dorsal dans le rappel d'un souvenir ancien dans le CEC est un résultat surprenant. En effet, la plupart des études d'imagerie cellulaire chez les rongeurs ayant utilisé *c-fos*, *zif268*, ou *Arc* montrent soit une plus faible expression dans la région CA1 lors du rappel d'un souvenir ancien, par rapport à un souvenir récent (Frankland et coll., 2004 ; Maviel et coll., 2004 ; Gusev et coll., 2005), soit des niveaux d'expression équivalents pour les deux types de souvenirs (Teixeira et coll., 2006). De même, chez l'Homme, une majorité d'études en IRMf montre des niveaux équivalents d'activité dans l'hippocampe lors du rappel d'un souvenir autobiographique récent ou ancien (Maguire et coll., 2001 ; Ryan et coll., 2001 ; Nadel et coll., 2007 ; Viard et coll., 2007), et certaines montrent un désengagement de l'hippocampe avec le temps (Niki et Luo, 2002 ; Piefke et coll., 2003 ; Takashima et coll., 2006 ; 2009). Néanmoins, une étude en TEP a mis en évidence une plus forte activité dans l'hippocampe lors du rappel d'un souvenir autobiographique ancien comparativement à celui d'un souvenir récent (Piolino et coll., 2004). Ceci est compatible avec la Théorie des Traces Multiples qui suggère que chaque nouvelle évocation du souvenir induirait un processus de ré-encodage afin de créer une trace supplémentaire dans l'hippocampe (Piolino et coll., 2004 ; Moscovitch et coll., 2006). Ce processus de ré-encodage serait plus important pour un souvenir ancien, qui n'a pas été ré-évoqué depuis un certain temps, que pour un souvenir récent qui serait plus familier. Ceci pourrait ainsi expliquer dans notre étude la plus grande expression de c-Fos à 25 jours qu'à 5 jours.

Un autre aspect intéressant de notre étude est l'observation de l'expression de c-Fos dans toutes les sous-régions de l'hippocampe dorsal. La plupart des études ayant utilisé *c-fos*, *zif268*, ou *Arc* se sont en effet focalisées sur CA1, dont le rôle dans la mémoire spatiale a déjà été démontré, notamment par une corrélation du nombre de neurones viables de CA1 avec la performance dans une tâche spatiale (e.g. Volpe et coll., 1992 ; Olsen et coll., 1994 ; Gilbert et coll., 2001). La région CA3, elle, est plutôt impliquée dans la formation d'associations arbitraires (e.g. l'association de la localisation d'un objet et de son identité), la 'complétion de patterns' (la reconstruction d'une information complète à partir d'une information partielle/incomplète arrivée à l'hippocampe) et la 'séparation des patterns' (la séparation de profils d'activation qui se chevauchent partiellement afin de pouvoir les récupérer individuellement par la suite ; Kesner, 2007a ; Martin et Clark, 2007 ; Gilbert et Brushfield, 2009). D'autre part, CA3 serait impliquée dans l'encodage et la consolidation d'une information spatiale, et non dans le rappel d'un souvenir récent (e.g. Lassalle et coll., 2000 ; Stupien et coll., 2003 ; Florian et Rouillet, 2004). En effet, le rôle de CA3 dans le rappel d'un



souvenir ancien n'a été que très peu étudié. Néanmoins, Ross et Eichenbaum (2006) ont montré, dans une tâche de transmission sociale de préférence de nourriture, une expression de *c-Fos* équivalente dans CA3 lors du rappel du souvenir, qu'il soit récent ou ancien. De même, Gusev et coll. (2005) ont observé avec le gène précoce *Arc* une activité similaire dans CA3 pour un souvenir récent ou ancien. Dans notre étude d'imagerie fonctionnelle avec *c-Fos*, en revanche, nous avons mis en évidence, et ceci dans le CEC (mais de façon moins marquée que pour CA1), une plus forte implication de CA3 pendant le rappel d'un souvenir ancien que pendant celui d'un souvenir récent. Si cette plus forte activité observée dans CA1 à 25 jours est bien due à un phénomène de ré-encodage, dans la mesure où CA3 participe au processus d'encodage et envoie directement des informations à CA1 via la boucle trisynaptique, l'idée d'un ré-encodage pourrait également expliquer l'augmentation d'activité observée dans CA3 à 25 jours. Ceci pourrait également s'appliquer au gyrus denté. En effet, nous avons aussi montré dans le CEC une plus forte activité de cette sous-région de l'hippocampe à 25 jours. Or, le gyrus denté participe à la 'séparation des patterns' lors de l'encodage, et il envoie directement des informations à CA3 (Kesner, 2007b ; Martin et Clark, 2007 ; Treves et coll., 2008). Le ré-encodage peut donc également expliquer nos résultats dans cette structure. Néanmoins, Trouche et coll. (2009) ont récemment montré l'implication de nouveaux neurones du gyrus denté dans les réseaux hippocampo-néocorticaux participant à la récupération d'un souvenir ancien. Ceci pourrait donc être une explication alternative ou complémentaire de nos résultats dans cette sous-région.

Il est également à noter que les données *c-Fos* obtenues pour l'hippocampe dans la condition 'Plate-forme visible' sont très similaires à celles provenant de la condition 'Plate-forme invisible', notamment dans le CEC. Ceci suggère que malgré l'aspect non mnésique de la tâche demandée aux rats, ces animaux auraient encodé de façon incidente des informations spatiales sur leur environnement, un phénomène déjà évoqué dans la littérature (e.g. Packard et McGaugh, 1996 ; Guzowski et coll., 2001). Ceci est d'autant plus probable que ce phénomène n'a pas été constaté pour les différentes sous-régions du mPFC, et que la condition 'Rideau' (empêchant réellement tout encodage spatial) a révélé, au niveau de l'hippocampe, des profils d'activité très différents de ceux des conditions 'Plate-forme invisible' et 'Plate-forme visible'. Cette observation rappelle à quel point il est important de trouver des conditions témoins appropriées pour des études d'imagerie de *c-fos* ou de *zif268*. La plupart des études effectuées avec la piscine de Morris utilisent une condition 'Home Cage' et/ou une condition de 'nage libre', où le temps de nage des rats est similaire à celui des

rats dans la condition ‘Plate-forme invisible’ afin d’être comparable (Guzowski et coll., 2001 ; Teather et coll., 2005 ; Texeira et coll., 2006 ; Jo et coll., 2007 ; Shires et coll., 2008 ; Trouche et coll., 2009). Néanmoins, cette condition ‘nage libre’ provoque un stress additionnel, les rats ne pouvant trouver d’échappatoire à la piscine en l’absence d’une plate-forme, contrairement aux rats testés dans la condition ‘Plate-forme invisible’. La condition ‘Rideau’ nous a donc paru plus appropriée pour contrôler en particulier le niveau de stress et l’encodage d’informations spatiales.

Enfin, tout comme pour le mPFC, le degré de dégradation de la trace a influé sur le niveau d’activation de l’hippocampe lors du rappel du souvenir ancien. En effet, alors que nous avons observé dans le CEC une plus forte implication des sous-régions de l’hippocampe dans le rappel à 25 jours par rapport à 5 jours, l’hippocampe a présenté des niveaux d’activation similaires aux deux délais dans le STC, là où la trace mnésique est dégradée. Il pourrait donc être intéressant de renouveler l’expérience en utilisant un autre gène précoce tel que *zif268*, qui présente un niveau basal constitutif plus important que *c-fos*. Ceci nous permettrait de voir si, dans le STC, le faible niveau d’expression de c-Fos dans l’hippocampe reflète en réalité un **désengagement** de cette structure pour une trace ancienne dégradée, impossible à observer avec *c-fos*. Pour des raisons techniques, nous n’avons pas réussi à mettre au point un protocole d’immunohistochimie de *Zif268* pendant cette thèse (et nous suspectons fortement une dégradation de la qualité de l’anticorps produit par notre fournisseur), mais il semble important de pouvoir vérifier cette possibilité. Le gène précoce *Arc*, contrairement à *c-fos* et *zif268*, est associé plus spécifiquement aux processus mnésiques et à la mémoire à long terme (Guzowski et coll., 1999 ; Miyashita et coll., 2008). En effet, certaines études ont montré que l’expression d’*Arc* dans CA1 était liée à l’encodage d’informations spatiales, y compris dans la piscine de Morris, mais n’était pas impliquée dans une version non spatiale de cette tâche (équivalent de notre condition ‘Plate-forme visible’ ; Guzowski et coll., 1999 ; Guzowski et coll., 2001). D’autre part, Gusev et coll. (2005) ont également montré une diminution de l’expression du gène *Arc* avec le temps dans CA1 (24h vs. 30 jours), lors du rappel d’un souvenir dans la piscine de Morris. L’utilisation de ce gène dans le STC et le CEC pourrait donc être une approche pertinente pour de futures études.

Il faudrait également établir dans quelle mesure l’hippocampe dorsal est nécessaire lors du rappel à 25 jours dans le contexte ‘standard’. Or, il n’était pas pertinent d’effectuer des inactivations réversibles dans cette salle en raison du niveau de performance trop détérioré à 25 jours chez les rats témoins (PBS) ayant des canules implantées dans l’hippocampe dorsal

(observations personnelles). Pour cela, il faudrait modifier le protocole d'acquisition, afin d'obtenir un niveau de performance suffisant à 25 jours chez ces animaux, mais cela reviendrait à renforcer la trace, ce qui pourrait poser d'autres problèmes en matière d'interprétation des résultats.

### **3.3 Vers quelle théorie pencher pour expliquer la consolidation systémique ?**

Pour récapituler, nos données montrent que le degré de dégradation de la trace influe sur la participation du mPFC et de l'hippocampe dorsal dans le rappel d'une trace ancienne, mais pas dans le sens où l'avait prédit la Théorie de Rudy. Le mPFC, et plus particulièrement le cortex cingulaire antérieur, paraît de toute évidence être impliqué dans le rappel d'un souvenir ancien non dégradé. Ceci serait plutôt compatible avec la Théorie Standard, et non avec la Théorie des Traces Multiples, puisque le souvenir rappelé ne serait pas de nature sémantique. Enfin, l'hippocampe semble impliqué dans le rappel des souvenirs, peu importe leur âge, mais avec une plus forte participation pour un souvenir ancien non dégradé. Cette observation peut aller dans le sens de la Théorie des Traces Multiples, mais elle paraît incompatible avec la Théorie Standard de la Consolidation. Les résultats de cette thèse ne sont donc en accord parfait avec aucune des théories dans leur ensemble. Au lieu de cela, une théorie alternative est envisageable. L'hippocampe est parfois décrit comme servant de pointeur pour le néocortex (Nadel et Moscovitch, 1997 ; Piolino et coll., 2004). Il se pourrait donc qu'avec le temps un souvenir devienne effectivement essentiellement dépendant du néocortex, et que lors du rappel, l'hippocampe ré-encode le contexte afin de transmettre cette information au néocortex, qui pourrait alors 'retrouver' ou 'compléter' le souvenir correspondant. Les deux structures seraient donc nécessaires pour le rappel des souvenirs anciens, contrairement à un souvenir récent qui ne serait pas encore dépendant du néocortex.

Il reste pourtant à comprendre pourquoi une seule étude en IRMf chez l'Homme (Piolino et coll., 2004) et une seule étude chez le rongeur (la nôtre) ont montré cette plus grande implication de l'hippocampe à très long terme. Il s'agit probablement des mêmes raisons pour lesquelles seules quelques études sont parvenues à démontrer un désengagement de l'hippocampe : des différences entre les espèces, les tâches (piscine de Morris *vs.* autres tâches spatiales ou de conditionnement), et les protocoles, sans oublier les facteurs confondus comme l'âge et la qualité de la trace mnésique. Chez l'Homme, par exemple, les deux seules études ayant démontré un désengagement de l'hippocampe avec le temps, au profit du

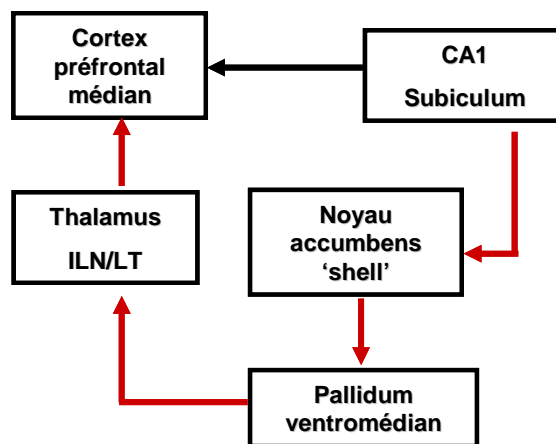
néocortex (Takashima et coll., 2006 ; Takashima et coll., 2009), ont étudié des souvenirs acquis au laboratoire, une situation analogue aux études chez les rongeurs où certaines expériences ont montré un désengagement de l'hippocampe avec le temps. Les autres études menées chez l'Homme ont utilisé des souvenirs autobiographiques remontant à plusieurs périodes de la vie des sujets, et sont donc rétrospectives. Les expérimentateurs n'ont pas eu de contrôle sur le niveau de dégradation des souvenirs et ont dû se baser sur des questionnaires donnés *à posteriori* aux sujets et à leurs proches pour évaluer l'exactitude du souvenir et son degré de précision. Ces deux types d'expériences forment donc deux situations très différentes qui pourraient expliquer les différences de résultats. D'autre part, certaines expériences chez les rongeurs ont montré que la consolidation systémique pouvait être très rapide, de l'ordre de 24h, si le souvenir intégrait un schéma mental ou des connaissances pré-existantes (Tse et coll., 2007 ; Takashima et coll., 2009). Ceci suggère que la consolidation systémique pourrait se dérouler de plusieurs façons à la fois au niveau temporel et spatial: plus ou moins rapidement, et avec un nombre de structures et un degré d'implication variables, selon la situation.

#### 4. Rôle du thalamus

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à une autre structure, jamais encore étudiée dans le cadre de la consolidation systémique. Le thalamus est une zone de transit très bien située pour recevoir quantités d'informations et les relayer par la suite à d'autres structures. Par ailleurs, une atteinte de certains noyaux thalamiques peut induire une amnésie diencephalique, très similaire aux amnésies causées par des lésions du lobe temporal médian (Aggleton et Brown, 1999 ; Gold et Squire, 2006). Néanmoins, l'hétérogénéité des lésions des patients ayant subi une atteinte thalamique ne permet pas d'identifier clairement les noyaux impliqués dans la mémoire. Ceci a donc amené à l'étude fonctionnelle de différents agrégats de noyaux thalamiques chez le Rat. Les noyaux thalamiques antérieurs (ATN) et les noyaux thalamiques intralaminaires/latéraux (ILN/LT) nous ont paru d'un grand intérêt de par leurs connexions différentes au sein des circuits impliquant nos structures d'intérêt, les ATN étant fortement connectés avec l'hippocampe, et les ILN/LT avec le cortex préfrontal. De plus, une dissociation fonctionnelle entre ces deux groupes de noyaux a été mise en évidence. En effet, si une lésion des ATN affecte les performances dans des tâches hippocampo-dépendantes, à la fois spatiales et non spatiales (e.g. Aggleton et coll. 1996 ; van Groen et coll., 2002 ; Wolff et coll., 2006), une lésion des ILN/LT affecte plutôt les performances dans des tâches sensibles à

une atteinte de structures préfrontales, comme celles évaluant l'attention ou la mémoire de travail, par exemple (e.g. Burk et Mair, 2001 ; Bailey et Mair, 2005 ; Mitchell et Dalrymple-Alford, 2006). Cependant, aucune étude n'avait évalué le rôle de ces noyaux dans le rappel d'un souvenir ancien. Leur implication dans la consolidation systémique d'un souvenir spatial restait donc inexplorée.

Les résultats ont ainsi montré pour la première fois le rôle des ILN/LT dans la mémoire ancienne (Publication 4). En effet, alors que la lésion des ILN/LT n'a pas affecté les performances d'acquisition ni le rappel d'un souvenir récent (5 jours) dans la piscine de Morris, confirmant ainsi la plupart des observations rapportées dans la littérature (Mitchell et Dalrymple-Alford, 2005 ; 2006 ; Wolff et coll., 2008 ; mais voir Mair et coll., 1998 et Gibb et coll., 2006), la lésion a provoqué une détérioration des performances lors du rappel d'un souvenir ancien (25 jours). Ces résultats suggèrent une implication des ILN/LT dans la consolidation systémique et/ou dans le rappel d'un souvenir ancien. Cette implication dans la consolidation systémique pourrait se faire via la voie hippocampo-préfrontale indirecte, décrite dans l'introduction (Figure 34).



**Figure 34** : Boucle hippocampo-thalamo-corticale mise en jeu dans la consolidation systémique et/ou la récupération d'une trace ancienne (schéma adapté de Thierry et coll., 2000). La flèche noire représente la voie hippocampo-préfrontale directe, les flèches rouges la voie indirecte.

En effet, le noyau centro-médian et le noyau paracentral font partie de l'agrégat ILN/LT et reçoivent des informations du pallidum ventromédian avant de les relayer vers le mPFC (Thierry et coll., 2000 ; Vertes, 2006). L'interruption de cette voie pourrait perturber la modulation de la voie hippocampo-préfrontale directe et ainsi empêcher le bon déroulement de la consolidation systémique et la formation du souvenir ancien. Il se pourrait également

que la voie hippocampo-préfrontale indirecte en elle-même joue un rôle prédominant dans la consolidation systémique et/ou dans le rappel du souvenir ancien, en dehors de son influence sur la voie directe pendant la consolidation systémique. Par ailleurs, les ILN/LT pourraient être en fait uniquement impliqués dans la consolidation du souvenir ancien. Une inactivation fonctionnelle de ces noyaux avant le rappel devrait préciser le rôle des ILN/LT. Ainsi, une altération des performances montrerait leur implication dans la récupération du souvenir, alors que si les performances ne sont pas altérées, ces noyaux participeraient uniquement à la consolidation systémique.

En ce qui concerne les ATN, notre étude a confirmé le rôle de ces noyaux lors de l'acquisition d'une tâche spatiale. En effet, les rats avec une lésion des ATN avaient de moins bonnes performances d'acquisition que celles des SHAM ou des ILN/LT. Ceci est conforme à la littérature, qui a d'ores et déjà montré que les lésions des ATN affectaient l'acquisition ainsi que la récupération d'informations dans des tâches spatiales telles que le labyrinthe radial et la piscine de Morris (Byatt et Dalrymple-Alford, 1996 ; Aggleton et coll., 1996 ; Warburton et Aggleton, 1999 ; Mitchell et Dalrymple-Alford, 2006 ; Wolff et coll., 2008). Dans notre étude, en raison de leur déficit dans l'acquisition de la tâche, les performances des rats présentant une lésion des ATN ont également été affectées lors du rappel à 5 et 25 jours post-acquisition, avec une performance équivalente au hasard. Nous n'avons donc pas pu conclure quant au rôle de ces noyaux dans la consolidation ou le rappel d'un souvenir ancien. Afin de vérifier l'implication de ces noyaux dans la consolidation systémique et/ou lors du rappel d'un souvenir récent *vs.* ancien, il faudrait donc effectuer une lésion post-acquisition ainsi que des inactivations fonctionnelles juste avant le test de rétention.

Il est également intéressant de noter que cette expérience sur la contribution de certains noyaux thalamiques a eu lieu dans le contexte 'standard'. Cependant, la dégradation de la trace avec le temps observée d'ordinaire dans cette salle a été compensée par les deux jours supplémentaires d'acquisition (utilisés pour permettre une éventuelle progression des performances des rats ATN après 6 jours d'acquisition). Ce faisant, nous nous sommes retrouvés dans des conditions similaires à celles propres au CEC en termes de qualité de la trace, à savoir aucune dégradation de la trace avec le temps chez les rats SHAM. Dans la mesure où, 1) dans le CEC, nous avons démontré le rôle du mPFC dans le rappel du souvenir ancien, 2) que la lésion des ILN/LT affecte les performances lors du rappel d'un souvenir ancien, et que 3) certains noyaux de l'agrégat ILN/LT font partie de la voie hippocampo-préfrontale indirecte, nous pouvons émettre l'hypothèse d'un réseau extra-hippocampique,

comprenant des structures extra-corticales, qui serait impliqué dans la consolidation systémique. Par ailleurs, il faudrait évaluer le niveau d'expression de c-Fos au niveau des ILN/LT dans les coupes provenant des expériences décrites dans la Publication 3, et ceci dans les deux contextes, pour confirmer l'effet de la dégradation du souvenir dans le niveau de participation de certaines structures à la consolidation systémique.





