



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED414)

Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives

THÈSE présentée par :

Michaël LOUREIRO

soutenue le : 30 novembre 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

**Implication de l'hippocampe ventral et des
noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus dans
les processus cognitifs sous-tendant la mémoire
spatiale chez le Rat**

THÈSE dirigée par :

Mr. CASSEL Jean-Christophe

Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr. POUCKET Bruno

Directeur de recherche, université de Marseille

Mme RAMPON Claire

Directeur de recherche, université Paul Sabatier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. VEINANTE Pierre

Maître de conférences (HDR), université de Strasbourg

Mme PEREIRA DE VASCONCELOS Anne

Chercheur (HDR), université de Strasbourg

Remerciements...

Je tiens en premier lieu à remercier le Comité d'Examen de ma thèse, le Dr. Pierre Veinante, le Dr. Claire Rampon et le Dr. Bruno Poucet. Merci pour le temps que vous aurez pris à lire et examiner mon travail. C'est un honneur pour moi que de pouvoir bénéficier de vos critiques.

Merci au Dr. Christian Kelche, directeur du LINC et doyen de la Faculté de Psychologie de Strasbourg, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie particulièrement le Pr. Jean-Christophe Cassel, mon directeur de thèse. Merci pour m'avoir fait confiance. Merci aussi pour ta disponibilité. Ton dynamisme, ta motivation sans limites et ta passion pour les neurosciences resteront pour moi des exemples à suivre. Bravo pour ce que tu as fait et fais encore pour ton équipe, pour le laboratoire et pour les Neurosciences Strasbourgeoises.

Un 'énormissime' remerciement au Dr. Anne Pereira de Vasconcelos qui a co-encadré cette thèse. Merci pour tout. Pour m'avoir accompagné aussi bien dans les aspects pratiques que théoriques. Merci pour m'avoir fait confiance, pour ton écoute et pour ton sourire. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée lors de la rédaction de ce manuscrit.

Un grand merci au Dr. Lucas Lecourtier. J'ai eu le plaisir de travailler à plusieurs reprises avec toi au cours de cette thèse. Merci pour nos discussions et tes conseils, que ce soit à propos des 'manips' ou lorsque j'étais à la recherche d'un stage post-doctoral. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir choisi afin de participer à l'un de tes projets. C'est le meilleur cadeau que tu pouvais me faire !

Merci à Michel Engeln et au Dr. Joëlle Lopez. Vous m'avez transmis le flambeau et m'avez permis de démarrer ma thèse sur de solides bases. Je ne sous-estime pas ce que je vous dois et vous souhaite une longue carrière scientifique.

Merci à Thibault Cholvin. J'ai eu la chance de pouvoir t'accompagner dans ta formation, notamment lors de ton stage de M2. Je me rappelle le conseil de Bruno Will, entendu lors d'un enseignement qu'il dispensait en Licence de Psychologie : « transmettre un savoir est une bonne façon d'apprendre ». Merci Thibault de m'avoir permis de progresser à tes cotés. Je te souhaite la réussite que tu mérites.

Un grand merci à Karin Herbeaux et Brigitte Cosquer. Merci pour tous ces bons moments passés à travailler avec vous. C'est une chance de vous avoir et de pouvoir bénéficier de votre savoir-faire. Mais surtout, merci pour votre bonne humeur.

Merci aux stagiaires qui ont contribué d'une façon ou d'une autre aux expériences présentées dans ce manuscrit : Mélanie Arrivet, Marie-Charlotte Diringer, Manon Lhomme, Marie-Laure Michel, Nicolas Merienne et Asma Latreche.

Merci aux animaliers, Olivier, Georges et Daniel pour vous être occupé avec soin de nos chers animaux.

Je remercie l'ensemble des doctorant(e)s du LINC. C'est avec beaucoup de nostalgie que je continuerai de penser à vous. Je remercie tout particulièrement mes colocataires de bureau, Marc-Antoine Muller, Sarah Pol-Bodetto, Mohamad Ali et Elodie Deschatrettes. Merci pour nos discussions et pour votre tolérance. Et oui, il vous a fallu supporter mes blagues et autres

jeux de mots. J'espère recroiser votre route et vous souhaite beaucoup de bonheur, quels que soient vos choix de carrière.

Je remercie tous les membres du LINC et plus particulièrement les membres de l'équipe de Neurobiologie Comportementale et Cognitive. Vous avez tous contribué à mon bien-être pendant cette thèse. Merci à tous pour cette ambiance à la fois studieuse et conviviale.

Je salue l'ensemble de mes camarades de la promotion 2008-2009 du Master 2 de Neurosciences de Strasbourg et remercie plus particulièrement Laetitia Wioland, Romain Bourdy, Antoine Valera, Joseph Chaumont et Alexandre Zeitler pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci beaucoup à Juliette pour la relecture de ce manuscrit.

Je profite de cette occasion pour remercier ma famille. Merci de m'avoir fait confiance depuis le début et de m'avoir soutenu à chacune des étapes tout au long de ces études.

Enfin, je remercie de tout mon cœur Noémie, ma fiancée. Merci de m'avoir accompagné depuis plus de 5 ans maintenant, dans mon aventure au sein des Neurosciences. Merci également de m'avoir aidé dans les moments difficiles. Si je suis arrivé jusqu'au bout de cette thèse, c'est aussi grâce à toi.

A ma fille, Aurélia...

Communications

Publications présentées dans ce manuscrit de thèse :

Loureiro M., Lecourtier L., Engel M., Lopez J., Cosquer B., Geiger K., Kelche C., Cassel J.-C., Pereira de Vasconcelos A. (2012) The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Structure and Function*. 217: 96-106.

Loureiro M., Cholvin T., Lopez J., Merienne N., Cosquer B., Geiger K., Cassel J.C., Pereira de Vasconcelos A. (2012) The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory. *Journal of Neuroscience*. 32(29): 9947-9959.

Loureiro M., Cholvin T., Cassel R., Cosquer B., Geiger K., Kelche C., Pereira de Vasconcelos A., Cassel J.-C. Ventral midline thalamus inactivation disrupts strategy shifting, not recall of spatial memory in rats. Manuscrit en preparation.

Publications issues de collaborations pendant la thèse :

Jacquet M., Lecourtier L., Cassel R., **Loureiro M.**, Cosquer B., Escoffier G., Miglioratti M., Cassel J.C., Roman F.S., Marchetti. Dorsolateral striatum and dorsal hippocampus : a serial contribution to learning of olfactory cue-reward associations in rats. En revision pour *Behavioral Brain Research*.

Cassel J.C., Pereira de Vasconcelos A., **Loureiro M.**, Cholvin T., Dalrymple-Alford J., Vertes R. The ventral midline thalamus: a crucial relay for cognitive behaviors requiring functional interactions between the prefrontal cortex and the hippocampus. Soumis à *Progress in Neurobiology*.

Goutagny R., **Loureiro M.**, Jackson J., Chaumont J., Williams S, Isope P., Kelche C, Cassel J.C., Lecourtier L. The lateral habenula is differentially coupled to prefrontal and hippocampal networks. Soumis à *Journal of Neuroscience*.

Communications affichées :

Loureiro M., Engel M., Lopez J., Lecourtier L., Herbeaux K., Cosquer B., Lazarus C., Cassel J.C., Pereira de Vasconcelos A. Implication of hippocampal subregions in the retrieval of a spatial reference memory task : a study using reversible inactivation in the Rat. 7th Meeting of the Federation of European Neuroscience Societies (FENS), Amsterdam (Pays-Bas), Juillet 2010.

Loureiro M., Cassel R., Cholvin T., Lecourtier L., Herbeaux K., Pereira de Vasconcelos A., Cassel J.C. The nucleus reuniens contributes to memory retrieval in a simple spatial learning task. 10th Meeting of the French Neuroscience Society, Marseille (France), Mai 2011.

Pereira de Vasconcelos A., Cholvin T., Cassel R., **Loureiro M.**, Lecourtier L, Cassel J.C. Ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei, ReRh) and spatial cognition in rats.

8th Meeting of the Federation of European Neuroscience Societies (FENS), Barcelone (Espagne), juillet **2012**.

Loureiro M., Cholvin T., Lopez J., Merienne N., Cosquer B., Geiger K., Cassel J.C., Pereira de Vasconcelos A. Ventral midline nuclei of the thalamus contribute to spatial memory persistence in rats. *8th Meeting of the Federation of European Neuroscience Societies (FENS)*, Barcelone (Espagne), juillet **2012**.

Communication orale :

Implication of hippocampal sub-regions in spatial memory. In *Neuroscience Upper Rhine Network (NEUREX) annual meeting*, Bale (Suisse), juin **2010**.

Sommaire

Introduction générale	1
1. Cadre Général de la thèse.....	1
2. Objectifs de la thèse.....	3
3. Structure de la thèse.....	5
Contexte Scientifique	6
Chapitre 1 : La mémoire multi-systèmes	6
1. Définition générale de la mémoire	6
2. Lien entre la mémoire à court terme et la mémoire à long terme : le modèle d'Atkinson et Shiffrin	7
3. La mémoire à long terme.....	9
3.1. Contributions de la neuropsychologie	9
3.2. Mémoire déclarative et mémoire non-déclarative	11
3.3. Modèles d'organisation des systèmes de mémoire.....	12
Chapitre 2 : Mémoire spatiale et hippocampe.....	15
1. La mémoire spatiale	15
1.1. Définition.....	15
1.2. Nature des informations spatiales.....	16
1.3. Traitements des informations spatiales.....	17
2. Base anatomique des représentations mnésiques.....	17
2.1. L'hippocampe	17
2.2. Hippocampe et mémoire spatiale.....	20
2.3. Ségrégation anatomique des fonctions hippocampiques	22
2.4. Autres structures impliquées dans la mémoire spatiale.....	24
3. Evaluation de la mémoire spatiale chez le Rat	25
3.1. Le test de la piscine de Morris	25
3.2. Le Labyrinthe du double-H	27
Chapitre 3 : La consolidation systémique.....	29
1. La consolidation synaptique.....	30
2. La consolidation systémique.....	31
2.1. L'amnésie rétrograde temporellement graduée	31
2.2. La théorie standard de la consolidation systémique	32
2.3. Critique de la théorie standard de la consolidation : l'amnésie rétrograde n'est pas toujours temporellement graduée	33
2.4. La théorie des traces multiples	35

2.5. La théorie de la transformation	36
2.6. Le cas particulier de la mémoire spatiale	37
2.7. La théorie des schémas	38
3. Le cortex préfrontal et le rappel de souvenirs anciens	40
3.1. Importance des connexions hippocampo-corticales	40
3.2. Le cortex préfrontal médian : rôle dans l'intégration des caractéristiques d'un souvenir devenu ancien	42
3.3. La théorie de Rudy.....	44
Chapitre 4 : Les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus : un relai entre le cortex préfrontal médian et l'hippocampe.....	46
1. Organisation neuroanatomique des noyaux Re et Rh	47
1.1. Localisation des noyaux	47
1.2. Afférences.....	48
1.3. Efférences	50
2. Modulation de l'activité du mPFC et de l'HPC par les neurones de la partie ventrale de la ligne médiane du thalamus	53
2.1. Modulation de l'activité du mPFC	53
2.2. Modulation de l'activité de l'hippocampe	54
3. Implication des noyaux Re et Rh du thalamus dans la mémoire.....	57
3.1. Apprentissages associatif : test de l'évitement passif.....	57
3.2. Mémoire de travail incluant la mémoire spatiale de travail	58
3.3. Mémoire spatiale de référence.....	60
Matériels et Méthodes	62
1. Sujets d'expérimentations	62
1.1. Souche utilisée	62
1.2. Âge des animaux.....	62
1.3. Conditions d'élevage	62
2. Interventions chirurgicales.....	62
2.1. Lésions excitotoxiques.....	63
2.2. Inactivations fonctionnelles réversibles.....	64
2.2.1. Protocole des implantations de canules	64
2.2.2. Composés pharmacologiques	66
2.2.3. Procédure pour les inactivations	66
3. Evaluations comportementales	68
3.1. Piscine de Morris	68

3.1.1. Description du dispositif.....	68
3.1.2. Principe de la tâche.....	69
3.1.3. Protocole d'acquisition.....	69
3.1.4. Test de rétention.....	70
3.2. Labyrinthe du double-H.....	70
3.2.1. Description du dispositif.....	70
3.2.2. Principe de la tâche.....	71
3.2.3. Protocole d'acquisition.....	72
3.2.4. Test de rétention.....	72
3.3. Labyrinthe en croix sur-élevé.....	73
3.3.1. Description du dispositif.....	73
3.3.2. Principe de la tâche.....	74
3.3.3. Protocole.....	74
3.4. Champ ouvert.....	75
3.4.1. Description du dispositif.....	75
3.4.2. Principe de la tâche.....	75
3.4.3. Protocole.....	75
3.5. Actographie ou test d'activité en cage d'élevage.....	76
3.6. Evaluation du seuil de nociception mécanique.....	76
4. Techniques histologiques et immunohistochimiques.....	77
4.1. Euthanasie des rats et prélèvement des cerveaux.....	78
4.2. Coupes au cryostat.....	78
4.3. Coloration au violet de Crésyl.....	78
4.4. Evaluation de la diffusion de la lidocaïne et du muscimol.....	79
4.4.1. Principe.....	79
4.4.2. Protocole.....	79
4.5. Evaluation de l'étendue des lésions des noyaux Re et Rh : Marquage immunohistochimique de la protéine NeuN.....	79
4.6. Marquage immunohistochimique de la protéine c-Fos.....	80
4.6.1. Principe.....	81
4.6.2. Protocole.....	82
<u>Contribution Expérimentale.....</u>	<u>83</u>
<u>Publication 1 : Etude de l'implication de l'hippocampe ventral dans l'acquisition et le rappel d'une mémoire spatiale.....</u>	<u>83</u>
Publication 1.....	84
<u>Publication 2 : Implication des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus (noyaux reuniens et rhomboïde) dans la persistance d'une mémoire spatiale chez le Rat.....</u>	<u>100</u>

Publication 2	101
<u>Publication 3 : Rôle des noyaux reuniens et rhomboïde dans le changement de stratégie lors d'une tâche de mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe et du cortex préfrontal médian</u>	<u>114</u>
Publication 3	115
<u>Discussion Générale et Perspectives</u>	<u>148</u>
<u>1. Le rappel d'une mémoire spatiale nécessite l'engagement d'un réseau distribué au sein de l'hippocampe</u>	<u>148</u>
<u>2. Rôle des noyaux reuniens et rhomboïde dans les processus cognitifs nécessitant une interaction entre l'hippocampe et le cortex préfrontal médian</u>	<u>154</u>
2.1. Implication des noyaux Re et Rh dans la persistance d'une mémoire spatiale de référence	154
2.2. Implication des noyaux Re et Rh dans le changement de stratégie et la flexibilité comportementale.....	159
<u>3. Conclusion.....</u>	<u>162</u>
<u>4. Perspectives.....</u>	<u>163</u>
4.1. Confirmer l'implication des noyaux Re et Rh du thalamus dans le processus de consolidation d'une mémoire spatiale comparativement à celle d'une mémoire contextuelle	163
4.2. Etude du circuit hippocampo-cortico-thalamique dans le cadre de la consolidation systémique et de la mémoire spatiale chez le Rat.....	164
4.3. Impact d'une lésion des noyaux Re et Rh sur l'activité des cellules du mPFC et de l'HPC impliquées dans la navigation	165
<u>Bibliographie</u>	<u>166</u>

Liste des figures

Contexte Scientifique

Figure 1 : Modèle modal d'Atkinson et Shiffrin.....	7
Figure 2 : La mémoire de travail de Baddeley et Hitch	8
Figure 3 : H.M. et le lobe temporal médian	10
Figure 4 : La tâche du dessin en miroir	11
Figure 5 : Système de MLT et ses différents sous-systèmes	12
Figure 6 : Modèle MNESIS	13
Figure 7 : L'hippocampe de Rat.....	19
Figure 8 : Connexions intrinsèques et extrinsèques de l'hippocampe	20
Figure 9 : Piscine de Morris et labyrinthe du double-H.....	27
Figure 10 : Théorie standard de la consolidation	33
Figure 11 : Théorie des traces multiples	35
Figure 12 : Le cortex préfrontal du Rat.....	43
Figure 13 : La théorie de Rudy	45
Figure 14 : Noyaux reuniens et rhomboïde.....	47
Figure 15 : Afférences du noyau reuniens	49
Figure 16 : Afférences du noyau rhomboïde.....	50
Figure 17 : Efférences du noyau reuniens.....	51
Figure 18 : Efférences du noyau rhomboïde	52
Figure 19 : Le labyrinthe radial à 8 branches.....	59

Matériels et Méthodes

Figure 20 : Dispositif d'instillation intra-cérébral	65
Figure 21 : Schéma de la piscine de Morris	69
Figure 22 : Schéma du double-H	71
Figure 23 : Protocole d'acquisition du double-H.....	72
Figure 24 : Test de rétention dans le double-H	73
Figure 25 : Le labyrinthe en croix sur-élevé	74
Figure 26 : Champ ouvert (<i>open field</i>).....	75
Figure 27 : Nociception mécanique	76
Figure 28 : Résultats du test de la pince calibrée	77

Figure 29 : Mécanismes d'expressions des gènes précoces	29
--	----

Discussion Générale et Perspectives

Figure 30 : Hippocampe dorsal vs hippocampe ventral.....	153
---	-----

Figure 31 : Conséquences d'une lésion des noyaux intralaminaires du thalamus sur le rappel en piscine de Morris	158
--	-----

Figure 32 : Circuit hippocampo-préfronto-thalamique	161
--	-----

Liste des principales abréviations

ACC	cortex cingulaire antérieur
AP	antéro-postérieur
BE	Bleu Evans
CA	corne d'Ammon
DH	labyrinthe du double-H
DHPC	hippocampe dorsal
DV	dorso-ventral
H.M.	Henry Molaison
HPC	hippocampe
IL	cortex infralimbique
ILN	noyau intralaminaire du thalamus
IRM	imagerie par résonance magnétique
LIDO	lidocaïne
LTM	lobe temporaux médians
MCT	mémoire à court terme
ML	médio-latéral
MLT	mémoire à long terme
MNESIS	Memory NEostructural Inter-Systemic
mPFC	cortex préfrontal médian
MSCI	muscimol
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
OFC	cortex orbito-frontal
PL	cortex prélimbique
Re	reuniens
Rh	rhomboïde
SPI	Serial Parallel Independent
VHPC	hippocampe ventral

Introduction

Introduction générale

1. Cadre général de la thèse

La mémoire, cette étonnante capacité cognitive nous permettant de retenir de l'information et de l'utiliser pour mieux nous adapter à notre environnement, a fait l'objet de nombreuses études ces dernières décennies. Comment se construit la mémoire de nos enfants, comment fonctionne notre mémoire à l'âge adulte, de quelle manière intervient le sommeil, ou encore comment le vieillissement affecte-t-il notre mémoire, sont quelques exemples de questions auxquelles les neurologues, neuropsychologues et neurobiologistes tentent d'apporter de nouveaux éclairages. Si les études sur la mémoire sont abondantes, c'est bien parce que cette fonction cognitive est impliquée dans de nombreux aspects de notre vie. C'est probablement lorsque la mémoire nous fait défaut que nous nous apercevons à quel point elle est nécessaire. Ne plus se souvenir de l'emplacement de sa voiture, éprouver des difficultés à apprendre ses leçons, avoir l'impression d'oublier quelque chose en partant de chez soi, oublier un rendez-vous, tous ces petits tracasseries du quotidien montrent à quel point la mémoire est indispensable. Mais cela n'est rien en comparaison de l'influence qu'ont les souvenirs de notre passé sur notre identité et nos comportements. En effet, nos souvenirs personnels (appelés également souvenirs épisodiques ou autobiographiques) constituent notre identité. Ils nous permettent non seulement de faire face aux situations présentes, mais aussi d'imaginer ce que pourra être notre avenir. Ces souvenirs, propres à chaque individu, lui permettent de voyager mentalement dans le temps et font partie du système de la mémoire déclarative (aussi appelée mémoire explicite), dont la caractéristique principale est que la récupération des informations se fait consciemment. Au contraire, le système de mémoire non-déclaratif (aussi appelé mémoire implicite) permet, par exemple, d'apprendre des procédures (écrire à l'aide d'un clavier) sans que le rappel des informations ne fasse l'objet d'un rappel conscient. L'étude neuropsychologique des patients amnésiques a permis de faire progresser considérablement nos connaissances sur les différents systèmes de mémoire et ainsi d'élaborer plusieurs théories sur leurs fonctionnements ou leurs localisations dans le cerveau. Grâce aux progrès technologiques, et en particulier à l'imagerie cérébrale, l'étude de sujets sains a également permis d'améliorer nos savoirs concernant l'organisation neuroanatomique de 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 complexité du cerveau humain, constitué d'environ 100 milliards de neurones formant un réseau complexe de connexions synaptiques, rend son étude extrêmement difficile. De plus, nous ne pouvons pas facilement analyser et intervenir directement sur le cerveau humain, sauf à l'aide de méthodes non-invasives telles que l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), ou sur la base de dissection post-mortem. Ainsi, les neurobiologistes ont cherché, dans le règne animal (notamment chez les rongeurs, les oiseaux, la drosophile ou encore l'aplysie), des modèles permettant l'étude des mécanismes neuronaux sous-tendant certains processus mnésiques. En effet, la mémoire étant nécessaire à la survie des espèces, ses mécanismes fondamentaux peuvent être étudiés dans l'ensemble du règne animal.

On sait que l'hippocampe (HPC) est une structure importante en ce qui concerne l'apprentissage et la mémoire, en particulier de type déclaratif. Cependant, un doute persiste concernant son rôle dans le maintien et la récupération de souvenirs anciens; en effet, l'observation de certains patients amnésiques présentant une lésion des lobes temporaux médians (comprenant l'HPC) a mené à l'idée d'une réorganisation spatio-temporelle de la trace mnésique, appelée consolidation systémique, c'est-à-dire une consolidation au niveau des structures cérébrales. Ainsi, certains auteurs pensent que l'HPC ne jouerait qu'un rôle transitoire dans la formation et le maintien des souvenirs et qu'il passerait progressivement le relais au néocortex (théorie standard de la consolidation ; Squire et Alvarez, 1995). A l'inverse, d'autres auteurs pensent que l'HPC reste toujours nécessaire au maintien et à la récupération de certains types de souvenirs, notamment ceux riches en détails contextuels, comme c'est le cas de la mémoire spatiale (théorie des traces multiples ; Nadel et Moscovitch, 1997). Par ailleurs, ces deux théories sont en accord sur le fait que les processus sous-tendant la consolidation systémique nécessitent une communication entre l'HPC et des structures néocorticales comme le cortex préfrontal médian (mPFC). Lorsque j'ai commencé mes travaux de recherche doctoraux, il existait un débat concernant l'implication différentielle des sous-régions hippocampiques dans les processus mnésiques. En effet, si la partie dorsale de l'HPC du Rat (ou postérieure chez l'Homme) était bien connue pour son implication dans les processus mnésiques, notamment spatiaux, la partie ventrale de l'HPC (ou antérieure chez l'Homme) était décrite pour son rôle nettement plus marqué dans les processus émotionnels, en particulier via ses connexions avec l'amygdale et l'hypothalamus. Néanmoins, les caractéristiques anatomiques intrinsèques et extrinsèques de l'HPC (en particulier la connexion monosynaptique et unidirectionnelle partant de l'HPC ventral vers le mPFC) suggéraient que l'HPC ventral pouvait avoir un rôle dans l'acquisition, la consolidation et/ou

le rappel d'une information, et que ce rôle pourrait dépendre de l'ancienneté du souvenir.

De plus, si les amnésies faisant suite à une lésion des lobes temporaux médians ont été particulièrement bien étudiées dans le contexte de la formation de nos souvenirs, les lésions du diencephale, comme celles observées dans le syndrome de Korsakoff, ou les accidents vasculaires cérébraux (AVC) affectant le thalamus, sont une autre cause de perturbation de la mémoire, dont certaines caractéristiques sont communes avec les amnésies liées à l'atteinte du lobe temporal médian. La compréhension des structures neuroanatomiques sous-tendant les amnésies diencephaliques est compliquée par le nombre important de noyaux thalamiques, voire extra-thalamiques qui peuvent être atteints dans le syndrome de Korsakoff ou après un AVC. Les modèles animaux, permettant d'effectuer des lésions sélectives de certains noyaux ou groupes de noyaux thalamiques, ont permis de mettre en évidence que les noyaux intralaminaires et antérieurs du thalamus pourraient être les principaux noyaux impliqués dans les amnésies diencephaliques. Cependant, parmi les noyaux thalamiques pouvant également influencer les processus mnésiques, les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus, constitués du noyau reuniens (Re) et du noyau rhomboïde (Rh), sont particulièrement bien positionnés pour contribuer à la consolidation et/ou au rappel des souvenirs. En effet, ces noyaux sont connectés anatomiquement à la fois au mPFC et à l'HPC, deux structures-clés impliquées dans la réorganisation de la mémoire au cours du temps. Des données électrophysiologiques, ayant notamment montré que le Re est la source excitatrice principale d'origine thalamique de l'HPC, sont venues appuyer l'hypothèse du rôle que pourrait jouer les noyaux Re et Rh dans le rappel de souvenirs récents et/ou anciens. Mon travail de thèse a été essentiellement focalisé sur ces structures cérébrales potentiellement impliquées dans la consolidation et le rappel d'un souvenir spatial chez le Rat, et pour lesquelles il n'existait étonnamment que peu de données comportementales dans la littérature.

2. Objectifs de la thèse

Mes premiers travaux de thèse avaient pour objectif d'étudier l'implication des deux sous-régions hippocampiques (HPC dorsal vs. HPC ventral) dans l'acquisition et le rappel d'une mémoire spatiale récemment consolidée. En effet, si le rôle de l'HPC dorsal n'était plus à démontrer, il n'en allait pas de même de l'HPC ventral. En mettant en œuvre une technique

d'inactivation fonctionnelle réversible par injection intracérébrale d'une substance bloquant les canaux sodiques (la lidocaïne), nous avons testé chez le Rat, le rôle de l'HPC ventral et dorsal dans l'acquisition d'une part, et le rappel d'autre part, de la localisation d'une plateforme dans un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris. Les performances de rappel ont été évaluées à deux délais post-acquisition (1 jour vs 5 jours après l'apprentissage) afin de vérifier si l'engagement de l'HPC ventral pouvait dépendre de la récence du souvenir. Les résultats de cette étude sont détaillés dans la Publication 1 (Loureiro et coll., *Brain Structure and Function* 217 : 93-106, 2012).

La consolidation systémique implique une réorganisation fonctionnelle au sein de l'HPC et des aires corticales, particulièrement le mPFC, nécessaire à la stabilisation et la persistance des souvenirs. Ceci sous-entend un échange d'informations au sein notamment d'un circuit hippocampo-préfrontal, deux régions cérébrales étant connues par ailleurs pour leur rôle-clé dans certains processus mnésiques tels que la mémoire de travail pour le mPFC ou la mémoire spatiale pour l'HPC. Alors qu'il existe une connexion monosynaptique partant de l'HPC ventral vers le mPFC, aucune connexion directe en retour du mPFC vers l'HPC n'est décrite dans la littérature. Les noyaux Re et Rh (partie ventrale de la ligne médiane du thalamus) sont idéalement situés d'un point de vue anatomique pour jouer le rôle de relais de l'information entre le mPFC et l'HPC et/ou coordonner l'activité de ces deux régions. Par des approches en imagerie révélant l'expression d'un gène précoce (*c-fos*), des lésions excitotoxiques et des inactivations fonctionnelles réversibles, nous avons montré la contribution des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans la consolidation à long terme d'une mémoire spatiale chez le Rat, mettant ainsi en avant l'implication d'un circuit hippocampo-préfronto-thalamique dans le maintien d'un souvenir spatial (Publication 2 : Loureiro et coll., *Journal of Neuroscience* 32, 9947-9959, 2012).

Enfin, certains auteurs ont démontré l'implication des noyaux Re et Rh dans d'autres tâches comportementales qui requièrent un engagement à la fois du mPFC et de l'HPC et non dans des tâches dépendant uniquement de l'engagement d'une seule de ces deux régions cérébrales. Afin de vérifier ces hypothèses dans une tâche comportementale testant d'une part, la mémoire spatiale dépendante de l'HPC et d'autre part, la capacité des animaux à changer de stratégie lors du rappel, capacité dépendante du mPFC, nous avons testé les effets d'une inactivation réversible soit du mPFC, soit de l'HPC, soit des noyaux Re et Rh avant un test de rétention effectué dans un labyrinthe aquatique récemment mis au point au laboratoire, le test

du Double-H. Les résultats obtenus dans ce test ont confirmé l'implication des noyaux Re et Rh dans une tâche dépendante de l'engagement à la fois du mPFC et de l'HPC. Ces données sont discutées et comparées à celles obtenues après une inactivation de ces trois structures dans un test évaluant la mémoire spatiale et dont le rappel à court terme dépend de l'HPC et non du mPFC (mémoire spatiale de référence en piscine de Morris) dans la Publication 3 (Loureiro et coll., manuscrit en cours de rédaction).

3. Structure de la thèse

Dans une première partie, intitulée « Contexte Scientifique », j'aborderai les généralités concernant la mémoire, les théories de la consolidation systémique et les structures cérébrales sur lesquelles mes travaux de thèse se sont focalisés. Le premier chapitre sera dédié à la présentation des différents systèmes de mémoire chez l'Homme. Dans le second chapitre, je présenterai la mémoire spatiale ainsi que l'une des structures-clés qui sous-tend ce type de mémoire, soit l'HPC. La troisième partie sera consacrée aux différentes théories de la consolidation systémique et abordera également le mPFC, son anatomie, ainsi que son rôle dans les processus mnésiques. Enfin, la quatrième partie concernera les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus, c'est à dire les noyaux Re et Rh, dont j'ai étudié l'implication à la fois dans la formation d'une mémoire spatiale récente et ancienne, mais également dans le test du double-H selon un protocole mettant en jeu à la fois l'HPC et le mPFC. Avant de présenter les résultats de mes travaux, les méthodes principales mises en œuvre dans mes expériences seront exposées dans la partie « Matériel et Méthodes », le détail de chaque protocole étant également inclus dans les publications auxquelles mes expériences ont donné lieu. La troisième partie de cette thèse (Contributions Expérimentales) sera consacrée à la présentation de mes résultats sous forme d'articles publiés ou en préparation. Enfin, la dernière partie, intitulée « Discussion Générale et Perspectives », consistera en une synthèse des résultats principaux, analysés dans le contexte de nos connaissances actuelles sur la mémoire et son organisation au niveau des structures cérébrales, suivie par les conclusions et les perspectives ouvertes par ce travail de thèse.

Contexte Scientifique

Chapitre 1 : La mémoire multi-systèmes

Chapitre 1 : La mémoire multi-systèmes

1. Définition générale de la mémoire

La mémoire est définie de façon générale par l'aptitude à conserver et restituer des informations rencontrées par le passé. Ces deux activités mentales sont l'aboutissement de plusieurs processus que sont l'encodage, la consolidation et le rappel des informations. L'encodage est le processus initial d'acquisition et de transformation de l'information en représentation mentale (ou trace mnésique). Cette information, une fois transformée, va faire l'objet d'une consolidation permettant ainsi le stockage des informations acquises. Enfin, les représentations mnésiques stockées peuvent être rappelées à tout moment.

Si elle peut être définie par ses processus principaux (encodage, consolidation et rappel), la mémoire n'est pourtant pas à considérer comme un système unitaire. En effet, dans la littérature, les auteurs parlent plutôt de plusieurs systèmes de mémoire, un système étant défini comme un réseau de neurones, anatomiquement et fonctionnellement distinct et intégré, spécialisé dans le traitement d'un type spécifique d'information (Tulving, 1972). Ces systèmes de mémoire peuvent se classer selon le registre sensoriel (visuel, auditif), le décours temporel (court terme, long terme), le format des représentations mnésiques (déclaratif, non-déclaratif), ou encore le mode de récupération de la trace mnésique (explicite, implicite).

Parmi ces classifications, celle du décours temporel avec la Mémoire à Court terme (MCT) et la Mémoire à Long terme (MLT) a été décrite à la fin du 19^{ème} siècle. En effet William James, dès 1890, proposa une distinction entre la mémoire primaire (aujourd'hui appelée 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 permet de maintenir les informations perçues de façon temporaire (quelques secondes). C'est le cas d'un numéro de téléphone que l'on retient le temps de le composer ; il est ensuite oublié. Si l'information est manipulée mentalement lors d'une opération cognitive, on parle alors de la Mémoire de Travail. C'est par exemple le cas lorsque l'on demande à un sujet de retenir une suite de chiffres puis de la 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 MLT de façon plus permanente.

2. Lien entre la mémoire à court terme et la mémoire à long terme : le modèle modal d'Atkinson et Shiffrin

A la fin des années 60, de nombreux chercheurs acceptent la nécessité de distinguer MCT et MLT. Atkinson et Shiffrin proposent en 1968 un modèle général de l'organisation de la mémoire connu sous le nom de modèle modal (Figure 1). Ce modèle distingue trois modules de stockage de l'information : la mémoire sensorielle, la MCT et la MLT. Dans un premier temps, l'organisme traite en parallèle les informations en provenance du monde extérieur grâce aux différents registres sensoriels. Ces informations sont maintenues dans ces registres pendant un temps très bref, de l'ordre de la milliseconde. Ces registres sensoriels fournissent ainsi des informations à la seconde composante du modèle, la MCT. Selon ce modèle, la capacité de la MCT est limitée, l'information est codée sous forme phonologique et le stockage est de courte durée, pas plus d'une minute. L'information stockée en MCT peut être transférée en MLT, ce transfert dépendrait de la durée de stockage en MCT et de la durée de révision ou de la répétition mentale des informations. D'après Atkinson et Shiffrin (1968), la MLT n'a pas de limite en termes de temps ou de capacité et le codage de l'information se ferait sous forme sémantique.

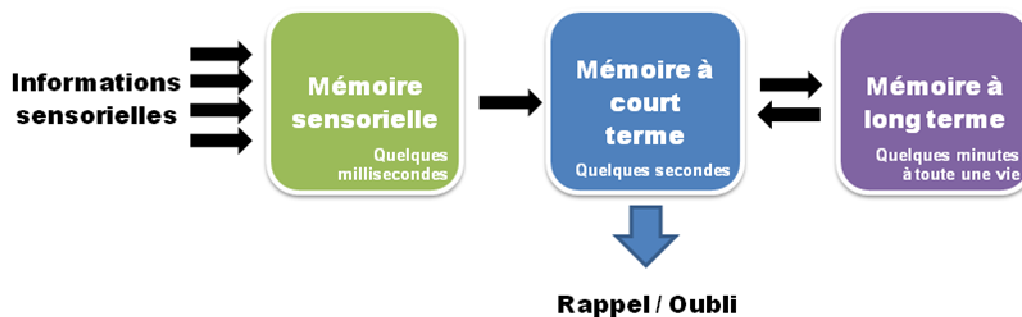


Figure 1 : Modèle modal d'Atkinson et Shiffrin. Le modèle modal divise la mémoire en trois sous-systèmes principaux. Le registre sensoriel qui peut retenir une grande quantité d'informations sous forme sensorielle pendant un temps extrêmement court (quelques millisecondes). La MCT, elle, contient un nombre limité d'éléments, stockés sous forme verbale pendant quelques secondes. La MLT correspond à notre vision intuitive de la mémoire. Les informations en MLT sont de nature sémantique. La MLT ne connaît pas de limites de capacité ou de durée de mémorisation.

Dans les années 70-80, certaines données de la littérature mettent en évidence que si le codage verbal semble privilégié dans la MCT (Conrad, 1964), certaines situations conduisent à exploiter un code visuel, qui possède également des propriétés spatiales (Brooks, 1968). De plus, alors que le modèle d'Atkinson et Shiffrin ne tient pas compte de l'influence de la MLT sur les propriétés de traitement de l'information en MCT, Watkins (1975) démontre au

contraire que nos connaissances en MLT peuvent améliorer nos performances en MCT. En effet, lorsque les items à retenir sont fréquemment employés, les performances d'empan mnésique (nombre d'items pouvant être stockés en MCT) sont améliorées (Watkins, 1975). Enfin, dans ce modèle, pour arriver dans le module de la MLT les informations doivent impérativement passer par la MCT. Cependant, l'évaluation de la mémoire du patient K.F., au contraire, démontre que la MLT peut être préservée alors que la MCT est déficiente (Shallice et Warrington, 1970). Le modèle modal apparaît ainsi trop simple, car il suppose que les opérations de traitement s'y déroulent toujours de la même manière (de façon sérielle) et que les connaissances sont représentées sous un même format (phonologique). Ces données ont donc favorisé l'émergence d'une nouvelle conception de la MCT, la mémoire de travail.

Baddeley et Hitch proposent, en 1974, le système de mémoire de travail à trois composantes : l'administrateur central (un système de contrôle et de coordination des opérations de traitement), la boucle-phonologique (spécialisée dans le traitement du système linguistique) et le calepin visuo-spatial (spécialisé dans le maintien et la manipulation temporaire d'informations visuo-spatiales) (Figure 2). En 2000, Baddeley complète son modèle en ajoutant un module supplémentaire, le *buffer* épisodique. Ce module est une interface entre les deux autres sous-systèmes (boucle phonologique et calepin visuo-spatial) et la MLT. Il est qualifié d'épisodique car ce module permet de stocker temporairement des informations intégrées dans un contexte spatio-temporel. L'ajout de cette interface complète ainsi le système de mémoire de travail proposé initialement par Baddeley et Hitch en tenant compte de l'influence des connaissances stockées en MLT sur les traitements à court terme de l'information.

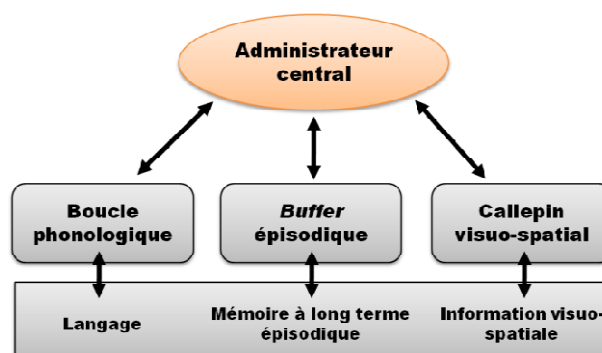


Figure 2 : La mémoire de travail de Baddeley et Hitch (1974, 2000). Ce système de mémoire permet le maintien temporaire d'informations, mais aussi la manipulation de celles-ci lors d'activités cognitives diverses. La mémoire de travail est un système dynamique à composantes multiples, en rupture avec la MCT qui, elle, est un système de stockage transitoire passif.

Les conceptions actuelles sur la mémoire sont donc assez éloignées du modèle d'Atkinson et Shiffrin, même si nous pouvons toujours en retrouver l'essence. Le modèle modal a été néanmoins le point de départ de très nombreux travaux dans le domaine de la mémoire et plus particulièrement en psychologie cognitive. Parce que le thème central de ma thèse est la MLT, je ne rentrerai pas plus dans les détails en ce qui concerne la MCT, pour me focaliser sur la MLT.

3. La mémoire à long terme

3.1. Contributions de la neuropsychologie

Ce sont les études neuropsychologiques de patients amnésiques qui ont contribué significativement à l'élaboration de plusieurs modèles d'organisation des différents systèmes de mémoire. Parmi ces études, c'est sans aucun doute l'examen neuropsychologique du patient Henry Molaison (Scoville et Milner, 1957), mieux connu sous les initiales H.M., qui a le plus influencé la modélisation des systèmes de MLT. Afin de remédier à des crises d'épilepsie très sévères, H.M. a subi une résection bilatérale des lobes temporaux médians (Figure 3). Suite à cette intervention chirurgicale, H.M. a développé une amnésie rétrograde, cette forme d'amnésie étant caractérisée par le fait que le patient ne se souvient plus des événements qui précèdent la lésion ayant causé l'amnésie, une amnésie qui peut remonter à quelques jours, quelques mois ou plusieurs années. Par ailleurs, H.M. souffrait également d'une amnésie antérograde, c'est-à-dire d'une incapacité à former de nouveaux souvenirs. Il était ainsi incapable de se souvenir des personnes qu'il venait de rencontrer ou d'une tâche qu'il venait d'accomplir, par exemple manger son repas. Néanmoins, sa capacité à retenir de l'information à très court terme était intacte, indiquant que le lobe temporal médian n'est pas nécessaire pour cette forme de mémoire.

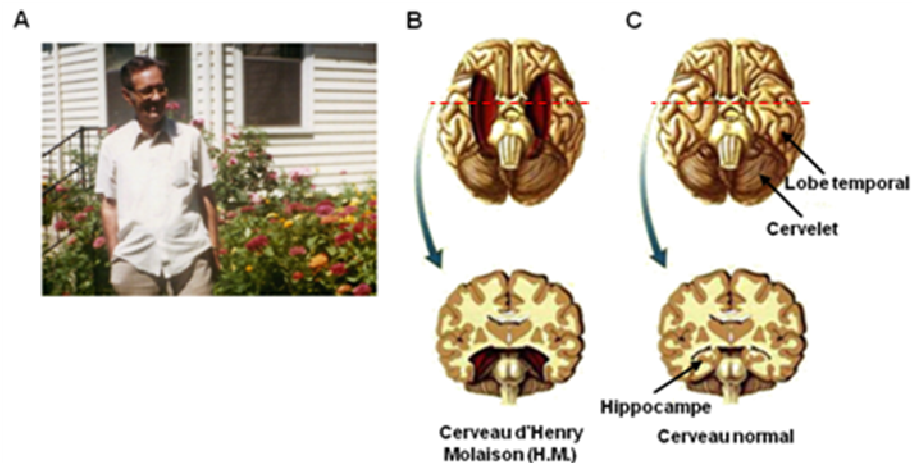


Figure 3 : A) Photo de H.M. (www.economist.com) B) Représentation du cerveau de H.M. et de l'extraction des lobes temporaux médians (zone rouge). C) Le lobe temporal médian chez l'Homme est composé de l'amygdale, de l'hippocampe, du cortex entorhinal, du cortex périrhinal, du subiculum, du présubiculum et du parasubiculum (Brewer et Moghedar, 2002). Image adaptée de www.delapsychologie.com.

Ces observations sont donc venues confirmer la dissociation entre le système de MCT et le système de MLT (voir Milner et coll., 1998, et Squire, 2009, pour revues). Par ailleurs, les capacités perceptives et intellectuelles de H.M. étaient préservées, suggérant d'une part que ces fonctions cérébrales sont dissociables des fonctions mnésiques, et d'autre part, que les fonctions cognitives préservées sont sous-tendues par d'autres régions cérébrales. Afin d'établir précisément le degré d'amnésie de H.M., la neuropsychologue Brenda Milner, qui a suivi ce patient pendant plus de 20 ans, lui a fait passer une batterie de tests neuropsychologiques, dont le test du dessin au miroir en 1962. Cette tâche, mettant en jeu des habiletés perceptivo-motrices, 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 de l'existence de plusieurs systèmes de MLT dans le cerveau (mémoire déclarative et mémoire non-déclarative), chacun de ces systèmes dépendant de structures cérébrales différentes.



Figure 4 : La tâche du dessin en miroir. Le sujet a pour objectif de dessiner 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 après atteinte des lobes temporaux médians. Image de lecerveau.mcgill.ca.

Il est apparu par la suite que la préservation de certains types de souvenirs chez H.M. s'étendait de façon générale aux habiletés motrices et cognitives, d'où la différenciation entre la mémoire déclarative ou explicite, atteinte chez H.M., et la mémoire non-déclarative ou implicite. Au fil des années et d'études d'autres patients amnésiques présentant des lésions similaires, une classification des sous-systèmes de la MLT a été établie.

3.2. Mémoire déclarative et mémoire non-déclarative

La mémoire telle que nous l'évoquons dans notre quotidien, c'est-à-dire cette faculté mentale nous permettant de nous souvenir des événements de notre vie, mais également des connaissances générales sur le monde qui nous entoure, est appelée mémoire déclarative. La caractéristique principale de ce système mnésique est que l'individu a conscience des informations rappelées, il peut ainsi les communiquer verbalement. La mémoire déclarative est composée de deux sous-systèmes que sont la mémoire sémantique et la mémoire épisodique (Figure 5). La mémoire épisodique est définie comme la mémoire des événements personnels, événements que l'on peut restituer temporellement et contextuellement. Ainsi, les informations stockées dans ce sous-système de la mémoire déclarative sont associées à un rappel conscient des expériences passées, soit l'événement à proprement parler, mais aussi où et quand ces expériences ont eu lieu. La mémoire épisodique nous permet ainsi de voyager mentalement dans le temps en nous remémorant les expériences personnellement vécues et en les utilisant pour imaginer ce que seront nos expériences à venir. La mémoire sémantique concerne les connaissances générales à la fois sur le monde et sur les concepts abstraits (par exemple, des règles de grammaire ou des opérations mathématiques) que nous retenons et qui ne sont pas associés lors de leur rappel à un contexte ou une période particulière de notre vie.

Alors que le rappel d'informations du système de mémoire déclarative fait référence à un rappel conscient et communicable, le mémoire non-déclarative, aussi appelée mémoire implicite, fait référence à un rappel non-conscient des informations. C'est ce système de mémoire qui nous permet d'apprendre des habiletés motrices, comme la conduite automobile ou le vélo. Ainsi, le rappel des séquences motrices permettant de conduire une voiture ou de rouler à vélo n'a pas besoin d'être conscient lors de l'exécution de la tâche.

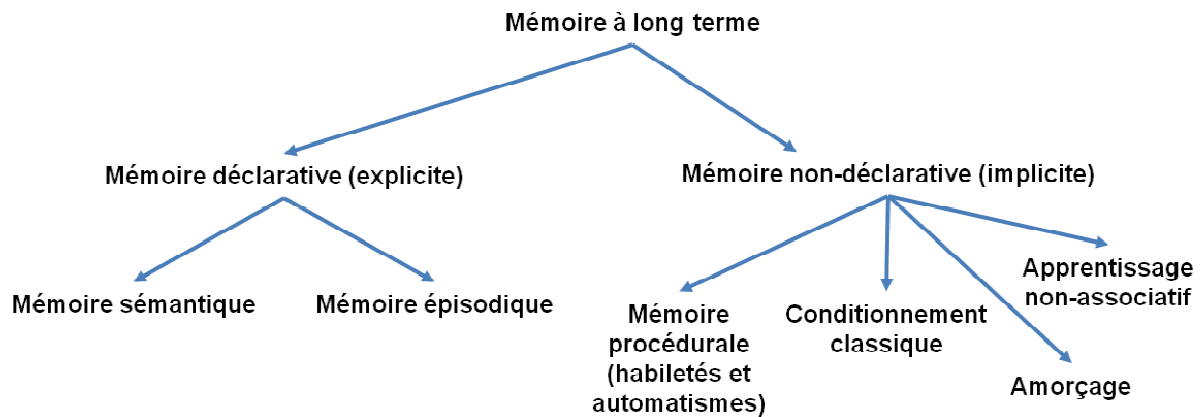


Figure 5 : Système de MLT et ses différents sous-systèmes (basé sur Squire et Zola-Morgan, 1991).

3.3. Modèles d'organisation des systèmes de mémoire

Différents auteurs ont proposé des modèles théoriques, qui sont pour la plupart des modèles structuro-fonctionnels, définissant plusieurs systèmes et leurs relations. Ainsi, selon Tulving, la mémoire s'organise en cinq principaux systèmes : la mémoire de travail, et parmi les mémoires à long terme, la mémoire procédurale, la mémoire perceptive, la mémoire sémantique et la mémoire épisodique, c'est le modèle SPI pour « Serial Parallel Independent » (Tulving, 1995, 2001). Le modèle SPI a pour originalité de préciser l'organisation et les relations entre les différents systèmes de mémoire. Cependant, parmi les limites de ce modèle, les liens avec la mémoire de travail ne sont pas précisés, ni ceux avec la mémoire procédurale. Le modèle SPI est plutôt centré sur les relations entre mémoire perceptive, mémoire sémantique et mémoire épisodique. Plus récemment, le modèle MNESIS (Memory NEoStructural Inter-Systemic model, Eustache et Desgranges, 2008) propose une synthèse des orientations théoriques actuellement pertinentes en neuropsychologie de la mémoire. La figure 6 représente un schéma des relations entre les différents systèmes de mémoire à court et à long terme proposé par Eustache et Desgranges en 2008. Sur la gauche de ce schéma, trois systèmes de représentations de la MLT (mémoire perceptive, mémoire sémantique et mémoire épisodique) sont intégrés de façon hiérarchique comme dans le modèle SPI élaboré

par Tulving (1995, 2001). Selon le modèle SPI, l'information serait d'abord encodée dans le système de représentation perceptive permettant ensuite la formation d'une mémoire sémantique. Enfin, l'encodage d'un souvenir de type épisodique serait permis par les représentations en mémoire sémantique. Dans ce modèle hiérarchisé, le stockage et le rappel des informations pour chaque système se feraient indépendamment les uns des autres. Sur le schéma représentant le modèle MNESIS (figure 6), la flèche rétroactive allant de la mémoire épisodique vers la mémoire sémantique indique que les souvenirs épisodiques peuvent subir un processus de sémantisation au fil du temps (certaines caractéristiques du temps et de l'espace s'affaiblissant). Ce processus ne concerne pas nécessairement tous les souvenirs. En effet, il existe de véritables souvenirs épisodiques (c'est-à-dire riches en détails contextuels et temporels) même pour un passé lointain (Piolino et coll., 2006). La seconde flèche rétroactive allant de la mémoire épisodique vers la mémoire perceptive représente l'une des formes de re-consolidation qui a lieu lorsque le rappel d'un souvenir épisodique active les représentations perceptives qui étaient associées à ce souvenir. La mémoire de travail occupe une position stratégique à l'interface entre les systèmes de MLT et la mémoire procédurale.

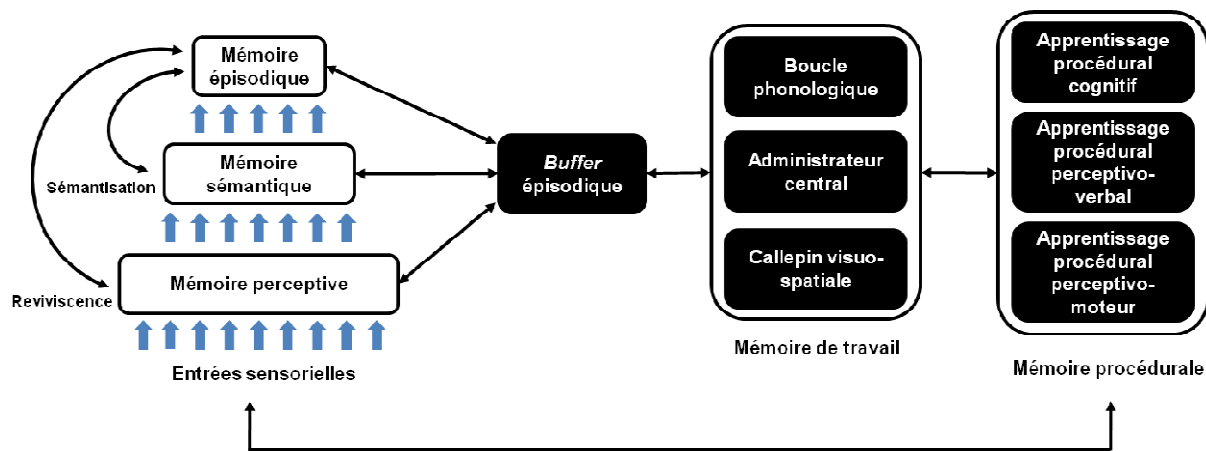


Figure 6 : MNESIS ou le Modèle NEOStructural InterSystémique décrit une synthèse des orientations théoriques les plus pertinentes en neuropsychologie de la mémoire. Ce modèle, qui comprend 5 systèmes de mémoire, intègre les concepts développés par Tulving (1995, 2001) et Baddeley (2000) et met l'accent sur les relations entre les différents systèmes afin de tenir compte de la nature dynamique et reconstructive de la mémoire humaine. Adapté du Schéma d'Eustache et Desgranges (2008).

Ainsi, d'une part, la mémoire de travail, via le *buffer* épisodique, aurait accès à des souvenirs de types épisodiques ou sémantiques et d'autre part, à des souvenirs procéduraux tels que des apprentissages perceptivo-cognitifs, perceptivo-verbaux ou perceptivo-moteurs. En rupture avec les modèles hiérarchisés et unidirectionnels des différents systèmes de mémoires (par exemple, le modèle SPI), le modèle MNESIS de par l'organisation des systèmes de

représentation à long terme, ainsi que leurs interactions, souligne au contraire le caractère dynamique et reconstitutif de la mémoire, l'influence qu'un système de mémoire peut avoir sur un autre (par exemple l'influence de nos souvenirs sur notre perception), ou encore les liens entre la mémoire de travail et la MLT.

Chapitre 2 : Mémoire spatiale et hippocampe

Chapitre 2 : Mémoire spatiale et hippocampe

Où, quand et comment sont stockés nos souvenirs ? Voilà maintenant plusieurs décennies que les neuroscientifiques cherchent à répondre à ces questions. S'il reste encore beaucoup à découvrir et à comprendre, les études de patients amnésiques ainsi que celles de modèles animaux d'amnésie humaine ont permis de mieux comprendre et d'identifier les composants anatomiques cérébraux sous-tendant la mémoire déclarative au sein du **lobe temporal médian**. Ce système cérébral comprend **l'hippocampe** (HPC) et ses structures adjacentes incluant le cortex entorhinal, le cortex périrhinal et la région parahippocampique. Ces structures sont apparues comme essentielles pour l'établissement d'une MLT des faits et des événements personnels (mémoire déclarative). L'HPC est également une structure fortement impliquée dans la **mémoire spatiale** qui, pour certaines au moins de ses caractéristiques, s'apparente à une mémoire épisodique (de type déclaratif). En effet, la mémoire épisodique comprend trois critères essentiels : le 'où', le 'quoi' et le 'quand' d'une expérience. Comme nous allons le voir dans ce chapitre, la mémoire spatiale chez l'animal permet de tester deux de ces trois critères : le 'où' et le 'quoi'. De plus, la mémoire spatiale allocentrique nécessite de créer des liens entre les divers indices d'un environnement (Aggleton et Pearce, 2001), processus similaire dans la mémoire épisodique. Etant donnée l'impossibilité de pouvoir tester, chez l'animal, l'aspect conscient de la mémoire épisodique, la mémoire spatiale est appelée mémoire de type épisodique ou '*episodic-like*'. Au cours de ma thèse, la majeure partie de mon travail était focalisé sur la mémoire spatiale et les structures qui sous-tendent l'acquisition, la consolidation et le rappel de ce type d'informations chez le Rat.