# Conclusions et perspectives



## Conclusions et perspectives

### *Conclusions*

Cette thèse avait pour objectif d'étudier la réorganisation spatio-temporelle des circuits neuronaux impliqués dans la consolidation et la récupération d'un souvenir ancien spatial chez le Rat. Cette thèse a permis tout d'abord de mettre au point des protocoles de mémoire de référence dans la piscine de Morris pour étudier le rappel d'un souvenir d'ordre spatial à très long terme, ce qui sera très utile pour de futures expériences au laboratoire. L'utilisation de deux contextes différents, avec la construction du CEC, ayant permis d'obtenir deux conditions expérimentales différentes au niveau du degré de dégradation de la trace mnésique, aura également été un atout majeur de cette thèse pour explorer l'influence de la dégradation de la trace et l'interaction de ce facteur avec l'âge du souvenir dans la consolidation systémique. En effet, les travaux de cette thèse ont révélé l'importance capitale de la qualité de la trace mnésique lors de la récupération d'un souvenir ancien, d'une part sur les processus mnésiques tels que l'extinction, et d'autre part sur les structures impliquées lors du rappel d'un souvenir ancien. Ainsi, selon que le souvenir sera dégradé ou non, on assistera à une dynamique classique d'extinction ou, au contraire, à un renforcement de la trace qui serait probablement à mettre en rapport avec un processus de reconsolidation. De même, la participation de l'hippocampe dorsal et du cortex cingulaire antérieur dans la récupération d'un souvenir ancien varie avec le degré de dégradation d'une trace mnésique. Ces études sont ainsi les premières dans la littérature à mettre en évidence l'importance de la qualité de la trace mnésique dans certains processus sous-tendant la mémoire. Elles ont ainsi permis de ré-interroger les théories actuelles sur la consolidation systémique. D'autre part, cette thèse a exploré pour la première fois le rôle de certains noyaux thalamiques dans la réorganisation spatio-temporelle de la trace mnésique, et a mis en évidence le rôle des noyaux intralaminaires/latéraux dans la mémoire ancienne, ouvrant ainsi un nouveau champ d'exploration dans ce domaine, très prometteur. En conclusion, ces travaux montrent une réorganisation spatio-temporelle d'un souvenir spatial chez le Rat, impliquant l'hippocampe dorsal, mais également des structures extra-hippocampiques telles que le cortex préfrontal médian et les noyaux thalamiques intralaminaires/latéraux. De plus, la qualité du souvenir (dégradé, non dégradé) apparaît comme un facteur clé dans la dynamique spatiale de la consolidation systémique.

*Perspectives*

1. Décours temporel de la consolidation systémique

Comme c'est souvent le cas dans la Recherche, en voulant répondre à certaines questions, nous en avons soulevé de nouvelles. Maintenant que nous avons mis en évidence dans le CEC l'implication du mPFC lors de la récupération d'un souvenir ancien, nous pourrions à présent explorer le décours temporel de la consolidation systémique. A quel moment, et dans quelles conditions, un souvenir devient-il dépendant du néocortex, et donc 'ancien' ? Ceci pourrait être étudié en utilisant à nouveau l'imagerie du gène précoce *c-fos*, voire celle du gène *Arc*, mais en ajoutant différents délais de rétention intermédiaires (e.g. 10 jours, 15 jours). D'autre part, certains travaux ont montré une consolidation systémique très rapide, expliquant cette dynamique différente par le fait que dans leurs expériences, le souvenir en question intégrait un schéma mental ou des connaissances pré-existantes. En effet, Tse et coll. (2007) ont montré qu'après avoir exposé des rats à plusieurs associations de goûts et de lieux, une nouvelle association apprise en un seul essai devenait très rapidement indépendante de l'hippocampe (en moins de 24 h). De même, Takashima et coll. (2009) ont montré en IRMf, lors d'une tâche d'associations de visages et de lieux, un désengagement de l'hippocampe pendant le rappel dès 24h ; or, ces sujets avaient déjà été exposés à d'autres associations de visages et de lieux lors d'une phase d'entraînement, une semaine plus tôt. Une fois le décours temporel de la consolidation systémique bien établi dans le CEC, il serait donc intéressant de tester cette hypothèse d'une dynamique plus rapide de consolidation systémique lors de connaissances pré-existantes. On pourrait par exemple procéder à un premier apprentissage dans la piscine, effectuer un test de rétention à un délai assez court (e.g. 24h), puis une nouvelle phase d'apprentissage avec une nouvelle localisation de la plate-forme (un '*reversal*'). Le souvenir qui en découlerait devrait intégrer un schéma général englobant le souvenir de la configuration spatiale de la pièce acquise auparavant, ainsi que les règles générales de la tâche. Il suffirait alors d'effectuer des tests de rétention à différents délais et d'utiliser l'activation du gène *c-fos* pour voir si le souvenir devient plus rapidement dépendant du mPFC.

## 2. Rôle d'autres structures dans la consolidation systémique d'un souvenir spatial

### 2.1 Le thalamus

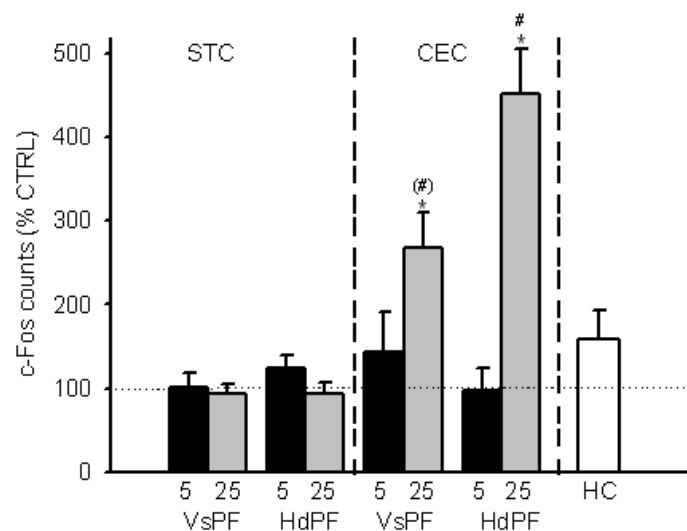
Il semble important de poursuivre l'étude du thalamus afin de mieux cerner son rôle dans la consolidation systémique et/ou dans la récupération d'un souvenir ancien, et étudier l'importance de la voie hippocampo-préfrontale indirecte. Le rôle exact des ILN/LT est à approfondir, mais il serait également intéressant d'insister sur le rôle des ATN et d'explorer les fonctions du noyau reuniens. En effet, le noyau reuniens serait très intéressant à étudier puisqu'il reçoit massivement des informations du mPFC. Il est aussi le noyau thalamique dont les projections vers l'hippocampe et le mPFC sont les plus importantes (Vertes, 2004 ; Vertes et coll., 2006; Vertes et coll., 2007). En cela, il a une position centrale et pourrait être un relais important dans le transfert d'informations du mPFC à l'hippocampe. Le rôle fonctionnel de ce circuit hippocampe-mPFC-reuniens-hippocampe est donc à explorer. Cependant, le rôle du noyau reuniens dans la mémoire spatiale de référence reste à démontrer. Récemment, Davoodi et coll. (2009) ont montré son implication dans la tâche de la piscine de Morris en utilisant des inactivations réversibles, mais l'étendue des lésions dues aux canules implantées, traversant notamment l'hippocampe, sont probablement à l'origine d'une partie au moins des déficits constatés, le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible chez les rats témoins ne dépassant pas 25%, soit l'équivalent du hasard. Le champ d'exploration de cette structure reste donc entier.

### 2.2 Le néocortex et le lobe temporal médian

Lors de l'étude princeps menée par Bontempi et coll. (1999), les auteurs ont pu montrer l'implication de plusieurs aires néocorticales dans la récupération d'un souvenir ancien, dont le cortex préfrontal médian qui a suscité l'intérêt de la plupart des études ultérieures. Toutefois, d'autres structures telles que le cortex rétrosplénial ou le cortex pariétal ont été moins étudiées. Le cortex rétrosplénial, par exemple, reçoit des projections du cortex cingulaire antérieur (Heidbreder et Groenewegen, 2003), et certaines études d'imagerie cellulaire, d'inactivations réversibles, ou de lésions ont d'ailleurs mis en évidence l'implication de cette structure lors du rappel d'un souvenir ancien (Maviel et coll., 2004 ; Haijima et coll., 2008, mais voir Piefke et coll., 2003). Il serait donc intéressant d'approfondir l'étude de cette structure, et notamment son implication dans l'apprentissage et le rappel de la position d'une plate-forme dans la piscine de Morris, par exemple. De même, nous pourrions

nous intéresser à certaines structures du lobe temporal médian, telles que le cortex entorhinal et le cortex périrhinal, qui ont tous deux fait l'objet d'études sur la consolidation systémique, de par leurs connexions avec l'hippocampe et le mPFC. Cho et coll. (1993), par exemple, ont ainsi montré qu'une lésion du cortex entorhinal chez la Souris affectait les performances dans un labyrinthe radial lors du rappel d'un souvenir récent et ancien.

Lors de l'étude de l'expression de c-Fos (Publication 3) nous nous sommes intéressés principalement à l'hippocampe dorsal et au mPFC. Néanmoins, nous avons également analysé les données provenant du cortex périrhinal. En effet, cette structure du lobe temporal médian reçoit principalement des informations sensorielles projetées ensuite à l'hippocampe et au subiculum de façon directe ou indirecte (via le cortex entorhinal). Par ailleurs, le cortex périrhinal reçoit également des informations du mPFC, et certaines études ont montré que le mPFC facilitait le transfert d'informations de l'hippocampe vers le néocortex en augmentant la communication entre le cortex entorhinal et le cortex périrhinal (Paz et coll., 2007 ; Ramos, 2008). Cette structure pourrait donc participer à un processus de consolidation systémique, et a déjà fait l'objet de quelques investigations. Sans surprise, certaines études chez le Rat ont mis en évidence une amnésie rétrograde temporellement graduée suite à des lésions du cortex périrhinal (Wiig et coll., 1996 ; Ramos et Vaquero, 2005), contrairement à d'autres études montrant une amnésie rétrograde non temporellement graduée (Burwell et coll., 2004 ; Ramos, 2008). Nous avons donc comparé le niveau d'activité du cortex périrhinal selon l'âge et le degré de dégradation de la trace dans notre expérience de c-Fos (Figure 35).



**Figure 35** : Résultats du comptage des noyaux c-Fos-positifs dans le cortex périrhinal, obtenus à 5 et 25 jours post-acquisition dans la piscine de Morris, dans les conditions 'Plate-forme visible' (VsPF) et 'Plate-forme invisible' (HdPF), dans les deux contextes (STC et CEC). La ligne en pointillés représente le niveau d'activation de la condition 'Rideau'. # Différent de la condition 'Rideau',  $p < 0.05$  ; \* Différent du groupe 5 jours,  $p < 0.05$  ; (#) Tendance,  $p = 0.08$ .

Comme le montre la Figure 35, l'activation du cortex périrhinal était plus élevée lors de la récupération d'un souvenir ancien que lors de la récupération d'un souvenir récent, et ce uniquement dans le CEC. Ce profil d'activation n'est pas sans rappeler celui du cortex cingulaire antérieur. Il serait donc intéressant de poursuivre les investigations du côté du cortex périrhinal, avec des inactivations réversibles, par exemple, pour compléter ces données.

### 3. Latéralisation

Enfin, lors de l'introduction de cette thèse, j'ai présenté certaines études en IRMf chez l'Homme où les structures activées en réponse à une tâche de mémoire déclarative ou de mémoire spatiale l'étaient de façon unilatérale ; il s'agit de latéralisation. En effet, les deux hémisphères du cerveau ont parfois des spécialisations fonctionnelles différentes, bien décrites chez l'Homme, mais également de façon plus anecdotique chez diverses espèces animales (voir Vallortigara et coll., 1999, pour une revue). Ainsi, certaines structures bilatérales du cerveau n'ont pas les mêmes fonctions, selon l'hémisphère dans lequel elles se trouvent. Ceci a été démontré chez l'Homme, notamment pour l'hippocampe. En effet, l'hippocampe droit est plus impliqué que l'hippocampe gauche dans des tâches de mémoire spatiale (e.g. Maguire et coll., 1997 ; 1998 ; 2000 ; Burgess et coll., 2002). Chez le Rat, nous avons récemment montré avec une approche génétique et des inactivations fonctionnelles (Klur et coll., 2009) que l'hippocampe droit était plutôt impliqué lors du rappel d'un souvenir spatial, alors que l'hippocampe gauche était plutôt impliqué lors de l'encodage et/ou de la consolidation de l'information spatiale. Certaines études chez l'Homme ont également montré une latéralisation au niveau du cortex préfrontal, le côté droit participant au rappel d'un souvenir épisodique, et le côté gauche au rappel d'un souvenir sémantique (Düzel et coll., 1999 ; Wiggs et coll., 1999). On pourrait alors se demander si la consolidation systémique est, elle aussi, latéralisée, d'autant plus que lors du comptage des expériences de c-Fos, il semblait y avoir une différence de marquage entre les deux hémisphères (observations personnelles), à la fois au niveau de l'hippocampe dorsal et du cortex cingulaire antérieur, mais les hémisphères n'avaient pas été distingués avec certitude lors de l'histologie. Ceci pourrait donc faire l'objet d'une étude très intéressante.

Pour conclure, cette thèse a apporté quelques éléments de réponses aux questions posées et a ouvert la voie à de nouveaux champs d'investigations. Même si la consolidation systémique est encore loin d'avoir révélé tous ses secrets, ces travaux ont contribué à une meilleure

compréhension des conditions dans lesquelles elle peut avoir lieu, et du réseau impliqué dans la réorganisation spatio-temporelle d'un souvenir spatial chez le Rat. L'avancée des connaissances dans ce domaine devrait permettre de mieux appréhender, chez l'Homme, la mémoire et ses désordres, et ainsi permettre au « vaste palais de la Mémoire » de Saint-Augustin d'être un peu moins mystérieux.



# Bibliographie



**A-**

Aggleton JP, Hunt PR, Nagle S, Neave N (1996) The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. *Behavioral Brain Research* 81: 189-198.

Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behavioral Brain Sciences* 22: 425-489.

Aggleton JP, Pearce JM (2001) Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B** 356: 1467-1482.

Alvarez P, Squire LR (1994) Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *PNAS* 91: 7041-7045.

Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS (1999) Temporally graded amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *The Journal of Neuroscience* 19(3): 1106-1114.

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J (2007) *The Hippocampus Book*. New York: Oxford University Press.

Aristote (entre -335/-323 av. J-C.) *Traité de la mémoire et de la réminiscence*.

Astur RS, Taylor LB, Mamelak AN, Philpott L, Sutherland RJ (2002) Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioural Brain Research* 132: 77-84.

**B-**

Baddeley A (2001) The concept of episodic memory. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B** 356: 1345-1350.

Bailey KR, Mair RG (2005) Lesions of specific and non-specific thalamic nuclei affect prefrontal cortex-dependent aspects of spatial working memory. *Behavioral Neuroscience* 119: 410-419.

Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C (2003) Task solving by procedural strategies in the Morris water maze. *Physiology and Behavior* 78: 785-793.

Barsalou LW (1988) The content and organization of autobiographical memories. (Neisser and Winograd Eds.) *Remembering reconsidered: ecological and traditional approaches to the study of memory*. pp. 193-243. New York: Cambridge University Press.

Bayley PJ, Hopkins RO, Squire LR (2003) Successful recollection of remote autobiographical memories by amnesic patients with medial temporal lobe lesions. *Neuron* 38: 135-144.

von Bechterew W (1900) Demonstration eines Gehirns mit Zerstörung der vorderen und inneren Theile der Hirnrinde beider Schläfenlappen. *Neurologisch. Zentralbl.* 19: 990-991.

Biedenkapp JC, Rudy JW (2007) Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. *Learning and Memory* 14: 200-203.

Blum S, Hebert AE, Dash PK (2006) A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *NeuroReport* 17(3): 341-344.

Boehnke SE, Rasmusson DD (2001) Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxine delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 105: 133-141.

Bolhuis JJ, Stewart CA, Forrest EM (1994) Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum. *Quarterly Journal of Experimental Psychology B* 47(2): 129-150.

Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400: 671-675.

Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S (2006) Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biology Psychiatry* 60(4): 352-360.

Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learning and Memory* 13: 187-191.

Brewer JB, Moghekar A (2002) Imaging the medial temporal lobe: exploring new dimensions. *Trends in Cognitive Neuroscience* 6(5): 217-223.

Bunge SA, Burrows B, Wagner AD (2004) Prefrontal and hippocampal contributions to visual associative recognition: interactions between cognitive control and episodic retrieval. *Brain and Cognition* 56: 141-152.

Bunsey M, Eichenbaum H (1995) Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and non-spatial stimulus-stimulus association. *Hippocampus* 5(6):546-556.

Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002) The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35:625-641.

Burk JA, Mair RG (2001) Effects of intralaminar thalamic lesions on sensory attention and motor intention in the rat: a comparison with lesions involving frontal cortex and hippocampus. *Behavioural Brain Research* 123: 49-63.

Burianova H, Grady CL (2007) Common and unique neural activations in autobiographical, episodic, and semantic retrieval. *Journal of Cognitive Neuroscience* 19(9): 1520-1534.

Buritova J, Besson JM (1999) Expression de la protéine c-Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière. Une technique pour étudier certains aspects physiopharmacologiques de la nociception. *Médecine/Sciences* 15 : 1126-1134.

Burwell RD, Bucci DJ, Sanborn MS, Jutras MJ (2004) Perirhinal and postrhinal contributions to remote memory for context. *The Journal of Neuroscience* 24(49): 11023-11028.

Byatt G, Dalrymple-Alford JC (1996) Both anteromedial and anteroventral thalamic lesions impair radial-maze learning in rats. *Behavioral Neuroscience* 110: 1335-1348.

## C-

Champagne D, Dupuy JB, Rochford J, Poirier J (2002) Apolipoprotein E knockout mice display procedural deficits in the Morris water maze: Analysis of learning strategies in three versions of the task. *Neuroscience* 114: 641-654.

Cho YH, Beracochea D, Jaffard R (1993) Extended temporal gradient for the retrograde and anterograde amnesia produced by ibotenate entorhinal cortex lesions in mice. *The Journal of Neuroscience* 13(4): 1759-1766.

Cimadevilla JM, Fenton AA, Bures J (2000) Functional inactivation of dorsal hippocampus impairs active place avoidance in rats. *Neuroscience Letters* 285 : 53-56.

Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005a) Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15: 260-272.

Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005b) Impaired remote spatial memory after hippocampal lesions despite extensive training beginning early in life. *Hippocampus* 15: 340-346.

Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2007) The hippocampus and spatial memory: findings with a novel modification of the water maze. *The Journal of Neuroscience* 27(25): 6647-6654.

Clayton NS, Griffiths DP, Emery NJ, Dickinson A (2001) Elements of episodic-like memory in animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B** 356: 1483-1491.

Corkin S (2002) What's new with the amnesic patient H.M.? *Nature Reviews Neuroscience* 3: 153-160.

## D-

Davoodi FG, Motamedi F, Naghdi N, Akbari E (2009) Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on spatial learning and memory in rats using Morris water maze task. *Behavioural Brain Research* 198(1): 130-135.

Delatour B, Gisquet-Verrier P (2000) Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behavioural Brain Research* 109: 113-128.

D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36: 60-90.

Dias R, Aggleton JP (2000) Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioural flexibility. *European Journal of Neuroscience* 12: 4457-4466.

Ding HK, Teixeira CM, Frankland PW (2008) Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning and Memory* 15: 290-293.