1. La mémoire spatiale

1.1. Définition

Qu'est ce que la mémoire spatiale ? C'est la mémoire des lieux, des espaces, des parcours que l'on apprend pour aller de notre maison à notre lieu de travail et que nous pouvons réaliser de façon presque automatique. C'est la mémoire spatiale qui nous permet de nous rappeler où nous avons laissé nos clés, ou plus formellement, de localiser un objectif à atteindre en tenant compte de la disposition relative d'autres objets par rapport à cet objectif. La mémoire spatiale est indispensable à un très grand nombre d'espèces animales. Retrouver sa tanière, son garde-manger, pouvoir se mettre rapidement à l'abri d'un prédateur sont autant de

circonstances où l'animal fait appel à ce type de mémoire. De plus, au regard des données expérimentales et cliniques provenant d'études menées chez l'Homme, le Primate et le Rongeur, les processus de traitement des informations relatives à l'espace, l'acquisition d'informations spatiales permettant ainsi la navigation et l'orientation dans un environnement, pourraient être similaires chez l'Homme et l'animal.

1.2. Nature des informations spatiales

En 1978, O'Keefe et Nadel proposent que la navigation du Rat dans son environnement est sous-tendue par deux systèmes de navigation spatiale : un système de « routes » (*taxon system*), basé sur les informations relatives au corps de l'animal ou **égocentriques**, et un système de « cartes » (*local system*), basé sur les informations **allocentriques** relatives aux relations entre les éléments visuels distaux et ceux du but à atteindre. Ces deux systèmes de représentations, égocentrique et allocentrique, existent en parallèle et leur utilisation permet à l'animal d'adapter ses déplacements de façon optimale pour atteindre un objectif dans son environnement (Burgess, 2006).

Les informations égocentriques

Les informations égocentriques proviennent de la perception que l'animal a de son corps, c'est-à-dire les informations vestibulaires et kinesthésiques relatives à la position du corps et à ses déplacements dans l'environnement. Les informations égocentriques permettent ainsi d'atteindre un but en suivant une succession de mouvements du corps. Par analogie avec l'Homme, ceci reviendrait à suivre les indications d'un GPS lors d'une promenade : par exemple, marcher 10 mètres puis tourner à gauche à la première intersection, marcher 40 mètres et tourner à droite etc. Si l'utilisation des informations égocentriques permet ainsi d'atteindre un but en suivant la même route à chaque fois, ce type de représentation est toutefois peu flexible. En effet, le simple changement de point de départ ou la confrontation avec une route barrée rend la stratégie caduque, l'individu ou l'animal serait alors perdu.

Les informations allocentriques

Les informations allocentriques concernent la configuration de repères perceptibles extra-corporels et de leurs liens spatiaux avec le but à atteindre. L'utilisation de ces informations allocentriques permet ainsi de créer des relations spatiales entre divers indices pour former une représentation mentale de l'environnement qui ne dépend pas de la position du corps. Ce type de représentation correspond à la « carte cognitive » décrite par O'Keefe et Nadel (1978), dont une partie des contributions théoriques s'appuie fortement sur les recherches menées

initialement par Tolman (1948). La théorie de la carte cognitive propose que l'HPC du Rat, ainsi que celui d'autres espèces, soit le substrat anatomique sous-tendant la représentation de l'environnement, de son contenu et des différentes localisations au sein de celui-ci. Les représentations de nature allocentrique sont caractérisées par une très grande flexibilité : plusieurs routes peuvent être générées pour accéder au but final. Ainsi, un étudiant de l'Université de Strasbourg pouvant avoir recours à une stratégie d'utilisation d'informations allocentriques, est capable de rejoindre le Palais Universitaire de la façon la plus directe possible quel que soit le point de départ sur le Campus de l'Esplanade.

1.3. Traitements des informations spatiales

En 1979, Olton et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence, chez le Rat, de différents types d'opérations pouvant être effectuées à partir d'informations spatiales. Ces auteurs font la distinction entre la **mémoire de référence** faisant partie du système de MLT et la **mémoire spatiale de travail**.

La mémoire de référence concerne les règles générales propres à une situation. Les informations restent constantes dans le temps et leur utilisation devient ainsi pertinente pour une même situation toutes les fois que celle-ci est rencontrée.

La mémoire spatiale de travail concerne le stockage d'informations spécifiques à une situation donnée et qui ne sont pertinentes que sur une durée de temps limitée.

2. Base anatomique des représentations spatiales

Trouver son chemin dans un environnement et se souvenir des événements qui s'y sont produits sont des fonctions cognitives cruciales qui ont été attribuées au lobe temporal médian et plus particulièrement à l'HPC.

2.1. L'hippocampe

Description anatomique

L'HPC est une structure bilatérale, logée dans chaque hémisphère cérébral sous les portions temporales et postérieures du néocortex. Chez le Rat, l'HPC, qui s'étale sur une longueur de 10 mm, une largeur de 3,5 mm et une épaisseur de 1,5 à 2 mm est formé de deux structures en forme de U inversés, le gyrus denté et la corne d'Ammon. Sur la base de différences morphologiques et de ses connexions synaptiques, la corne d'Ammon (CA) est encore

subdivisée en trois parties : CA3, CA2 et CA1.

On peut distinguer deux axes pour le définir : un axe antéro-postérieur, appelé également axe septo-temporal et un axe médio-latéral (figure 7).

La dénomination de l'axe septo-temporal laisse deviner la forme incurvée de l'HPC semblable à une corne, d'où son autre nom : la corne d'Ammon. En effet, l'extrémité antérieure de cette corne (le pôle septal) se détache de sa position dorso-médiane, où elle est en contact avec son homologue controlatéral, pour se diriger vers l'arrière. Tout en s'éloignant de l'axe médian, l'HPC se recourbe pour atteindre sa position ventro-latérale (pôle temporal). Cette forme particulière permet de distinguer un HPC dit dorsal, d'un HPC dit ventral. Plus récemment a été introduit le terme d'HPC intermédiaire pour désigner la partie de l'HPC se trouvant entre l'HPC dorsal et l'HPC ventral. Ce découpage anatomique de l'HPC en trois sous-régions - dorsale, intermédiaire et ventrale - est sous-tendu par une cartographie de l'expression génétique qui montre que chacune de ces sous-parties hippocampiques possède des domaines moléculaires qui permettent de les distinguer les unes des autres (Fanselow et Dong, 2010).

L'HPC dorsal est bordé antérieurement par le septum, postérieurement par la partie la plus dorsale du cortex entorhinal, ventralement par le thalamus, dorsalement et dorsolatéralement par le cortex pariétal et une partie du cortex occipital. Les HPC droit et gauche sont reliés par le corps calleux.

L'HPC ventral est bordé antérieurement par la corne postérieure du ventricule latéral, postérieurement et latéralement par les parties temporale, occipitale et pariétale du cortex. Il se termine au contact de l'amygdale à proximité du cortex piriforme.

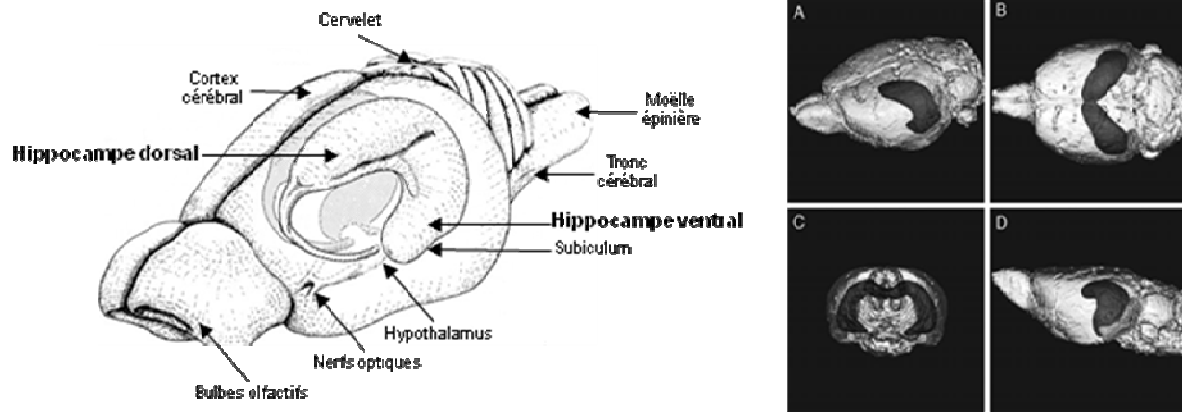


Figure 7 : Le dessin de gauche représente le cerveau d'un rat au sein duquel l'HPC est mis en avant. A droite, l'image du cerveau d'un rat obtenue par résonances magnétiques (IRM). Sur ces images, l'HPC est en noir avec une vue du cerveau en orientation oblique (A), une vue dorsale (B), frontale (C), et latérale (D) (Photographies extraites de *The Hippocampus Book*, édition 2007).

Description morphologique de l'hippocampe

L'HPC 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. Elle est formée par les dendrites apicales des cellules granulaires et pyramidales ainsi que leurs afférences.

Connexions de l'hippocampe

Les principales afférences et efférences, de même que les connexions intrinsèques de l'HPC sont schématisées sur la figure 8. La principale source d'afférences à l'HPC est le cortex entorhinal, avec ce que l'on appelle la **boucle trisynaptique**. Via la voie perforante, les neurones du cortex entorhinal envoient des informations sur l'environnement en provenance des aires corticales sensorielles et associatives vers les cellules granulaires du gyrus denté et pyramidales de CA3. 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 ; van Strien et coll., 2009).

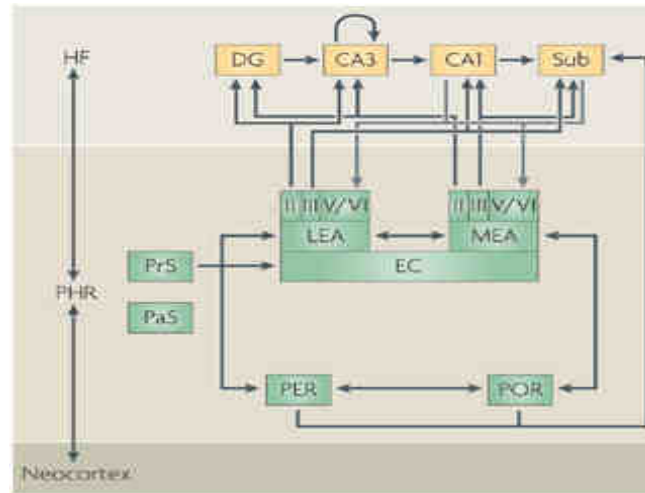


Figure 8 : Ce schéma, extrait de la revue publiée en 2009 par van Strien et ses collaborateurs, représente les principales connexions intrinsèques et extrinsèques de l'HPC et de la région parahippocampique. Les neurones du néocortex projettent vers le cortex parahippocampique (PHR) qui projette à son tour vers la formation hippocampique (HF). Au sein du PHR deux projections en parallèles sont distinguées : le cortex périrhinal (PER) qui projette vers le cortex entorhinal latéral (LEA) et le cortex postrhinal (POR) qui projette vers le cortex entorhinal médian (MEA). Les connexions entre le cortex entorhinal (EC) et les cortex PER et POR sont réciproques. De plus, l'EC reçoit des afférences du présubiculum (PrS). L'EC est à l'origine de la voie perforante qui projette vers toutes les sous-régions hippocampiques. La couche II du EC projette vers le gyrus denté (DG) et CA3 tandis que la couche III du EC projette vers CA1 et le subiculum (Sub). La voie polysynaptique, traditionnellement appelée la **boucle tri-synaptique**, décrit des connexions qui relient séquentiellement chaque sous-région hippocampique. En résumé, les cellules granulaires du DG donnent naissance aux fibres moussues qui projettent vers CA3 qui via les collatérales de Schaffer projettent vers CA1 et enfin, les cellules pyramidales de CA1 projettent vers le Sub. Les efférences d'HF ont pour origine CA1 et Sub et sont dirigées vers le PHR, en particulier vers les couches profondes du cortex entorhinal. Les chiffres romains indiquent les couches corticales.

2.2. Hippocampe et mémoire spatiale

L'HPC occupe une place centrale dans bon nombre d'études neurobiologiques sur la mémoire depuis la description par Scoville et Milner, en 1957, d'une amnésie sévère suite à l'ablation bilatérale des lobes temporaux médians. Les déficits de mémoire spatiale et épisodique sont souvent les premiers symptômes que manifestent des patients ayant des atteintes des lobes temporaux médians dues à des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer (Kolb et Whishaw, 1996). L'avis de l'ensemble de la communauté scientifique est maintenant unanime concernant l'implication de l'HPC dans la mémoire épisodique (Eichenbaum et Cohen, 2001 ; Kinsbourne et Wood, 1975 ; O'Keefe et Nadel, 1978 ; Squire et Zola-Morgan, 1991 ; Vargha-Khadem et coll., 1997), c'est-à-dire la mémoire des expériences personnelles associées à un contexte spatio-temporel (Tulving, 1983). De la même manière, les auteurs s'accordent sur l'implication de l'HPC des espèces non-primates dans la mémoire spatiale (Eichenbaum et Cohen, 2001 ; Morris et coll., 1982 ; O'Keefe and Nadel, 1978), et ce rôle dans le traitement

des informations spatiales semblerait être similaire à celui qui est à l'œuvre chez l'Homme (Abrahams et coll., 1999 ; Maguire et coll., 1996, 1998, 1999 ; Spiers et coll., 2001 ; Vargha-Khadem et coll., 1997). Parmi les différentes études mettant en évidence l'implication de l'HPC dans la mémoire spatiale chez l'Homme, celle de Maguire et coll. en 2000, est l'une des plus célèbres. Ces auteurs, grâce à l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), ont étudié l'anatomie cérébrale des chauffeurs de taxi Londoniens ayant plus ou moins d'expérience professionnelle. Les résultats de cette étude ont montré que le volume de l'HPC postérieur des chauffeurs de taxi (l'équivalent de l'HPC dorsal chez le Rat) était significativement supérieur à celui des témoins exerçant une autre profession. A l'inverse, le volume de l'HPC antérieur des chauffeurs de taxi était plus petit que celui des témoins. Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence une corrélation entre le nombre d'années d'expérience professionnelle et le volume de l'HPC droit, renforçant l'idée du rôle prépondérant de cette structure dans la navigation et la mémoire spatiale. De nombreuses études en imagerie chez l'Homme sain ont également été effectuées dans des environnements virtuels et ont permis de mettre en évidence une activation de l'HPC soit au cours de la navigation spatiale (Maguire et coll., 1997 ; Mayes et coll., 2004 ; Parslow et coll., 2004), soit dans des protocoles distinguant les stratégies allocentriques des réponses de type droite/gauche (Bohbot et coll., 2004), soit encore après l'apprentissage dans un environnement réel (Mellet et coll., 2000).

En 1971, John O'Keefe et John Dostrovsky ont fait une découverte qui a constitué l'un des arguments majeurs quant à l'implication de l'HPC dans la mémoire spatiale. Ces auteurs ont enregistré l'activité neuronale unitaire dans l'HPC de rats et se sont alors rendu compte qu'un certain nombre de neurones, silencieux la plupart du temps, présentaient des bouffées de décharges électriques soudaines, appelées potentiel d'action, lorsque l'animal se trouvait à certains emplacements de l'environnement. Cette découverte amena par la suite O'Keefe à utiliser la terminologie de « **cellule de lieu** ». Les cellules de lieu sont présentes à la fois dans les régions CA1 et CA3 de l'HPC dorsal et ventral (O'Keefe et Dostrovsky, 1971 ; Poucet et coll., 1994) et représentent environ 50 % du million de neurones pyramidaux qui constituent la principale classe de cellules dans l'HPC. Si les décharges enregistrées dans les cellules de lieu sont fortement modulées par les informations visuelles, elles le sont également par les informations olfactives, proprioceptives, vestibulaires, idiothétiques au sens large. Leur champ d'activité, soit la zone de l'environnement dans laquelle leur décharge est intense, peut être de forme et de taille variable, couvrant 10 à 50 % de l'environnement exploré. Ces

champs d'activité sont formés en quelques minutes et restent stables dans le temps pendant des semaines, formant ainsi un substrat cellulaire à la mémoire spatiale. L'activité des cellules de lieu est flexible ; en effet, lorsqu'on replace l'animal dans un environnement différent, l'activité des cellules se réadapte en variant la forme ou l'intensité de leur champ d'activité. Ce phénomène est appelé *remapping* (Muller et Kubie, 1987 ; Wilson et McNaughton, 1993).

2.3. Ségrégation anatomique des fonctions hippocampiques

En 1998, Moser et Moser suggèrent que les différentes sous-régions hippocampiques (partie dorsale ou septale vs. partie ventrale ou temporale) ne seraient pas impliquées de manière équivalente dans les processus sous-tendant la mémoire spatiale. Leur hypothèse est fondée sur trois arguments.

Le premier argument est basé sur des études anatomiques qui suggèrent que les connexions afférentes et efférentes de l'HPC dorsal et ventral sont distinctes (Amaral et Witter, 1989 ; Fanselow et Dong, 2010 ; Petrovich et coll., 2001 ; Risold et Swanson, 1996 ; Swanson et Cowan, 1977 ; Witter et Amaral, 2004). En effet, l'existence d'un gradient anatomique concernant la précision de l'encodage d'informations visuo-spatiales, le long de l'axe longitudinal ou septo-temporal de l'HPC, est directement liée à ces différences anatomiques. Les connexions principales de l'HPC, notamment avec le cortex entorhinal, sont organisées selon un gradient topographique allant du pôle septal au pôle temporal. Sur la base de ce gradient peuvent être distinguées trois sous-régions hippocampiques possédant des connexions distinctes : une partie dorsale, ventrale et une partie intermédiaire qui partage certaines caractéristiques avec ses deux sous-régions voisines. En ce qui concerne la précision du codage visuo-spatial, il est important de noter que l'HPC, de sa partie dorsale à intermédiaire, possède de fortes connexions avec la région dorso-latérale du cortex entorhinal, région qui reçoit de façon privilégiée des informations visuo-spatiales en provenance du cortex et qui possède des neurones, appelées cellule de la grille (voir paragraphe suivant : Autres structures impliquées dans la mémoire spatiale), qui représentent les informations visuo-spatiales avec une très bonne précision en comparaison avec les cellules de la grille présentes dans la région ventro-médiane du cortex entorhinal, région connectée avec la partie ventrale de l'HPC (Brun et coll., 2008 ; Dolgoro et Amaral, 1998 ; Fyhn et coll., 2004 ; McNaughton et coll., 2006). De plus, les cellules de lieux présentes dans la partie dorsale de l'HPC possèdent des champs d'activités plus précis par rapport aux champs d'activités des cellules de lieux des neurones de la partie ventrale de l'HPC (Colombo et coll., 1998 ; Deadwyler et Hampson, 1999 ; Jung et coll., 1994 ; Kjelstrup et coll., 2008 ; Moser et Moser,

1998 ; Poucet et coll., 1994).

Le second des arguments annoncés est fondé en partie sur les résultats obtenus par Moser et Moser (1995) concernant les effets de lésions partielles de l'HPC dans un test évaluant la mémoire spatiale chez le Rat. Dans cette expérience, des rats étaient évalués dans le test de la piscine de Morris. Dans ce test, l'objectif pour l'animal est de retrouver une plate-forme immergée dans de l'eau opacifiée en s'aidant des indices visuels présents dans la pièce. Des rats ayant subi des lésions de l'HPC dorsal montrent une incapacité à acquérir cette tâche alors qu'une lésion de l'HPC ventral n'a pas perturbé les performances des rats (Moser et Moser, 1995).

Troisièmement, et c'est le dernier argument, les lésions de l'HPC ventral, et non de l'HPC dorsal, altèrent les réponses comportementales émotionnelles. Par exemple, Henke (1990) a observé que des lésions de l'HPC ventral provoquaient une augmentation des ulcères lors d'un protocole de stress induit par une contention de l'animal. De plus, Kjelstrup et ses collaborateurs (2002) ont montré chez le Rat que des lésions de la partie ventrale de l'HPC augmentaient le nombre de visites des branches ouvertes (sans paroi ou non protégées) dans un labyrinthe en croix sur-élevé et diminuait le nombre de leurs défécations dans un environnement bien éclairé. Ces données expérimentales sont à mettre en relation avec les connexions de l'HPC ventral avec l'amygdale, l'hypothalamus et l'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien (Jay et coll., 1989).

Toutefois, l'HPC ventral pourrait également contribuer au rappel d'une information spatiale. En effet, certains travaux expérimentaux ont montré que l'HPC ventral seul peut permettre l'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale en piscine de Morris, à condition que le protocole classique soit quelque peu adapté (De Hoz et coll., 2003). D'autre part, en ce qui concerne le rôle de l'HPC ventral dans la MLT, Gusev et al. (2005) montrent chez le Rat que dans un test de mémoire spatiale en piscine de Morris, l'HPC ventral serait engagé dans le rappel d'un souvenir récent, mais non dans celui d'un souvenir ancien. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé l'imagerie cellulaire du gène précoce Arc/Arg 3.1. Enfin, la lésion de l'HPC ventral chez le Rat affecte le rappel aussi bien à court qu'à long terme, mais dans un test de peur conditionnée au contexte (Sutherland et coll., 2008), et donc un test à forte connotation émotionnelle.

2.4. Autres structures impliquées dans la mémoire spatiale

Si l'HPC joue un rôle prédominant dans la mémoire spatiale, il est important de noter que d'autres régions participent au processus mnésique sous-tendant ce type de mémoire. Ainsi, les données de la littérature, les évaluations neuropsychologiques, de même que les études en imagerie suggèrent l'implication du **cortex parahippocampique** dans l'acquisition de la mémoire spatiale (Barrash et coll., 2000 ; Habib et Sirigu, 1987). Chez le rongeur, une lésion complète du **cortex rétrosplénial** aboutit à une altération des capacités de navigation sur la base de repères allocentriques (Vann et Aggleton, 2002, 2004). La découverte de la présence de **cellules de direction** de la tête chez l'animal dans le cortex rétrosplénial est un argument supplémentaire en faveur de l'implication de cette région dans la mémoire spatiale. En effet, ces cellules constituent une autre classe de cellules présentant une activité spatiale. Initialement découvertes dans le présubiculum dorsal (Ranck, 1984), elles sont également présentes au sein de l'HPC et dans d'autres structures connectées au présubiculum comme, par exemple, les noyaux thalamiques antérieurs (Taube, 1998). Ces cellules ont la particularité de décharger quand l'animal oriente sa tête dans une direction spécifique, indépendamment de sa position et de son comportement, fournissant ainsi une sorte de « boussole » à la carte cognitive. Le **cortex pariétal** semble également constituer l'une des structures importantes dans la navigation spatiale (pour revue voir : Save et Poucet, 2000 ; 2009). Des études de cas cliniques décrivent depuis plusieurs décennies une altération de l'apprentissage spatial et une désorientation dans les lieux familiers suite à une lésion du cortex pariétal droit ou bilatéral (De Renzi, 1962 ; Kase et coll., 1977). Le cortex pariétal serait le support des informations spatiales égocentriques (Aguirre et D'Esposito, 1999 ; Levine et coll., 1985) plutôt qu'allocentriques (Teng et Squire, 1999). De plus, chez le rongeur, des lésions du **striatum dorso-latéral** perturbent les capacités cognitives des animaux lorsqu'ils sont soumis à des tests d'évaluation de la mémoire spatiale. Cette structure extra-hippocampique semblerait également impliquée dans l'intégration des informations spatiales égocentriques (McDonald et White, 1994 ; Packard et McGaugh, 1992 ; Packard et McGaugh, 1996). Enfin, la découverte récente des '*grid cells*' et des '*goal-directed cells*' fournit de nouveaux éléments pour la compréhension de la navigation spatiale. Découvertes en 2004 par un groupe de chercheurs norvégiens (Fyhn et coll., 2004 ; Hafting et coll., 2005), les '*grid cells*' ou cellules de la grille sont des neurones mis en évidence au sein du **cortex entorhinal** et qui ont pour principale caractéristique de générer des potentiels d'actions pour plusieurs points de l'espace, répartis régulièrement dans l'environnement que l'animal est en train d'explorer. Cette activité particulière forme une sorte de grille hexagonale, d'où leur appellation de cellule de la

grille. Ces cellules pourraient fournir à l'animal un cadre de référence métrique lui permettant de s'orienter dans son environnement, un espace euclidien, en somme. Au même moment, un groupe de chercheurs français (Hok et coll., 2005) découvre au sein du **cortex préfrontal médian** du Rat des cellules qui s'activent à l'endroit précis de la localisation d'un objectif à atteindre dans l'environnement qu'explore le rat. Ces cellules sont appelées '*goal-directed cells*' ou les cellules dirigées vers un objectif.

Ainsi, la navigation spatiale met en jeu un réseau distribué au sein de plusieurs régions cérébrales, possédant chacune des neurones ayant des propriétés différentes, et qui en communiquant les unes avec les autres, permettent à l'animal de naviguer dans un environnement et de pouvoir s'y repérer pour atteindre un ou plusieurs objectifs.

3. Evaluation de la mémoire spatiale chez le Rat

La mémoire spatiale des rongeurs, et en particulier celle du Rat, peut être évaluée à l'aide de nombreux tests. L'un des plus utilisés dans la littérature est celui de la piscine de Morris, et c'est celui que j'ai utilisé dans la majeure partie de mes expériences de thèse. J'ai également utilisé un second test, le labyrinthe du Double-H, récemment mis au point au sein du laboratoire (Cassel et coll., 2012 ; Pol Bodetto et coll., 2011), et qui permet d'étudier, chez le rongeur, les capacités d'utilisation d'une stratégie égocentrique et allocentrique, ainsi que le passage de l'une à l'autre stratégie au sein d'une même session de rappel.

3.1. Le test de la piscine de Morris

Le test de la piscine de Morris, développé par Richard Morris en 1981, est fondé sur la tendance naturelle du Rat à s'échapper de l'eau (qui a un caractère aversif pour lui lorsque la température de l'eau est fraîche) et sur ses excellentes capacités natatoires. Le dispositif du test consiste en un bassin rempli d'eau froide (21°C) opacifiée par l'ajout de lait en poudre. Une plate-forme immergée juste sous la surface de l'eau est placée dans un endroit de la piscine. L'objectif pour le rat sera de nager le plus rapidement possible vers la plate-forme afin de s'extraire de l'eau froide. Pendant la phase d'apprentissage de la tâche, le rat sera placé plusieurs fois dans la piscine pour qu'il apprenne, au fur et à mesure des essais et des jours, l'emplacement de la plate-forme. Un apprentissage se caractérise par une diminution progressive conjointe de la latence d'arrivée à la plate-forme et de la distance parcourue jusqu'à celle-ci au fil des jours. Pour évaluer le souvenir de la localisation de la plate-forme, un test de rétention d'une durée de 60 secondes est réalisé. Lors de ce test, la plate-forme est

retirée du dispositif. La surface de la piscine est alors divisée en 4 quadrants virtuels et le temps passé dans chaque quadrant est mesuré. Un rat qui n'aurait pas mémorisé ou qui ne pourrait pas se rappeler la localisation de la plate-forme passera autant de temps dans les quatre quadrants, soit 25 % du temps total dans le quadrant cible (celui où se situait la plate-forme lors de l'apprentissage). En revanche, lorsque l'animal se souvient de l'emplacement de celle-ci, il nagera préférentiellement dans le quadrant cible et passera plus de 25 % du temps total dans ce quadrant. Une autre variable couramment mesurée est le nombre de passages effectués dans une zone virtuelle centrée sur la plate-forme et élargie d'un anneau de 10 cm. Cette analyse permet de se faire une idée du degré de précision du rappel. Afin de vérifier certains paramètres non-mnésiques pouvant influencer les performances du rat dans la piscine, il est également possible d'effectuer un test avec une plate-forme visible. Cela permettra de vérifier certains facteurs tels que la motivation à rejoindre la plate-forme, de même que les capacités visuelles et sensori-motrices de l'animal (D'Hooge et coll., 2001).