Douville K, Woodard JL, Seidenberg M, Miller SK, Leveroni CL, Nielson KA, Franczak M, Antuono P, Rao SM (2005) Medial temporal lobe activity for recognition of recent and remote famous names: an event-related fMRI study. *Neuropsychologia* 43: 693-703.

Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram. *Annual Review Psychology* 55: 51-86.

Dudai Y (2006) Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Current Opinion in Neurobiology* 16: 174-178.

Duncan GE, Stumpf WE (1991) Brain activity patterns: assessment by high resolution autoradiographic imaging of radiolabeled 2-deoxyglucose and glucose uptake. *Progress in Neurobiology* 37(4): 365-382.

Düzel E, Cabeza R, Picton TW, Yonelinas AP, Scheich H, Heinze HJ, Tulving E (1999) Task-related and item-related brain processes of memory retrieval. *PNAS* 96:1794-1799.

## E-

Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H (1999) The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23: 209-226.

Eisenhardt D, Menzel R (2007) Extinction learning, reconsolidation and the internal reinforcement hypothesis. *Neurobiology of Learning and Memory* 87: 167-173.

Ekstrom AD, Kahana MJ, Caplan JB, Fields TA, Isham EA, Newman EL, Fried I (2003) Cellular networks underlying human spatial navigation. *Letters to Nature* 425: 184-187.

Epp J, Keith JR, Spanswick SC, Stone JC, Prusky GT, Sutherland RJ (2008) Retrograde amnesia for visual memories after hippocampal damage in rats. *Learning and Memory* 15: 214-221.

**F-**

Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG (1997) Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without delay. *The Journal of Neuroscience* 17(5): 1880-1890.

Florian C, Roulet P (2004) Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural Brain Research* 154: 365-374.

Frankland PW, O'Brian C, Ohno M, Kirkwood A, Silva AJ (2001)  $\alpha$ -CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Letters to Nature* 411: 309-313.

Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304: 881-883.

Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 119-130.

Frenkel L, Maldonado H, Delorenzi A (2005) Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *European Journal of Neuroscience* 22: 1757-1766.

Fuster JM (2001) The prefrontal cortex --- an update: time is of the essence. *Neuron* 30: 319-333.

**G-**

Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, Mansuy I (2002) Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418: 970-975.

Gibb SJ, Wolff M, Dalrymple-Alford JC (2006) Odour-place paired-associate learning and limbic thalamus: comparison of anterior, lateral and medial thalamic lesions. *Behavioural Brain Research* 172: 155-168.

Gilbert PE, Kesner RP, Lee I (2001) Dissociating hippocampal subregions: a double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11: 626-636.

Gilbert PE, Brushfield AM (2009) The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioural assessment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33(5): 774-781.

Gilboa A, Winocur G, Rosenbaum RS, Poreh A, Gao F, Black SE, Westmacott R, Moscovitch M (2006) Hippocampal contributions to recollection in retrograde and anterograde amnesia. *Hippocampus* 16: 966-980.

Gisquet-Verrier P, Alexinsky T (1986) Does contextual change determine long-term forgetting? *Animal Learning and Behavior* 14(4): 349-358.

Glees P, Griffith HB (1952) Bilateral destruction of the hippocampus (cornu ammonis) in a case of dementia. *Psychiatrie, Neurologie, und medizinische Psychologie (Leipz)* 123: 193-204.

Gold JJ, Squire LR (2006) The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learning and Memory* 13: 699-710.

van Groen T, Kadish I, Wyss JM (2002) Role of the anterodorsal and anteroventral nuclei of the thalamus in spatial memory in the rat. *Behavioural Brain Research* 132: 19-28.

Grunthal E (1947) Über das klinische Bild nach umschriebenem beiderseitigem Ausfall der Ammonshornrinde. *Monatsschr, Psychiatrie, und Neurologie* 113: 1-16.

Gusev PA, Cui C, Alkon DL, Gubin AN (2005) Topography of Arc/Arg 3.1 mRNA expression in the dorsal and ventral hippocampus induced by recent and remote spatial memory recall: dissociation of CA3 and CA1 activation. *The Journal of Neuroscience* 25(41): 9384-9397.

Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience* 2(12): 1120-1124.

Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *The Journal of Neuroscience* 21(14): 5089-5098.

## H-

Haijima A, Ichitani Y (2008) Anterograde and retrograde amnesia of place discrimination in retrosplenial cortex and hippocampal lesioned rats. *Learning and Memory* 15: 477-482.

Haist F, Gore JB, Mao H (2001) Consolidation of human memory over decades revealed by functional magnetic resonance imaging. *Nature Neuroscience* 4 (11): 1139-1145.

Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2001) Cellular imaging of *zif268* expression in the hippocampus and amygdale during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *The Journal of Neuroscience* 21(6): 2186-2193.

Hannesson DK, Vacca G, Howland JG, Phillips AG (2004) Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not in spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. *Behavioural Brain Research* 153: 273-285.

Hartley T, Maguire EA, Spiers HJ, Burgess N (2003) The well-worn route and the path less traveled: distinct neural bases of route following and wayfinding in humans. *Neuron* 37: 877-888.



Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27: 555-579.

Herrera DG, Robertson HA (1996) Activation of *c-fos* in the brain. *Progress in Neurobiology* 50: 83-107.

Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cognitive Brain Research* 3: 167-181.

de Hoz L, Knox J, Morris RGM (2003) Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus* 13: 587-603.

de Hoz L, Moser EI, Morris RGM (2005) Spatial learning with unilateral and bilateral hippocampal networks. *European Journal of Neuroscience* 22: 745-754.

Hughes P, Dragunow M (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews* 47(1): 133-178.

## **J-**

James W (1890) *The principles of psychology*. New York: Holt, Rhinehart & Winston.

Jarrard LE (1978) Selective hippocampal lesions: differential effects on performance by rats of a spatial task with preoperative versus postoperative training. *J Comp Physiol Psychol* 92: 1119-1127.

Jarrard LE (1995) What does the hippocampus really do? *Behavioural Brain Research* 71:1-10.

Jarrard LE, Davidson TL, Bowring B (2004) Functional differentiation within the media temporal lobe in the Rat. *Hippocampus* 14: 434-449.

Jay TM, Burette F, Laroche S (1996) Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses. *Journal of Physiology Paris* 90: 361-366.

Jo YS, Hye Park E, Hwan Kim I, Kwon Park S, Kim H, Taek Kim H, Choi JS (2007) The medial prefrontal cortex is involved in spatial memory retrieval under partial-cue conditions. *The Journal of Neuroscience* 27(49): 13567-13578.

Joel D, Tarrasch R, Feldon J, Weiner I (1997) Effects of electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex or its subfields on 4-arm baited, 8-arm radial maze, two-way active avoidance and conditioned fear tasks in the rat. *Brain Research* 765: 37-50.

Jung MW, Wiener S, McNaughton BL (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the Rat. *The Journal of Neuroscience* 14(12): 7347-7356.

## K-

Kesner RP (2007a) Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning and Memory* 14: 771-781.

Kesner RP (2007b) A behavioural analysis of dentate gyrus function. *Progress in Brain Research* 163: 567-576.

Kessels RPC, de Haan EHF, Kappelle LJ, Postma A (2001) Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews* 35: 295-303.

Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256(5057): 675-677.

Kirwan CB, Bayley PJ, Galvan VV, Squire LR (2008) Detailed recollection of remote autobiographical memory after damage to the medial temporal lobe. *PNAS* 105(7): 2676-2680.

Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani R, Certa U, Cassel JC (2009) Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: an approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus*, 19(9): 800-816.

Kubik S, Miyashita T, Guzowski JF (2007) Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning and Memory* 14: 758-770.

## L-

Lacroix L, White I, Feldon J (2002) Effect of excitotoxic lesions of rat medial prefrontal cortex on spatial memory. *Behavioural Brain Research* 133: 69-81.

Laroche S, Davis S, Jay TM (2000) Plasticity at Hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10: 438-446.

Lassalle JM, Bataille T, Halley H (2000) Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiology of Learning and Memory* 73: 243-257.

Lattal KM, Mullen MT, Abel T (2003) Extinction, renewal, and spontaneous recovery of a spatial preference in the water maze. *Behavioral Neuroscience* 117(5): 1017-1028.

Lehmann H, Lacanilao S, Sutherland RJ (2007) Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. *European Journal of Neuroscience* 25: 1278-1286.

Lenck-Santini PP, Save E, Poucet B (2001) Evidence for a relationship between place-cell spatial firing and spatial memory performance. *Hippocampus* 11(4): 377-390.

Lenck-Santini PP, Muller RU, Save E, Poucet B (2002) Relationships between place cell firing fields and navigational decisions by rats. *The Journal of Neuroscience* 22(20): 9035-9047.

Leyhe T, Müller S, Milian M, Eschweiler GW, Saur R (2009) Impairment of episodic and semantic autobiographical memory in patients with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 47(12): 2464-2469.

Li CQ, Liu D, Huang L, Wang H, Zhang JY, Luo XG (2008) Cytosine arabinoside treatment impairs the remote spatial memory function and induces dendritic retraction in the anterior cingulate cortex of rats. *Brain Research Bulletin* 77: 237-240.

Lomber SG (1999) The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *Journal of Neuroscience Methods* 86: 109-117.

Lucas JA (2002) Memory, overview. *Encyclopedia of the human brain* Vol.2 : 817-833.

## M-

Maei HR, Zaslavsky K, Teixeira CM, Frankland PW (2009) What is the most sensitive measure of water maze probe test performance? *Frontiers in Integrative Neuroscience* 3: 1-9.

Maguire EA, Frackowiack RSJ, Frith CD (1997) Recalling routes around London: activation of the right hippocampus in taxi drivers. *The Journal of Neuroscience* 17(18): 7103-7110.

Maguire EA, Burgess N, Donnett JG, Frackowiak RSJ, Frith CD, O'Keefe J (1998) Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science* 280: 921-924.

Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RSJ, Frith CD (2000) Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *PNAS* 97(8): 4398-4403.

Maguire EA, Henson RNA, Mummery CJ, Frith CD (2001) Activity in prefrontal cortex, not hippocampus, varies parametrically with the increase in remoteness of memories. *NeuroReport* 12: 441-444.

Mair RG, Burk JA, Porter MC (1998) Lesions of the frontal cortex, hippocampus, and intralaminar thalamic nuclei have distinct effect on remembering in rats. *Behavioral Neuroscience* 112: 772-792.

- Malpeli JG (1999) Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *Journal of Neuroscience Methods* 86: 119-128.
- Maquet P, Laureys S, Peigneux P, Fuchs S, Petiau C, Phillips C, Aerts J, Del Fiore G, Degueldre C, Meulemans T, Luxen A, Franck G, Van Der Linden M, Smith C, Cleeremans A (2000) *Nature Neuroscience* 3(8): 831-836.
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Phil Trans R Soc Lond B* 262: 23-81.
- Martin JH, Ghez C (1999) Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. *Journal of Neuroscience Methods* 86: 145-159.
- Martin SJ, de Hoz L, Morris RGM (2005) retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* 43: 609-624.
- Martin SJ, Clark RE (2007) The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(4): 401-431.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305: 96-99.
- McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC (1995) Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological Review* 102(3): 419-457.
- McDonald RJ, Hong NS, Devan BD (2004) The challenges of understanding mammalian cognition and memory-based behaviours: an interactive learning and memory systems approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 719-745.
- McDonald RJ, Lo Q, King AL, Wasiak TD, Hong NS (2007) Empirical tests of the functional significance of amygdala-based modulation of hippocampal representations: evidence for multiple memory consolidation pathways. *European Journal of Neuroscience* 25: 1568-1580.
- McGauran AMT, O'Mara SM, Commins S (2005) Vestibular influence on water maze retention: transient whole body rotations improve the accuracy of the cue-based retention strategy. *Behavioural Brain Research* 158: 183-187.
- Meeter M, Murrer JMJ (2004) Consolidation of long-term memory: evidence and alternatives. *Psychological Bulletin* 130(6): 843-857.
- Micheau J, Riedel G, Roloff EVL, Inglis J, Morris RGM (2004) Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behavioral Neuroscience* 118(5): 1022-1032.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) *Cognitive neuroscience and the study of memory*. *Neuron* 20: 445-468.

- Mitchell AS, Dalrymple-Alford JC (2005) Dissociable memory effects after medial thalamus lesions in the rat. *European Journal of Neuroscience* 22: 973-985.
- Mitchell AS, Dalrymple-Alford JC (2006) Lateral and anterior thalamic lesions impair independent memory systems. *Learning and Memory* 13: 388-396.
- Miyamoto S, Leipzig JN, Lieberman JA, Duncan GE (2000) Effects of ketamine, MK-801, and amphetamine on regional brain 2-deoxyglucose uptake in freely moving mice. *Neuropsychopharmacology* 22(4): 400-412.
- Miyashita T, Kubik S, Lewandowski G, Guzowski JF (2008) Networks of neurons, network of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 89(3): 269-284.
- Moghaddam M, Bures J (1996) Contribution of egocentric spatial memory to place navigation of rats in the Morris water maze. *Behavioural Brain Research* 78: 121-129.
- Morris RGM (1981) Spatial localisation does not depend on the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12: 239-260.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal damage. *Nature* 297: 681-683.
- Morris RGM (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11: 47-60.
- Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, Nadel L (2005) Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic, and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy* 207: 35-66.
- Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS (2006) The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic, and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology* 16: 179-190.
- Moser E, Moser MB, Andersen P (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of Neuroscience* 13(9): 3916-3925.
- Moser MB, Moser EI (1998) Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 18(18): 7535-7542.
- Moser MB, Moser EI (1998b) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8: 608-619.
- Moser EI, Kropff E, Moser MB (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annual Reviews of Neuroscience* 31: 69-89.
- Muller R (1996) A quarter of a century of place cells. *Neuron* 17: 979-990.

**N-**

Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 217-227.

Nadel L, Campbell J, Ryan L (2007) Autobiographical memory retrieval and hippocampal activation as a function of repetition and the passage of time. *Neural Plasticity* 2007: 90472.

Nader K, Schafe GE, Ledoux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdale for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406: 722-726.

Nader K (2003) Memory traces unbound. *Trends in Neuroscience* 26(2): 65-72.

Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 224-234.

Niki K, Luo J (2002) An fMRI study on the time-limited role of the medial temporal lobe in long-term topographical autobiographic memory. *Journal of Cognitive Neuroscience* 14(3): 500-507.

**O-**

O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34: 171-175.

O'Keefe J, Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Oxford University Press.

Olsen GM, Scheel-Krüger J, Moller A, Jensen EH (1994) Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. *Behavioral Neuroscience* 108(4): 681-690.

Olton DS, Samuelson RJ (1976) Remembrance of places past: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 2: 97-116.

Olton DS, Walker JA, Gage FH (1978) Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Research* 139: 295-308.

Olton DS, Becker JT, Handelman GE (1979) Hippocampus, space, and memory. *Behavioural Brain Science* 2: 313-365.

**P-**

Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 65: 65-72.

Parslow DM, Morris RG, Fleminger S, Rahman Q, Abrahams S, Recce M (2005) Allocentric spatial memory in humans with hippocampal lesions. *Acta Psychologica* 118: 123-147.

Paul CM, Magda G, Abel S (2009) Spatial memory: theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research* 203(2): 151-164.

Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press.

Paz R, Bauer P, Paré D (2007) Learning-related facilitation of rhinal interactions by medial prefrontal inputs. *The Journal of Neuroscience* 27(24): 6542-6551.

Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, Cosquer B, Lopez J, Certa U, Cassel JC (2006) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: a comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the Rat. *Neuroscience* 141: 1649-1663.

Piefke M, Weiss PH, Zilles K, Markowitsch HJ, Fink GR (2003) Differential remoteness and emotional tone modulate the neural correlates of autobiographical memory. *Brain* 126: 650-668.

Piolino P, Giffard-Quillon G, Desgranges B, Chételat G, Baron JC, Eustache F (2004) Re-experiencing old memories via hippocampus: a PET study of autobiographical memory. *NeuroImage* 22: 1371-1383.

Potvin O, Allen K, Thibaudeau G, Doré FY, Goulet S (2006) Performance on spatial working memory tasks after dorsal or ventral hippocampal lesions and adjacent damage to the subiculum. *Behavioral Neuroscience* 120(2): 413-422.

Poucet B, Thinus-Blanc C, Muller RU (1994) Place cells in the ventral hippocampus of rats. *Neuroreport* 5: 2045-2048.

Poucet B, Lenck-Santini PP, Paz-Villagran V, Save E (2003) Place cells, neocortex and spatial navigation: a short review. *Journal of Physiology Paris* 97: 537-546.

Prados J, Manteiga RD, Sansa J (2003) Recovery effects after extinction in the Morris swimming pool navigation task. *Learning and Behavior* 31(3): 299-304.

Press GA, Amaral DG, Squire LR (1989) Hippocampal abnormalities in amnesic patients revealed by high-resolution magnetic resonance imaging. *Nature* 341: 54-57.

## R-

Rajah MN, McIntosh AR (2005) Overlap in the functional neural systems involved in semantic and episodic memory retrieval. *Journal of Cognitive Neuroscience* 17(3): 470-482.

- Ramos MJM, Vaquero JMM (2005) The perirhinal cortex of the rat is necessary for spatial memory retention long after but not soon after learning. *Physiology and Behavior* 86: 118-127.
- Ramos MJM (2008) Perirhinal cortex lesions produce retrograde amnesia for spatial information in rats: consolidation or retrieval? *Learning and Memory* 15: 587-596.
- Rempel-Clower NL, Zola SM, Squire LR, Amaral DG (1996) Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *The Journal of Neuroscience* 16(16): 5233-5255.
- Rescorla RA (2004) Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval. *Learning and Behavior* 32(4): 401-408.
- Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M (2009) The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *The Journal of Neuroscience* 29(25): 8206-8214.
- Ribot T (1881) *Les maladies de la mémoire*. Paris : Eds. G. Baillière.
- Riccio D, Ackil J, Burch-Vernon A (1992) Forgetting of stimulus attributes: methodological implications for assessing associative phenomena. *Psychological Bulletin* 112: 433-445.
- Rosenbaum RS, Priselac S, Köhler S, Black SE, Gao F, Nadel L, Moscovitch M (2000) Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. *Nature Neuroscience* 3(10): 1044-1048.
- Rosenbaum RS, Winocur G, Moscovitch M (2001) New views on old memories: re-evaluating the role of the hippocampal complex. *Behavioural Brain Research* 127: 183-197.
- Rosenbaum RS, Köhler S, Schacter DL, Moscovitch M, Westmacott R, Black SE, Gao F, Tulving E (2005) The case of K.C.: contributions of a memory-impaired person to memory theory. *Neuropsychologia* 43:989-1021.
- Rosenbaum RS, Winocur G, Grady CL, Ziegler M, Moscovitch M (2007) Memory for familiar environments learned in the remote past: fMRI studies of healthy people and an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. *Hippocampus* 17(12): 1241-1251.
- Ross RS, Eichenbaum H (2006) Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *The Journal of Neuroscience* 26(18): 4852-4859.
- Roulin, JL (1998) La mémoire humaine. *Psychologie Cognitive*, pp.268-328. Collection Grand Amphi, Bréal.
- Rudy JW, Biedenkapp JC, O'Reilly RC (2005) Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: an alternative view. *Learning and Memory* 12: 445-446.



Ryan L, Nadel L, Keil K, Putnam K, Schyner D, Trouard T, Moscovitch M (2001) Hippocampal complex and retrieval of recent and very remote autobiographical memories: evidence from functional magnetic resonance imaging in neurologically intact people. *Hippocampus* 11: 707-714.

Ryan L, Cox C, Hayes SM, Nadel L (2008) Hippocampal activation during episodic and semantic memory retrieval: comparing category production and category cued recall. *Neuropsychologia* 46: 2109-2121.

Ryan L, Lin CY, Ketcham K, Nadel L (2009) The role of medial temporal lobe in retrieving spatial and nonspatial relations from episodic and semantic memory. *Hippocampus*, *in press*.

## S-

Sara SJ (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory* 7: 73-84.

Save E, Cressan A, Thinus-Blanc C, Poucet B (1998) Spatial firing of hippocampal place cells in blind rats. *The Journal of Neuroscience* 18(5): 1818-1826.

Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 20: 11-21.

Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290: 1170-1174.

Shires KL, Aggleton JP (2008) Mapping immediate-early gene activity in the rat after place learning in a water-maze: the importance of matched control conditions. *European Journal of Neuroscience* 28: 982-996.

Shrager Y, Bayley PJ, Bontempi B, Hopkins RO, Squire LR (2007) Spatial memory and the human hippocampus. *PNAS* 104(8): 2961-2966.

Siapas AG, Wilson MA (1998) Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron* 21: 1123-1128.

Simons JS, Spiers HJ (2003) Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 637-648.

Sirkin DW (1983) Critical defatting of frozen brain sections for optimal differentiation with the cresyl violet staining. *Stain Technology* 58(2): 121-122.

Smith CN, Squire LR (2009) Medial temporal lobe activity during retrieval of semantic memory is related to the age of the memory. *The Journal of Neuroscience* 29(4): 930-938.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of Neurochemistry* 28: 897-916.

Sokoloff L (1981). Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1: 7-36.

van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 272-282.

Squire LR, Amaral DG, Press GA (1990) Magnetic resonance imaging of the hippocampal formation and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia. *The Journal of Neuroscience* 10(9): 3106-3117.

Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review* 99(2): 195-231.

Squire LR, Zola-Morgan S (1991) The medial temporal lobe system. *Science* 253:1380-1386.

Squire LR, Knowlton B, Musen G (1993) The structure and organization of memory. *Annual Reviews of Psychology* 44: 453-495.

Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology* 5: 169-177.

Squire LR, Zola SM (1998) Episodic memory, semantic memory, and amnesia. *Hippocampus* 8: 205-211.

Squire LR (2009) The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* 61: 6-9.

Steinvorth S, Levine B, Corkin S (2005) Medial temporal lobe structures are needed to re-experience remote autobiographical memories: evidence from H.M. and W.R. *Neuropsychologia* 43: 479-496.

Stringer KG, Martin GM, Skinner DM (2005) The effects of hippocampal lesions on response, direction, and place learning in rats. *Behavioral Neuroscience* 119(4): 946-952.

Stupien G, Florian C, Roullet P (2003) Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 80: 32-41.

Sutherland RJ, Weisend MP, Mumby D, Astur RS, Hanlon FM, Koerner A, Thomas MJ, Wu Y, Moses SN, Cole C, Hamilton DA, Hoising JM (2001) Retrograde amnesia after hippocampal damage: recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus* 11: 27-42.

Sutherland RJ, O'Brian J, Lehmann H (2008) Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. *Hippocampus* 18: 710-718.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of Neuroscience* 24(20): 4787-4795.

## T-

- Takashima A, Petersson KM, Rutters F, Tendolkar I, Jensen O, Zwartz MJ, McNaughton BL, Fernandez G (2006) Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study. *PNAS* 103(3): 756-761.
- Takashima A, Nieuwenhuis ILC, Jensen O, Talamini LM, Rijpkema M (2009) Shift from hippocampal to neocortical centered retrieval network with consolidation. *The Journal of Neuroscience* 29(32): 10087-10093.
- Takehara K, Kawahara S, Kirino Y (2003) Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *The Journal of Neuroscience* 23(30): 9897-9905.
- Teather LA, Packard MG, Smith DE, Ellis-Behnke RG, Bazan NG (2005) Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory* 84: 75-84.
- Teng E, Squire LR (1999) Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Letters to Nature* 400: 675-677.
- Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *The Journal of Neuroscience* 26(29): 7555-7564.
- Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampal-prefrontal pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10: 411-419.
- Tolman EC (1948) Cognitive maps in rats and men. *The Psychological Review* 55(4): 189-208.
- Treves A, Tashiro A, Witter MP, Moser EI (2008) What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154: 1155-1172.
- Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RGM (2007) Schemas and memory consolidation. *Science* 316: 76-82.
- Tulving E (1972) Episodic and semantic memory. (Tulving E, et Donaldson W, Eds.) *Organization of memory*. pp.381-403. New York: Academic Press.
- Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, Rampon C (2009) Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *PNAS* 106(14): 5919-5924.
- Tulving E, LePage L. (2000) Where in the brain is the awareness of one's past? (Schacter DL et Scarry E, Eds.) *Memory, Brain, and Belief*. pp. 208-228. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Tulving E (2002) Episodic memory: from mind to brain. *Annual Reviews of Psychology* 53:1-25.

## U-

Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research* 146: 3-17.

## V-

Vallortiga G, Rogers LJ, Bisazza A (1999) Possible evolutionary origins of cognitive brain lateralization. *Brain Research Reviews* 30: 164-175.

Vargha-Kadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M (1997) Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* 277: 376-380.

Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51: 32-58.

Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142: 1-20.

Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ (2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology* 499: 768-796.

Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C (2007) Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Research Bulletin* 71: 601-609.

Viard A, Piolino P, Desgranges B, Chételat G, Lebreton K, Landeau B, Young A, De La Sayette V, Eustache F (2007) Hippocampal activation for autobiographical memories over the entire lifetime in healthy aged subjects : an fMRI study. *Cerebral Cortex* 17(10): 2453-2467.

Viard A, Lebreton K, Chételat G, Desgranges B, Landeau B, Young A, De La Sayette V, Eustache F, Piolino P (2009) Patterns of hippocampal-neocortical interactions in the retrieval of episodic autobiographical memories across the entire life-span of aged adults. *Hippocampus: in press*.

Victor M, Agamanolis D (1990) Amnesia due to lesions confined to the hippocampus: a clinical-pathologic study. *Journal of Cognitive Neuroscience* 2(3): 246-257.

Volpe BT, Davis HP, Towle A, Dunlap WP (1992) Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlates with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions. *Behavioral Neuroscience* 106(3): 457-464.

## W-

- Wang H, Shimizu E, Tang YP, Cho M, Kyin M, Zuo W, Robinson DA, Alaimo PJ, Zhang C, Morimoto H, Zhuo M, Feng R, Shokat KM, Tsien JZ (2003) Inducible protein knockout reveals temporal requirement of CaMKII reactivation for memory consolidation in the brain. *PNAS* 100(7): 4287-4292.
- Wang SH, Teixeira CM, Wheeler AL, Frankland PW (2009) The precision of remote context memories does not require the hippocampus. *Nature Neuroscience* 12(3): 253-255.
- Warburton EC, Aggleton JP (1999) Differential deficits in the Morris water maze following lesions of the anterior thalamus and fornix transection. *Behavioural Brain Research* 98: 27-38.
- Whishaw, IQ (1998) Place learning in hippocampal rats and the path integration hypothesis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 22: 209-220.
- Wiggs CL, Weisberg J, Martin A (1999) Neural correlates of semantic and episodic memory retrieval. *Neuropsychologia* 37:103-118.
- Wiig KA, Cooper LN, Bear MF (1996) Temporally graded retrograde amnesia following separate and combined lesions of the perirhinal cortex and fornix in the Rat. *Learning and Memory* 3: 313-325.
- Winocur G (1990) Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. *Behavioural Brain Research* 38: 145-154.
- Winocur G, McDonald RM, Moscovitch M (2001) Anterograde and retrograde amnesia in rats with large hippocampal lesions. *Hippocampus* 11: 18-26.
- Winocur G, Moscovitch M, Caruana DA, Binns MA (2005a) Retrograde amnesia in rats with lesions to the hippocampus on a test of spatial memory. *Neuropsychologia* 43: 1580-1590.
- Winocur G, Moscovitch M, Fogel S, Rosenbaum RS, Sekeres M (2005b) Preserved spatial memory after hippocampal lesions: effects of extensive experience in a complex environment. *Nature Neuroscience* 8(3): 273-275.
- Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M (2007) Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature Neuroscience* 10(5): 555-557.
- Witter MP, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. (George Paxinos, Eds.) *The Rat Nervous System*. pp. 635-704. London: Elsevier Academic Press.
- Wolff M, Gibb SJ, Dalrymple-Alford JC (2006) Beyond spatial memory: the anterior thalamus and memory for temporal order of a sequence of odor cues. *The Journal of Neuroscience* 26: 2907-2913.

Wolff M, Gibb SJ, Cassel JC, Dalrymple-Alford JC (2008) Anterior but not intralaminar thalamic nuclei support allocentric spatial memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 90: 71-80.

Woodard JL, Seidenberg M, Nielson KA, Miller SK, Franczak M, Antuono P, Douville KL, Rao SM (2007) Temporally graded activation of neocortical regions in response to memories of different ages. *Journal of Cognitive Neuroscience* 19(7): 1113-1124.

## Z-

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 6(10): 2950-2967.

# Annexe





## REVERSIBLE INACTIVATION OF THE DORSAL HIPPOCAMPUS BY TETRODOTOXIN OR LIDOCAINE: A COMPARATIVE STUDY ON CEREBRAL FUNCTIONAL ACTIVITY AND MOTOR COORDINATION IN THE RAT

A. PEREIRA DE VASCONCELOS,<sup>a1</sup> S. KLUR,<sup>a,b1</sup>  
C. MULLER<sup>a1</sup> B. COSQUER,<sup>a</sup> J. LOPEZ,<sup>a</sup> U. CERTA<sup>b</sup>  
AND J. C. CASSEL<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>LN2C FRE 2855, Université Louis Pasteur, ULPICNRS, Institut Fédératif de Recherche IFR 37, GDR CNRS 2905, 12 rue Goethe, F 67000 Strasbourg, France

<sup>b</sup>F. Hoffmann-La Roche Ltd., RCMG, CH 4070 Basel, Switzerland

**Abstract**—Reversible inactivation of the hippocampus by lidocaine or tetrodotoxin is used to investigate implications of this structure in memory processes. Crucial points related to such inactivation are the temporal and spatial extents of the blockade. We compared effects of intrahippocampal infusions of commonly-used doses of lidocaine (5 or 10  $\mu$ g) or tetrodotoxin (5 or 10 ng) in rats at two post-infusion delays (5 or 30 min), using 2-deoxyglucose autoradiography to visualize local cerebral glucose metabolism, and beam-walking performance to assess motor coordination. In addition, memory retrieval was evaluated in a water maze after bilateral infusions of 10  $\mu$ g lidocaine. A unilateral tetrodotoxin infusion induced dose- and time-dependent reductions of 2-deoxyglucose uptake in the vicinity of the infusion site (dorsal hippocampus:  $-29\%$  to  $-67\%$ ) and in other ipsi- and contralateral brain regions (ventral hippocampus, lateral thalamus, cortical regions). The maximal effect was at 10 ng, at the delay of 30 min between the tetrodotoxin infusion and the 2-deoxyglucose injection. Uni- and bilateral infusions of tetrodotoxin induced dramatic motor coordination deficits. Conversely, lidocaine reduced 2-deoxyglucose uptake ( $-19\%$ ) in the dorsal hippocampus only at 10  $\mu$ g, with weak extrahippocampal effects. Whether infused uni- or bilaterally and regardless of the dose, lidocaine did not alter motor coordination. When infused bilaterally, however, 10  $\mu$ g of lidocaine impaired short-term retrieval of spatial information in a water maze. Because lidocaine i) induced a weak though significant functional blockade mainly restricted to the infusion site, ii) had no consequences on motor coordination and, nevertheless iii) altered short-term spatial memory retrieval, we conclude that acute intrahippocampal infusions of lidocaine may offer some advantages over tetrodotoxin at the doses used herein. © 2006 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** 2-deoxyglucose, beam-walking, functional inactivation, glucose metabolism, memory, water maze.

<sup>1</sup> Contributed equivalently to the work.

\*Corresponding author. Tel: +33-3-90-24-19-52; fax: +33-3-90-24-19-58.

E-mail address: jean-christophe.cassel@psycho-ulp.u-strasbg.fr (J.-C. Cassel).

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; Lido, lidocaine; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; T<sub>QT</sub>, target quadrant; TTX, tetrodotoxin; 2DG, 2-deoxyglucose.

0306-4522/06\$30.00+0.00 © 2006 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.023

Considerable evidence points to the hippocampus as a key structure for the encoding and retrieval of explicit memories (O'Keefe and Nadel, 1978; Squire, 1992; Eichenbaum, 1997). In humans, the right hippocampus is activated in navigation tasks where retrieval of spatial configuration is essential (Maguire et al., 1997; Nunn et al., 1999; Burgess et al., 2002). In the rat, the hippocampus, and mostly its dorsal part, is a key system for processing information about the spatial arrangement of stimuli and events (Moser et al., 1995; Moser and Moser, 1998a,b; Eichenbaum et al., 1999; O'Keefe, 1999; de Hoz et al., 2003).

To study the role of the hippocampus in memory processes in rodents, traditional approaches have used electrolytic, aspiration or radiofrequency lesions, or local injections of excitotoxins such as glutamate analogs in high concentrations, which have the main advantage of sparing fibers passing through the damaged structure (for review see Jarrard, 2001, 2002). Such irreversible lesion techniques have proved very useful to identify the neural systems participating in hippocampal-related memory processes. However, lesion studies make it sometimes difficult to draw precise conclusions about the time course of neurobiological mechanisms contributing to these processes (for review see Izquierdo and Medina, 1998; Ambrogio Lorenzini et al., 1999). Indeed, permanent lesions cannot always unambiguously identify if one or more of the different stages of memory processes is disabled (encoding, consolidation, retrieval). One additional difficulty with experiments using permanent lesions is that time-dependent neural reorganization (e.g. sprouting, alterations of receptor sensitivity) may partially compensate for an initial deficit and thereby bias data interpretation (for review see Cassel et al., 1997; Ambrogio Lorenzini et al., 1999).

To some extent, such drawbacks can be circumvented by reversible local inactivation methods. For most, reversible "lesions" rely upon the administration of drugs which temporarily block a particular brain region (for review, see Ambrogio Lorenzini et al., 1999). The main advantage of such methods is that they provide information not only on "where," but also on "when" and for "how long" the processes involved in a given function may take place. In addition, the inactivation-induced effects cannot be readily compensated for as the properties of an inactivated system are changed only for a short time (Bures and Buresova, 1990). Thus, drug infusion before acquisition or before retrieval was used to show that learning and recall could be altered independently (Bohbot et al., 1996; Moser

and Moser, 1998b; Parron et al., 2001; Cimadevilla et al., 2001). Along the same line, reversible inactivation experiments showed that retrieval of recent or remote memories may involve different brain structures, i.e. the hippocampus for short-term memories, and the prefrontal cortex for long term memories (Maviel et al., 2004; Frankland and Bontempi, 2005). Also, chronic inactivation of the hippocampus for several days beginning after acquisition was used to disrupt long-term consolidation (Riedel et al., 1999).

However, two important points raised by reversible lesion experiments, essential for the interpretation of the results, are the temporal and spatial extents of the blockade. In many studies, authors speculated about the spatial extent and time course of the inactivation without providing any objective support for this (Ambrogio Lorenzini et al., 1997; Cimadevilla et al., 2001). In some other studies, data documented the spatial (temporal) limits of drug diffusion or functional effects (e.g. Zhuravin and Bures, 1991), although in the approach by Zhuravin and Bures, the target structure was not directly related to learning and memory processes. Thus, data concerning the anatomical limits of the drug effects, especially when inactivation targeted the dorsal hippocampus, remain quite sparse.

In the literature, reversible inactivation of the dorsal hippocampus was mostly performed with tetrodotoxin (TTX; Fenton and Bures, 1993; Fenton et al., 1995; Cimadevilla et al., 2001) or lidocaine (Lido; Sandkuhler et al., 1987; Bohbot et al., 1996; Parron et al., 2001). Because of their action on voltage-dependent sodium channels, both drugs induce a generalized blockade of neuronal function (Hille, 1966; Narahashi, 1972; Ritchie, 1975). However, TTX and Lido differ in their efficiency. Lido produces a short-lasting blockade, characterized by almost immediate effects lasting about 10–20 min and recovering over the next 30–120 min (Malpeli and Schiller, 1979; Sandkuhler et al., 1987; Martin, 1991; Fenton and Bures, 1994), whereas TTX blockade is maximal between 30 and 120 min after administration, decays exponentially, and generally vanishes within 24 h (Zhuravin and Bures, 1991).

In the present study, we compared the functional consequences of reversible inactivation induced by Lido and TTX infusions in the dorsal hippocampus. In a first experiment, using two doses commonly used in the literature (5 and 10  $\mu\text{g}$  for Lido; 5 and 10 ng for TTX), we assessed the effects of a unilateral hippocampal inactivation on local cerebral glucose metabolism visualized by the autoradiographic 2-deoxyglucose (2DG) method (Sokoloff et al., 1977). 2DG injections were made 5 or 30 min after Lido or TTX infusion. Observation of the rats' behavior suggested that inactivation of the dorsal hippocampus could affect motor function. Thus, in a second experiment, using uni- and bilateral hippocampal infusions and two post-infusion delays (5 or 30 min), we assessed the effects of Lido and TTX (same doses as in the first experiment) on motor coordination in the beam-walking test (Goldstein and Davis, 1990; Hofferer and Cassel, 1996). Finally, based on the results of experiments 1 and 2, we designed a third experiment in which rats were tested for retrieval of a

platform location in a water maze after only a bilateral infusion of 10  $\mu\text{g}$  Lido.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

All experiments were performed in accordance with the rules of the European Committee Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (references for personal licenses are no. 67-7 for A.PdV. and no. 67-215 for J-C.C.; other authors under the former's responsibility). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used to a reasonable amount regarding statistical constraints.

### Experiment 1: metabolic study

**Subjects.** Fifty-three 3-month-old male Lister Hooded rats were obtained from the breeding colony of Harlan (Horst, Netherlands). They were housed individually in transparent Makrolon cages (42×26×15 cm) in quiet facilities under a 12-h light/dark cycle (light on at 07:00 h) with free access to food and water.

**Surgery.** Rats were implanted bilaterally with intrahippocampal infusion devices under a combination of ketamine (6.38 mg/kg) and xylazine (0.85 mg/kg) anesthesia. One stainless steel guide cannula (external diameter 0.4 mm) was stereotaxically implanted within each dorsal hippocampus using the following coordinates in mm according to Paxinos and Watson (1998): anteroposterior:  $-3.8$  (from Bregma), mediolateral:  $\pm 3.0$  (from midline), dorsoventral:  $-1.5$  (from dura). The incisor bar was at  $-3.3$  mm. Preliminary studies using Methylene Blue infusions (1  $\mu\text{L}$  of a 2% solution) showed that these coordinates enabled appropriate location of the infusion sites as well as diffusion of the dye in the dentate gyrus and CA1 (not illustrated). Each guide cannula was kept in place by acrylic dental cement tightly fixed to the skull by stainless steel screws. At the end of surgery, after the cement had dried, a stainless steel mandrel (0.28 mm in diameter) was placed into the guide cannula. After surgery, the rats were allowed to recover from the anesthesia under a warm lamp before being placed back (as soon as they were able to move) into their home cage.

**Intrahippocampal infusions.** Before the start of the experiment, the rats were habituated to being manipulated, as they would be for infusions, over three consecutive days (they were held on the experimenter's legs, the mandrels were removed and, about 60 s later, placed back into the guide cannula). For the experiment, the rats were gently restrained by hand, the mandrels were removed, and an infusion needle (external diameter 0.28 mm) was inserted into the guide cannula. The tip of each infusion needle protruded 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula into the hippocampal parenchyma. The other needle tip was connected to a 10  $\mu\text{L}$  Exmire syringe by polyethylene tubing. Using a microinjection pump (CMA/100), Lido hydrochloride (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0.5 and 1% in phosphate-buffered saline (PBS) (i.e. 5 and 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) or TTX citrate (Tocris Cookson Ltd., Avonmouth, UK), 0.0005% and 0.001% in PBS (i.e. 5 or 10 ng/ $\mu\text{L}$ ) was infused unilaterally at a rate of 1.0  $\mu\text{L}$  over 60 s (Zhuravin and Bures, 1991; Fenton and Bures, 1994; Bohbot et al., 1996; Cimadevilla et al., 2001; Klement et al., 2005). After infusion, the needle was left in place for another 60 s before it was slowly removed and the mandrels were placed back into the guide cannula. All experimental rats subjected to unilateral infusions of TTX or Lido were concomitantly infused with an equal volume of PBS on the contralateral side; control rats receiving a bilateral intrahippocampal infusion of PBS (1 mM).

**2DG autoradiography.** The day before the experiment, a femoral vein was catheterized with polyethylene tubing (Clay Ad-



ams, PE50) under ketamine/xylazine anesthesia (same doses as those used for guide cannula implantations). In order to have free access to the catheter without disturbing the rat's movements, the catheter was threaded under the skin, up to the back through a small opening in the skin. A loop was made with the end of the catheter and put into the animal's back, right under the skin. The animals were allowed to recover from surgery under a warm lamp. Subsequently, they were transferred to their home cage for 17–24 h before the experiment was started. Five or 30 min after the unilateral intrahippocampal infusion of PBS, 5 or 10  $\mu$ g Lido, or 5 or 10 ng TTX (either on the left or the right side), the [ $^{14}$ C]2DG (13.6 MBq/kg, specific activity 2.0 GBq/mmol, 53.0 mCi/mmol, NEN, Perkin Elmer, Life Sciences, Mechelen, BE) was injected to the rats as a single i.v. pulse. Thus, nine groups of five or six subjects were constituted: one with bilateral PBS injections (control), four with 5 or 10  $\mu$ g Lido infused either 5 or 30 min before the 2DG injection, and four with 5 or 10 ng TTX infused either 5 or 30 min before the 2DG injection. At least two rats of each Lido or TTX dose condition received the infusion in the left hippocampus, the other ones being infused in the right one. During the 45 min following the 2DG injection, freely-moving rats were placed in a circular open field (50 cm high, 90 cm in diameter), and every 10 min an object was added to (or displaced in) the open field to stimulate the rats' overall arousal and thus their cerebral metabolism (objects were pebbles and plastic bowls). Approximately 45 min after the 2DG injection, the rats were decapitated, right after an i.v. injection of pentobarbital (12 mg in 0.2 mL). Brains were rapidly removed, frozen and cut into 20- $\mu$ m coronal sections at  $-22^{\circ}\text{C}$  in a cryostat, from the most posterior part of the hippocampus to the posterior limit of the septal region. Some of the sections were collected and stained with Cresyl Violet for verification of infusion sites. Other sections were autoradiographed on Kodak Biomax MR-1 films along with [ $^{14}$ C]methyl methacrylate standards calibrated for their  $^{14}\text{C}$  concentrations in brain tissue. The autoradiographs were then analyzed with an image processing system (Biocom 500, Les Ulis, France) without knowledge of the treatment. Tissue  $^{14}\text{C}$  concentrations reflecting local cerebral 2DG uptake were determined from the optical densities of the autoradiograms and a calibration curve obtained from the calibrated standards. Densities were assessed in an anterior (close to infusion site, at about  $-3.5$  mm anterior to Bregma) and a posterior (distant from infusion site, at about Bregma  $-5.6$  mm) region of the dorsal hippocampus, as well as in regions surrounding the infusion site such as the overlying parietal cortex, the underlying laterodorsal thalamus, the dorsal lateral geniculate nucleus (at about Bregma  $-3.5$  mm). We also assessed 2DG uptake in the visual cortex, the ventral hippocampus and the entorhinal cortex (at about Bregma  $-5.6$  mm).

### Experiment 2: motor coordination

Strain, sex and age of the subjects ( $n=65$ ), surgeries for guide cannula implantations, and Lido or TTX infusion procedures, as well as doses used, were exactly the same as in experiment 1.

**Beam-walking test.** An evaluation of motor coordination was performed by placing each rat on a  $2\times 200$ -cm wooden beam elevated 80 cm above the floor and divided into four 50-cm segments. One extremity of the beam was connected to the home cage. A net was spread out 15 cm underneath the beam in order to catch the rats that fell from the beam. All rats were trained according to the protocol previously described by Galani et al. (2002). In the first session, the rats were placed on the beam 50 cm away from the home cage on five consecutive occasions. In the next session, the rats were placed 50, 100, 150 and 200 cm away from the home cage, successively, with one trial for each of the four distances. In the third session, the rats were placed twice 100 cm and then twice 200 cm away from the home cage. In the fourth session, the rats were placed 200 cm away on three con-

secutive runs. On the fifth day, all rats were tested on three consecutive trials in one session without prior infusion, but their scores were recorded. When they fell from the beam, the rats were gently placed back on the place where they had slipped, facing their home cage. Performance evaluation was as follows: for each 50-cm segment of the beam, the experimenter rated the locomotor behavior; a score of one per segment was given when the rat walked across the segment with all paws on the upper surface of the beam. Conversely, a score of 0 was given for each segment on which the rat slipped, placed its toes on the side surface of the beam or fell from the beam. The overall score on each day was calculated by adding the scores of the three runs (maximal score=12). After this training procedure, normal rats perform at almost asymptotic levels of performance (average score close to 8.5; crossing time is less than 5 s), though further testing may result in additional improvement, usually not exceeding one point in magnitude. For the following 5 days, all rats were first drug- or PBS-infused and subsequently tested on three consecutive trials as on the no-infusion testing day. Their performances were recorded on each day. Score rating was made by an experimenter who was unaware of the compound infused.

**Intrahippocampal infusions.** From test days 1–5, control rats were bilaterally infused with PBS, and tested for beam-walking 5 min ( $n=8$ ) or 30 min ( $n=5$ ) after infusion. The other groups (four to eight rats/group) were infused with either 5 or 10  $\mu$ g Lido, or 5 or 10 ng TTX, and tested either 5 or 30 min later. From test days 1–4, rats from the Lido and the TTX experimental groups received a unilateral infusion of Lido or TTX (alternatively into the left and right hippocampus, from day to day) and of PBS in the contralateral hippocampus. On test day 5, these rats received Lido or TTX bilaterally before being tested. Given the clarity of the results on this last infusion day (see Results hereafter) and the number of injections already made, it did not seem necessary to us to perform an additional testing day with another bilateral infusion. All rats were subsequently left for a 48 h recovery period. After this delay, they were subjected to an additional session of the beam-walking test 5 min after bilateral infusions of PBS. Due to a technical problem, rats from the groups that were tested 30 min after PBS infusions and those from the group tested 5 min after 5 ng TTX infusions were not re-tested at this 48 h delay.

### Experiment 3: retrieval in the water maze after Lido infusion

As the effects of Lido found in experiment 1 (2DG) were limited and there was no alteration of motor coordination after Lido infusions in experiment 2, even at the highest of both doses, we designed this third experiment to verify that the high dose of Lido was actually sufficient to block behavioral functions described as being hippocampal-dependent, such as short-term retrieval of spatial memories (e.g. Frankland and Bontempi, 2005). Strain, sex and age of the subjects ( $n=16$ , eight rats/group), surgeries for guide cannula implantations and infusion procedures were exactly the same as in experiments 1 and 2, except that only one dose of 10  $\mu$ g Lido (or PBS as control) was infused bilaterally at only one occasion, i.e. right before the probe trial. Given the motor coordination problems exhibited by the rats infused with TTX, this compound was not tested in the water maze.

**Water-maze test.** The water maze consisted of a circular pool (diameter 160 cm; height 60 cm) filled to half its height with water ( $21^{\circ}\text{C}$ ) made opaque by addition of powdered milk. The experimental room contained different extra-maze cues and the illumination was provided by a neon lamp placed 1.80 m above the center of the pool. Each rat was tested on six consecutive days according to a protocol using four consecutive trials per day. For each trial, the rat was released in the pool, facing the wall at a randomly designed starting point. A maximum of 60 s was given to

reach an invisible transparent circular platform (diameter 11 cm) submerged 1 cm underneath the water surface. The platform was always at the same location, on each trial and over all days. Once the rat had climbed onto the platform, it was left there for 10 s before being removed and gently placed at the next starting point. If the rat did not find the platform on time, it was placed on the platform for 10 s by the experimenter. Swim paths were recorded using a video camera connected to a video tracking system (Ethovision, Noldus, The Netherlands). The time needed for the rat to reach the platform (latency) as well as the distance swum during each trial were computed by the system and taken into account for the statistical analysis. Twenty-four hours after the last testing day, the platform was removed and all rats were given a probe trial for 60 s, during which the time spent in the different quadrants was recorded by the system. For the probe trial, the rats were released in the pool, facing the wall, at a starting point opposite to where the platform was located during acquisition. The probe trial was started about 5 min after infusion of Lido (10  $\mu$ g) or PBS. The variable taken into account was the retention index, which was calculated as the ratio of thrice the time spent in the target quadrant ( $T_{QT}$ ) divided by the sum of the time spent in each of the three other quadrants ( $T_{Q1}$ ,  $T_{Q2}$ ,  $T_{Q3}$ ). According to this formula  $[(3 \times T_{QT}) / (T_{Q1} + T_{Q2} + T_{Q3})]$ , values close to 1 account for absence of retention, as it corresponds to a random distribution of swim patterns.

### Histology

The rats from the beam-walking test and those from the water-maze test experiments were killed with an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, ip) and perfused transcardially with a 4% paraformaldehyde (PFA) solution. The brains were removed and post-fixed 2–4 h in 4% PFA and then cryoprotected with a 20% saccharose solution (in PBS) before being cut in a cryostat ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) in 30  $\mu\text{m}$  thick sections. These sections, together with those set apart from the 2DG autoradiography experiment, were stained with Cresyl Violet and used to check appropriate aspect and placement of the infusion sites.

### Statistical analysis

The 2DG data (experiment 1) were analyzed using an ANOVA (according to a Dose  $\times$  Delay  $\times$  Side design for each region of interest) and two-tailed Student's unpaired *t*-tests to compare the same side between drug-infused and PBS rats. The overall beam-walking scores (experiment 2) were analyzed as follows. For PBS rats, we used an ANOVA with one between-subject factor (Delay, two levels: 5 or 30 min after infusion) and one within-subject factor (Days, six levels: no infusion and then five PBS infusion days). For rats infused with Lido or TTX, the data were analyzed using an ANOVA with two between-subject factors (Dose, two levels: 5 and 10  $\mu$ g for Lido, or 5 and 10 ng for TTX; Delay, two levels: 5 and 30 min) and one within-subject factor (Side, four levels: no infusion, left infusion, right infusion, bilateral infusion). For beam-walking scores collected 48 h after the last drug infusion, i.e. when the rats were bilaterally infused with PBS, we used a one factor between-subject ANOVA (Group, eight levels). For the analysis of water-maze performances (experiment 3), we used an ANOVA for repeated measures (acquisition) or a two-tailed Student's unpaired *t*-test (probe trial). When appropriate, multiple comparisons were run using the Newman-Keuls multiple range test (Winer, 1971), with a significance level taken at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Experiment 1: metabolic study

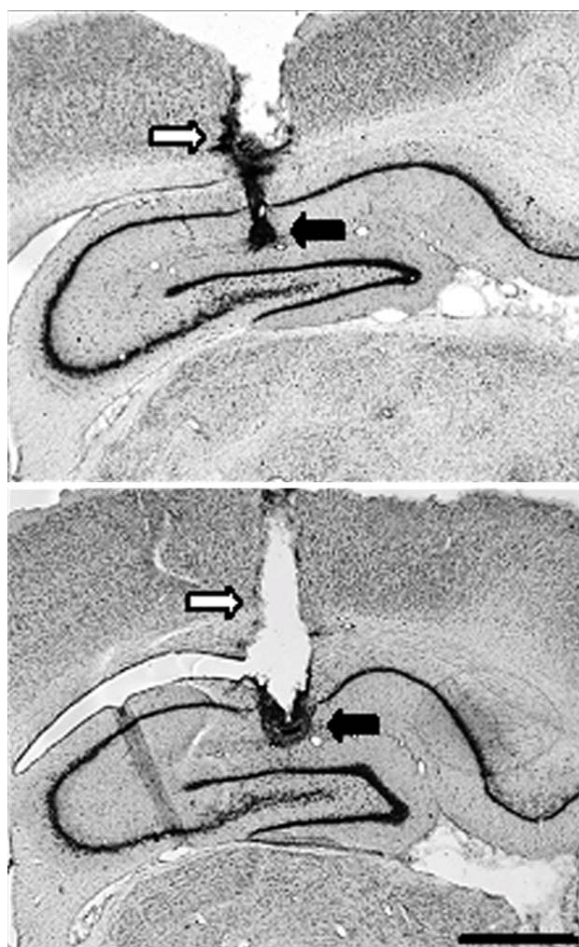
**General observations.** An intrahippocampal infusion of Lido at a dose of 5 or 10  $\mu$ g did not induce any overt

change in general behavior (e.g. locomotor activity, movement coordination) during the following 2 h. No sign of ataxia could be observed and there was no obvious hyperactivity as described after hippocampectomy (e.g. *Teitelbaum and Milner, 1963*). Conversely, 5 or 10 ng of TTX clearly altered the general behavioral capacities: less than 5 min post-infusion, most of the TTX-treated rats exhibited signs of ataxia, moving slowly, sometimes creeping, or showing some general difficulties in their displacements. All these behavioral signs lasted until kill and seemed more pronounced after the highest dose of TTX (10 ng). In addition, in some rats, right after infusion, stereotypies were noticed, and two of them manifested seizure-like behavior (wild running episodes, face twitches and forelimb movements). One of those died before the 2DG injection, after a severe wild running episode. These stereotypies only lasted for few minutes after infusion, after which the rats became ataxic, staying mostly immobile, though being able to move for the rest of the experiment. As suggested previously, such short-lasting seizure-like behavior might be, at least partly, due to the volume and rate of infusion of the drug (1  $\mu\text{L}$  over 1 min), previous studies having shown that this volume/rate can induce trauma (*Martin and Ghez, 1999*). In rats subjected to the same volume/rate of PBS or Lido infusions, however, seizure-like behavior was never observed.

**Intrahippocampal infusion sites.** A typical example of the overall aspect of the hippocampal tissue at the level of the infusion site in a Lido and a TTX rat is shown in *Fig. 1*. The overall aspect of the tissue surrounding the infusion site was not different between PBS, Lido and TTX rats. Almost all infusion sites were found to be localized in the anterior pole of the dorsal hippocampus, for most between  $-3.60$  and  $-4.16$  mm from Bregma (*Fig. 2*). Three rats were discarded from the statistical analyses because of inappropriate infusion sites.

**Metabolic data.** The exact quantification of local cerebral glucose utilization normally requires collection of several blood samples along the 45-min period of the 2DG experiment (*Sokoloff et al., 1977*). We considered that such an approach was not compatible with our open field free running conditions. Therefore, we used an alternative semi-quantitative approach, previously used by others (for a review, see *Duncan and Stumpf, 1991*). To help reduce variation in the intensity of the 2DG labeling unrelated to conditions of the experiment such as dose or delay, the absolute  $^{14}\text{C}$  value from each brain area of interest was divided by the radioactivity measured (nCi/g) in the genu of the corpus callosum of the same rat. Thus, this semi-quantitative evaluation is considered as a measure of relative metabolic activity for the selected structures (*Ackermann et al., 1984; Maxwell and Fink, 1988*). This ratio adjustment was used after we verified that there was no significant Group effect on the genu of the corpus callosum means. Absolute values in this structure in nCi/g were:  $109 \pm 5$  in PBS,  $119 \pm 6$  in Lido 5  $\mu\text{g}$ –5 min,  $107 \pm 8$  in Lido 10  $\mu\text{g}$ –5 min,  $101 \pm 9$  in Lido 5  $\mu\text{g}$ –30 min,  $112 \pm 9$  in Lido 10  $\mu\text{g}$ –30 min,  $115 \pm 9$  in TTX 5 ng–5 min,  $113 \pm 9$  in TTX





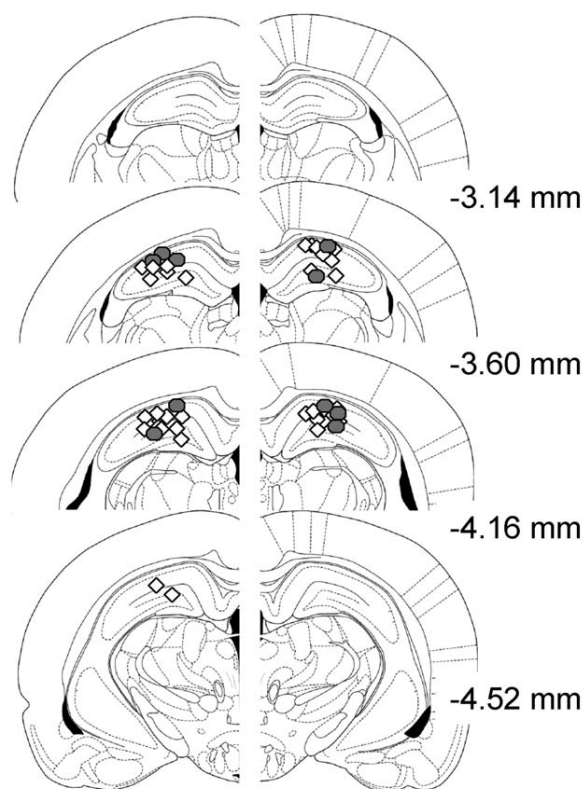
**Fig. 1.** Photograph of a typical section through the left hippocampus of a rat, which shows the intraparenchymal placement of (and the cortical damage associated with) the guide cannula fixed to the skull (white arrows). This guide cannula was used to perform infusions of PBS, Lido (top) or TTX (bottom) into the dorsal hippocampus. On some occasions, the needle track (white arrow) or the infusion site (black arrow) exhibited some gliosis. Scale bar=1 mm.

10 ng–5 min,  $118 \pm 5$  in TTX 5 ng–30 min, and  $129 \pm 8$  in TTX 10 ng–30 min rats. Analysis of variance showed no significant Group effect ( $F_{8,41}=1.8$ , ns).

**Lido effects.** The ANOVA of the relative 2DG glucose uptake values showed a significant overall Dose effect in the anterior part of the dorsal hippocampus and in the visual cortex ( $F_{1,19}=10.2$  and  $6.5$ , respectively,  $P<0.05$ ), a significant Delay effect in the thalamus ( $F_{1,19}=5.9$ ,  $P<0.05$ ) and the entorhinal cortex ( $F_{1,19}=5.4$ ,  $P<0.05$ ), a significant Side effect in the anterior part of the dorsal hippocampus ( $F_{1,19}=16.4$ ,  $P<0.001$ ), the parietal cortex ( $F_{1,19}=9.7$ ,  $P<0.01$ ), and the dorsal lateral geniculate nucleus ( $F_{1,19}=7.0$ ,  $P<0.05$ ). The Dose $\times$ Delay interaction was significant only in the anterior part of the dorsal hippocampus ( $F_{1,19}=5.9$ ,  $P<0.05$ ) and the entorhinal cortex ( $F_{1,19}=5.4$ ,  $P<0.05$ ). The Side $\times$ Dose interaction was significant in both the anterior ( $F_{1,19}=8.7$ ,  $P<0.01$ ) and the posterior part of the dorsal hippocampus ( $F_{1,19}=11.8$ ,

$P<0.001$ ), and in the thalamus ( $F_{1,19}=6.3$ ,  $P<0.05$ ). There was no significant effect of Dose, Delay or Side, or of any of the interactions in the ventral hippocampus. When significant, the Dose effect was due to a stronger effect at the high dose, the Delay effect to a slightly more pronounced effect at the 30 min delay, the Side effect to a reduction of 2DG uptake on the side infused with Lido. Finally, the Side $\times$ Dose interaction reflected a reduction that was significant on the infused side only at the high dose. The analyses were furthered by a series of *t*-tests, using an adjustment of the  $\alpha$  level.

**Comparison between PBS and Lido (side by side unpaired Student's *t*-test, Table 1, Figs. 3 and 4).** At both delays between the infusion and the 2DG injection (5 or 30 min), 5  $\mu$ g of Lido induced no significant 2DG uptake changes in the vicinity of the infusion site, i.e. the anterior part of the dorsal hippocampus. Likewise, no significant metabolic changes were found in any distant ipsi- or contralateral areas in the 5  $\mu$ g Lido group, as compared with the same side in PBS-infused rats, except for the ipsilateral



**Fig. 2.** Schematic representation of the infusion sites on coronal sections through the dorsal hippocampus of the rats used to assess the metabolic effects of unilateral infusions of Lido or TTX on 2DG uptake. Coordinates are in mm from Bregma according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1998). Each unilateral infusion site of TTX- or Lido-infused rats is represented by an open diamond, the center of which corresponds to the infusion needle tip. Bilateral infusion sites of PBS rats are represented as a grayish octagon. Infusion sites drawn on the left hippocampus correspond to rats that received the infusion of the drug into the left hippocampus, and those drawn on the right one correspond to rats that were infused into the right hippocampus.