Deux protocoles différents sont classiquement utilisés dans ce test, l'un permettant d'évaluer la **mémoire de travail** et l'autre la **mémoire spatiale de référence**. Lors de la mise en œuvre d'un protocole évaluant la mémoire de travail, les informations acquises ne sont valables que pour une partie de l'expérience. Concrètement, la localisation de la plate-forme change d'un jour sur l'autre. Le rat doit donc utiliser les informations acquises lors du premier essai de chaque jour pour retrouver la plate-forme. Lorsque l'on évalue la mémoire de travail dans ce type de tâche, il est important que le point de départ change d'un essai à l'autre afin de favoriser l'utilisation d'une stratégie allocentrique. Dans le protocole de mémoire de référence, la plate-forme immergée reste à la même place pendant toute la durée de l'apprentissage (d'essai en essai et de jour en jour). Ainsi les informations acquises lors du premier jour restent valables les jours suivants. Ce type de protocole est utilisé pour étudier la MLT et c'est celui que j'ai mis en œuvre lors de mes expériences. De même que dans le cas du protocole de mémoire de travail, pour favoriser la stratégie allocentrique, les rats devront être lâchés de points de départ différents à chaque essai. Ce protocole de mémoire de référence favorise ainsi l'intégration des relations entre les éléments distaux situés à l'extérieur de la piscine (géométrie de la salle, objets de la pièce comme les fenêtres, des posters sur les murs...) et la position de la plate-forme. L'apprentissage de la tâche peut être décomposé en une composante spatiale et une composante procédurale (Baldi et coll., 2003 ; Hodges, 1996). En effet, le rat apprend d'une part la localisation de la plate-forme (où chercher) et d'autre part la stratégie la plus efficace pour la retrouver (comment chercher).

L'un des indices comportementaux permettant d'évaluer l'amélioration de la stratégie utilisée par le rat est ce que l'on appelle la thigmotaxie, c'est-à-dire le comportement qui consiste à nager le long des parois du dispositif. Au fur et à mesure des essais, l'animal passera moins de temps à longer les parois de la piscine pour chercher plus au centre et donc optimiser ses chances de la retrouver.

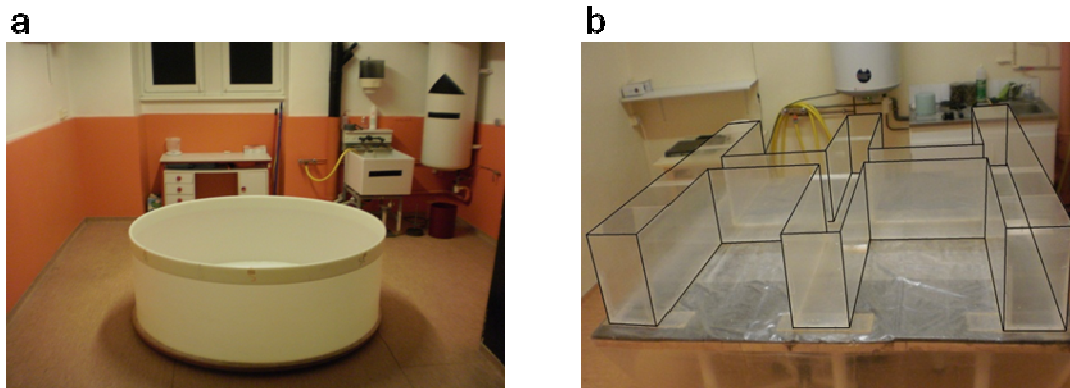


Figure 9 : Photographies des dispositifs de la piscine de Morris (a) et du labyrinthe en Double-H (b).

3.3. Labyrinthe du double-H

Le labyrinthe du double-H a été créé au sein du laboratoire par Jean-Christophe Cassel. Son objectif était d'élaborer un test permettant d'être suffisamment « simple » pour que l'acquisition d'une mémoire spatiale se fasse en peu de sessions, permettre de forcer un apprentissage basé sur des informations de nature allocentrique ou sur des informations égocentriques, et d'établir une mémoire dont le déclin est minimal au cours du temps en vue d'étudier les processus de consolidation à long terme d'une mémoire spatiale ou procédurale (Cassel et coll., 2012 ; Pol-Bodetto et coll., 2011 ; Schumacher, 2011). Ainsi, le dispositif du double-H consiste en un labyrinthe aquatique propre à évaluer la mise en place d'une mémoire spatiale et/ou procédurale chez le rongeur dans une situation aversive. Le dispositif consiste en une allée horizontale reliant trois allées verticales (tels 2 H contigus vus du dessus). Tout comme dans la piscine de Morris, la tâche pour l'animal consiste à apprendre la localisation d'une plate-forme immergée en utilisant les indices visuels externes au dispositif (stratégie allocentrique) ou en répétant tous les jours le même trajet (stratégie égocentrique). Le principal avantage de ce dispositif est la possibilité pour l'expérimentateur de favoriser l'engagement d'une stratégie allocentrique ou égocentrique, en fonction du protocole d'apprentissage utilisé et ceci en un minimum de temps (2 à 4 sessions). Ainsi, si l'animal est introduit dans le dispositif à différents endroits, mais que la plate-forme reste toujours à la même place, la stratégie la plus efficace pour l'animal est une stratégie allocentrique. A

l'inverse, lorsque l'animal est systématiquement introduit à partir de la même branche et que la plate-forme ne change pas de place, la répétition de la tâche favorise l'utilisation d'une stratégie égocentrique. Après la phase d'acquisition, un test de rétention est réalisé. Lors de ce test, la plate-forme est retirée du dispositif et le comportement du rat est analysé pendant une durée de 60 sec. Les variables principales mesurées dans ce test sont le parcours du rat, la première et la seconde branche choisies par les rats ainsi que le temps passé dans chacune des branches. Le rat est lâché d'une branche différente de celles utilisées lors de l'acquisition dans l'optique de mettre en évidence soit l'utilisation d'une stratégie égocentrique, soit celle d'une stratégie allocentrique, voire le passage d'une stratégie à l'autre après la première erreur. Si le rat utilise une stratégie égocentrique, le point de départ lors du test étant différent, son premier parcours le mènera vers une branche différente de celle où était localisée la plate-forme lors de l'acquisition (appelé branche cible). En revanche, si le rat utilise préférentiellement une stratégie de type allocentrique, la première branche choisie sera la branche cible, le rat passera ainsi significativement plus de temps dans cette branche. Si le rat passe d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique, son premier parcours le mènera vers une branche différente de la branche cible, puis il se dirigera vers la branche cible dans laquelle il passera significativement plus de temps que dans les autres branches pour (plus de détails, voir la section 'Matériels et Méthodes'). Les particularités de ce protocole nous ont permis de mettre en évidence l'implication des noyaux Re et Rh du thalamus dans les changements de stratégie et dans la flexibilité comportementale (Publication 3).

Chapitre 3 :

La consolidation

systemique

Chapitre 3 : La consolidation systémique

Les souvenirs des personnes qui nous sont familières, des lieux que nous connaissons, des événements que nous vivons définissent qui nous sommes. Ils construisent littéralement l'identité de chaque individu. Ces souvenirs ne sont cependant pas formés instantanément. Ils vont progressivement passer d'un état initial instable (susceptibles d'être perturbés, oubliés) à un état permanent, stable. Dans le domaine des théories et des recherches sur la mémoire, ce processus progressif de stabilisation de la MLT et qui débute juste après l'acquisition d'un événement est appelé la **consolidation** (Dudai, 2004). Le terme 'consolidation' est attribué à Muller et Pilzecker, qui, en effectuant l'analyse d'une série d'études réalisées à Göttingen entre 1892 et 1900, mettent en évidence le fait que la stabilisation de la mémoire dans le temps n'est pas un phénomène instantané (Muller et Pilzecker, 1900). Cette évidence est fondée sur la recherche systématique des lois qui gouvernent l'acquisition et le rappel de matériel verbal, comme l'avait commencé Ebbinghaus (1885). Muller et Pilzecker ont montré dans leur étude que si le rappel correct des items verbaux s'améliorait après les premières minutes d'acquisition, lorsque de nouveaux items étaient présentés juste après le premier apprentissage, le rappel correct des premiers items encodés était moins bon (un phénomène qu'il nomme une « rétroaction inhibitrice »). Ils ont suggéré que ce phénomène reflète une période post-acquisition durant laquelle les nouvelles informations sont en cours de consolidation, la perturbation de cette phase par l'apprentissage de nouveaux items entraînant une fixation moins bonne des premiers items présentés (Müller et Pilzecker, 1900).

Peu de temps avant que Müller et Pilzecker introduisent le terme de consolidation, ce phénomène avait également été proposé sur la base de données cliniques. Dans les amnésies globales d'origine organique, la mémoire des événements récemment acquis est généralement beaucoup plus atteinte que la mémoire d'événements plus anciens ; cette observation est résumée dans ce que l'on appelle la **loi (ou gradient) de Ribot**, ou encore loi de régression : la détérioration de la mémoire allant toujours des souvenirs les plus instables (souvenirs d'acquisition récente) aux souvenirs les plus stables (souvenirs d'acquisition plus ancienne) (Ribot, 1882).

Le terme de 'consolidation' dans la littérature en neurosciences fait référence à deux types ou familles de processus. La première catégorie de processus est accomplie entre les premières minutes ou heures après que l'encodage ait eu lieu. Ces processus relativement rapides ont

lieu dans des régions précises au sein des réseaux neuronaux qui ont été impliqués dans l'encodage de la représentation mnésique. Beaucoup d'études ont été focalisées sur les processus et mécanismes de cette consolidation au niveau des synapses, donnant lieu au terme de **consolidation synaptique**. La consolidation synaptique ne sera évoquée dans ce chapitre que brièvement.

Un autre type de processus de consolidation prend plusieurs semaines, plusieurs mois voire plusieurs années pour être accompli. Ce processus renvoie à la réorganisation au cours du temps des circuits cérébraux, ou systèmes, qui sous-tendent le rappel des informations. Lors de ce décours temporel, la trace mnésique pourrait s'étendre, au moins en partie, à de nouveaux emplacements dans le cerveau et en même temps devenir indépendante des structures cérébrales qui ont sous-tendu son acquisition. Ce processus est appelé la **consolidation systémique**. Mes expériences de thèse ont été réalisées dans le cadre de cette consolidation systémique.

1. La consolidation synaptique

La consolidation synaptique est un phénomène universel, elle a été décrite chez de nombreuses espèces animales et pour de nombreuses tâches mnésiques. La MLT, dans le contexte de la consolidation synaptique, est conventionnellement définie comme étant une mémoire qui dure plus de 24 heures, à l'exception de l'étude de la potentialisation à long terme (le premier modèle d'investigation électrophysiologique sous-tendant l'apprentissage et la mémoire chez les vertébrés ; Bliss et Collingridge, 1993 ; Bliss et Lomo, 1973), pour laquelle même une heure est considérée comme du long terme.

Le modèle standard de la consolidation synaptique postule que les traces mnésiques peuvent exister sous au moins deux formes : une forme à court terme, instable ou labile, et une forme à long terme, stable. La trace à court terme peut se détériorer ou bien subir une maturation vers une forme plus durable, ou alternativement, les traces à court et à long terme peuvent se développer en parallèle. Les conditions physiologiques qui donnent lieu à une consolidation synaptique à long terme, bien que n'étant pas encore totalement identifiées, sembleraient impliquer un signal supraliminaire de neurotransmetteur, ou, plus probablement, la coïncidence de deux ou plusieurs signaux, incluant des neuromodulateurs (McGaugh, 2002). Ces signaux initient et favorisent la consolidation synaptique. Ainsi, l'arrivée d'informations déclenche une cascade de signaux de transduction intracellulaire, conduisant à la modification

de protéines synaptiques et par conséquent à des modifications de l'excitabilité synaptique et de la quantité de neurotransmetteurs libérés au niveau de la synapse. En accord avec ce modèle, la même cascade de signaux de transduction intracellulaire peut également activer des facteurs de transcription conduisant à la modulation de l'expression de gènes. Ces mécanismes aboutissent à des modifications à long terme des protéines synaptiques ainsi que de la croissance et du remodelage des synapses, ce qui permettrait à la trace mnésique de devenir stable. L'activation, l'expression et la fonction de certains facteurs de transcription et de gènes précoces représentent une partie essentielle de la cascade d'événements qui a lieu lors d'une période limitée dans le temps, pendant et juste après la fin d'un apprentissage, et qui peut être perturbée par différents types d'agents, dont des inhibiteurs de la synthèse protéique ou des inhibiteurs des récepteurs NMDA du glutamate. Cette période est celle de la consolidation synaptique. Il est important de noter que ces processus impliquent la synapse, mais également le corps cellulaire des neurones (Dudaï, 2004 ; Milner et coll., 1998 ; voir Redondo et Morris, 2011 concernant le concept de '*synaptic tagging and capture*').

2. La consolidation systémique

2.1. L'amnésie rétrograde temporellement graduée

Nous avons vu dans le premier chapitre que la neurochirurgie du patient H.M. a produit ce que l'on appelle une amnésie rétrograde, c'est-à-dire la perte des souvenirs déclaratifs qui avaient été acquis lors de la période qui précédait son opération. Cependant, son amnésie n'était pas complète. En effet, bien que H.M. ait perdu ses souvenirs déclaratifs les plus récents, il possédait toujours des souvenirs datant de son enfance (Scoville et Milner, 1957), d'où le terme d'amnésie rétrograde temporellement graduée. Des analyses ultérieures ont révélé que l'amnésie rétrograde de H.M. s'étendait sur une période d'environ 11 ans (Sagar et coll., 1985). La découverte du caractère incomplet et échelonné dans le temps de l'amnésie rétrograde indiqua que les LTM pouvaient avoir une implication limitée dans le temps concernant le stockage et le rappel de souvenirs déclaratifs et que, à la longue, ce type de mémoire pouvait être conservé dans d'autres régions cérébrales. Cette dissociation pourrait s'expliquer par une réorganisation spatio-temporelle de la trace mnésique au niveau des régions/sous-régions cérébrales, autrement dit par des processus liés à la consolidation systémique. De plus, bien que la MCT (rappel immédiat) chez le patient H.M. était préservée, ce dernier n'était plus capable de conserver, au-delà de quelques secondes, les informations qu'il venait d'apprendre (amnésie antérograde) (Corkin, 2002, Scoville et Milner, 1957). En

prenant en considération cette caractéristique et le fait que les souvenirs les plus anciens étaient également préservés, le déficit mnésique de H.M. ne pouvait être attribué à des perturbations de l'acquisition, de la MCT ou des capacités globales de stockage des souvenirs, mais plutôt à des perturbations du rappel et de la consolidation.

Des lésions sélectives de la formation hippocampique ou du cortex entorhinal effectuées chez des animaux de laboratoire (souris, rats, lapins, primates non-humains) produisent des amnésies temporellement graduées post-lésionnelles s'étendant sur plusieurs semaines dans différents tests mnésiques (Cho et coll., 1993 ; Clark et coll., 2005 ; Kim et Fanselow, 1992 ; Kim et coll., 1995 ; Winocur 1990 ; Zola-Morgan et Squire, 1990).

Enfin, certaines études d'imagerie fonctionnelle ont permis de mettre en évidence une activité temporellement graduée, au cours du rappel et à différents délais post-acquisition, dans des structures du LTM chez l'Homme (Haist et coll., 2001), et dans la formation hippocampique chez la souris (Bontempi et coll., 1999), ce qui suggère une réorganisation spatio-temporelle des circuits cérébraux dans la formation d'une MLT.

2.2. La théorie standard de la consolidation systémique

Les exemples d'amnésie rétrograde temporellement graduée à la fois chez l'Homme et chez les animaux ont permis l'élaboration de plusieurs modèles de consolidation basés sur les systèmes cérébraux. Au début des années 70, Marr fut le premier à proposer le modèle de la consolidation systémique. Il proposa que l'HPC permettrait de stocker très rapidement les événements qui ont lieu le jour même, avant que ces informations ne soient transférées au néocortex pour subir une réorganisation et une reclassification (processus de sémantisation ou de généralisation des informations). De plus, Marr proposa que ce processus de transfert d'information de l'HPC vers le néocortex puisse dépendre d'une réactivation, au cours du sommeil, des circuits cérébraux impliqués dans l'encodage de la représentation mnésique. Ainsi, une expérience est initialement encodée en parallèle dans les réseaux hippocampiques et corticaux. La réactivation ultérieure des réseaux hippocampiques entraînerait un renforcement progressif des connexions cortico-corticales, ce qui permettrait aux nouveaux souvenirs de devenir peu à peu indépendants de l'HPC et d'être graduellement intégrés aux souvenirs corticaux préexistants (Figure 10). Dans ce modèle, la mémoire récente se détériorerait plus rapidement après une lésion de l'HPC comparativement aux effets d'une lésion du néocortex.

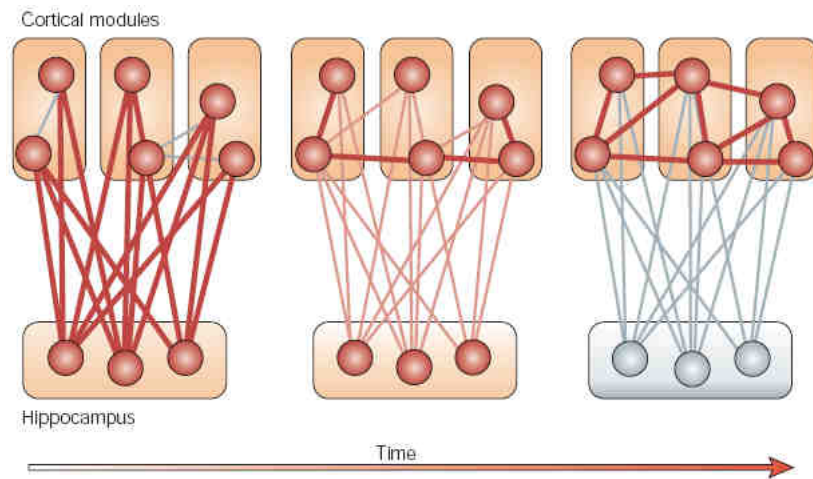


Figure 10 : Théorie Standard de la consolidation. Marr propose que les connexions entre les différents modules corticaux se renforcent au fil du temps, permettant un désengagement progressif de l’HPC. Le rappel d’un souvenir ancien est alors indépendant du fonctionnement de l’HPC (Schéma extrait de Frankland et Bontempi, 2005).

2.3. Critiques de la théorie standard de la consolidation : l’amnésie rétrograde n’est pas toujours temporellement graduée

En 1975, Marslen-Wilson et Teuber menèrent une étude dans laquelle ils comparaient les performances mnésiques du patient H.M. à celles d’un groupe de patients ayant subi une atteinte du lobe frontal ; des sujets au cerveau intact furent utilisés comme témoins. Dans cette étude, les sujets devaient reconnaître des visages de personnalités qui avaient été populaires à différentes périodes de leur vie, le tout s’étalant sur 50 années. Les sujets témoins et les patients ayant subi une atteinte du lobe frontal avaient une courbe d’oubli standard, les souvenirs les plus récents étaient mieux rappelés que les plus anciens. Au contraire, H.M. montrait une mémoire appauvrie pour les personnalités devenues célèbres après l’intervention chirurgicale ou peu de temps avant sa chirurgie, alors que des célébrités plus anciennes étaient rappelées normalement. Ces observations sont en accord avec la théorie standard de la consolidation systémique. Bien que les conclusions des auteurs de cette étude concernent la mémoire déclarative dans son ensemble, il est important de remarquer que l’identification de personnalités telles que Franklin Roosevelt est un test qui évalue principalement la mémoire sémantique (mémoire des connaissances générales).

Le suivi des études évaluant la MLT (ou ancienne) dans les amnésies du LTM depuis H.M. montrent qu’il y a autant de rapports d’amnésies rétrogrades avec ou sans gradient temporel (Winocur et coll., 2010). Cette revue de la littérature concernant les patients avec des amnésies rétrogrades, dues à des lésions des LTM, met en évidence le fait que la perte de mémoire sans gradient temporel est associée à des tests évaluant la mémoire épisodique, qui

évaluent par exemple le rappel d'événements personnels autobiographiques, alors que l'effet graduel était observé lorsque la mémoire sémantique était évaluée. L'absence de distinction entre mémoire sémantique et mémoire épisodique est une limite importante de la théorie standard de la consolidation.

L'étude des amnésies rétrogrades chez les rongeurs (rats, souris) met également en évidence des différences en terme de présence ou non d'un gradient temporel (Sutherland et coll., 2010). Winocur, en 1990, fournit l'une des premières démonstrations expérimentales d'une amnésie temporellement graduée, en mettant en place une procédure de transmission sociale d'une préférence alimentaire chez le rat. Dans ce test, un rat-sujet (S) est placé avec un rat-démonstrateur (D) qui vient d'être mis au contact avec un échantillon de nourriture ayant une odeur particulière. Lors d'une session suivante, effectuée dans le même contexte, deux échantillons de nourriture sont présentés à S, l'un étant familier (celui transmis par D) et l'autre étant nouveau. S montre alors une préférence pour la nourriture ayant l'odeur transmise par D. Dans cette étude, des rats ayant des lésions de l'HPC dorsal étaient capables d'apprendre la préférence d'odeur comme les sujets contrôles mais montraient un oubli accéléré de cet apprentissage, indiquant une amnésie antérograde. Lors des tests de la mémoire ancienne, les lésions de l'HPC abolissaient le rappel de la préférence alimentaire lorsque les lésions étaient effectuées un ou deux jours après l'apprentissage mais pas après des délais plus longs, 5 et 10 jours après la fin de l'acquisition (Winocur, 1990). Ces résultats sont en accord avec les études de cas cliniques telles que celles menées avec H.M. Le même type de résultats a été observé dans d'autres tests et espèces (Kim et Fanselow, 1992 ; Zola-Morgan et Squire, 1990).

Sutherland et ses collaborateurs, en 2001, publient les résultats d'une expérience dans laquelle ils ont entraîné des rats à retrouver une plate-forme dans la piscine de Morris. Ces rats ont subi une lésion hippocampique 2 ou 14 semaines après l'acquisition de la tâche. Les résultats ont montré une amnésie sans gradient temporel (pour cette évaluation de la mémoire spatiale), quel que soit le délai, la lésion hippocampique empêchant les rats de retrouver la localisation de la plate-forme. D'autres études ont montré des amnésies rétrogrades sans gradient avec des délais plus longs (Clark et coll., 2005 ; Winocur et coll., 2005).

Il y a donc une convergence concernant les données de la littérature obtenues chez l'Homme et l'animal concernant le fait que l'amnésie rétrograde temporellement graduée n'est pas systématiquement observée après une atteinte de l'HPC. Le type de mémoire testé semble être

un facteur clé permettant de comprendre les divergences d'observations.

2.4. La théorie des traces multiples

En 1997, Nadel et Moscovitch ont proposé une théorie alternative à celle de Marr, appelée « théorie des traces multiples ». Cette évolution était fondée sur deux observations principales. La première concerne le fait que des lésions des LTM produisent dans certains cas des amnésies rétrogrades sans gradient temporel pour certains types de souvenirs déclaratifs tels que la mémoire épisodique/autobiographique (Cipolotti et coll., 2001 ; Viskontas et coll., 2000) et de façon générale, les mémoires riches en détails contextuels (Rosenbaum et coll., 2000 ; Winocur et coll., 2005). Deuxièmement, le rappel détaillé d'anciens souvenirs épisodiques impliquerait toujours l'HPC (Addis et coll., 2004 ; Maguire et Frith, 2003). Prenant en considération ces données, la théorie des traces multiples propose que : (1) la mémoire est encodée au sein d'un réseau hippocampo-cortical ; (2) la réactivation de la mémoire entraîne la génération d'une nouvelle trace mnésique au sein des neurones de l'HPC qui sont liés aux réseaux corticaux ; (3) les traces mnésiques hippocampiques fournissent le contexte spatial et temporel du souvenir ; (4) les traces mnésiques corticales sont indépendantes d'un contexte, tel que les souvenirs de type sémantique ; (5) le rappel de souvenirs épisodiques, incluant un contexte détaillé de l'événement, dépend du réseau hippocampo-cortical quel que soit le délai de rappel ; (6) le rappel de souvenirs sémantiques ancien est possible en l'absence d'un HPC fonctionnel (Nadel et Moscovitch, 1997).

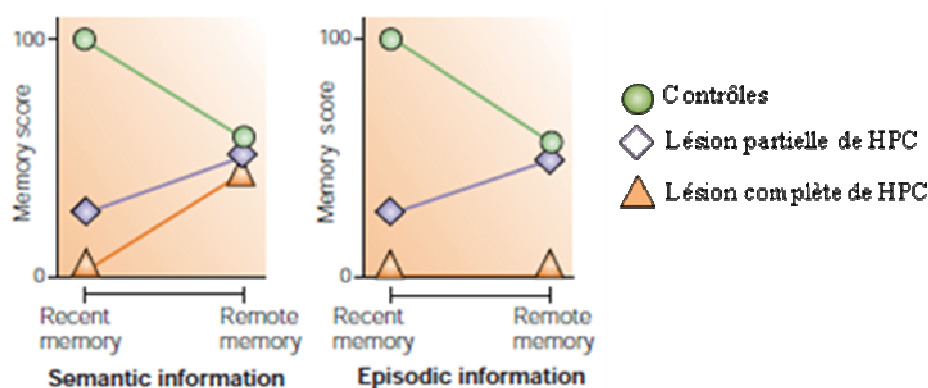


Figure 11 : Prédiction de la théorie des traces multiples après une lésion de l'hippocampe (HPC) concernant des souvenirs sémantiques (à gauche) ou épisodiques (à droite) en fonction du délai de rappel ; *recent memory* pour un délai court et *remote memory* pour un délai plus long (Schéma extrait de Franckland et Bontempi, 2005).

2.5. La théorie de la transformation

Winocur, Moscovitch et Bontempi (2010) ont proposé une évolution du modèle des traces multiples. En opposition avec la théorie standard de la consolidation systémique qui met en avant une linéarité entre la mémoire formée initialement et sa version consolidée, ces auteurs développent une argumentation en faveur d'un changement des caractéristiques de la mémoire au cours du temps. Leur cadre théorique peut être résumé en trois éléments clés : (1) la mémoire formée initialement, qui pour Winocur et ses collaborateurs est de type épisodique et donc liée à un contexte spatial et temporel, reste dépendante de l'HPC aussi longtemps que cette mémoire reste de nature épisodique ; (2) au cours du temps et des expériences, cette mémoire est le support d'un développement, au niveau du néocortex, d'une version schématique qui conserve le sens et les caractéristiques essentielles de la représentation mnésique initiale, mais qui est dépourvue des détails de son contexte spatio-temporel ; (3) il y aurait une dynamique réciproque entre les deux types de mémoires de telle sorte que l'une ou l'autre (épisodique ou sémantique) pourrait être rappelée de façon prédominante en fonction des circonstances qui provoquent leur restitution.