**Table 1.** Effects of Lido and TTX on local cerebral 2DG uptake

	Groups	Side	ADHp	PDHp	VHp	LTh	DLG	PCx	VCx	ECx
PBS		Ipsi	187±5	211±16	172±3	345±11	403±16	306±13	315±20	169±7
		Contra	174±2	210±10	173±4	351±21	387±22	291±18	342±15	168±7
Lido										
5 min	Lido 5 µg	Ipsi	194±12	199±15	172±12	329±28	378±11	277±18	329±8	152±1
		Contra	187±6	184±7	171±5	355±20	383±16	268±10	328±7	152±4
	Lido 10 µg	Ipsi	151±4***	181±6	169±4	340±10	297±20**	255±16	294±18	147±2*
		Contra	164±4	187±9	172±7	306±9	320±23	265±11	285±11*	148±3
30 min	Lido 5 µg	Ipsi	174±9	192±13	169±9	301±18	322±18**	263±13	298±9	154±9
		Contra	162±4	186±10	166±8	298±15	318±25	266±18	303±19	150±4
	Lido 10 µg	Ipsi	159±6**	189±7	161±6	286±14	310±36	256±9*	261±9	151±2
		Contra	168±6	203±4	174±5	318±8	350±16	283±7	304±18	175±4
TTX										
5 min	TTX 5 ng	Ipsi	154±10*	177±15	158±2	308±32	78±8***	169±38**	271±29	158±4
		Contra	171±10	210±12	182±9	348±18	100±5***	275±21	368±17	166±4
	TTX 10 ng	Ipsi	132±10***	138±3**	129±11**	218±21***	43±5***	155±23***	153±18***	144±8
		Contra	166±6	179±17	146±7**	309±18*	77±6***	279±16	295±25	154±16
30 min	TTX 5 ng	Ipsi	149±7**	169±12	150±7*	221±25***	46±7***	165±18***	179±24**	157±5
		Contra	173±6	194±7	169±7	284±18**	72±7***	261±13	272±16**	153±6
	TTX 10 ng	Ipsi	107±6***	125±8**	150±7*	171±10***	28±1***	102±4***	105±4***	180±5
		Contra	147±7**	162±6**	199±3**	228±11***	60±5***	179±23**	208±17***	188±6

Values are means of radioactivity±SEM, expressed in % of nCi/g measured in the genu of the corpus callosum, with five–six rats/group. For abbreviations, see legend of Fig. 4, DLG, dorsal lateral geniculate nucleus.

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ , statistically significant differences from PBS (unpaired Student's *t*-test).

dorsal lateral geniculate nucleus with the 30 min delay ( $-20\%$ ,  $P < 0.01$ , Table 1, Fig. 3, upper part of Fig. 4).

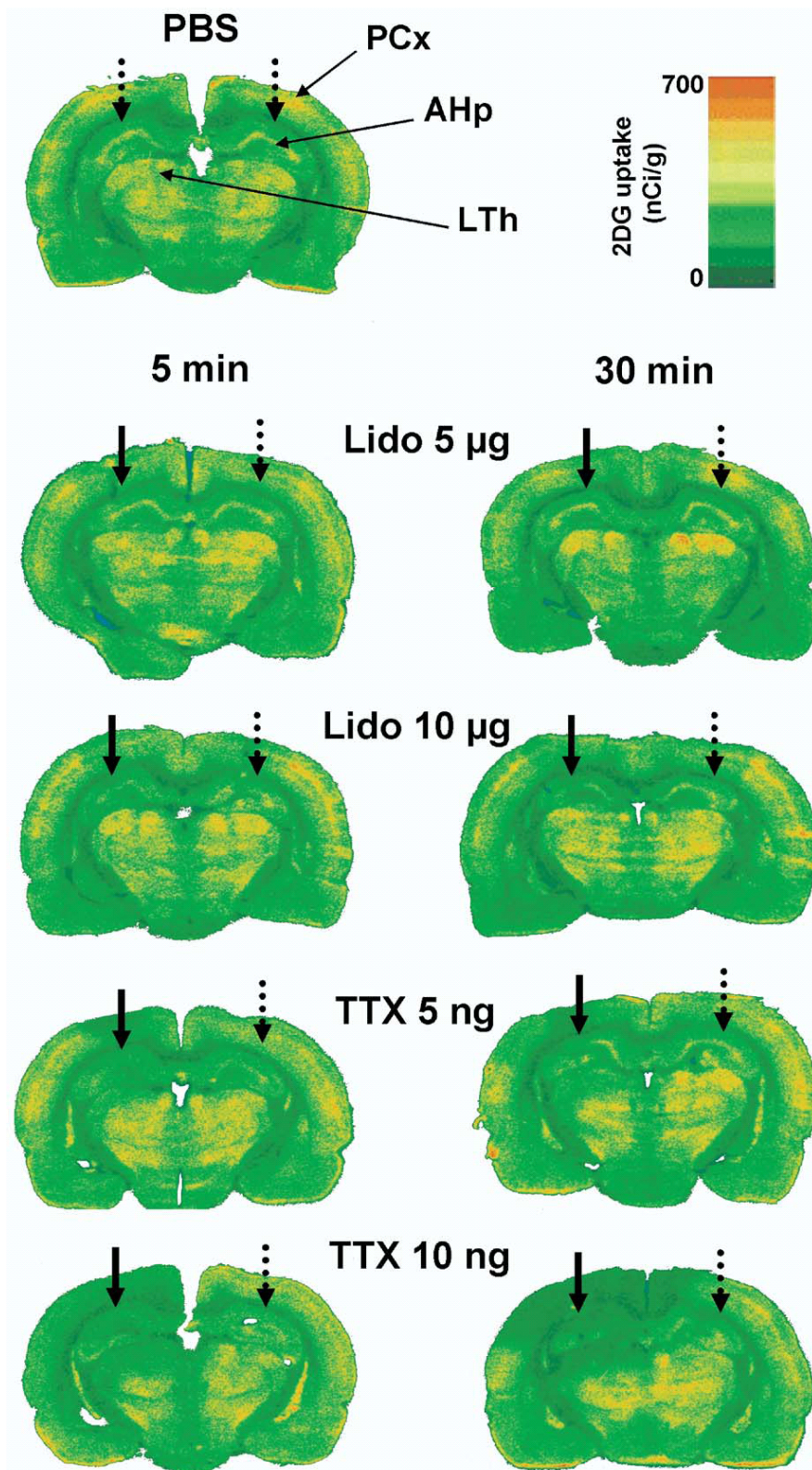
With the 10 µg dose, Lido infusion induced a significant ipsilateral 2DG uptake decrease in the vicinity of the infusion site, the anterior part of the dorsal hippocampus ( $-19\%$  and  $-15\%$ ,  $P < 0.001$  with the 5 min and 30 min delay, respectively), in the ipsilateral dorsal lateral geniculate nucleus ( $-26\%$ ,  $P < 0.01$ ) and in the entorhinal cortex ( $-13\%$ ,  $P < 0.05$ ) with the 5 min delay, and in the ipsilateral parietal cortex with the 30 min delay ( $-16\%$ ,  $P < 0.05$ ). Contralaterally, a decrease in 2DG uptake was only observed in the visual cortex at 5 min ( $-17\%$ ,  $P < 0.05$ ), as compared with the same side in PBS-infused rats (Table 1, Fig. 3, lower part of Fig. 4).

**TTX effects.** The ANOVA of the relative 2DG glucose uptake values showed a significant overall Dose effect in the anterior ( $F_{1,17} = 11.9$ ,  $P < 0.01$ ) and posterior ( $F_{1,17} = 19.9$ ,  $P < 0.001$ ) parts of the dorsal hippocampus, the visual cortex ( $F_{1,17} = 34.9$ ,  $P < 0.001$ ), the thalamus ( $F_{1,17} = 9.8$ ,  $P < 0.01$ ), and the dorsal lateral geniculate nucleus ( $F_{1,17} = 19.4$ ,  $P < 0.01$ ). There was also a significant Delay effect in the visual cortex ( $F_{1,17} = 33.1$ ,  $P < 0.01$ ), the thalamus ( $F_{1,17} = 13.8$ ,  $P < 0.01$ ), the parietal cortex ( $F_{1,17} = 5.2$ ,  $P < 0.05$ ), the entorhinal cortex ( $F_{1,17} = 9.4$ ,  $P < 0.01$ ), the ventral hippocampus ( $F_{1,17} = 4.5$ ,  $P < 0.05$ ), and the dorsal lateral geniculate nucleus ( $F_{1,17} = 20.2$ ,  $P < 0.001$ ). Finally, if one excepts the entorhinal cortex ( $F_{1,17} = 4.2$ ,  $P = 0.06$ ), a significant Side effect was observed in all structures (lowest *F* value found in the posterior part of the dorsal hippocampus:  $F_{1,17} = 25.4$ ,

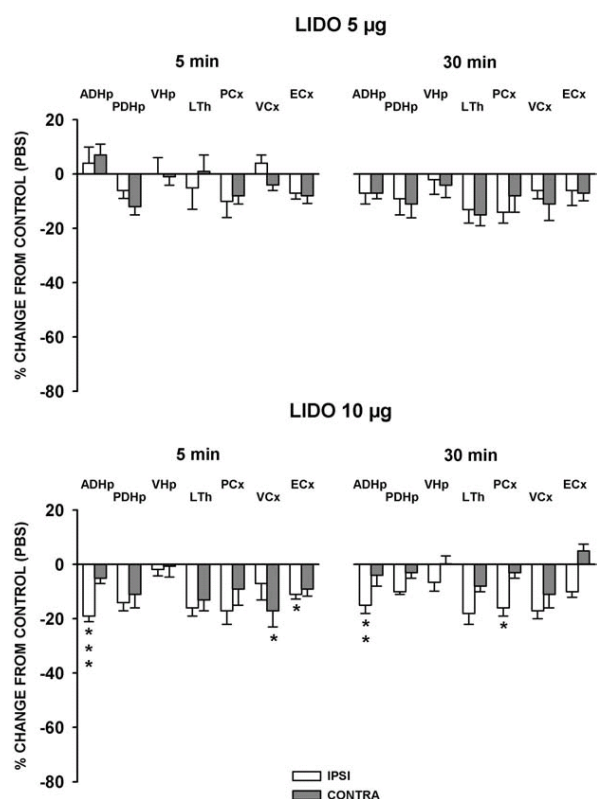
$P < 0.001$ ). None of the interactions was significant, except in the ventral hippocampus, where there was a significant Side×Dose×Delay interaction ( $F_{1,17} = 5.6$ ,  $P < 0.05$ ). This interaction was due to an increase of the 2DG uptake contralaterally to the infusion side at the high dose of TTX and only with the 30 min delay. When significant, the Dose effect was due to a stronger overall effect at the high dose, the Delay effect to a more pronounced overall effect with the 30 min delay, and the Side effect to a reduction of 2DG uptake on the side infused with TTX. As for Lido, the analyses were furthered by a series of *t*-tests, using an adjustment of the  $\alpha$  level.

**Comparison between PBS and TTX (unpaired Student's *t*-test, Table 1, Figs. 3 and 5).** With the 5 ng dose, TTX induced ipsilateral 2DG uptake decreases, restricted to the anterior part of the dorsal hippocampus ( $-18\%$ ,  $P < 0.05$ ), the parietal cortex ( $-45\%$ ,  $P < 0.01$ ) and the dorsal lateral geniculate nucleus ( $-81\%$ ,  $P < 0.001$ ), with the 5 min delay. With the 30 min delay between the infusion and the 2DG injection, 5 ng of TTX induced ipsilateral 2DG uptake decreases ( $-13$  to  $-89\%$ ) in six out of the eight areas; these were the anterior part of the dorsal hippocampus ( $-21\%$ ,  $P < 0.01$ ), the ventral hippocampus ( $-13\%$ ,  $P < 0.05$ ), the thalamus ( $-41\%$ ,  $P < 0.001$ ), the dorsal lateral geniculate nucleus ( $-89\%$ ,  $P < 0.001$ ) and the visual and parietal cortices ( $-43\%$ ,  $P < 0.01$  and  $-46\%$ ,  $P < 0.001$ , respectively) as compared with the same side in PBS-infused rats (Table 1, upper part of Fig. 5). Contralaterally, no changes were observed with the 5 min delay, except for the dorsal lateral geniculate nucleus





**Fig. 3.** Color-coded representative 2DG autoradiograms of coronal sections of rat brain taken at the level of the anterior part of the dorsal hippocampus and the parietal cortex (coordinates from Bregma  $-3.6$  mm according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1998)). Lido and TTX infusion sides are represented by a dark solid arrow. PBS infusion sides are represented by a dark stippled arrow. Thin arrows on the top section point to the regions in which 2DG uptake measurements were performed (AHp, anterior part of the dorsal hippocampus; LTh, laterodorsal thalamus; PCx, parietal cortex). Note the moderate decrease of 2DG labeling at the infusion site in  $10 \mu\text{g}$  Lido groups at both times. After TTX infusion, the decrease in 2DG labeling was more pronounced within the infusion site, but also occurred in adjacent structures (cortex and thalamus), especially when the delay between drug infusion and the 2DG injection was of 30 min; the metabolic decrease spread to the contralateral side in  $10 \text{ ng}$  TTX rats.



**Fig. 4.** Average ( $\pm$ S.E.M.) relative changes of 2DG uptake in various structures of the rat brain: ADHp, anterior part of the dorsal hippocampus; ECx, entorhinal cortex; LTh, laterodorsal thalamus; PCx, parietal cortex; PDHp, posterior part of the dorsal hippocampus; VCx, visual cortex; VHp, ventral hippocampus. 2DG was injected i.v. 5 (left) or 30 min (right) after unilateral intrahippocampal infusions of 5  $\mu$ g (top) or 10  $\mu$ g (bottom) Lido. For each rat, the relative variation was calculated as follows: respecting the brain side and the structure, each absolute 2DG uptake value (nCi/g) was expressed as a percent change from the absolute 2DG uptake value found in rats infused with PBS. Thus, a negative variation corresponds to a decrease of 2DG uptake. Significant differences from PBS are as follows: \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$ .

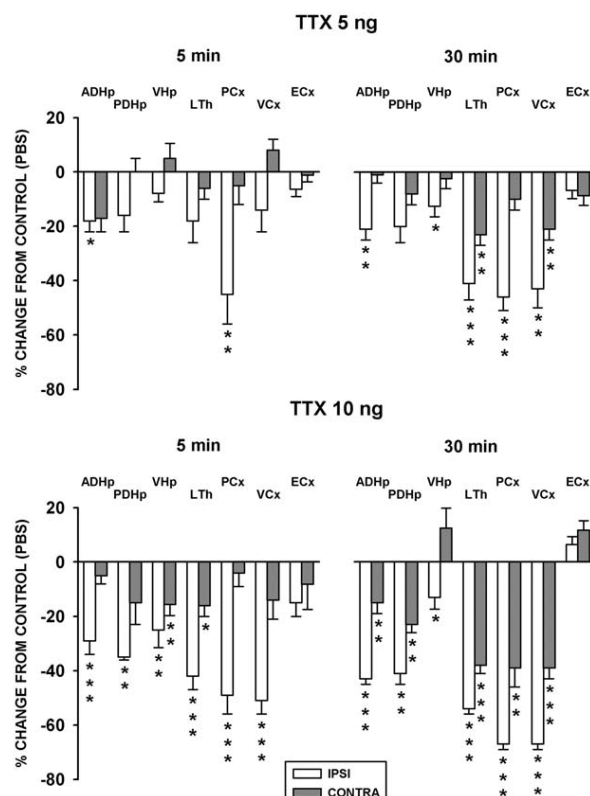
(–74%,  $P<0.001$ ). With the 30 min delay, 2DG uptake rates were significantly lower by 21% and 23% ( $P<0.01$ ) in the visual cortex and thalamus of TTX 5 ng-treated rats, respectively, and by 81% ( $P<0.001$ ) in the dorsal lateral geniculate nucleus, as compared with PBS-infused rats (Table 1, Fig. 3, upper part of Fig. 5).

At the 10 ng dose and with both delays, TTX induced a significant 13–93% 2DG uptake decrease in seven out of the eight ipsilateral structures studied, i.e. the anterior part of the dorsal hippocampus (–29%,  $P<0.001$  at 5 min, –43%,  $P<0.001$  at 30 min), the posterior part of the dorsal hippocampus (–35%,  $P<0.01$  at 5 min, –41%,  $P<0.001$  at 30 min), the ventral hippocampus (–25%,  $P<0.01$  at 5 min, –13%,  $P<0.05$  at 30 min), the thalamus (–42% at 5 min, –54% at 30 min,  $P<0.001$ ), the parietal cortex (–49%, at 5 min, –67%, at 30 min,  $P<0.001$ ), the visual cortex (–51% at 5 min, –67% at 30 min,  $P<0.001$ ), and the dorsal lateral geniculate nucleus (–89%,  $P<0.001$  at 5 min, –93%,  $P<0.01$  at 30 min), as compared with the

same side in PBS rats (Table 1, lower part of Fig. 5). Contralaterally, in TTX 10 ng-infused rats, 2DG uptake was decreased with the 5 min delay in the ventral hippocampus (–16%,  $P<0.01$ ), the thalamus (–16%,  $P<0.01$ ) and the dorsal lateral geniculate nucleus (–80%,  $P<0.001$ ). With the 30 min delay, however, all contralateral areas showed 2DG uptake decreases, except the entorhinal cortex and the ventral hippocampus, as compared with PBS-infused rats. The changes ranged from –15 to –85% and were most pronounced in the dorsal lateral geniculate nucleus (–85%,  $P<0.001$ ), in both the visual and parietal cortex (–39%,  $P<0.001$ ) and in the thalamus (–38%,  $P<0.001$ ). In the dorsal hippocampus, contralateral 2DG uptake was decreased by –15% in the anterior part ( $P<0.001$ ) and by –23% in the posterior part ( $P<0.001$ ) as compared with PBS-infused rats (Table 1, Fig. 3, lower part of Fig. 5).

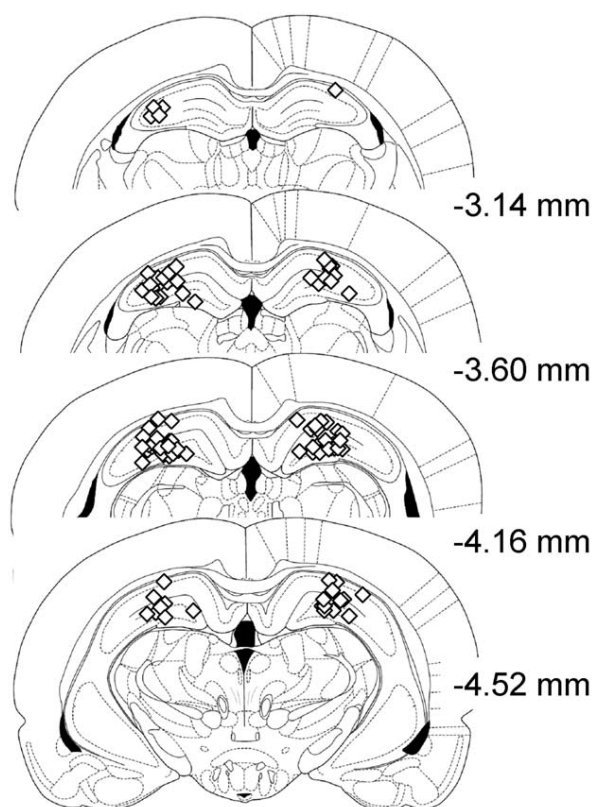
### Experiment 2: beam-walking performance

**Intrahippocampal infusion sites.** The infusion sites were examined as in experiment 1 and are shown in Fig. 6. All infusion sites were found to be localized in the anterior pole of the dorsal hippocampus, most often between –3.60 and –4.16 mm from Bregma, as was the case in the



**Fig. 5.** Average ( $\pm$ S.E.M.) relative changes of 2DG uptake in various structures of the rat brain after TTX infusions. Abbreviations are as in Fig. 4. 2DG was injected i.v. 5 (left) or 30 min (right) after unilateral intrahippocampal infusions of 5 ng (top) or 10 ng (bottom) TTX. All rats were killed 45 min after the 2DG injection. For each rat, the relative variation was calculated as explained in Fig. 4. Significant differences from PBS are as follows: \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$ .





**Fig. 6.** Schematic representation of the infusion sites on coronal sections through the dorsal hippocampus of the rats tested for beam-walking performance. Coordinates are in mm from Bregma according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1998). Each infusion site is represented by an open diamond, the center of which corresponds to the microinfusion needle tip.

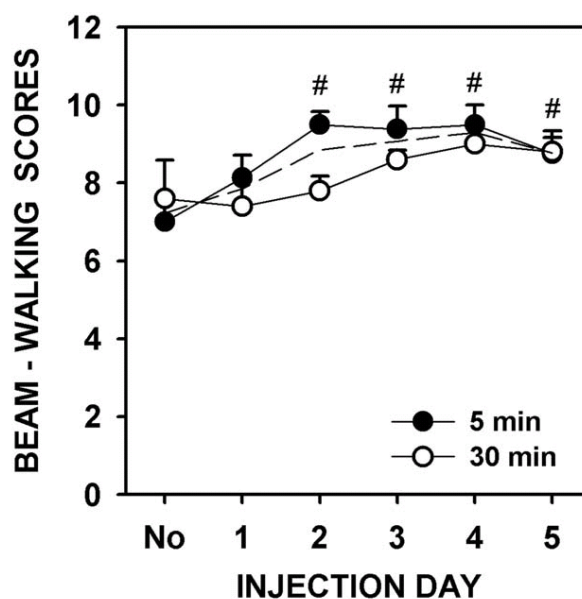
metabolic study (experiment 1). Eight rats were discarded from the statistical analyses because of inappropriate infusion sites.

**PBS infusions and beam-walking performance.** The data are shown in Fig. 7. On the first day (when there was no PBS infusion), performance reached an average score slightly below 8, which further improved over the subsequent days. The ANOVA of the beam-walking scores showed a significant overall Day effect ( $F_{5,55}=4.4$ ,  $P<0.01$ ), but neither a significant Delay effect ( $F_{1,11}=1.2$ , ns), nor a significant Delay $\times$ Day interaction ( $F_{5,55}=1.2$ , ns). The Day effect was due to overall scores being significantly better on PBS days 2, 3, 4 and 5, than on the day of testing without any prior PBS infusion.

**Lido infusions and beam-walking performance.** The ANOVA of the beam-walking scores recorded 5 min after infusions (Fig. 8, top left), which were distinguished according to whether or not there was a Lido infusion and whether this infusion was made on the left, the right or on both sides, showed no significant effects of the Dose ( $F_{1,10}<1.0$ , ns), the Side ( $F_{3,30}<1.0$ , ns) or the Dose $\times$ Side interaction ( $F_{3,30}<1.0$ , ns). The ANOVA of the beam-walking scores recorded 30 min after the infusion (Fig. 8, top right) showed no significant Dose effect ( $F_{1,11}<1.0$ , ns),

but there was a significant Side effect ( $F_{3,33}=6.3$ ,  $P<0.01$ ), due to overall scores that were significantly better when the rats were infused bilaterally, as compared with each of the three other conditions ( $P<0.01$ ). The Dose $\times$ Side interaction was not significant ( $F_{3,33}<1.0$ , ns).

**TTX infusions and beam-walking performance.** The ANOVA of the beam-walking scores recorded 5 min after infusions (Fig. 8, bottom left), and which were also distinguished according to whether or not TTX was infused and whether it was infused on the left, the right or on both sides, showed no significant effect of the Dose ( $F_{1,8}<1.0$ , ns), but there was a significant effect of the Side ( $F_{3,24}=5.5$ ,  $P<0.01$ ). This Side effect was due to scores that were significantly reduced when the infusion was made bilaterally ( $P<0.01$ ) or in the right hippocampus ( $P<0.05$ ), as compared with the No infusion scores. When infused in the left hippocampus, TTX tended to impair motor coordination performance ( $P=0.07$ ). The Dose $\times$ Side interaction was not significant ( $F_{3,24}<1.0$ , ns). The ANOVA of the beam-walking scores recorded 30 min after the infusions of TTX (Fig. 8, bottom right) revealed no significant Dose effect ( $F_{1,7}<1.0$ , ns), but there was a significant Side effect ( $F_{3,21}=20.5$ ,  $P<0.001$ ). This effect was due to overall scores that were significantly reduced when the rats were infused in the right ( $P<0.001$ ) or the left hippocampus ( $P<0.001$ ), or bilaterally ( $P<0.001$ ), as compared with the No infusion condition. The Dose $\times$ Side interaction was not significant ( $F_{3,33}<1.0$ , ns).



**Fig. 7.** Average (+S.E.M.) beam-walking scores in PBS groups over six consecutive test days in previously trained rats. On the first day, rats were handled just as they would be for intrahippocampal infusions of PBS, but were not infused (No). On that specific day, rats from one group were tested 5 min while those from the other group were tested 30 min after handling. On each of the other 5 days (1–5), all rats were tested 5 or 30 min after a bilateral intrahippocampal infusion of 1  $\mu$ L PBS. # Significantly different from the “No” day (5 and 30 min merged; no PBS),  $P<0.05$ . The dashed line indicates the average performance in both groups merged.

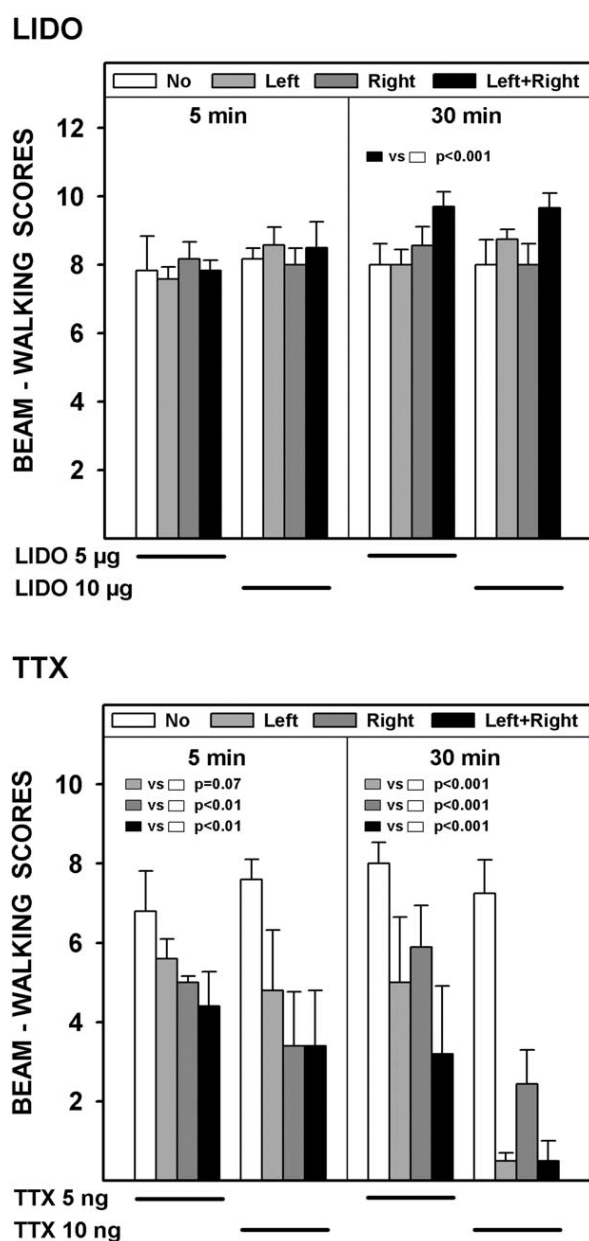


Fig. 8. Average (+S.E.M.) beam-walking scores in Lido (top) and TTX (bottom) groups, under various experimental conditions. Testing was performed over six consecutive days in previously trained rats. On the first day, rats were handled just as they would be for the subsequent intrahippocampal infusions, but were not infused (No, white bar). On that specific day, the rats were tested 5 min (left panel) or 30 min (right panel) after handling. On each of the other 5 days, all rats were tested 5 or 30 min after an intrahippocampal infusion of 5 or 10 µg Lido (top) or 5 or 10 ng TTX (bottom). For each dose, each rat was infused in the left (light gray bar; mean value of two sessions), the right (dark gray bar; mean value of two sessions) or in both hippocampi (black bar; single session). When an infusion of Lido or TTX was made on only one side (1 µL), PBS (1 µL) was infused on the other one at the same time. The significance level in the insert refers to an inter-side comparison merged over both doses (notice that there was no Side×Dose interaction). The improvement found in rats with bilateral infusions of Lido (30 min delay) most probably reflected a training effect as this was the last condition to be tested in the Lido groups.

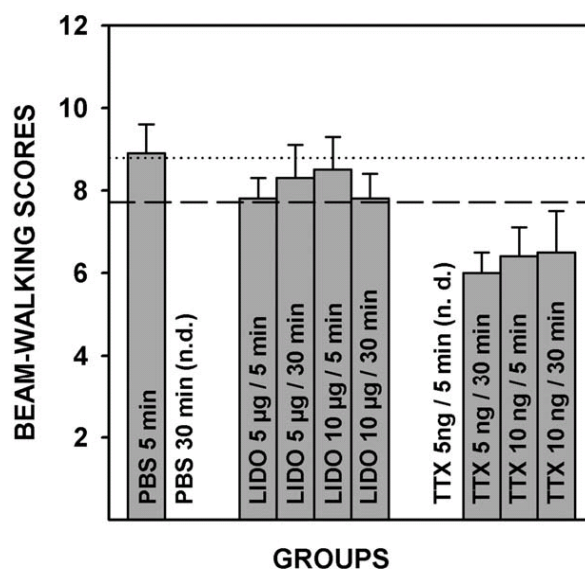


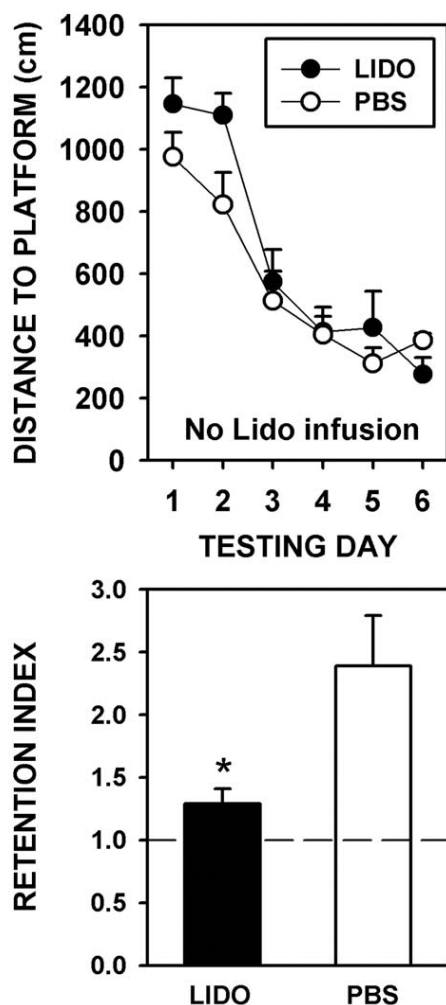
Fig. 9. Average (+S.E.M.) beam-walking scores recorded during a single bilateral PBS-infusion session in the rats that had been tested after uni- or bilateral infusions of PBS (PBS 5 min, corresponding to the 5 min group shown in Fig. 7), of Lido and tested 5 or 30 min after the infusion (LIDO 5 µg/5 min; LIDO 5 µg/30 min; LIDO 10 µg/5 min; LIDO 10 µg/30 min, corresponding to the groups shown in Fig. 8, top), or of TTX and tested 5 or 30 min after the infusion (TTX 5 ng/30 min; TTX 10 ng/5 min; TTX 10 ng/30 min, corresponding to the groups shown in Fig. 8, bottom). Note that, due to a technical problem, rats tested 30 min after PBS infusions (30 min group in Fig. 7) and rats tested 5 min after 5 ng TTX infusions were not retested (n.d.) at the 48-h delay. Rats previously tested after TTX infusions showed weaker performances but the overall ANOVA failed to show a significant Group effect. The dotted line corresponds to the average scores on the last testing day (day 5 in Fig. 7) of all rats that had been repeatedly tested after PBS infusions, while the dashed one corresponds to the mean pre-inactivation test scores (day No in Figs. 7 and 8) of all rats (PBS, LIDO and TTX, merged).

*Last bilateral PBS infusion test, 48 h after the bilateral drug infusion test.* The data are shown in Fig. 9. The ANOVA (single Group factor, eight levels) showed no significant Group effect ( $F_{7,39}=1.8$ ,  $P=0.12$ ).

### Experiment 3: retrieval in the water maze after Lido infusion

Acquisition trials were run without prior Lido infusions. In fact, Lido was bilaterally infused on only one occasion, i.e. before the probe trial. Locations of the infusion sites were comparable to those described in Fig. 6 (not illustrated). The behavioral data are presented in Fig. 10. The ANOVA of the acquisition scores (distances; the ANOVA of latencies lead to identical conclusions) showed no significant Group effect ( $F_{1,14}=1.7$ ,  $P=0.21$ ) and no significant Group×Day interaction ( $F_{5,70}=1.8$ ,  $P=0.12$ ), but there was a significant Day effect ( $F_{5,70}=39.9$ ,  $P<0.001$ ). The Day effect reflected learning, accounted for by overall performances that were significantly better on each of days 3–6 in comparison with day 1 or 2 ( $P<0.001$  in all cases), as well as on days 5 and 6 in comparison with day 3 ( $P<0.05$ ). We also found that the retention index was significantly reduced in rats subjected to bilateral infusions





**Fig. 10.** Average (+S.E.M.) distances to reach the platform in the water-maze test during acquisition of a constant platform location (top). The rats, which were given four consecutive trials on each day with different release positions for each trial, were not subjected to prior Lido infusions. The Lido and PBS groups refer to the treatments the rats received right before the probe trial, which was given 24 h after the last acquisition day. Probe-trial performance is shown in the bottom figure as an average (+S.E.M.) retention index (see Experimental Procedures). The long dashed lines indicate random performance. \* Significantly different from PBS,  $P < 0.05$ .

of Lido as compared with their PBS-treated counterparts ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

### Metabolic study

Our metabolic data demonstrate that 10  $\mu\text{g}$  Lido induced a 15–20% functional inhibition localized around the infusion site, with effects mainly restricted to the anterior part of the dorsal hippocampus; 5  $\mu\text{g}$  Lido induced no detectable change in cerebral functional activity. Conversely, at both doses, TTX showed more pronounced reductions of 2DG uptake, spreading to ipsilateral and contralateral brain areas.

Rates of glucose utilization predominantly reflect nerve terminal activity (Nudo and Masterton, 1986; Sharp et al., 1988; Kurumaji et al., 1993). Therefore, the 2DG technique is an excellent tool for assessing cerebral functional activity, particularly in hippocampal circuitry, in intact or lesioned rats (Sokoloff, 1981; Wree et al., 1988). Data concerning the functional consequences of either Lido or TTX on brain glucose metabolism after intrahippocampal infusion have not been published so far. Data on metabolic effects of intracortical infusion of Lido, however, showed effects extending beyond the region of drug diffusion, but the dose was of 40  $\mu\text{g}$  and the technique assessing metabolic activity used  $^{14}\text{C}$ -glucose as the tracer (Martin, 1991).

In the present study, the limited metabolic decrease restricted to the infusion site after Lido exposure confirms the relatively small diffusion of the drug. This diffusion was previously shown to be less than 1.5 mm for concentrations ranging from 10 to 40  $\mu\text{g}$  in a volume of 1  $\mu\text{L}$ , in both cortical and subcortical tissue (Sandkuhler et al., 1987; Martin, 1991; Malpeli 1999; Boehnke and Rasmusson, 2001; Daumas et al., 2005). Furthermore, the magnitude of functional inactivation reported in the present study after 10  $\mu\text{g}$  of Lido (about 20%) was comparable to that reported by Riedel et al. (1999) with a selective antagonist of AMPA/kainate receptors, or by Crane et al. (1978) with pentobarbital. This level of inactivation also appeared sufficient to impair encoding and retrieval of spatial memory, as well as trace consolidation or long term storage (Riedel et al., 1999). However, in the present study, we have to consider that the degree of inhibition observed in the Lido group might be under-evaluated because of the time-course of the drug effects—the maximal inactivation being achieved between 10 and 20 min post-infusion (Martin, 1991; Fenton and Bures, 1994; Tehovnik and Sommer, 1997; Malpeli 1999)—and because of the 2DG experiment timing, i.e. 45 min from the 2DG injection to euthanasia. However, Sokoloff et al. (1977) showed that most of the final glucose utilization rates mainly reflect the cerebral metabolism occurring during the first 15–20 min after the radioactive tracer injection, a period which completely covered the inactivation period of the drug in our 5-min delay condition, though more partially in the 30 min one. To circumvent this, the use of [ $^{14}\text{C}$ ]glucose kinetics uptake might be a better indicator of the metabolic effects of fast-acting inactivators (Martin and Ghez, 1999).

The large and widespread metabolic consequences of TTX infusion in the present study appear discordant with the spatial spread of the drug, previously shown to affect a spherical region of about 1.5–2.0 mm in diameter at either 5 or 10 ng (in 1  $\mu\text{L}$ ) (Zhuravin and Bures, 1991; Cimadevilla et al., 2001; Klement et al., 2005). Klement et al. (2005) showed that spontaneous and evoked potentials which are observed 0.5–2 mm away from the infusion site can be blocked almost simultaneously over this 2 mm distance by TTX infusion. Silenced spontaneous extracellular action potentials was also observed in the ventral hippocampus, thus more than 5 mm away from the infusion site (Olypher et al., 2006), as shown by Boehnke and Rasmusson

(2001) within the cerebral cortex. In the present study, significant decreases in 2DG uptake were observed in the ventral hippocampus at the high dose with a 5-min delay between the infusion and the 2DG injection, and at both doses with the 30-min delay.

In the present study, the reduced metabolic activity observed in the parietal cortex might well arise from direct inhibition of TTX diffusing from the infusion site to surrounding regions, a consequence of backflow along the needle track, as previously shown with muscimol (Corcoran et al., 2005). However, because of the densely packed alvear, fimbrial and callosal fiber bundles surrounding the hippocampal surface, which might prevent or limit diffusion out of the hippocampus (Morris et al., 1989), the metabolic consequences observed within the adjacent thalamus, after TTX, might be rather linked to indirect effects involving hippocampo-thalamic connections (Swanson and Cowan, 1977; Shibata, 1992). This possibility is in line with the report of Corcoran et al. (2005), who showed no diffusion toward the thalamus after intrahippocampal infusion of [<sup>3</sup>H] muscimol. Furthermore, decreased functional activity within the visual cortex of TTX-treated rats might be linked to the reduced activity in the dorsal lateral geniculate nucleus (Ribak and Peters, 1975; Sanderson et al., 1991) or the lateral thalamus (Takahashi, 1985). Finally, the reduction of the contralateral hippocampal functional activity after a unilateral hippocampal TTX infusion might be a result of decreased activity of the commissural connections between both hippocampi. Electrophysiological evidence supports the concept of feedforward inhibition between both hippocampi (Buzsaki and Czeh, 1981; Buzsaki and Eidelberg, 1981; Douglas et al., 1983; Van Praag et al., 1997). Furthermore, Martin and Ghez (1999) showed that after unilateral intracortical muscimol infusion, there was a hypometabolism in the contralateral cortex receiving callosal projections. Finally, we cannot exclude an effect of TTX on fibers passing through the hippocampus, also compromising function in the ventral hippocampus (Cimadevilla et al., 2000, 2001; Olypher et al., 2006).