Les deux premiers points sont directement dérivés de la théorie des traces multiples de Nadel et Moscovitch (1997), qui postule que lorsqu'un événement est représenté sous forme de mémoire épisodique, la trace mnésique consiste en des liaisons entre des neurones hippocampiques et corticaux. A chaque fois que la mémoire est rappelée, elle serait ré-encodée par l'HPC en même temps que le contexte dans lequel elle est rappelée. Ainsi, plus la mémoire est ancienne, plus il y a de traces mnésiques formées et plus il y a de probabilités et d'opportunités pour qu'elle soit rappelée. Basées sur les régularités à travers les souvenirs et leur réactivation, les structures néocorticales permettraient d'extraire ce qui est commun aux différents contextes et de retenir le sens et les caractéristiques essentielles indépendamment des contextes. L'HPC serait toujours nécessaire pour représenter de façon détaillée les caractéristiques épisodiques d'un événement. De plus, l'HPC jouerait un rôle facilitateur pour former, dans les structures corticales, des versions schématiques qui incorporent l'essentiel de l'événement ainsi que les informations sémantiques qui lui sont liées (McNaughton et coll., 2006). Le troisième point est une conséquence des deux premiers et constitue l'un des éléments centraux de l'hypothèse de la transformation.

L'une des prémisses centrales de la théorie standard de la consolidation systémique est que la mémoire qui est établie avec le temps au niveau du néocortex est la même que celle initialement représentée dans l'HPC. Winocur et ses collaborateurs (2010) proposent que les

mémoires qui sont consolidées dans le néocortex sont fondamentalement différentes de celles initialement dépendantes de l'HPC. Ils proposent que dans un cerveau intact, la mémoire initialement dépendante d'un contexte et représentée dans l'HPC (mémoire épisodique) est transformée en une mémoire indépendante du contexte et représentée dans des structures néocorticales (mémoire sémantique). Leur hypothèse n'implique pas que la mémoire indépendante du contexte remplace systématiquement la mémoire dépendante d'un contexte, les deux types de mémoire pourraient coexister.

Cette hypothèse est notamment fondée sur le phénomène de généralisation du contexte dans des tâches comportementales effectuées chez l'animal. En effet, que ce soit dans le test de transmission sociale d'une préférence alimentaire ou dans un test de conditionnement de peur à un contexte, lorsque les animaux sont testés à des délais courts, le rappel des informations est spécifique du contexte d'apprentissage. En revanche, lorsque ce délai augmente, le rappel n'est plus spécifique du contexte d'apprentissage (Wiltgen et Silva, 2007 ; Winocur et coll., 2007). Ces observations sont en accord avec un gradient de généralisation au cours du temps et avec l'idée d'un processus de transformation qui donne lieu à une mémoire schématique qui est moins dépendante du contexte dans lequel les informations sont apprises (pour revue voir Winocur et coll., 2010).

2.6. Le cas particulier de la mémoire spatiale

Comme pour la mémoire épisodique, le rôle de l'HPC dans le rappel à long terme d'une mémoire spatiale chez l'homme fait encore débat. En effet, si le rôle de l'HPC dans l'acquisition d'une mémoire spatiale n'est plus remis en question (Burgess et coll., 2002), son rôle dans la mémoire et la navigation dans des environnements bien appris est moins établi. Des examens neuropsychologiques ont montré des déficits en mémoire spatiale dans des environnements familiers, mais chez des patients dont les lésions concernaient plutôt le gyrus para-hippocampique et le lobe pariétal et non l'HPC (Aguirre et coll., 1996). Cependant, l'approche clinique en neuroimagerie de la mémoire spatiale a mis en évidence que l'HPC est impliqué lors du rappel d'une expérience riche en détails sur l'environnement et le contexte autobiographique pendant la navigation, et ceci quel que soit le délai de rappel (Niki et Luo, 2002).

Les données obtenues en expérimentation animale semblent plus unanimes concernant l'implication de l'HPC dans le rappel à long terme d'une mémoire spatiale. En effet, les études des conséquences d'une lésion de l'HPC sur le rappel à court et à long terme d'une mémoire

spatiale n'ont pas permis de mettre en évidence un gradient temporel. Autrement dit, lorsque l'HPC est atteint, les animaux ne sont plus capables de se souvenir des informations spatiales quel que soit le délai de rappel évalué dans le test de la piscine de Morris (Bolhuis et coll., 1994 ; Clark et coll., 2005 ; Martin et coll., 2005 ; Mumby et coll., 1999 ; Sutherland et coll., 2001). Les données concernant l'implication de l'HPC dans le test de conditionnement de peur à un contexte sont plus ambiguës, montrant selon les études l'absence ou la présence d'un gradient temporel (Kim et Fanselow, 1992 ; Maren et coll., 1997 ; Sutherland et coll., 2008 ; pour revue voir Sutherland et coll., 2010). Cependant une étude récente, par l'utilisation de l'optogénétique (une technique permettant d'inactiver temporairement une région cérébrale et ceci de façon très précise temporellement et spatialement) a permis de mettre en évidence une implication de l'HPC dorsal dans le rappel à long terme dans un test de conditionnement de peur au contexte (Goshen et coll., 2011). Ces données confirment l'implication de l'HPC dans le traitement d'un contexte riche en détails et dans la mémoire spatiale, quel que soit le délai, et rentre dans le cadre de la théorie des traces multiples décrite ci-dessus.

2.7. La théorie des schémas

La quatrième théorie que je vous présente dans cette thèse concerne les schémas. Ce modèle postule que les sites néocorticaux seraient bien dédiés au rappel à long terme d'informations mais que le processus progressif et graduel de stabilisation des réseaux corticaux n'est pas inévitable. De façon distincte du modèle standard de la consolidation systémique, ce modèle alternatif propose que le cortex permettrait un apprentissage aussi rapide que le permettent les réseaux neuronaux hippocampiques mais que les nouvelles connexions corticales seraient transitoires et rapidement perdues, alors que les nouvelles informations traitées par l'HPC serait intégrées à des réseaux neuronaux préexistants ou « schémas » (Morris, 2006). En l'absence de ces schémas, la consolidation prendrait du temps et correspondrait en partie aux processus décrits dans la théorie standard de la consolidation systémique.

Ce modèle explicatif de la consolidation systémique est lié au concept d'indexage hippocampique. En accord avec la théorie standard de la consolidation, les neurones hippocampiques permettraient l'intégration, sous la forme d'un indexage anatomique, d'informations transmises par des modules corticaux au sein desquels sont représentées les différentes caractéristiques d'une expérience. Ainsi, un profil d'activité neuronal reflétant les détails sensoriels d'une expérience, peut générer un profil d'association unique au sein du cortex (Teyler et DiScenna, 1987). L'activation d'une partie de ce profil d'activité corticale

(par exemple l'odeur d'une nourriture) résulte en l'activation de son indexage hippocampique. En retour, cette activation hippocampique permet de retrouver les associations corticales faites avec le profil d'activité de l'indice (l'odeur) et ainsi de réactiver l'ensemble des associations corticales en lien avec l'expérience initiale. Ces associations indirectes permettraient ainsi de rappeler des informations mnésiques au sein de réseau corticaux dont les connexions sont initialement trop faibles pour être rappelées indépendamment de l'HPC.

Néanmoins, la théorie des schémas se distingue de la théorie standard de la consolidation systémique par la possibilité d'un apprentissage et d'une consolidation rapide de nouvelles informations au sein du cortex. Ceci serait rendu possible par l'assimilation des informations à celles déjà consolidées sous la forme de profils d'activités corticales aussi appelés 'schéma'. Selon la théorie des schémas, la trace correspondant à l'indexage hippocampique guide le processus par lequel les nouvelles informations font l'objet d'une consolidation, mais l'HPC ne le ferait pas en générant de nouvelles connexions entre les modules corticaux pour toutes les caractéristiques de la nouvelle expérience. Au contraire, les nouvelles informations seraient, sous certaines conditions, rapidement intégrées à l'activation d'un schéma pertinent par rapport aux nouveaux items encodés. Selon ce modèle, la construction d'un schéma serait un processus lent, aussi lent que dans la théorie standard de la consolidation systémique (plusieurs semaines, voire plusieurs mois ou années), mais une fois établies, les nouvelles informations, pouvant être rapportées à ce schéma, sont consolidées et stockées rapidement au niveau cortical (Morris, 2006).

Pour tester cette hypothèse, Tse et ses collaborateurs (2007) ont entraîné des rats à apprendre simultanément plusieurs associations entre une odeur et une localisation, en utilisant différentes odeurs (indices odorants) et différents puits contenant de la nourriture. Les puits étaient localisés au sein d'un environnement familier appelé '*event arena*'. Pour le rat, la tâche consistait à apprendre quelle odeur était associée à une localisation spécifique de telle sorte que lorsque l'indice odorant était présenté dans la boîte de départ (*start box*) adjacente à l'*event arena*, l'animal était récompensé en allant à l'emplacement correct et en recevant plus de nourriture correspond à l'odeur que s'il rejoignait les mauvais emplacements. Par exemple, les rats devaient apprendre que l'odeur de banane était associée au puits A et l'odeur de bacon associé au puits B. Lors du test de rétention, le rat n'obtenait aucune récompense et les temps passés à creuser au niveau de chacun des puits étaient enregistrés. L'apprentissage de cette tâche est progressif et nécessite de nombreuses sessions (18 sessions à raison de 1 essai pour chaque association par sessions et 1 session par jour, tous les deux jours) pour que l'animal ait

des performances optimales. A la suite de cet apprentissage et après avoir été testés, les animaux devaient apprendre deux nouvelles associations « odeur-localisation ». Lors de ce nouvel apprentissage, une seule session était nécessaire pour que les animaux développent une préférence de place associée à chacune des deux nouvelles odeurs. Les auteurs ont conclu que l'acquisition rapide de ces nouvelles associations en une seule session (un seul essai pour chaque association) et leur rétention au délai de 24 heures, est un argument en faveur de l'apprentissage d'un schéma (qui prend plusieurs semaines pour être appris) qui facilite l'apprentissage, la consolidation et le rappel de nouvelles associations. En effet, des animaux n'ayant pas acquis progressivement ce schéma ont des performances qui déclinent au bout de 90 min (Day et coll., 2003). Les auteurs ont également étudié les effets d'une lésion hippocampique sur l'acquisition et le rappel dans cette tâche. Une lésion de l'HPC effectuée avant l'acquisition entraîne une incapacité des animaux à apprendre la tâche. En revanche, une lésion effectuée 48 heures après l'apprentissage des deux nouvelles associations n'affecte pas le rappel du schéma (6 associations « odeur-localisation ») ni le rappel des deux nouvelles associations. Ces résultats impliquent que la trace mnésique des associations « odeur-localisation » est localisée dans des structures extra-hippocampiques (probablement corticales) et que la consolidation des nouvelles associations, dont l'acquisition implique l'HPC, peut prendre moins de 48 h. D'autres données ont confirmé ces résultats et ont montré que cette consolidation rapide à partir de schémas préexistants était dépendante de la transmission dopaminergique au sein de l'HPC (Bethus et coll., 2010), d'une activation du gène précoce Arc au sein du cortex prélimbique, une sous-région du mPFC (Tse et coll., 2011) et que la formation d'un schéma impliquait les récepteurs NMDA et AMPA du cortex cingulaire antérieur, une autre sous-région du mPFC (Wang et coll., 2012). Les interactions entre l'HPC et le mPFC apparaissent cruciales dans le processus de consolidation progressif d'un schéma et dans l'apprentissage et la consolidation rapide de nouvelles informations pouvant être associées à un schéma préexistant.

3. Le cortex préfrontal et le rappel de souvenirs anciens

3.1. Importance des connexions hippocampo-corticales

Quel que soit le modèle explicatif de la consolidation au niveau des systèmes, l'un des points essentiels de ce processus mnésique est la nécessité d'un mécanisme de réactivation des connexions hippocampo-corticales pour que la trace mnésique devienne stable dans le temps. La réactivation des traces mnésiques hippocampiques entraînerait la réinstallation de l'activité

corticale liée à l'expérience ce qui va permettre aux informations encodées d'être stabilisées et de donner lieu à une trace mnésique corticale. Cette réactivation peut se faire pendant une tâche mnésique, *on-line* (Carr et coll., 2011) ou pendant le sommeil, *off-line* (Born et Wilhelm, 2012). Il a également été montré que l'induction d'une potentialisation à long terme (un mécanisme permettant le renforcement durable de la connexion entre deux synapses qui sont activées simultanément) au niveau du gyrus denté chez le rat éveillé et libre de ses mouvements conduit à une augmentation significative de l'expression de Zif268 pendant le sommeil, dans différentes régions corticales incluant le cortex entorhinal, auditif, somato-sensoriel et le mPFC (Ribeiro et coll., 2002). Zif268 est un facteur de transcription qui est impliqué dans la régulation de la plasticité synaptique et la stabilisation de la mémoire (Lee et coll., 2004 ; Jones et coll., 2001). L'inactivation de l'HPC par une instillation intra-cérébrale de tétracaïne avant le sommeil bloque cette augmentation de Zif268 au niveau cortical. Ces observations indiquent que l'expression de gènes au niveau cortical et les conséquences à long terme que cela induit peuvent être sous le contrôle de l'HPC. De plus, une plasticité corticale normale est indispensable pour former un souvenir ancien dans les réseaux cortico-corticaux. Ainsi, il a été observé que des souris mutantes α -CaMKII^{+/-}, présentant une altération de la potentialisation à long terme dans le cortex et non dans l'HPC, ont une incapacité à former des souvenirs anciens (Frankland et coll., 2001).

L'une des façons d'étudier la consolidation systémique consiste à altérer le fonctionnement des structures qui sous-tendent le rappel d'un souvenir ancien tout en préservant les capacités de rappel d'un souvenir récent. Ainsi, de nombreuses expériences ont mis en évidence que les interventions (inactivation réversible ou lésion permanente) au niveau cortical affectent principalement le rappel d'un souvenir ancien et non celui d'un souvenir récent (Maviel et coll., 2004 ; Takehara et coll., 2003 ; Zola-Morgan et Squire, 1990). Très récemment, Lesburguères et ses collaborateurs (2011) ont mis en évidence l'implication du cortex orbito-frontal (OFC) dans le rappel à long terme (30 jours) d'une transmission sociale d'une préférence alimentaire, test dont l'acquisition et le rappel récent (1 jour) dépendent de l'HPC. De plus, ces auteurs, par la mise en œuvre d'une inactivation temporaire des récepteurs AMPA, soit de l'HPC, soit de l'OFC, effectuée dans une période de deux semaines qui suit immédiatement l'acquisition de la préférence alimentaire, ont montré l'importance de ces deux structures et de leurs interactions dans la persistance d'un souvenir. Enfin, ces auteurs ont également montré que les mécanismes épigénétiques qui ont lieu au sein du OFC lors de l'acquisition de la tâche sont un élément crucial dans la consolidation à long terme de la

préférence alimentaire (Lesburguères et coll., 2011). Parmi les régions étudiées, l'OFC semble donc être une région impliquée dans le maintien à long terme d'un souvenir. Les différentes sous-régions du cortex préfrontal médian chez le rat apparaissent également comme cruciales dans le processus de consolidation. Ainsi, des études d'imagerie cérébrale et d'inactivation ont montré l'implication du cortex cingulaire antérieur dans le rappel d'un souvenir ancien et ceci dans différentes tâches mnésiques (Frankland et coll., 2004 ; Lopez et coll., 2012 ; Maviel et coll., 2004 ; Teixeira et coll., 2006). S'il semble il y avoir un consensus dans la littérature concernant l'implication du cortex cingulaire antérieur dans la persistance d'un souvenir, les données concernant l'implication des cortex pré-limbique et infra-limbique sont divergentes selon les études (Frankland et coll., 2004 ; Takehara-Nishiuchi et coll., 2006). Ces différences pourraient être dues au type de tâche utilisée (piscine de Morris vs. conditionnement de peur) ou à l'espèce étudiée (souris vs. rats). L'hypothèse du rôle du mPFC dans l'intégration des caractéristiques d'un souvenir a été mis en avant par Frankland et Bontempi en 2005.

3.2 Le cortex préfrontal médian : rôle dans l'intégration des caractéristiques d'un souvenir devenu ancien

Le cortex préfrontal médian (mPFC) du Rat est composé de quatre sous-régions, deux sous-régions dorsales : le cortex agrulaire médian et le cortex cingulaire antérieur ; et deux sous-régions ventrales : le cortex prélimbique (PL) et le cortex infralimbique (IL). Ces régions sont connectées de façon réciproque aux cortex sensoriels, moteurs et à certaines structures du système limbique (Uylings et coll., 2003). De façon générale, le mPFC 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). Le mPFC est une structure fortement impliquée dans les processus liés à la flexibilité comportementale et aux changements de stratégies (Floresco et coll., 2008 ; Ragozzino et coll., 2003). Ainsi, lorsqu'un rat doit par exemple passer d'une stratégie basée sur l'utilisation d'indice de type égocentrique (tourner à droite ou à gauche) à une stratégie basée sur l'utilisation d'un indice visuel pour obtenir un renforçateur alimentaire dans un labyrinthe en croix, l'inactivation du mPFC a pour conséquence une augmentation du nombre d'essais nécessaires pour apprendre la nouvelle stratégie (Block et coll., 2007). L'implication du mPFC dans la capacité des rats à changer de stratégie a été mise en évidence dans différents tests comportementaux (Dias et Aggleton, 2000 ; Oualian et Gisquet-Verrier, 2010 ; Ragozzino et coll., 1999) et en relation avec ses connexions avec le noyau médiodorsal du thalamus et le noyau accumbens (Block et coll., 2007).

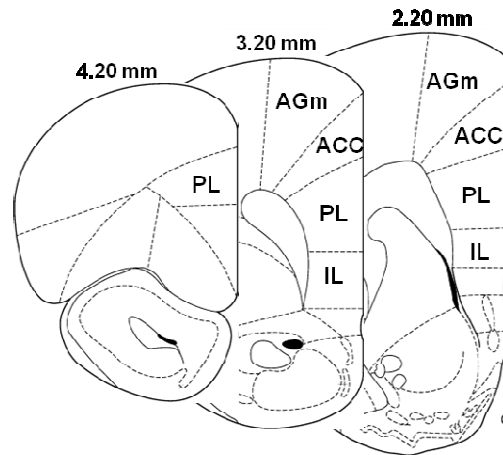


Figure 12. Schéma représentant les subdivisions du mPFC selon trois niveaux d'antéro-posteriorité (Schéma de coupe coronale adapté de Paxinos et Watson, 1998).

Par ses connexions anatomiques, le mPFC est idéalement positionné pour intégrer et synthétiser des informations provenant d'un grand nombre de régions cérébrales (Heidbreder et Groenewegen, 2003 ; Hoover et Vertes, 2007 ; Miller, 1996). Cette capacité d'intégration du cortex préfrontal lors du rappel d'un souvenir ancien pourrait être le reflet du rôle fonctionnel joué par l'HPC lors du rappel d'un souvenir récent. En effet, initialement, l'HPC intégrerait des informations provenant de différents modules corticaux, codant les caractéristiques d'un événement, pour générer rapidement une trace mnésique cohérente (Eichenbaum, 2004 ; Morris, 2006). En accord avec cette hypothèse, le rappel d'une mémoire récente (dont le rappel a lieu 1 à 10 jours après la fin de l'acquisition) est associé avec une activation de l'HPC et l'inactivation réversible ou une lésion permanente de l'HPC perturbe préférentiellement le rappel de souvenirs récemment appris. Lorsque les souvenirs deviennent plus anciens, ce rôle d'intégration serait transféré au mPFC via le renforcement des connexions cortico-corticales. De par la capacité du mPFC à intégrer des informations provenant de différentes régions corticales, ce processus de renforcement permettrait aux réseaux corticaux de fonctionner indépendamment de l'HPC. Ainsi, des inactivations ou des lésions du cortex prélimbique ou du cortex cingulaire antérieur, tout en laissant intacte la formation hippocampique, empêchent le rappel de souvenirs anciens (Frankland et coll., 2004 ; Lopez et coll., 2012 ; Maviel et coll., 2004 ; Takehara et coll., 2003).

Le cortex préfrontal pourrait avoir un autre rôle lors du rappel d'un souvenir ancien. Les études d'imagerie chez l'animal montrent que l'activité de l'HPC est inhibée lors du rappel d'un souvenir spatial ou contextuel devenu ancien. D'un point de vue fonctionnel, cette hypothèse pourrait avoir du sens dans la mesure où ce mécanisme préviendrait le ré-encodage par l'HPC

de souvenirs préexistants. Cela indique également que le mPFC n'aurait pas qu'un rôle passif dans le stockage des informations mais un rôle actif dans l'inhibition de l'HPC. En effet, les lobes frontaux exercent un contrôle inhibiteur descendant (*'top-down'*) sur des régions corticales associatives, en particulier des régions temporales, afin d'organiser l'information à rappeler et les stratégies nécessaires au rappel volontaire (Tomita et coll., 1999 ; Fukushima et coll., 2004). Selon cette hypothèse, qui reste à être démontrée dans le cadre de la consolidation systémique, l'inhibition de l'HPC par le mPFC serait dépendante de l'information qui est encodée et du degré de similarité entre les souvenirs stockés et les nouvelles informations. Ainsi, lorsque la nouvelle expérience encodée ne correspond pas à des informations déjà consolidées, l'HPC ne serait pas inhibé. En revanche, si les informations rencontrées ont déjà fait l'objet d'une consolidation, l'HPC serait inhibé par le mPFC (Franckland et Bontempi, 2005). Cette hypothèse est compatible avec l'existence de cellules comparatives dans le mPFC dont la fonction est d'évaluer l'apparition de situations concordantes et discordantes (*'match'* vs. *'mismatch'*) (Moody et coll., 1998) mais nécessite d'être testée dans le cadre du rappel à long terme d'un souvenir.

3.3. La théorie de Rudy

En 2005, en marge des théories prédominantes de la consolidation systémique, Rudy et ses collaborateurs ont proposé que le mPFC ne serait pas le site de stockage des souvenirs anciens, mais serait activé en réponse à une difficulté d'accès à une trace mnésique n'ayant pas un degré suffisant de précision ou ayant été en partie dégradée. Pour ces auteurs, l'implication du mPFC serait une conséquence de l'oubli spontané. Ainsi, les mémoires anciennes, devenant plus 'faibles', seraient plus difficiles à rappeler. Dans ce contexte, le mPFC pourrait alors apporter le signal permettant de *'booster'* l'activité des régions telles que l'HPC, dans lesquelles la trace mnésique est contenue (Rudy et coll., 2005). Cette implication du mPFC ne serait donc pas dépendante du délai de rappel mais plutôt de la force du souvenir au moment où le rappel à lieu.

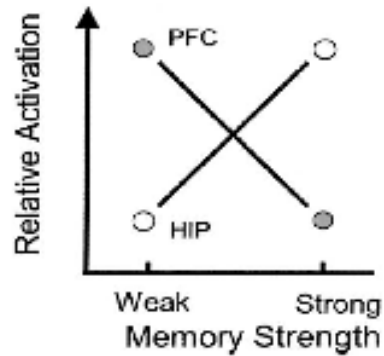


Figure 13. Prédications de la théorie de Rudy. Un souvenir fort activera l'hippocampe (HIP) alors qu'un souvenir faible ou dégradé sollicitera le cortex préfrontal (PFC) indépendamment de l'âge du souvenir (Rudy et coll., 2005).

Cette hypothèse a été testée récemment au sein du laboratoire (Lopez et coll., 2012). Pour cela, des rats ont été entraînés dans un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris et testés aux délais de 5 (mémoire récente) et 25 jours (mémoire ancienne). Les rats étaient entraînés soit dans une salle au sein de laquelle la saillance des indices visuels permet d'obtenir des performances de rappel qui ne se dégradent pas au cours du temps, soit dans une salle dans laquelle les performances des rats sont moins bonnes au fur et à mesure que le délai de rappel s'éloigne de la dernière session d'acquisition (pour plus de détails concernant les caractéristiques de ces salles, voir Lopez et coll., 2008). A l'issue des tests de rappel, les animaux étaient euthanasiés en vue d'effectuer un marquage de la protéine c-Fos, un indicateur de l'activité neuronale, dans l'HPC (CA1, CA3 et le gyrus denté) et le mPFC (cortex cingulaire antérieur (ACC), cortex PL et IL). Les résultats ont montré une augmentation générale de l'expression de la protéine c-Fos dans l'HPC et le mPFC, quel que soit le délai, chez les animaux testés dans la salle sans dégradation des performances de rappel en comparaison à la salle avec dégradation des performances. De plus, l'activité au niveau de CA1 et de l'ACC était significativement plus importante au délai de 25 jours par rapport au délai de 5 jours dans le contexte sans dégradation des performances. Ces résultats indiquent donc, que l'engagement de l'HPC et du mPFC dépend à la fois du délai de rappel et de la qualité de rappel, ces deux régions étant impliquées lorsque de bonnes performances de rappel sont observées à long terme. Selon la théorie de Rudy et ses collaborateurs, le mPFC aurait dû être significativement plus activé lors du rappel à 25 jours dans le contexte avec dégradation des performances, ce qui n'a pas été le cas dans cette expérience. Ainsi, l'ensemble de ces données ne semble pas confirmer l'hypothèse de l'implication du mPFC lors du rappel d'un souvenir 'faible' (Lopez et coll., 2012).

Chapitre 4 :
Les noyaux ventraux
de la ligne médiane
du thalamus

Chapitre 4 : Les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus : un relai entre le cortex préfrontal médian et l'hippocampe

L'hippocampe (HPC) et le cortex préfrontal médian (mPFC) sont des régions cérébrales fortement impliquées dans les processus mnésiques. Nous avons vu dans le chapitre précédent que les connexions entre l'HPC et le mPFC sont essentielles au processus de consolidation des souvenirs ainsi qu'à leur restitution lorsque ces souvenirs sont anciens. La manière dont ces deux structures interagissent dans le cadre des processus mnésiques n'est pas encore précisément définie. Des études menées chez le rongeur et le primate non-humain ont permis de mettre en évidence des projections denses provenant de l'HPC vers le mPFC (Carr et Sesack, 1996 ; Cavada et coll., 1983 ; Ferino et coll., 1987 ; Goldman-Rakic et coll., 1984 ; Irle et Markowitsch, 1982 ; Jay et coll., 1989 ; Jay et Witter, 1991 ; Swanson, 1981). Chez le rat, les efférences provenant de l'HPC vers le mPFC prennent leur origine principalement dans la partie ventrale de la formation hippocampique au niveau de CA1 et du subiculum, et se terminent au niveau de l'aire médiale orbitale et des cortex PL et IL (Hoover et Vertes, 2007 ; Jay et coll., 1989 ; Jay et Witter, 1991). Il n'y a pas de projections à partir de CA2/CA3 ou du gyrus denté vers le mPFC (Jay et Witter, 1991). De plus, l'HPC forme des synapses asymétriques avec les cellules pyramidales de mPFC (Carr et Sesack, 1996) et exerce une action excitatrice sur celles-ci (Ferino et coll., 1987 ; Jay et coll., 1995 ; Laroche et coll., 1990, 2000). Alors que les projections de l'HPC vers le mPFC sont très bien documentées, il n'existe pas de preuve dans la littérature d'une connexion directe en retour du mPFC vers l'HPC (Beckstead, 1979 ; Buchanan et coll., 1994 ; Goldman-Rakic et coll., 1984 ; Room et coll., 1985 ; Sesack et coll., 1989 ; Takagishi et Chiba, 1991). S'il n'existe pas de connexion directe en retour du mPFC vers l'HPC, alors les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus, comprenant le noyau **reuniens** (Re) et le noyau **rhomboïde** (Rh), apparaissent comme étant un relai possible pouvant jouer un rôle fondamental dans la transmission d'informations entre le mPFC et l'HPC et ainsi intervenir dans les processus nécessitant ce type d'interaction.