Finally, TTX metabolic effects were more pronounced when the delay between the infusion and the 2DG injection was of 30 min. This is consistent with the slower time course of TTX action as compared with that of Lido (Zhuravin and Bures, 1991). Because of its high efficiency on the sodium channel and its extremely long "residency time," TTX binding to the sodium channel produces much stronger and longer-lasting effects than Lido does (Hille, 1977). While Lido may offer some advantages as compared with TTX, the question of other, perhaps even more appropriate agents is still open. For instance, muscimol is a commonly used GABA agonist inducing rapid hyperpolarization. Its effects are maximal within 10–20 min following infusion, and achieve a radius of 1.5–2 mm, as shown for Lido. Muscimol, however, persists longer in the tissue (up to 2 h compared with 1 h with Lido; Martin and Ghez, 1999), like Lido has limited effects outside the infusion site (Corcoran et al., 2005), and does not block the fibers en passage.

### Sensory-motor evaluation

The disruption of motor processes may bias performance relying upon a motor response (e.g. press a lever, visit a maze, swim to a platform. . .). Although extensively used to investigate memory processes, the motor consequences of intrahippocampal infusions of various drugs, including Lido or TTX, have been little evaluated on a quantitative basis, and, to our knowledge, never compared directly. It is noteworthy, however, that Klement et al. (2005) and Weierska et al. (2005) observed no persistent signs of ataxia after intrahippocampal TTX infusions (5 ng in 1  $\mu$ L). In the present study, we found an alteration of motor functions in the beam-walking test, the deficits being especially severe after 10 ng of TTX at 30 min post-infusion, but already present at 5 min post-infusion. On the contrary, regardless of the dose, Lido had no overt motor consequences at 5 or 30 min post-infusion.

While the hippocampus makes unique contributions to memory, it has also been associated with locomotor activity and the control of motor responses, in which the ventral part of the hippocampus may take a predominant role (for a review see Bast and Feldon, 2003). To support this, TTX infusion (5 or 10 ng/ $\mu$ L) within the ventral hippocampus has been shown to induce marked decreases of locomotor activity for about 30 min post-infusion, which covers both delays used in the present study: this hypoactivity is most probably due to a decrease in dopaminergic transmission within the accumbens nucleus (Bast et al., 2001). Thus, in the present study, the TTX-induced decrease in functional activity within the hippocampus might well have participated in the alterations of performances recorded in the beam-walking test. The more severe motor deficits observed after 10 ng (vs. 5 ng) of TTX were in accordance with a greater reduction in hippocampal metabolic activity at this dose, particularly within the ventral hippocampus (–33 to –41%).

The motor alterations observed in TTX-infused rats might also be linked to the metabolic changes observed in the thalamus. Indeed, the thalamus showed marked 2DG uptake decreases in all groups of TTX-infused rats, except in the 5 ng TTX group at the 5 min delay. This structure has extensive connections with visual cortical areas (Van Groen and Wyss, 1992) and parts of the hippocampal formation, providing a pathway by which sensory activity might gain access to the limbic system (Takahashi, 1985; Thompson and Robertson, 1987). Finally, it cannot be excluded that the decrease in cerebral glucose metabolism observed in parietal and visual cortices, also played some role in the alterations of motor coordination after TTX infusion. The fact that, when rats were re-tested 48 h after the last infusion of the drug, all TTX rats had recovered performances close to the pre-testing levels in the beam-walking test suggests that most of the aforementioned drug-induced effects were mainly attributable to a slowly reversible action of the drug, rather than, for example, to a lasting effect cumulated over days or to lesions/gliosis that might develop around the infusion sites. Although the reduction was not significant, there were slightly weaker



re-testing performances in rats previously infused with TTX as compared with the other groups. To which extent this reduction may be assigned to less efficient effects of testing repetition because of renewed hippocampal inactivation (at least on one side) remains to be addressed experimentally, perhaps using a between-subject design. This issue appears all the more interesting because, on the last testing day (30 min delay only), rats bilaterally injected with Lido performed slightly better than on the previous days (no or unilateral infusion), suggesting that repeated inactivation of the hippocampus and/or of some parts of surrounding structures by TTX may be sufficient to interfere with some benefits of sensory-motor experience.

The sensory-motor effects of TTX stand in contrast with some previous studies in which this drug was used without persistent side effects on motor behavior (Klement et al., 2005; Wesierska et al., 2005). On first analysis, part of this discrepancy might be accounted for by differences in the delay between drug injection and testing (5 or 30 min in the present study against 45–60 min, and up to 6 h; e.g. Ambrogio Lorenzini et al., 1997; Cimadevilla et al., 2000; Klement et al., 2005). However, as TTX maximal effects were shown to last for about 90 min before beginning to decay (Zhuravin and Bures, 1991), this explanation does not appear convincing. Another possibility would be that among all previous studies based on infusions of TTX in the hippocampus, none, in fact, has directly addressed a potential alteration of motor coordination by using a specific test. As cortical damage was shown to alter beam-walking performance (e.g. Hofferer and Cassel, 1996), it is also possible that the TTX-induced deficit reflected unspecific interactions of TTX with cortical tissue overlying the hippocampus and that, in earlier studies, the cortical impact of TTX may have been more limited than herein. A final possibility may be related to the volume and infusion rate of the drug which, when excessive, might cause transient seizure-like behavior. While this explanation might apply to our rats tested 5 min after TTX infusion, it is perhaps less compatible with our observations in those tested at the 30-min delay. In addition, other studies, which did not report persistent motor side effects, used the same drug infusion parameters as herein (Zhuravin and Bures, 1991; Fenton and Bures, 1994; Bohbot et al., 1996; Cimadevilla, 2001; Klement et al., 2005). In any case, it is difficult to propose a more direct comparison between our present data and earlier issues, especially because earlier reports on hippocampal inactivation did not assess the extent of TTX effects, whether on the basis of metabolic activity or on that of precise quantification of sensorimotor capabilities. Further experiments seem required to understand the substrates of this surprising, though robust finding, and to better distinguish between spreading of effects due to drug diffusion and those accounted for by functional “diffusion” within interconnected neuronal systems.

## CONCLUSION

In conclusion, intrahippocampal infusion of Lido at the dose of 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  appears well-suited when short-lasting

reversible inactivation is needed to investigate functional dynamics of hippocampal-dependent memory processes. Indeed, a blockade mainly confined to the area of interest, together with an absence of motor consequences make it possible for Lido to offer some advantages over TTX, at least at the doses often reported in the literature. This possibility is strengthened by our water maze data, which clearly demonstrated that the dose of 10  $\mu\text{g}$  Lido was sufficient to block retrieval of a previously learned platform location. Based on our metabolic and sensory-motor data, it is nevertheless possible that TTX inactivation could also work for such approaches, but a dose of 5 ng or less might be more appropriate. For TTX, the delay between infusion and behavioral measures should perhaps remain either short or substantially longer than in the present study, as previous studies using long delays did not comment on persistent motor effects or failed to observe such effects. Finally, the interpretation of experimental data obtained with TTX should perhaps not ignore the possibility or risk of a lack of neuroanatomical selectivity.

*Acknowledgments*—We gratefully acknowledge Dr. Astrid Nehlig for providing the facilities necessary for running the metabolic study, Ms. Noémie Becker and Mr. Alexis Lafont for their technical investment in the behavioral approach of this experiment, as well as Olivier Bildstein, Okwando Egesi and George Edomwonyi for animal care. The authors would also like to wholeheartedly thank Dr. Monique Majchrzak and Prof. Bruno Will for their constructive comments on the manuscript. Grant sponsors: F. Hoffmann-La Roche Ltd (Switzerland), CNRS-ULP (FRE 2855; France).

## REFERENCES

- Ackermann RF, Finch DM, Babb TL, Engel J Jr (1984) Increased glucose metabolism during long-duration recurrent inhibition of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 4:251–264.
- Ambrogio Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G (1997) Analysis of mnemonic processing by means of totally reversible neural inactivations. *Brain Res Brain Res Protoc* 1:391–398.
- Ambrogio Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni G (1999) Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* 71:1–18.
- Bast T, Zhang WN, Feldon J (2001) The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA<sub>A</sub> agonist muscimol. *Exp Brain Res* 139:39–52.
- Bast T, Feldon J (2003) Hippocampal modulation of motor processes. *Prog Neurobiol* 70:319–345.
- Boehnke SE, Rasmusson DD (2001) Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 105:133–141.
- Bohbot V, Otahal P, Liu Z, Nadel L, Bures J (1996) Electroconvulsive shock and lidocaine reveal rapid consolidation of spatial working memory in the water maze. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4016–4019.
- Bures J, Buresova O (1990) Reversible lesions allow reinterpretation of system level studies of brain mechanisms of behaviour. *Concepts Neurosci* 1:69–89.
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002) The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35:625–641.
- Buzsaki G, Czéh G (1981) Commissural and perforant path interactions in the rat hippocampus. Field potentials and unitary activity. *Exp Brain Res* 43:429–438.

- Buzsaki G, Eidelberg E (1981) Commissural projection to the dentate gyrus of the rat: evidence for feed-forward inhibition. *Brain Res* 230:346–350.
- Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B (1997) The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: a review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51:663–716.
- Cimadevilla JM, Fenton AA, Bures J (2000) Functional inactivation of dorsal hippocampus impairs active place avoidance in rats. *Neurosci Lett* 285:53–56.
- Cimadevilla JM, Wesierska M, Fenton AA, Bures J (2001) Inactivating one hippocampus impairs avoidance of a stable room-defined place during dissociation of arena cues from room cues by rotation of the arena. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3531–3536.
- Corcoran KA, Desmond TJ, Frey KA, Maren S (2005) Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J Neurosci* 25:8978–8987.
- Crane PD, Braun LD, Cornford EM, Cremer JE, Glass JM, Oldendorf WH (1978) Dose dependent reduction of glucose utilization by pentobarbital in rat brain. *Stroke* 9:12–18.
- Daumas S, Halley H, Frances B, Lassalle JM (2005) Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* 12:375–382.
- de Hoz L, Knox J, Morris RG (2003) Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze spatial learning depending on the training protocol. *Hippocampus* 13:587–603.
- Douglas RM, McNaughton BL, Goddard GV (1983) Commissural inhibition and facilitation of granule cell discharge in fascia dentata. *J Comp Neurol* 219:285–294.
- Duncan GE, Stumpf WE (1991) Brain activity patterns: assessment by high resolution autoradiographic imaging of radiolabeled 2-deoxyglucose and glucose uptake. *Prog Neurobiol* 7:365–382.
- Eichenbaum H (1997) How does the brain organize memories? *Science* 277:330–332.
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H (1999) The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23:209–226.
- Fenton AA, Bures J (1993) Place navigation in rats with unilateral tetrodotoxin inactivation of the dorsal hippocampus: place but not procedural learning can be lateralized to one hippocampus. *Behav Neurosci* 107:552–564.
- Fenton AA, Bures J (1994) Interhippocampal transfer of place navigation monocularly acquired by rats during unilateral functional ablation of the dorsal hippocampus and visual cortex with lidocaine. *Neuroscience* 58:481–491.
- Fenton AA, Arolfo MP, Nerad L, Bures J (1995) Interhippocampal synthesis of lateralized place navigation engrams. *Hippocampus* 5:16–24.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130.
- Galani R, Lehmann O, Bolmont T, Aloy E, Bertrand F, Lazarus C, Jeltsch H, Cassel JC (2002) Selective immunolesions of CH4 cholinergic neurons do not disrupt spatial memory in rats. *Physiol Behav* 76:75–90.
- Goldstein LB, Davis JN (1990) Influence of lesion size and location on amphetamine-facilitated recovery of beam-walking in rats. *Behav Neurosci* 104:320–327.
- Hille B (1966) Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves. *Nature* 210:1220–1222.
- Hille B (1977) The pH-dependent rate of action of local anesthetics on the node of Ranvier. *J Gen Physiol* 69:475–496.
- Hofferer E, Cassel JC (1996) A comparison of the effects of two fimbria-fornix lesion techniques on beam-walking performance in the rat: aspiration versus electrolysis. *Behav Brain Res* 74:175–180.
- Izquierdo I, Medina JH (1998) On brain lesions, the milkman and Sigmunda. *Trends Neurosci* 21:423–426.
- Jarrard LE (2001) Retrograde amnesia and consolidation: anatomical and lesion considerations. *Hippocampus* 11:43–49.
- Jarrard LE (2002) Use of excitotoxins to lesion the hippocampus: update. *Hippocampus* 12:405–414.
- Klement D, Past'alkova E, Fenton AA (2005) Tetrodotoxin infusions into the dorsal hippocampus block non-locomotor place recognition. *Hippocampus* 15:460–471.
- Kurumaji A, Dewar D, McCulloch J (1993) Metabolic mapping with deoxyglucose autoradiography as an approach for assessing drug action in the central nervous system. In: *Imaging drug action in the brain* (London ED, ed), pp 207–263. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Maguire EA, Frackowiak RS, Frith CD (1997) Recalling routes around London: activation of the right hippocampus in taxi drivers. *J Neurosci* 17:7103–7110.
- Malpeli JG, Schiller PH (1979) A method of reversible inactivation of small regions of brain tissue. *J Neurosci Methods* 1:143–151.
- Malpeli JG (1999) Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J Neurosci Methods* 86:119–128.
- Martin JH (1991) Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 127:160–164.
- Martin JH, Ghez C (1999) Pharmacological inactivation in the analysis of the central control movement. *J Neurosci Methods* 86:145–159.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96–99.
- Maxwell RC, Fink G (1988) The patterns of [14C]-2-deoxyglucose uptake in female rat brain produced by electrical stimulation of hypothalamic and limbic brain areas. *Neuroscience* 24:241–263.
- Morris RG, Halliwell RF, Bowery N (1989) Synaptic plasticity and learning. II: Do different kinds of plasticity underlie different kinds of learning? *Neuropsychologia* 27:41–59.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9697–9701.
- Moser MB, Moser EI (1998a) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608–619.
- Moser MB, Moser EI (1998b) Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7535–7542.
- Narahashi T (1972) Mechanism of action of tetrodotoxin and saxitoxin on excitable membranes. *Fed Proc* 31:1124–1132.
- Nudo RJ, Masterton RB (1986) Stimulation-induced [14C]-2-deoxyglucose labeling of synaptic activity in the central auditory system. *J Comp Neurol* 245:553–565.
- Nunn JA, Graydon FJ, Polkey CE, Morris RG (1999) Differential spatial memory impairment after right temporal lobectomy demonstrated using temporal titration. *Brain* 122 (Pt 1):47–59.
- O'Keefe J, Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon.
- O'Keefe J (1999) Do hippocampal pyramidal cells signal non-spatial as well as spatial information? *Hippocampus* 9:352–364.
- Olypher AV, Klement D, Fenton AA (2006) Cognitive disorganization in hippocampus: a physiological model of the disorganization in psychosis. *J Neurosci* 26:158–168.
- Parron C, Poucet B, Save E (2001) Re-evaluation of the spatial memory deficits induced by hippocampal short lasting inactivation reveals the need for cortical co-operation. *Behav Brain Res* 127:71–79.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th edition*. San Diego: Academic Press.
- Ribak CE, Peters A (1975) An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Res* 92:341–368.
- Riedel G, Micheau J, Lam AG, Roloff EL, Martin SJ, Bridge H, de Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RG (1999) Reversible neural



- inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2:898–905.
- Ritchie JM (1975) Binding of tetrodotoxin and saxitoxin to sodium channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 270:319–336.
- Sanderson KJ, Dreher B, Gayer N (1991) Prosencephalic connections of striate and extrastriate areas of rat visual cortex. *Exp Brain Res* 85:324–334.
- Sandkuhler J, Maisch B, Zimmermann M (1987) The use of local anaesthetic microinjections to identify central pathways: a quantitative evaluation of the time course and extent of the neuronal block. *Exp Brain Res* 68:168–178.
- Sharp JW, Gonzalez MF, Morton MT, Simon RP, Sharp FR (1988) Decreases of cortical and thalamic glucose metabolism produced by parietal cortex stimulation in the rat. *Brain Res* 438:357–362.
- Shibata H (1992) Topographic organization of subcortical projections to the anterior thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 323:117–127.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28:897–916.
- Sokoloff L (1981) Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system. *Fed Proc* 40:2311–2316.
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195–231.
- Swanson LW, Cowan WM (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172:49–84.
- Takahashi T (1985) The organization of the lateral thalamus of the hooded rat. *J Comp Neurol* 231:281–309.
- Tehovnik EJ, Sommer MA (1997) Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 74:17–26.
- Teitelbaum H, Milner P (1963) Activity changes following partial hippocampal lesions in rats. *J Comp Physiol Psychol* 56:284–289.
- Thompson SM, Robertson RT (1987) Organization of subcortical pathways for sensory projections to the limbic cortex. II. Afferent projections to the thalamic lateral dorsal nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 265:189–202.
- Van Groen T, Wyss JM (1992) Projections from the laterodorsal nucleus of the thalamus to the limbic and visual cortices in the rat. *J Comp Neurol* 324:427–448.
- Van Praag H, Black IB, Staubli UV (1997) Neonatal vs. adult unilateral hippocampal lesions: differential alterations in contralateral hippocampal theta rhythm. *Brain Res* 768:233–241.
- Wesierska M, Dockery C, Fenton AA (2005) Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *J Neurosci* 25:2413–2419.
- Winer BJ (1971) *Statistical principles in experimental design*. New York: McGraw Hill.
- Wree A, Schleicher A, Zilles K, Beck T (1988) Local cerebral glucose utilization in the Ammon's horn and dentate gyrus of the rat brain. *Histochemistry* 88:415–426.
- Zhuravin IA, Bures J (1991) Extent of the tetrodotoxin induced blockade examined by pupillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Exp Brain Res* 83:687–690.

(Accepted 7 May 2006)  
(Available online 22 June 2006)

## Résumé :

Ce travail de thèse visait à étudier la réorganisation spatio-temporelle des circuits neuronaux impliqués dans la consolidation et la récupération d'un souvenir ancien spatial chez le Rat, et plus particulièrement le rôle de l'hippocampe et du cortex préfrontal médian dans la consolidation systémique. Nos résultats ont tout d'abord montré l'importance de la prééminence des indices distaux dans une tâche de piscine de Morris pour la qualité d'un souvenir. Ceci est d'autant plus crucial que le degré de dégradation d'une trace mnésique ancienne influait le déroulement de certains processus mnésiques tels que l'extinction. Par ailleurs, ces travaux de thèse ont révélé que le degré de dégradation d'une trace mnésique modulait le niveau de participation de l'hippocampe et du cortex cingulaire antérieur lors du rappel d'un souvenir ancien. Enfin, alors que les travaux dans la littérature se sont surtout focalisés sur l'implication des structures néocorticales dans la consolidation systémique, nous avons mis à jour le rôle des noyaux thalamiques intralaminaires/latéraux dans la consolidation et/ou le rappel d'un souvenir ancien de nature spatiale. Dans leur ensemble, ces résultats ne sont pas pleinement en accord avec les théories actuelles sur la consolidation systémique, mais suggèrent que la réorganisation spatio-temporelle d'un souvenir spatial pourrait s'opérer différemment selon les conditions dans lesquelles le souvenir est formé puis rappelé.

## Summary :

This thesis aimed at studying the spatio-temporal reorganization of a remote spatial memory in the Rat, and more particularly the roles of the hippocampus and the medial prefrontal cortex in systems consolidation. We first showed, in the Morris water maze, that contextual cue saliency affected the precision and thus the quality of memories. This is important as the degree of trace degradation determined the outcome of extinction of a remote memory. Furthermore, we found that the degree of trace degradation determined the level of participation of the hippocampus and the anterior cingulate cortex during remote memory retrieval. Lastly, whereas most studies in the literature focused on the role of neocortical areas in systems consolidation, we demonstrated that the intralaminar/lateral thalamic nuclei may also participate in systems consolidation and/or retrieval of a remote memory. In conclusion, taken together, these results do not fully corroborate the main theories on systems consolidation. Instead, it seems that the way in which the spatio-temporal reorganization of a memory takes place could depend on the conditions in which memories are formed and subsequently recalled.