1. Organisation neuroanatomique des noyaux Re et Rh

1.1. Localisation des noyaux

Les noyaux Re et Rh font partie d'un ensemble de noyaux localisés dans la partie médiane du thalamus, nommés les noyaux de la ligne médiane du thalamus. Cet ensemble de noyaux s'étend de la partie dorsale à la partie ventrale du thalamus (Paxinos et Watson, 1998). Au niveau rostral et en suivant l'axe dorso-ventral, ces noyaux sont le noyau paraventriculaire, le noyau paraténial, et le Re, ce dernier noyau étant localisé juste au dessus du troisième ventricule (Groenewegen et Witter, 2004 ; Jones, 2007). Antérieurement, le Re est divisé en une partie gauche et une partie droite par le troisième ventricule ; au niveau médian et postérieur du Re, ces deux parties se rejoignent pour ne former qu'un seul groupe de cellules situé juste au dessus du troisième ventricule (Figure 14). Au niveau postérieur, le Re est bordé de chaque côté par le périréuniens. A un niveau plus postérieur, juste en dessous de la limite antérieure de l'HPC, apparaît le Rh. Dans sa partie rostrale, le Rh est composé de deux structures en forme d'ailes qui se rejoignent caudalement pour ne former qu'une seule région (Van der Werf et coll., 2002).

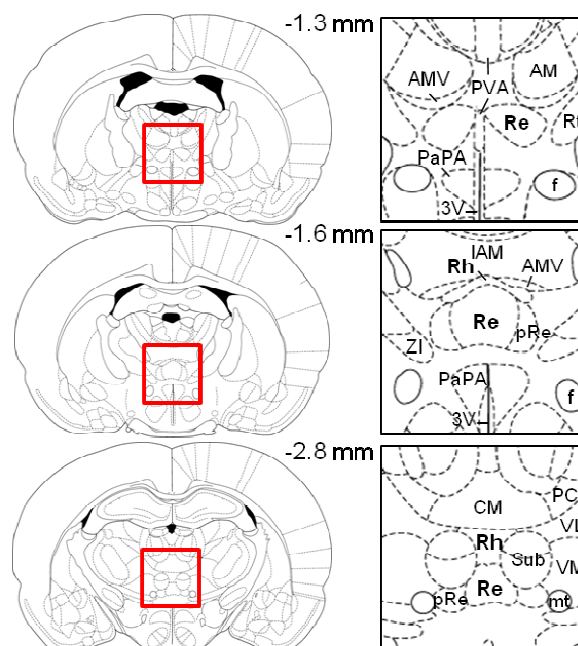


Figure 14 : Localisation des noyaux reuniens (Re) et rhomboïde (Rh) selon trois plans de l'axe antéro-postérieur de l'encéphale de Rat. Les schémas sont extraits de Paxinos et Watson (1998). 3V, 3^{ème} ventricule, AM, noyau antémédian du thalamus, AMV, noyau ventral antémédian du thalamus, CM, noyau centro-médian du thalamus, f, fornix, IAM, noyau inter-antémédian du thalamus, mt, tractus mammillothalamique, PaPA, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, PC, noyau para-central du thalamus, pRe, périréuniens, PVA, noyau paraventriculaire antérieur du thalamus, Rt, noyau réticulaire, Sub, noyau submédian, VL, noyau ventro-latéral du thalamus, VM, noyau ventro-médian, ZI, *zona incerta*.

1.2. Afférences

Dans cette section ainsi que dans la suivante, seules les principales connexions afférentes et efférentes des noyaux Re et Rh, avec un intérêt particulier pour l'HPC et le mPFC, seront décrites. Pour des descriptions plus détaillées, le lecteur pourra se référer au chapitre de Gronewegen et Witter paru dans Paxinos (2004), aux études réalisées par Vertes et ses collaborateurs (Hoover et Vertes, 2012 ; Vertes, 2002, 2010 ; Vertes et coll., 2006) et à la revue de Van der Werf et coll. (2002).

Le noyau reuniens

Les afférences du Re proviennent de nombreuses régions corticales et sous-corticales (Figure 15). Au niveau cortical, les neurones localisés dans les cortex agrulaire, cingulaire antérieur, IL et PL constituent la plus dense innervation vers le Re (Hurley et coll., 1991 ; McKenna et Vertes, 2004 ; Vertes, 2002 ; Witter et coll., 1990). D'autres fibres afférentes d'origine corticale viennent des cortex orbital médian, insulaire, ectorhinal, périrhinal et rétrosplénial. Le Re reçoit également des afférences du subiculum dorsal et ventral (Witter et coll., 1990 ; Wouterlood et coll., 1990), des noyaux médians et antérieurs de l'amygdale (Herkenham, 1978), de la branche horizontale de la bande diagonale de Broca, de la strie terminale et des cornes d'Ammon de l'HPC dorsal et ventral (McKenna et Vertes, 2004). Le Re reçoit également des projections d'autres noyaux diencephaliques incluant le noyau réticulaire du thalamus, le noyau géniculé latéral, la *zona incerta*, les aires pré-optiques médianes et latérales, l'hypothalamus médian et latéral et des noyaux pré- et supra-mamillaire. En provenance du tronc cérébral, le Re reçoit une innervation de l'aire tegmentale ventrale, de la formation réticulée, du noyau tegmental dorso-latéral, des colliculi supérieurs, de la substance grise péri-aqueducule, du raphé, du locus coeruleus et du noyau parabrachial (Krout et coll., 2002 ; Vertes et coll., 2010). En résumé, le Re est un point de convergence de fibres prenant leur origine dans de nombreuses structures télencéphaliques, diencephaliques et du tronc cérébral.

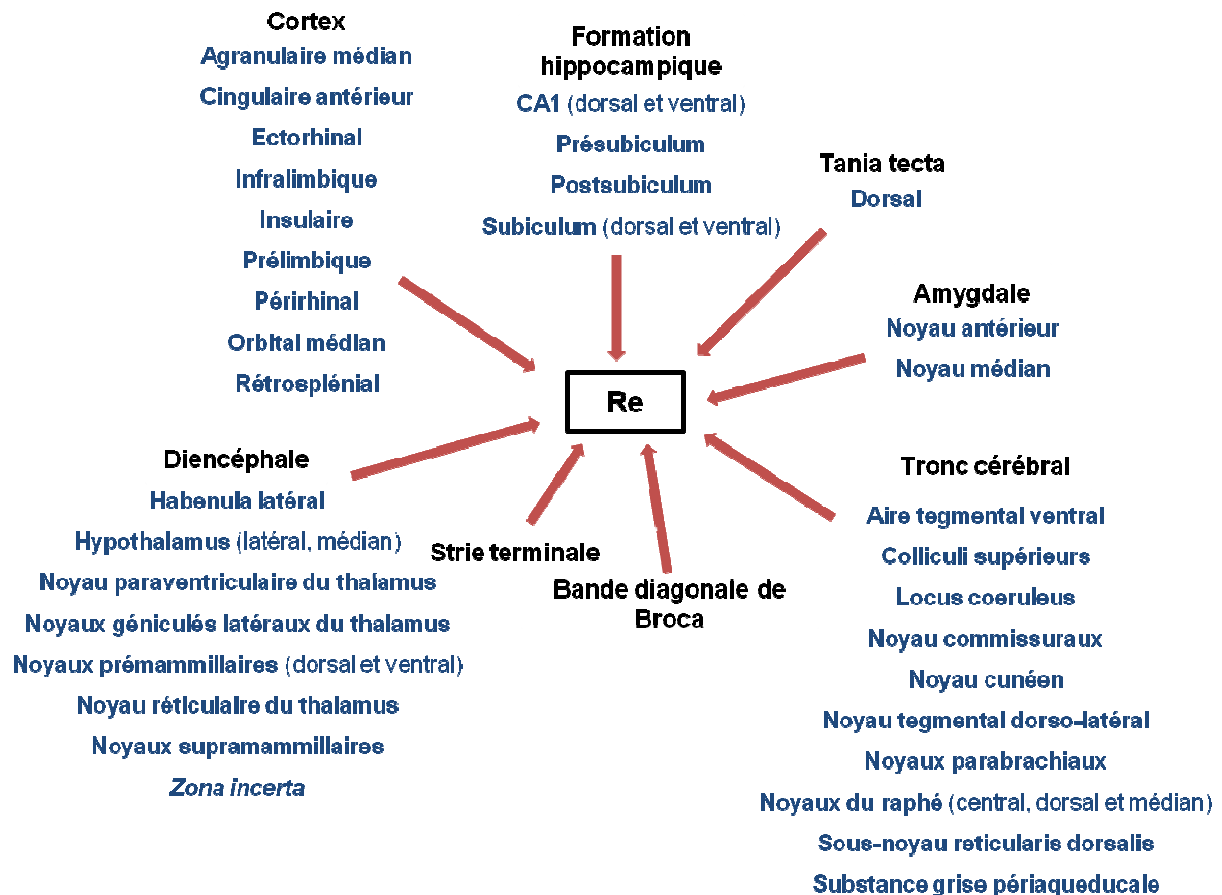


Figure 15 : Principales afférences du noyau reuniens (Re)

Le noyau rhomboïde

Les données concernant les afférences principales vers le Rh ne sont pas décrites dans la littérature avec autant de détails que celles du Re (Groenewegen et Witter, 2004). Comme pour le Re, la plupart des structures cérébrales qui envoient des projections afférentes au Rh se situent dans le tronc cérébral, dont l'innervation majeure est sérotoninergique en provenance du noyau du raphé (Vertes et coll., 2010). D'autres afférences proviennent de la formation réticulée, du noyau tegmental dorso-latéral, de la substance noire, des noyaux supramammillaires et du locus coeruleus (Rassnick et coll., 1998). Les noyaux parabrachiaux ventro-latéraux et médians projettent également vers le Rh (Kroust et Loewy, 2000). Enfin, le Rh reçoit des fibres afférentes des cortex IL, PL, cingulaire antérieur, agranulaire médian et du cortex somatosensoriel primaire (Vertes et coll., 2004).

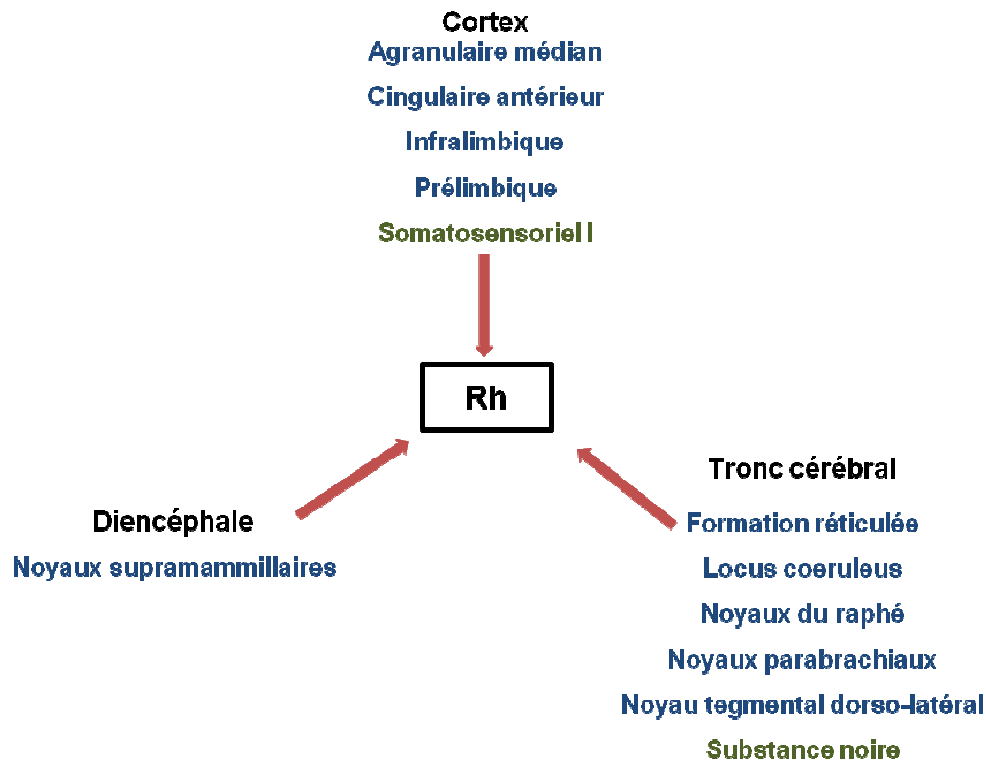


Figure 16 : Principales afférences du noyau rhomboïde (Rh). Les connexions spécifiques du Rh par rapport au noyau Re sont en vert.

1.3. Efférences

Le noyau reuniens

Par l'utilisation du traceur antérograde *Phaseolus vulgaris leucoagglutini* (PHA-L), Vertes et ses collaborateurs (2004) ont étudié les projections efférentes du Re et du Rh, apportant ainsi de nouvelles informations à celles déjà disponibles dans la littérature (Baisen et Hoover, 1979 ; Berendse et Groenewegen, 1990, 1991 ; Groenewegen et Berendse, 2004 ; Ohtake et Yamada, 1989). En injectant le traceur au centre du Re, une forte concentration de fibres marquées avec PHA-L est observée dans la partie antérieure du télencéphale, avec le plus fort marquage dans les cortex piriforme antérieur, orbital médian, PL, orbital ventral, orbital ventro-latéral et le claustrum. Plus caudalement, le marquage est très dense dans le mPFC, plus particulièrement au niveau des cortex PL et IL. Dans l'HPC dorsal, le marquage est restreint à la couche *lacunosum-moleculare* de la région CA1. Il n'y a aucun marquage au niveau de CA2, CA3 et du gyrus denté. Au niveau de l'HPC ventral, le marquage est très dense au niveau de la couche *lacunosum-moleculare* de la région CA1. Il y a également beaucoup de fibres marquées au niveau du subiculum, du pré- et parasubiculum au niveau de leur couche moléculaire, ainsi que dans les cortex ectorhinal, périrhinal et de la partie latérale

du cortex entorhinal. Dans une étude plus récente, Hoover et Vertes (2012) ont utilisé deux traceurs rétrogrades, le Fluorogold et le Fluororuby, qu'ils ont injecté respectivement dans les sous-régions du mPFC et de l'HPC. Les résultats de cette étude ont montré que le plus grand nombre de neurones marqués se situe au niveau de la partie médiane du Re, partie du noyau la plus étendue selon les axes médio-latéral et dorso-ventral. D'autre part, sur la quasi-totalité de l'axe antéro-postérieur du Re, il y a plus de neurones marqués avec le Fluororuby, environ 60%, alors que les neurones marqués avec le Fluorogold représentent environ 40% du nombre total de neurones. La seule exception concerne la partie la plus caudale du Re dans laquelle les proportions sont inversées. Ces données suggèrent qu'une plus grande proportion de neurones de la partie rostrale du Re projette vers l'HPC alors qu'une plus grande proportion de neurone de la partie caudale du Re projette vers le mPFC. Concernant les projections vers l'HPC, le nombre de neurones marqués est beaucoup plus important (10x supérieur) lorsque l'injection est réalisée au niveau de l'HPC ventral en comparaison avec des injections effectuées au niveau de l'HPC dorsal, suggérant une plus forte connexion du Re avec l'HPC ventral par rapport à l'HPC dorsal (Hoover et Vertes, 2012 ; Vertes et coll., 2007). Enfin, 3 à 6% des neurones du Re sont co-marqués par les deux traceurs rétrogrades injectés dans le mPFC et l'HPC apportant ainsi un argument anatomique important concernant le rôle du Re dans les interactions hippocampo-corticales.

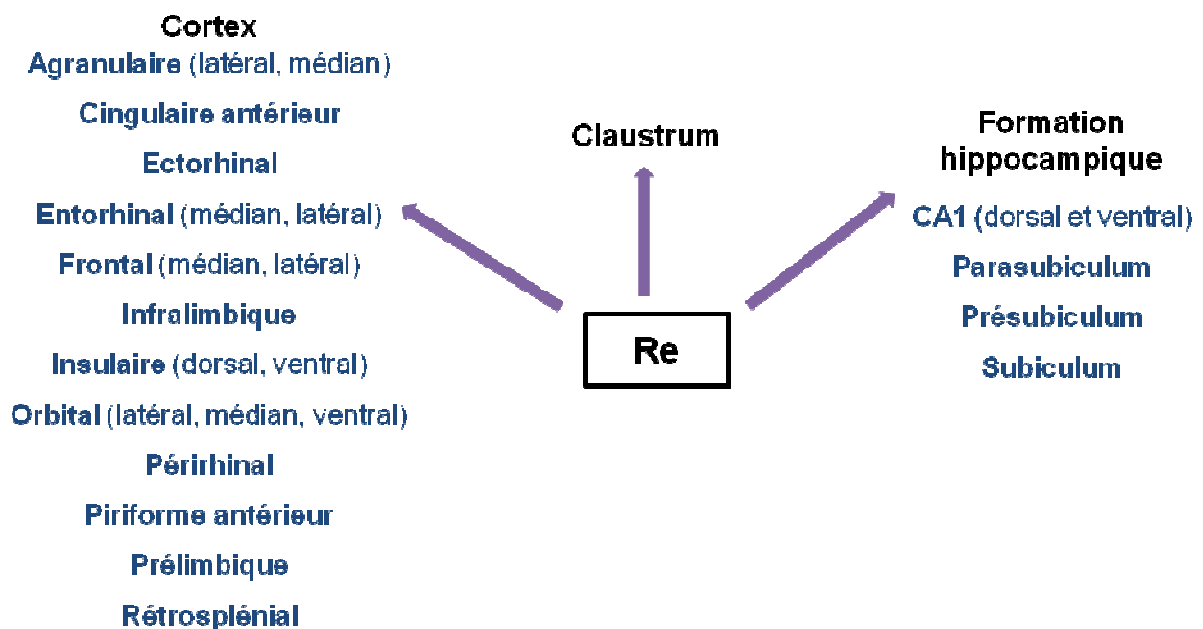


Figure 17 : Principales efférences du noyau reuniens (Re).

Le noyau rhomboïde

En injectant le marqueur antérograde PHA-L dans le Rh, Vertes et ses collaborateurs (2006) ont observé une distribution importante des terminaisons des fibres marquées dans la région médiane et ventro-latérale du cortex frontal mais également au niveau du striatum, essentiellement au niveau des régions rostro-ventrale et ventro-médiale caudale. Dans le mPFC, le plus fort marquage est observé dans les couches profondes des cortex prelimbic, orbito-médian, et cingulaire antérieur. Au niveau du septum, le marquage le plus intense est restreint à la partie latérale de la commissure antérieure correspondant au noyau accumbens. Les régions dorso-médiane et ventro-latérale du cortex sont également marquées, de même que la portion rostrale du septum latéral. Au niveau de l'HPC dorsal, une bande étroite au niveau de la couche *lacunosum-moleculare* de CA1 est observable. A un niveau plus postérieur, cette bande est toujours présente au niveau de la moitié dorsale de l'HPC et ne s'étend pas au niveau de l'HPC ventral comme c'est le cas lors d'injections effectuées dans le Re. Enfin, des marquages au niveau des cortex rétrospécial, occipital, entorhinal et périrhinal sont également présents.

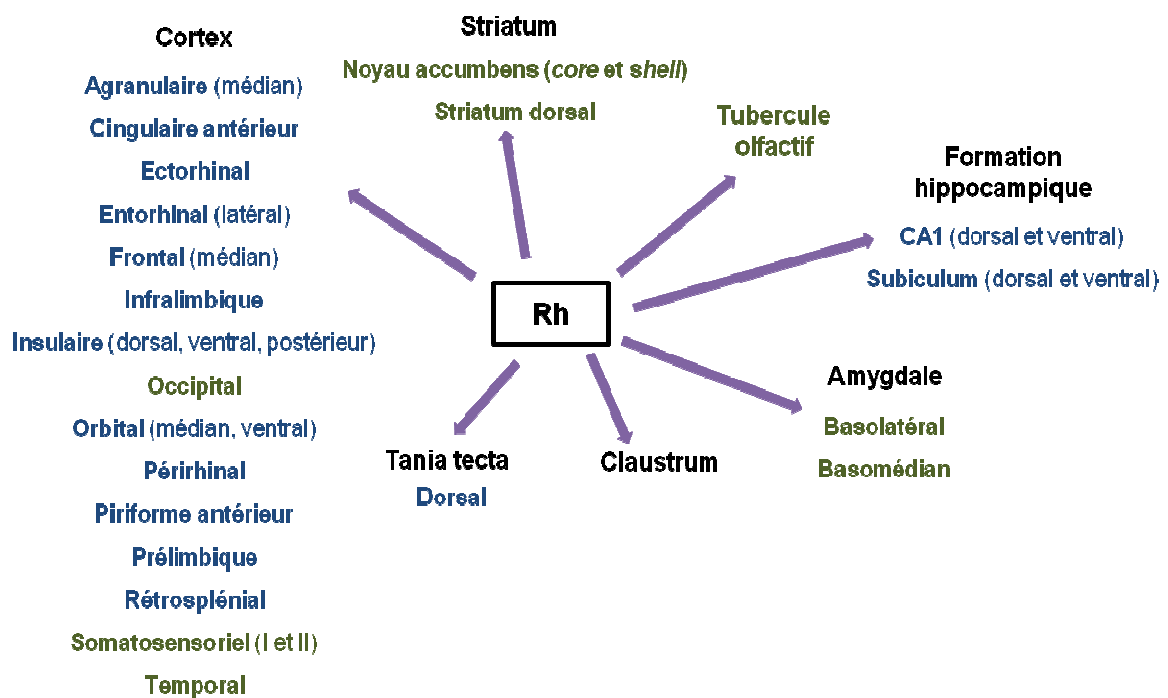


Figure 18 : Principales efférences du noyau rhomboïde (Rh). Les connexions spécifiques du Rh par rapport au noyau Re sont en vert.

En résumé, les neurones des noyaux Re et Rh sont idéalement positionnés pour intégrer des

informations provenant de régions corticales relativement diffuses. Ces neurones sont également influencés par les projections provenant de noyaux du tronc cérébral, impliqués dans la modulation des états de vigilance. De par leurs connexions à la fois avec des noyaux du tronc cérébral et des régions corticales impliquées dans le traitement d'informations sensorielles variées, Van der Werf et ses collaborateurs (2002) ont proposé une implication des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans la perception consciente polysensorielle. Par leurs connexions avec le mPFC et l'HPC, les noyaux Re et Rh pourraient également être impliqués dans les processus mnésiques nécessitant la rétention de représentations mentales complexes.

2. Modulation de l'activité du mPFC et de l'HPC par les neurones de la partie ventrale de la ligne médiane du thalamus

Au vu des connexions particulières qu'entretiennent le Re et le Rh avec le mPFC et l'HPC, il est très probable que l'activité des neurones présents dans ces deux noyaux thalamiques influence celle des neurones du mPFC et de l'HPC, et inversement. De manière surprenante, il n'existe que très peu d'études ayant étudié l'influence d'une stimulation du Re et du Rh sur l'activité des cellules du mPFC et de l'HPC et aucune n'a étudié à ce jour l'influence d'une stimulation des neurones du mPFC et de l'HPC sur l'activité des neurones du Re et du Rh.

2.1. Modulation de l'activité du mPFC

La première démonstration expérimentale en faveur d'une influence des noyaux de la ligne médiane du thalamus sur l'activité du cortex préfrontal a été réalisée en 1942 par Dempsey et Morrison. Ces auteurs ont étudié les effets d'une stimulation du thalamus sur l'activité des neurones des cortex non primaires. Les données obtenues montrent alors qu'une stimulation répétée de la ligne médiane du thalamus entraîne des modifications de l'activité des neurones des cortex non primaires. Plus récemment, Viana di Prisco et Vertes (2006) ont implanté des électrodes d'enregistrement dans le mPFC de rat afin d'observer des potentiels de champs dans les cortex agranulaire médian, cingulaire antérieur, PL et IL. Ces auteurs ont observé que la stimulation des noyaux paraventriculaire et Re induisait des potentiels de champs de large amplitude dans le cortex PL. Les auteurs se sont ensuite intéressés plus particulièrement aux effets d'une stimulation du Re et du Rh, qui, en comparaison à l'état de repos, ont induit une faible déviation positive du signal (P1 ; +0.1 mV), suivie par une déviation négative (N2 ; -0.85 mV) et enfin une déviation positive plus importante que la première (P2 ; +0.68 mV). La

durée de ces modifications du signal était respectivement de 5, 25 et 70 ms. Quel qu'était l'emplacement des électrodes d'enregistrement dans le mPFC, les latences des potentiels évoqués correspondaient à une transmission monosynaptique excitatrice, corrélant ainsi les données anatomiques concernant la connexion directe du Re et du Rh vers le mPFC. Ces auteurs ont également étudié les effets de deux stimulations appariées (*paired-pulse stimulation*) et ont observé un phénomène de facilitation induit par la première stimulation sur la seconde (*paired-pulse stimulation*). En effet, l'augmentation d'amplitude de la seconde stimulation était plus importante dans les cortex IL (+83%) et PL (+75%) que dans le cortex cingulaire antérieur (+22%). Les changements observés dans les cortex PL et IL étaient équivalents à ceux enregistrés dans l'HPC dorsal après le même type de stimulation (+62%). Dans une étude plus récente, Eleore et ses collaborateurs (2011) ont également observé que deux stimulations appariées du Re, chez la souris, induisaient une facilitation de la seconde réponse dans le mPFC, démontrant ainsi clairement que l'activation des neurones de Re est capable de produire un phénomène de plasticité à court terme dans le mPFC.

2.2. Modulation de l'activité de l'hippocampe

En 1985, Van der Wolf et ses collaborateurs ont effectué des lésions électrolytiques des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus pour en évaluer l'impact sur le rythme thêta hippocampique mais n'ont trouvé aucun effet. Hirayasu et Wada (1992a, b) ont observé qu'une activation importante des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus par injection d'un agoniste des récepteurs glutamatergiques, le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), induisait des convulsions généralisées associées à un enregistrement électro-encéphalographique caractéristique des crises épileptiques de type limbique. Cette injection a également facilité l'embrasement ultérieur de l'HPC. Bien que démontrées de façon indirecte, les données obtenues dans les études réalisées par Hirayasu et Wada ont montré que le Re pouvait exercer une influence sur l'activité et le fonctionnement de l'HPC (voir aussi Miller et Ferrendelli, 1990 ; Miller et coll., 1989 ; Patel et coll., 1988). En 2001, Bertram et ses collaborateurs rapportent qu'un blocage sélectif de l'activité des neurones de la ligne médiane du thalamus inhibe l'embrasement de l'activité observée dans l'HPC (CA3), dans un modèle de crises d'épilepsie d'origine limbique. Sur des rats anesthésiés par inhalation d'uréthane, Dolleman-Van der Weel et ses collaborateurs (1997) ont stimulé le Re et enregistré des potentiels de champs ainsi que l'activité unitaire de neurones à différentes profondeurs dans la région CA1 de l'HPC dorsal. En fonction de la profondeur du tissu, les auteurs de cette étude ont observé des variations positives du signal, entre la couche *radiatum* et *alveus* de

CA1, et des variations négatives dans la couche *lacunosum-moleculare* de CA1. En accord avec les données anatomiques, aucune de ces modifications n'a été observée au niveau du gyrus denté. Concernant les variations négatives du signal, les auteurs ont observé des latences de réponse correspondant à des connexions mono ou di-synaptiques. Les latences monosynaptiques ont été enregistrées lors des stimulations de la partie rostrale du Re. Les latences di-synaptiques ont été observées lors de la stimulation de la partie caudale du Re. Lorsque les stimulations étaient réalisées au centre du Re, des réponses plus complexes étaient enregistrées, combinant des variations rapides du signal avec des latences monosynaptiques suivies par des variations plus lentes, faisant probablement intervenir des connexions di-synaptiques. Fondée sur ces observations, les auteurs ont émis l'hypothèse que la partie caudale du Re possède des neurones qui projettent vers la partie rostrale du Re, dans laquelle sont localisés des neurones qui projettent directement vers l'HPC. Cette hypothèse a été confirmée par l'injection d'un traceur anterograde dans le Re caudal qui a été transporté dans la partie ventrale du Re (Dolleman-Van der Weel et coll., 1997). A partir de leurs résultats électrophysiologiques et anatomiques, ces auteurs ont élaboré un modèle anatomo-fonctionnel dans lequel les neurones du Re peuvent influencer de façon mono ou di-synaptique les cellules pyramidales de la région CA1 de l'HPC via les synapses établies au niveau des dendrites apicaux de la couche *lacunosum-moleculare*. Cette influence est supposée excitatrice d'après les données électrophysiologiques. D'autres projections peuvent former des synapses avec les dendrites d'interneurones inhibiteurs ou excitateurs qui possèdent des prolongements issus de la couche *radiatum* vers la couche *lacunosum-moleculare*. Enfin, une autre population d'interneurones, pouvant être influencés par les neurones du Re, ont leurs corps cellulaires dans les couches *alveus* et *oriens* de CA1. Lorsque ces interneurones sont activés, ils exercent une action inhibitrice sur les cellules pyramidales. De plus, via le subiculum, les neurones pyramidaux de la région CA1 projettent en retour vers le Re et ferment ainsi une boucle fonctionnelle dans laquelle le Re module l'activité de CA1, et ceci en tenant compte des informations provenant de l'HPC. L'étude menée par Bertram et Zhang (1999) contribue au modèle proposé par Dolleman-Van der Weel et ses collaborateurs. Dans cette étude, les auteurs ont étudié l'activité des cellules de CA1 suite à une stimulation soit du Re soit de CA3 et ont montré que la stimulation du Re et de CA3 provoque des effets comparables (effets excitateurs d'amplitudes comparables) mais des conséquences physiologiques différentes, suite à des stimulations répétées. Premièrement, lorsque deux stimulations appariées étaient réalisées avec un délai très court entre les deux stimulations, cela résultait en une suppression de la seconde réponse lorsque CA3 était stimulé alors que la

réponse était facilitée lorsque la stimulation était effectuée dans le thalamus. Deuxièmement, la stimulation répétée (3 stimulations) des noyaux thalamiques a entraîné une augmentation progressive de l'amplitude des potentiels post-synaptiques. En revanche, la stimulation répétée de CA3 n'a entraîné qu'une faible augmentation d'amplitude au niveau de CA1 lors de la deuxième stimulation, un plateau était observé lors des stimulations suivantes. Les réponses enregistrées dans CA1 étaient toujours significativement plus élevées après une stimulation du thalamus qu'après une stimulation de CA3. Enfin, ces auteurs ont observé que l'induction d'une LTP au niveau des neurones pyramidaux de CA1 pouvait être observée après une stimulation conditionnée des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus. Cette stimulation n'a pas entraîné de modification des réponses enregistrées dans CA1 suite à une stimulation de CA3, ce qui suggère que la LTP induite était bien spécifique des connexions entre le thalamus et CA1. Plus récemment, une étude a montré que l'activité des neurones du Re pouvait dépendre du rythme thêta hippocampique. Morales et ses collaborateurs en 2007 ont stimulé des neurones du Re et enregistré des potentiels évoqués au niveau de la région CA1 de l'HPC chez des rats anesthésiés. Ils ont observé que lorsqu'ils induisaient une activité de type thêta par le pincement de la queue de l'animal, il y avait une réduction de la latence des potentiels évoqués dans l'HPC en comparaison à un état du système sans activité thêta. Ces auteurs ont également observé une augmentation de la décharge des neurones du Re lors de la présence du rythme thêta en comparaison avec des périodes qui précèdent et qui suivent immédiatement l'induction de ce rythme (Morales et coll., 2007). La modulation de l'activité des neurones du Re couplée au rythme thêta a également été démontrée dans l'étude publiée récemment sous la forme d'un résumé en vue d'une présentation de poster lors du congrès américain des neurosciences (Ito et coll., 2012). Ce groupe norvégien a également montré que l'activité des neurones du Re dépendait de la trajectoire des rats dans un test d'alternance dans un labyrinthe en T et que la modulation de la fréquence de décharge des cellules de CA1 en fonction de la trajectoire de l'animal dans la même tâche, était diminuée après une lésion du noyau Re (Ito et coll., 2012, voir aussi Wood et coll., 2000). Ces données montrent que l'activité des neurones de CA1 est influencée par celle du noyau Re et que ces interactions sont dépendantes du rythme thêta. De façon très intéressante, une étude récente a mis en évidence que l'administration de kétamine (50 mg/kg), un antagoniste des récepteurs NMDA, par voie intra-péritonéale, induit une augmentation de la décharge des neurones dans le Re et dans la région CA1 de l'HPC, ainsi qu'une augmentation de la puissance des oscillations delta dans les deux structures. Cette augmentation des oscillations delta dans l'HPC peut également être observée après une injection de kétamine directement dans le Re et peut être bloquée par

l'injection de muscimol dans le Re. Ces auteurs ont relié leurs observations à la physiopathologie de la schizophrénie. En effet, certaines études montrent qu'il y a une augmentation de la puissance du rythme delta chez les patients atteints de schizophrénie lorsqu'ils sont éveillés (Boutros et coll., 2008 ; Clementz et coll., 1994 ; Fehr et coll., 2001) alors que ce rythme est normalement observé lors du sommeil lent chez des sujets sains (McCormick et Bal, 1997). A ce sujet, il est intéressant de noter que les agents anti-psychotiques typiques ou atypiques induisent une augmentation de l'expression de protéines, telle que c-Fos, dans les noyaux de la ligne médiane du thalamus, Re et Rh compris (Cohen et coll., 1998 ; Vaisanen et coll., 2004).

Les résultats obtenus par ces évaluations électrophysiologiques constituent des arguments solides en faveur d'une modulation de l'activité du mPFC et de l'HPC par le Re et le Rh. Ainsi ces deux noyaux thalamiques pourraient jouer un rôle important dans certaines fonctions cognitives, et plus particulièrement dans les processus mnésiques, sous-tendus par le mPFC, l'HPC ou nécessitant une interaction entre ces deux structures cérébrales. Cette hypothèse a guidé la majeure partie de mon travail de thèse.

3. Implication des noyaux Re et Rh du thalamus dans la mémoire

3.1. Apprentissage associatif : test de l'évitement passif

Le test de l'évitement passif est utilisé pour évaluer les fonctions mnésiques basées sur l'association entre un stimulus aversif, tel qu'un léger choc électrique, avec un contexte environnemental particulier. Classiquement, l'expérience est réalisée dans un dispositif constitué de deux compartiments, l'un faiblement éclairé et à un second compartiment avec un éclairage d'une plus forte intensité. Dans ce test, le rongeur a tendance à préférer le compartiment obscur et, lorsqu'il est placé dans le compartiment éclairé, il ira très rapidement dans le compartiment obscur et y passera significativement plus de temps. Lors de l'acquisition de la tâche, l'animal est placé dans le compartiment le plus éclairé et lorsqu'il entre dans le compartiment obscur, un léger choc électrique est délivré au niveau de ses pattes. Une porte guillotine empêche l'animal de s'échapper du compartiment obscur lors de la délivrance du choc électrique. Pour le test de rétention, l'animal est à nouveau placé dans le compartiment le plus éclairé et la latence d'entrée dans le compartiment obscur est mesurée. Lorsque l'association entre le choc électrique et le contexte obscur est réalisé, la latence d'entrée dans le compartiment obscur sera beaucoup plus longue par rapport à la latence initiale, avant que l'association ait eu lieu. Zhang et ses collaborateurs (2011) ont montré, par

la quantification de la protéine c-Fos, que l'HPC, le mPFC et l'amygdale étaient impliqués dans l'acquisition du test d'évitement passif. Du fait des connexions entre ces trois régions cérébrales et les noyaux Re et Rh, Davoodi et ses collaborateurs (2011) ont voulu tester l'implication des noyaux Re et Rh dans l'acquisition, la consolidation et le rappel de l'association entre le choc électrique et le contexte obscur. Pour cela, ils ont effectué des inactivations réversibles des noyaux Re et Rh par instillation de tétracaïne. Ces instillations étaient réalisées soit juste avant la phase d'acquisition de la tâche, soit juste avant un test de rétention réalisé 24 h après la fin de l'acquisition, soit à différents délais après la fin de l'acquisition (5, 90 ou 360 min). Les résultats ont montré une diminution des performances de rétention des animaux lorsque les instillations étaient faites juste avant l'acquisition, juste avant le test de rétention et 5 min après la fin de l'acquisition. Ces données sont les premières à suggérer une implication des noyaux Re et Rh dans l'acquisition, la consolidation et le rappel d'un apprentissage de type associatif.

3.2. Mémoire de travail incluant la mémoire spatiale de travail

Lorsque la mémoire de travail implique le traitement d'informations spatiales ainsi qu'une mise à jour constante de ces informations, par exemple lors d'une tâche de navigation, les performances des animaux dépendent d'une contribution, voire d'une coopération entre le mPFC et l'HPC (Mair et coll., 1998 ; Porter et Mair, 1997; Vann et coll., 2000). Le test du labyrinthe radial à 8 branches a été très utile pour mettre en évidence l'implication du mPFC et de l'HPC dans la mémoire spatiale de travail. Dans le protocole classique de ce test, l'animal, en restriction alimentaire, est libéré au centre du dispositif et peut trouver de la nourriture à l'extrémité de chaque bras (Figure 19). Il l'ingère en une fois, de sorte qu'il ne lui sert à rien de revenir dans un bras déjà visité, on vérifie simplement que l'animal apprend à ne plus faire d'erreurs de ce type : on teste ainsi sa mémoire de travail. En général, la performance des rats dans ce type de protocole du labyrinthe radial est sensible aux perturbations du mPFC, et plus particulièrement du cortex PL (Seamans et coll., 1995), mais également à une déconnexion entre le mPFC et l'HPC (Aujla et Beninger, 2001; Floresco et coll., 1997, 1999; Seamans et coll., 1995, 1998).



Figure 19 : Le labyrinthe radial à 8 branches. Photographie prise au laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives de Strasbourg.

Hembrook et Mair (2011) ont réalisé des lésions excitotoxiques des noyaux Re et Rh avant l'acquisition du protocole classique dans le labyrinthe à 8 branches. Dans ce test, les performances des animaux lésés étaient significativement moins bonnes que celles des animaux contrôles. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une implication des noyaux Re et Rh dans une tâche mnésique qui nécessite une interaction entre le mPFC et l'HPC (Hembrook et Mair, 2011). Une étude plus récente des mêmes auteurs a apporté de nouveaux éléments en faveur de cette hypothèse (Hembrook et Mair, 2012). Dans cette seconde étude, les auteurs ont testé les effets d'une inactivation réversible (par instillations de muscimol à différentes concentrations) des noyaux Re et Rh, soit dans un test dépendant de l'HPC et du mPFC soit dans un test uniquement affecté par des lésions de l'HPC. Dans cette expérience, les rats, en restriction alimentaire, étaient d'abord entraînés dans une chambre opérante équipée de deux leviers rétractables. Lors de la première étape de ce test, un seul levier était présent, puis, après des délais de 1, 5 ou 25 secondes, les deux leviers étaient présentés. La récompense alimentaire était délivrée lorsque le levier, différent de celui présenté lors de la première étape du test, était pressé. La réalisation de ce test est dépendante de l'intégrité fonctionnelle du mPFC et de l'HPC (Porter et coll., 2000). Les auteurs ont observé une altération des performances des rats dans ce test suite à l'instillation de muscimol quelle que soit la concentration utilisée et quel que soit le délai de rétention. Dans la seconde expérience, les mêmes rats étaient testés dans un protocole du labyrinthe radial à 8 branches où un délai est instauré entre chaque essai et où les choix des branches appâtées varient d'un essai à l'autre (*a delayed non-matching protocol* en anglais). La réalisation de ce test est dépendante de l'HPC mais pas du mPFC (Mair et coll., 1998 ; Porter et coll., 2000), contrairement à la version classique du labyrinthe radial décrite plus haut (Hembrook et Mair, 2011). Dans cette tâche, la perturbation des performances des rats lésés était indépendante du

délai de rétention mais dépendante de la dose injectée, seule la concentration la plus importante de muscimol (2.5 nmol) a induit une diminution significative du nombre de réponses correctes. Les auteurs ont proposé comme interprétation de leurs résultats qu'une inactivation circonscrite aux noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus, obtenue avec la dose la plus faible de muscimol, produisait des perturbations du comportement uniquement dans des tâches dépendantes à la fois du mPFC et de l'HPC. Lors du second test, dans lequel les résultats étaient dépendants de la dose de muscimol, les effets obtenus avec la forte dose ont été imputés à une inactivation de régions distantes des noyaux Re et Rh (Hembrook et Mair, 2012). Ces conclusions sont en accord avec les données d'imagerie cérébrale obtenues par Vann et ses collaborateurs (2000a). En quantifiant l'expression de la protéine c-Fos, ces auteurs ont étudié l'implication de nombreux noyaux thalamiques dans la mémoire spatiale de travail. Dans cette expérience, les animaux sont entraînés dans un protocole classique du labyrinthe radial à 8 branches et testés dans le même dispositif soit dans la même salle (condition 1) soit dans une nouvelle salle (condition 2) comportant de nouveaux indices visuels. Un troisième groupe de rats (condition 3) n'avait accès qu'à une seule des branches et qui était appâté autant de fois que dans les deux autres conditions expérimentales. Ainsi, les conditions expérimentales différaient quant à la demande spatiale, c'est-à-dire en terme de traitement des indices visuels. Les résultats ont montré une augmentation significative de la protéine c-Fos dans le noyau Re en fonction de l'augmentation de la demande d'utilisation des indices visuels (condition 1 < condition 2 < condition 3). Ce profil d'activation était similaire pour le cortex PL (Vann et coll., 2000a) ainsi que pour l'HPC dorsal et ventral (Vann et coll., 2000b).

3.3. Mémoire spatiale de référence

L'étude de l'implication des noyaux Re et Rh dans la mémoire spatiale de référence a été réalisée par l'évaluation des effets d'une lésion excitotoxique ou d'une inactivation réversible de ces noyaux dans le test de la piscine de Morris. En 2009, Davoodi et ses collaborateurs ont publié les résultats suivants : (1) l'injection de tétracaïne dans les noyaux Re et Rh juste avant une session d'acquisition en piscine de Morris avec un protocole de mémoire de référence perturbe l'acquisition de la tâche sans avoir de conséquence sur le test de rappel ; (2) une inactivation des noyaux Re et Rh réalisée immédiatement après la fin de la session d'acquisition ou juste avant le test de rappel empêche les rats de se souvenir de l'emplacement de la plate-forme lors du test de rétention effectué 24h après la fin de l'acquisition. De par les connexions particulières qu'entretiennent les noyaux Re et Rh avec l'HPC et le fait que cette

tâche soit dépendante de l'HPC (D'Hooge et De Deyn, 2001 ; Silva et coll., 1998), ces conclusions paraissent plausibles. Cependant, dans cette étude, les rats contrôles avaient des performances équivalentes à une recherche aléatoire de la plate-forme lors du test de rétention. Autrement dit, les résultats des animaux expérimentaux étaient comparés à des animaux qui n'étaient pas capables de retrouver l'emplacement de la plate-forme (Davoodi et coll., 2009). Cette observation rend difficile voire impossible de conclure quant à l'implication des noyaux Re et Rh dans le rappel d'une mémoire spatiale de référence. Une seconde étude concernant l'implication des noyaux Re et Rh dans la mémoire spatiale de référence a été publiée au début de l'année 2009 par Dolleman-Van der Weel et ses collaborateurs. Dans cette étude, les auteurs ont comparé les effets d'une lésion excitotoxique des noyaux Re et Rh à ceux d'une lésion bilatérale de l'HPC ou du noyau thalamique médio-dorsal. Les rats ont été entraînés à raison de 6 sessions de 3 essais par jour pendant trois jours et un test de rétention a été réalisé 24 heures après la dernière session. Bien que tous les rats aient amélioré leurs performances au fur et à mesure des essais et des sessions lors de l'acquisition, les animaux ayant des lésions soit de l'HPC soit du thalamus médio-dorsal avaient des performances significativement moins bonnes que les groupes contrôles. Lors du test de rétention, seuls les rats ayant une lésion de l'HPC avaient des performances qui ne différaient pas d'une recherche au hasard de l'emplacement préalable de la plate-forme. Les auteurs ont effectué une analyse de la stratégie utilisée par les rats lors du test de rétention. Cette analyse a montré que les rats avec une lésion des noyaux Re et Rh nageaient directement vers l'emplacement où se situait la plate-forme lors des séances d'acquisition mais ne persistaient pas dans le quadrant comme les rats contrôles le faisaient. Les auteurs en ont conclu à une implication des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans les changements de stratégies et plus particulièrement dans la suppression d'un comportement inadapté, cette fonction cognitive étant sous-tendue par le mPFC et l'HPC ventral (Chudasama et coll., 2012).

Ainsi, au moment de commencer ma thèse, il y avait très peu d'études concernant l'implication des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans les processus sous-tendant la mémoire et en particulier la mémoire spatiale et aucune concernant l'implication de ces noyaux thalamiques dans la consolidation à long terme d'une mémoire spatiale chez le Rat. Etant donné les connexions entre les Re et Rh avec d'une part le mPFC, et d'autre part l'HPC (surtout sa partie ventrale), l'hypothèse de l'implication de ces noyaux thalamiques dans les processus mnésiques était très probable et méritait d'être vérifiée.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Sujets d'expérimentations

1.1. Souche utilisée

Toutes les expériences présentées dans cette thèse ont été réalisées avec des rats mâles de la souche Long-Evans (provenance centre d'élevage R. Janvier, France). Cette souche de rats est fréquemment utilisée dans les tâches d'apprentissage et de mémoire spatiale du fait de leur bonnes capacités visuelles (D'Hooge et coll., 2001 ; Paul et coll., 2009). Harker et Whishaw (2002) ont par ailleurs montré que les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale des rats Long-Evans étaient non seulement excellentes, mais aussi similaires à celles de la souche sauvage.

1.2. Âge des animaux

Les rats étaient âgés de trois mois et pesaient entre 250 et 300 grammes à leur arrivée au laboratoire. Ils ont été testés environ 1 mois après leur arrivée, une à deux semaines après l'intervention chirurgicale, soit vers l'âge de 4 mois.

1.3. Conditions d'élevage

A leur arrivée au laboratoire, les rats ont été 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 ainsi que les salles d'évaluations comportementales étaient maintenues à température ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et humidité ($50\% \pm 10\%$) constantes. Les animaux étaient soumis à un rythme nyctéméral constant, comprenant une période d'obscurité et de lumière de 12 heures chacune (la phase diurne allant de 7 h à 19h). L'ambiance sonore était entretenue par une radio FM pendant la journée. Enfin, les rats disposaient d'eau et de nourriture *ad libitum* et étaient testés pendant la phase diurne.

2. Interventions chirurgicales

Tous les rats utilisés dans les différentes expériences de cette thèse ont subi une intervention chirurgicale consistant soit en une lésion excitotoxique des noyaux reuniens (Re) et rhomboïde (Rh) du thalamus, soit en une implantation unilatérale d'une canule en vue d'une

instillation dans les noyaux Re et Rh ou encore en une implantation bilatérale lorsque les instillations étaient réalisées dans le cortex préfrontal médian (mPFC) ou dans les deux sous-régions hippocampiques (dorsale : dHipp et ventrale : vHipp). Ces opérations avaient lieu avant le début des évaluations comportementales. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées lors de ces différentes opérations étaient calculées à partir de l'atlas stéréotaxiques de Paxinos et Watson (1998).

2.1. Lésions excitotoxiques

Pour effectuer les lésions excitotoxiques, nous avons injecté, par chirurgie stéréotaxique, du N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) directement dans le parenchyme au niveau des noyaux Re et Rh. Pour cela, les rats étaient anesthésiés avec du pentobarbital (50 mg/kg) par injection intrapéritonéale. Après avoir rasé le crâne du rat, celui-ci était placé sur un cadre stéréotaxique et recevait une injection sous-cutanée de xylocaïne (0.1 mL/rat) au niveau du scalp. Les rats recevaient également une injection intra-musculaire d'antibiotique (0.3 mL/rat, Extencilline) et leurs yeux étaient protégés par un gel ophtalmique (Lacrigel). Le scalp était alors incisé et dégagé localement pour laisser apparaître la boîte crânienne et les structures osseuses. Après craniotomie, les lésions excitotoxiques des noyaux Re et Rh étaient réalisées par instillation de 0.12 M de NMDA (Sigma, Saint-Louis, USA) dissout dans une solution de tampon phosphate salin (PBS). Ces instillations étaient réalisées avec une canule d'instillation (\emptyset 0.28 mm) connectée à une micro-pompe motorisée via un cathéter. Un volume de 0.10 μ L par site de NMDA était injecté lentement pendant une période de 5 minutes (0.02 μ L / min). Après avoir laissé la canule *in situ* pendant 5 minutes supplémentaires, afin de s'assurer de la diffusion du NMDA dans la structure cible et d'éviter la remontée du produit le long de la canule, celle-ci était délicatement retirée. En prenant un angle afin d'éviter le sinus sagittal, les rats recevaient au total 3 injections de NMDA. Ces instillations étaient ainsi faites soit en passant par l'hémisphère gauche soit en passant par l'hémisphère droit. Les deux premières instillations étaient réalisées avec un angle de 15° par rapport à la suture sagittale selon les coordonnées suivantes (Paxinos et Watson, 1998) : AP (antéro-postérieur) = -1.6 mm, -2.3 mm par rapport au bregma ; ML (médio-latéral) = \pm 2.0 mm par rapport à la suture sagittale ; DV (dorso-ventral) = -6.9 mm et -7.0 mm par rapport à la dure-mère. La troisième instillation était réalisée avec un angle de 10° par rapport à la suture sagittale selon les coordonnées suivantes : AP = -3.0 mm ; ML = \pm 1.4 mm ; DV = 7.0 mm. Les rats contrôles (SHAM) subissaient la même opération à l'exception des instillations de NMDA, seul le PBS était instillé. Une fois les instillations terminées, le crâne et le scalp étaient nettoyés puis le scalp

était refermé par des points de suture. Les rats étaient alors placés sous des lampes chauffantes. Dès leur réveil, ils étaient déposés dans leur cage d'élevage. Les animaux bénéficiaient d'une période de récupération de deux semaines avant le début des tests comportementaux et étaient manipulés quotidiennement afin de s'assurer de leur état de santé.

2.2. Inactivations fonctionnelles réversibles

2.2.1. Protocole des implantations de canules

Les implantations de canules étaient réalisées sur des rats anesthésiés avec un mélange de xylazine (0.85 mg/kg Rompun, 2% Centravet, Nancy, France) et de kétamine (6.38 mg/kg Imalgène 500, Centravet, Nancy, France) par injection intra-péritonéale. Les animaux étaient ensuite placés dans un cadre stéréotaxique. Jusqu'à la craniotomie, les procédures de désinfection et d'incision du scalp ainsi que l'injection d'antibiotique étaient strictement les mêmes que celles réalisées lors des lésions excitotoxiques. Trois perforations de la boîte crânienne étaient effectuées à l'aide d'une fraise dentaire afin d'y placer trois vis d'horloger, deux dans les os pariétaux et une dans l'os frontal. Ces vis permettaient un bon maintien du dispositif d'instillation. Enfin, un ou deux trous étaient réalisés au niveau de la boîte crânienne afin de pouvoir descendre, selon l'expérience réalisée, un ou deux guides canules pour une instillation uni- ou bilatérale.

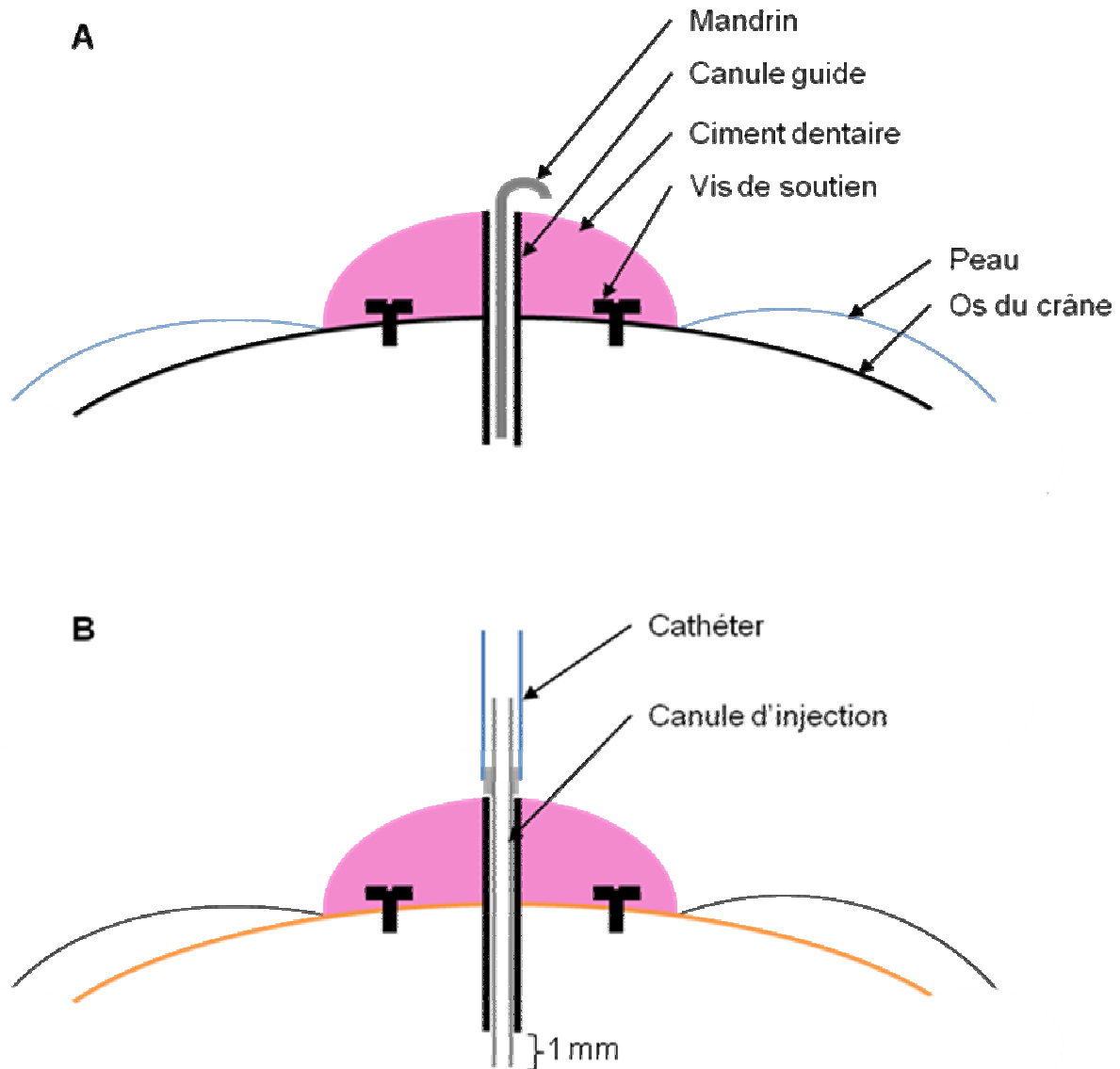


Figure 20. Représentations schématiques du dispositif d'instillation intra-cérébrale. A Le dispositif expérimental est constitué d'une canule-guide implantée dans la structure d'intérêt et d'un mandrin glissé dans la canule-guide afin d'éviter son obstruction.

Les coordonnées stéréotaxiques dans le cas d'une implantation unilatérale en vue d'une instillation dans les noyaux Re et Rh, réalisée avec un angle de 15° par rapport à la suture sagittale, étaient les suivantes : AP = -2.3 mm ; ML = ± 1.7 mm ; DV = -6.2 mm (Paxinos et Watson, 1998). Les coordonnées utilisées en vue d'une implantation bilatérale de deux guides canules étaient les suivantes : pour une implantation dans le dHipp AP = -3.8 mm ; ML ± 2.4 mm ; DV = -2.2 mm et pour une implantation dans le vHipp AP = -5.6 mm ; ML = ± 5.1 mm ; DV = -6.8 mm. Lorsque la cible était le mPFC, les coordonnées étaient les suivantes : AP = -3.8 mm ; ML = ± 2.4 mm ; DV = -6.2 mm. Les guides canules étaient maintenus en place par du ciment dentaire. Elles étaient ensuite entourées d'un cylindre en plastique pour les protéger

des chocs, et un mandrin était placé dans chaque canule pour en éviter l'obstruction. Les rats étaient ensuite placés sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil puis ramenés dans leur cage. Les animaux bénéficiaient d'au moins 7 jours de récupération avant le début des tests comportementaux.

2.2.2. Composés pharmacologiques

En vue d'inactiver temporairement les régions cérébrales d'intérêt, notre choix s'était porté sur la lidocaïne et le muscimol (LIDO ou MSCI, Sigma, Saint-Louis, USA). La LIDO est un anesthésique local qui, en bloquant les canaux sodiques dépendants du voltage, empêche la genèse et la propagation de potentiel d'action (Lomber 1999 ; Malpeli 1999). L'une des critiques majeure de l'utilisation de la LIDO est le blocage des fibres nerveuses qui passent la structure cérébrale au sein de laquelle l'instillation est réalisée. C'est l'une des raisons qui nous a conduits à utiliser le MSCI dans les dernières expériences que j'ai réalisées au cours de ma thèse (Publication 3). En effet, le MSCI est connu pour permettre l'inactivation des neurones sans modifier l'excitabilité des fibres de passages (Edeline et coll., 2002 ; van Duuren et coll., 2007). Le MSCI est un agoniste des récepteurs GABA_A qui augmente la perméabilité membranaire des ions chlorures et qui de ce fait accroît la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane plasmique des neurones. Ce changement de potentiel a pour conséquence une diminution du seuil d'excitabilité de la cellule et de ce fait de la probabilité de générer un potentiel d'action. Les concentrations utilisées étaient de 20 µg/0.3 µL lors d'instillation de LIDO dans les noyaux Re et Rh et de 40 µg/µL lorsque les instillations étaient réalisées dans les sous-régions hippocampiques et le mPFC. Ces doses ont fait l'objet d'une validation au sein du laboratoire (Lopez et coll., 2012 ; Pereira de Vasconcelos et coll., 2006). Les concentrations de MSCI étaient de 0.25 µg/0.3 µL pour les noyaux Re et Rh et de 0.25 µg/1 µL pour le dHipp et le mPFC. La LIDO et le MSCI étaient dissous dans du PBS. La solution était préparée à température ambiante et agitée à l'aide d'un Vortex le jour où les instillations avaient lieu.

2.2.3. Procédure pour les inactivations

Habituation

La mise en œuvre de la technique d'inactivation réversible par instillation intra-cérébrale de LIDO ou de MSCI nécessite une période pendant laquelle les rats sont habitués progressivement à l'ensemble du protocole d'instillation. En effet, cette technique requiert le maintien de l'animal pendant toute la durée de l'instillation et de la diffusion de la substance

dans le parenchyme, soit plusieurs minutes. L'habituation a lieu durant plusieurs jours pour diminuer progressivement la réaction de stress que l'on provoque par le maintien de l'animal. Ainsi, dans nos expériences, 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. Le premier jour d'habituation, le rat est maintenu ainsi pendant au moins 30 secondes. Le jour suivant, les mandrins étaient retirés des guides canules et placés dans une solution d'éthanol (70%), le rat était maintenu en contention pendant 1 minute et les mandrins étaient remis en place. Les troisième et quatrième jours étaient identiques, mais avec une contention plus longue d'une durée de 1 min 30 sec et 2 min, respectivement. Le temps nécessaire pour l'instillation de LIDO ou de MSCI était de 1 min 30 sec pour des instillations réalisées dans les noyaux Re et Rh et de 2 min pour les sous-régions hippocampiques et le mPFC. Ainsi, le protocole d'habituation au temps de maintien de l'animal était de 3 jours pour l'instillation dans les noyaux Re et Rh et de 4 jours pour l'instillation dans les deux sous-régions hippocampiques et le mPFC. La veille du test de rétention, les mandrins étaient retirés et le rat recevait une instillation de PBS filtré avec un volume et débit d'injection identiques à ceux pour l'instillation de LIDO ou de MSCI lors du jour de test, soit 1 μL / 90 sec pour les deux sous-régions hippocampiques et le mPFC et 0.3 μL /60 sec pour les noyaux Re et Rh. L'instillation était suivie d'une période de 30 sec (temps de diffusion de la substance) avant de retirer les canules d'injection et remettre les mandrins. L'ensemble de ces procédures permettaient à l'animal de s'habituer progressivement au dispositif et à toute la procédure mise en œuvre lors des instillations.

Dispositif et procédure des instillations

Une pompe de micro-injection était utilisée pour effectuer les instillations intra-hippocampiques, intra-mPFC et intra-ReRh de LIDO ou de MSCI à une vitesse de 0.66 μL /min et 0.3 μL /min, respectivement. Cette pompe était munie d'une seringue Hamilton de 10 μL reliée à une canule d'injection par un cathéter en polyéthylène. L'ensemble seringue-cathéter-canule d'injection était préalablement rempli d'eau ultra pure et son étanchéité était vérifiée. La substance à injecter était aspirée à partir de la canule d'injection en prenant soin d'intercaler une petite bulle d'air (0.2 μL) entre l'eau ultra pure et la solution. L'emplacement de la bulle d'air était marqué afin de vérifier que l'injection se faisait correctement (la bulle doit se déplacer sans se comprimer). Le jour du test, les rats recevaient alors une instillation de LIDO, de MSCI ou de PBS. Toutes les instillations de LIDO étaient effectuées 5 à 10 minutes avant le passage du rat dans un test comportemental. Les instillations de MSCI

étaient effectuées 30 min avant les tests comportementaux, ce délai correspondant à l'effet maximal de la substance (Edeline et coll., 2002 ; va Duuren et coll., 2007).

3. Évaluations comportementales

L'ensemble des tests comportementaux était effectué au cours de séances réparties entre 9h et 13h, et l'ordre de passage des animaux était différent d'un jour à l'autre dans le but de minimiser l'impact de la variation du niveau d'éveil et de la vigilance au cours de la journée sur les performances comportementales.

3.1. Piscine de Morris

3.1.1. Description du dispositif

La piscine de Morris est une enceinte circulaire en PVC blanc de 160 cm de diamètre et de 60 cm, de hauteur découpée virtuellement en 4 quadrants égaux (Figure 21). Lors des tests, la piscine est remplie à mi-hauteur, soit environ 700 Litres d'eau à une température de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Cette température confère à l'eau son caractère aversif pour l'animal et en fait donc une source de motivation nécessaire à la réalisation de la tâche. Une plate-forme cylindrique en plastique transparent de 11 cm de diamètre est disposée au centre de l'un des 4 quadrants et immergée 2 cm sous la surface de l'eau. Afin de rendre invisible cette plate-forme, 500 g de lait en poudre sont ajoutés de manière à opacifier l'eau. Ainsi, l'animal n'a pas la possibilité de visualiser la plate-forme lors de l'acquisition de la tâche. Une caméra placée au dessus de la piscine et reliée à un ordinateur (système Smart, SD Instruments, Etats-Unis) permettait de suivre le trajet du rat et d'enregistrer différents paramètres tels que la latence d'arrivée sur la plate-forme, la distance parcourue jusqu'à la celle-ci et dans les différentes zones de la piscine, ou encore la vitesse de nage. La salle dans laquelle se situe la piscine comportait des indices distaux stables (repères sur les murs, bureau, évier, etc.) permettant à l'animal de se repérer et de localiser la plate-forme (Lopez et coll., 2012).

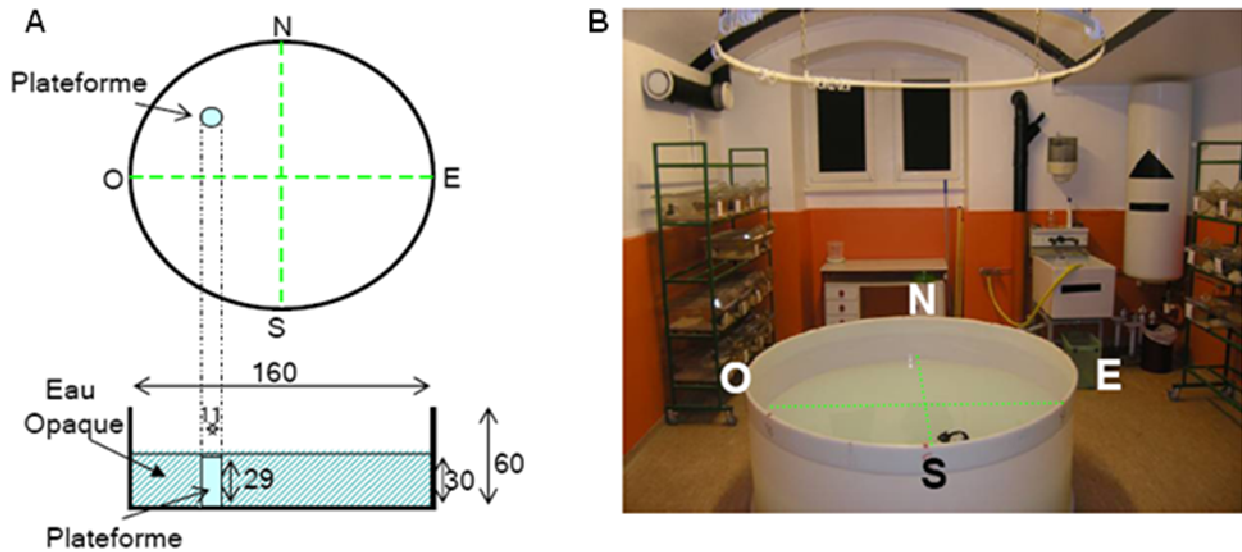


Figure 21 Schéma (A) et photographie (B) du dispositif du test de la piscine de Morris. Dimensions en cm.

3.1.2. Principe de la tâche

La piscine de Morris est conçue pour évaluer la capacité des animaux à utiliser des indices spatiaux et à se construire une représentation allocentrique d'un environnement (i.e., la source de l'information spatiale est purement externe) afin de mémoriser la localisation d'une plateforme fixe immergée sous la surface de l'eau (Morris, 1981). Ainsi, par la répétition des essais, ce test permet d'évaluer la mémoire de référence (qui concerne les règles et procédures propres à une situation, rappelées dès qu'elles sont nécessaires), dans la mesure où, malgré des points de départ différents au cours des essais, les rats sont amenés à retrouver le même but. Un apprentissage se traduira par une diminution progressive du temps ou de la distance d'accès à la plate-forme avec la répétition des essais et des jours de test.

3.1.3. Protocole d'acquisition

Le protocole utilisé était le même dans toutes les expériences. Le premier jour d'entraînement était constitué de 4 essais consécutifs avec une plateforme visible, afin d'habituer l'animal au dispositif et à la procédure expérimentale consistant notamment à monter sur une plateforme dans la piscine. Les rats étaient ensuite entraînés pendant 5 ou 8 jours avec une plateforme invisible (cachée sous la surface de l'eau opacifiée), à raison de 4 essais par jour. Lors de l'expérience d'inactivation des sous-régions hippocampiques avant chaque session d'acquisition, les rats étaient entraînés pendant 5 jours uniquement afin de limiter les effets tissulaires provoqués par des instillations répétées. Dans les expériences visant à tester le rappel au-delà de 24h après la fin de l'acquisition, les rats étaient entraînés 8 jours, ce qui

permettait d'obtenir de bonnes performances de rétention aux délais les plus longs (5 ou 25 jours) pour les groupes contrôles (Lopez et coll., 2012). Quel que soit le nombre de jours 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. Si l'animal ne la trouvait pas la lorsque le temps était écoulé, il était guidé vers celle-ci par l'expérimentateur. Les rats restaient alors 10 sec sur la plate-forme avant que l'expérimentateur ne lance l'essai suivant. La latence, la distance d'accès à la plate-forme ainsi que le temps passé par les animaux à proximité des parois de la piscine (thigmotaxie) étaient enregistrées comme paramètres de mesure pendant l'acquisition. L'apprentissage de la tâche se traduisait par une diminution progressive de ces trois variables avec la répétition des essais et des sessions.

3.1.4. Test de rétention

Lors des tests de rétention, la plate-forme était retirée de l'enceinte et les rats lâchés d'un point de départ différent de ceux utilisés lors de l'acquisition de la tâche, n'avaient qu'un seul essai de 60 sec. Le temps passé dans chaque quadrant était enregistré ainsi que le nombre de passages dans l'aire cible, c'est-à-dire une surface comprenant la zone de la plate-forme élargie d'un anneau de 10 cm (soit un disque de 700 cm² centré sur la plate-forme et représentant 3,5% de la surface totale de la piscine). Le nombre de passages dans cette zone rend compte de la précision de la recherche. Un pourcentage de temps passé par l'animal dans le quadrant cible était également calculé de manière à faire apparaître une préférence pour ce quadrant. En effet, si les animaux ne manifestaient pas de préférence de place pour le quadrant dans lequel se situait la plate-forme lors de l'acquisition, ils passaient environ 25% du temps total de nage dans chacun des 4 quadrants. Au contraire, si le temps passé dans le quadrant cible était significativement supérieur à 25% du temps total de nage, nous en inférons que les animaux se souvenaient de l'emplacement de la plate-forme.

3.2. Labyrinthe du Double-H

3.2.1. Description du dispositif

Le labyrinthe du Double-H (DH) est constitué d'une allée horizontale reliant trois allées verticales (tels deux H contigus vus du dessus) en plexiglas (voir Figure 22). Les allées ou branches verticales du labyrinthe ont une longueur de 160 cm et une largeur de 20 cm. Chacune des branches est équipée de parois d'une hauteur de 35 cm. Par convention, les bras intermédiaires sont appelés Sud (S) et Nord (N). Les quatre branches latérales du labyrinthe sont désignées par leur emplacement vis-à-vis des deux bras centraux : Nord-Ouest (NO),

Nord-Est (NE), Sud-Est (SE) et Sud-Ouest (SO). Le DH est rempli à moitié avec un volume de 170 Litres d'eau à 21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). L'eau est opacifiée par l'ajout de 250 g de lait en poudre. Une plate-forme circulaire de 11 cm de diamètre et de 14 cm de hauteur est placée à l'extrémité de la branche cible (NE). Cette plate-forme est immergée à 1 cm sous la surface de l'eau. Le dispositif est installé dans une pièce dédiée, comportant des indices distaux fixes (évier, chauffe-eau, tuyauterie, formes géométriques aux murs).

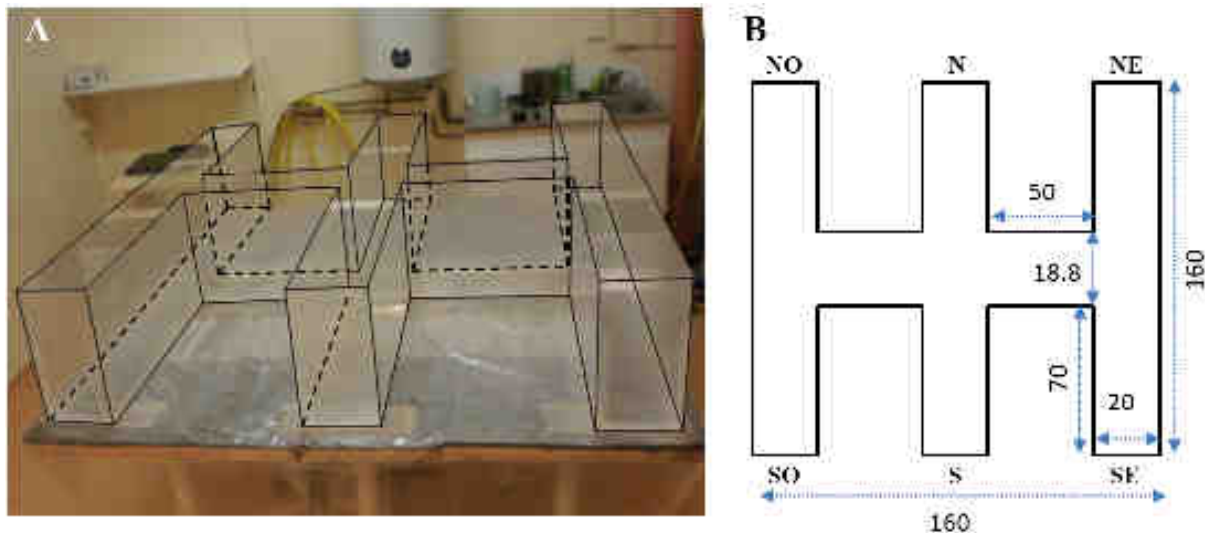


Figure 22 Photographie (A) et schéma (B) du dispositif du double-H. Dimension en cm.

3.2.2. Principe de la tâche

Le DH est un labyrinthe aquatique permettant d'évaluer les capacités de mise en place d'une mémoire spatiale et/ou procédurale chez le rongeur dans une situation « aversive » (Pol-Bodetto et coll., 2011 ; Cassel et coll., 2012). La tâche consiste à apprendre la localisation d'une plate-forme immergée en utilisant les indices visuels externes au dispositif (stratégie allocentrée) ou en répétant tous les jours le même trajet (stratégie égocentrée). Le principal avantage de ce dispositif est la possibilité pour l'expérimentateur de favoriser l'engagement d'une stratégie allocentrée ou égocentrée en fonction du protocole d'apprentissage utilisé. Ainsi, si l'animal est introduit dans le dispositif à différents endroits, mais que la plate-forme reste toujours à la même place, la stratégie la plus efficace pour l'animal est une stratégie allocentrée. A l'inverse, lorsque l'animal est systématiquement introduit dans la même situation et que la plate-forme ne change pas de place, la répétition de la tâche favorise l'utilisation d'une stratégie égocentrée.

3.2.3. Protocole d'acquisition

Le protocole avait pour objectif de favoriser la mise en place d'une stratégie allocentrique utilisée par le rat dans sa recherche de la plate-forme. Le premier jour permettait à l'animal de se familiariser au dispositif, à raison d'une session de 4 essais. Le rat était lâché face à la paroi à l'extrémité du bras nord-ouest (NO) et devait rejoindre la plate-forme immergée située à l'extrémité du bras sud-ouest (SO). Lors de cette session de familiarisation, l'eau n'était pas opacifiée et les animaux n'avaient pas accès à l'ensemble du dispositif, une porte guillotine était positionnée au niveau de la première intersection. Cette session de familiarisation était suivie de 4 jours d'apprentissage à raison d'une session de 4 essais par jour. La plate-forme était positionnée à l'extrémité de la branche nord-est (NE) et ne changeait pas d'emplacement lors de l'apprentissage de son emplacement. Les points de départ étaient soit la branche nord (N) soit la branche sud (S). L'ordre des points de départ était contrebalancé d'une session à l'autre (NSSN, SNNS, NSNS, SNSN). L'accès au bras faisant face au bras de départ était condamné à l'aide d'une porte guillotine. Chaque essai durait au maximum 60 sec, et l'intervalle inter-essai, durant lequel le rat était laissé sur la plate-forme, était de 10 sec.

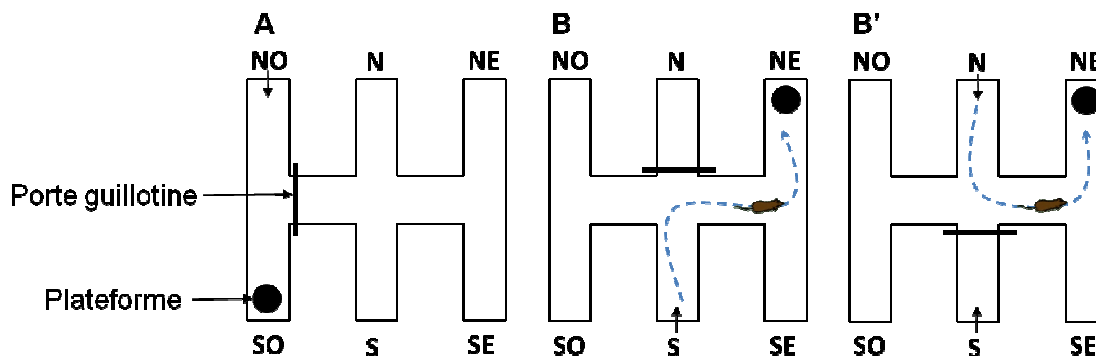


Figure 23. Protocole d'acquisition dans le double-H. A Etape de familiarisation de l'animal au dispositif. B et B' représente les deux points de lâchés utilisés pendant l'acquisition. La flèche noire indique les points de lâchés.

3.2.4. Test de rétention

Le test de rappel de l'emplacement de la plate-forme était effectué 24h après la fin de l'acquisition. Lors de ce test, la plate-forme était retirée du dispositif et les rats avaient un unique essai de 60 sec. Les animaux étaient introduits dans le dispositif à l'extrémité du bras SO. Le bras opposé (NO) était condamné par une porte guillotine. La latence d'accès à l'emplacement où se trouvait la plate-forme lors de l'acquisition était mesurée, ainsi que la latence pour accéder à l'extrémité de la branche N (emplacement où l'animal cherche la plate-forme s'il utilise une stratégie procédurale). Le temps passé et le nombre d'entrées dans chaque branche et dans l'espace central étaient également mesurés.

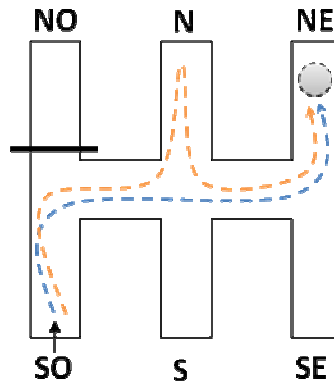


Figure 24. Test de rétention dans le labyrinthe du double-H. Les lignes en pointillé représentent les trajectoires des rats. En orange, celle d'un rat qui utilise de façon privilégiée une stratégie égocentrique ; en bleu, un rat qui utilise une stratégie de type allocentrique et qui va directement dans la branche cible (NE).

De par les connexions anatomiques entre les régions que nous avons étudiées (mPFC, dHipp, Re et Rh) avec des structures impliquées dans l'anxiété et l'activité locomotrice des animaux, nous avons systématiquement testé l'effet des lésions ou des inactivations dans le labyrinthe en croix sur-élevé (pour l'anxiété) et le test en champ ouvert (pour la locomotion). De plus, l'activité locomotrice des rats lésés à été enregistrée pendant 24 h dans leur cage familière. Enfin, le noyau Re étant impliqué dans le traitement d'information nociceptive, l'effet d'une inactivation réversible des noyaux Re et Rh sur le seuil de détection d'une information nociceptive mécanique a été évalué par l'utilisation d'une pince calibrée. Le protocole de chacun de ces test est décrit ci-après.

3.3. Labyrinthe en croix surélevé

3.3.1. Description du dispositif

Le labyrinthe en croix surélevé est constitué de 4 branches en plexiglas noir de 50 cm de long sur 10 cm de large, trouvant leur origine au niveau d'une plate-forme centrale de 10 x 10 cm. Les branches fermées (Nord et Sud) ont une paroi de 40 cm de haut tandis que les branches ouvertes (Est et Ouest) ont un rebord de 1,5 cm de haut (Figure 25). L'ensemble du dispositif est situé à 73 cm du sol. De plus, l'intensité d'éclairage des branches ouvertes sont de 10 lux, celle des branches fermées étaient de 5 lux et celle au centre était de 7,5 lux. Une caméra placée au dessus du labyrinthe permet de visualiser les comportements sans interférer avec le déroulement du test. Les déplacements ainsi que le temps passé dans chaque partie du dispositif sont comptabilisés à l'aide d'un logiciel par un expérimentateur n'ayant pas connaissance du groupe expérimental auquel le rat appartient (Cosquer et coll., 2005 ; Koenig et coll., 2008).

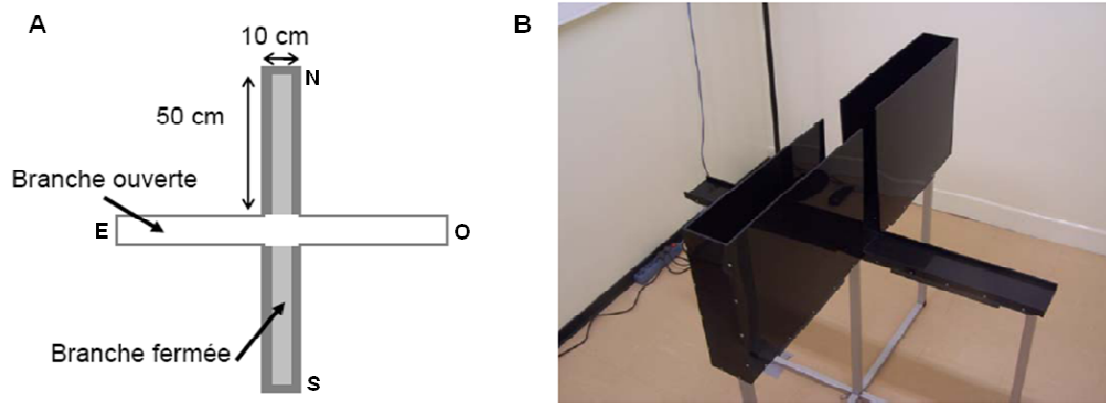


Figure 25. Schéma (A) et photographie (B) du test du labyrinthe en croix surélevé.

3.3.2. Principe de la tâche

Le labyrinthe en croix surélevé (*Elevated Plus Maze*) est couramment utilisé pour évaluer le niveau d'anxiété d'un animal ou l'effet anxiolytique d'une substance (Cosquer et coll., 2005). La présence de branches ouvertes (sans parois), éclairées et situées en hauteur, constitue une situation anxiogène. A l'inverse, les branches fermées (avec parois), moins exposées à la lumière, représentent un environnement peu anxiogène pour l'animal. Ainsi, les visites des branches ouvertes sont le signe d'un faible niveau d'anxiété de l'animal (Dawson et Tricklebank, 1995). De plus, le nombre total d'entrées dans les différentes branches constitue un indice de l'activité locomotrice générale.

3.3.3. Protocole

Les instillations de LIDO, de MSC1 ou de PBS avaient lieu dans une pièce adjacente à la pièce de test 10 (LIDO) ou 30 (MSC1) min avant le passage de chaque rat dans le dispositif. Avant la passation du test, l'animal était placé dans la salle d'expérimentation pour une période d'habituation de 5 min. Le test commençait lorsque l'animal était déposé au centre du labyrinthe, sa tête faisant face à la branche Nord. Il pouvait alors se déplacer librement. Le nombre d'entrées (présence des 4 pattes) dans chaque branche (N, S, E, O) ainsi qu'au centre, le temps passé dans chacune de ces parties, ainsi que le nombre de défécations étaient comptabilisés. Les animaux exploraient le labyrinthe pendant 5 min. Entre chaque passage, le dispositif était nettoyé à l'alcool absolu de façon à uniformiser les traces olfactives sur l'ensemble du dispositif. Chaque animal recevait le même traitement que celui administré lors de la séance d'acquisition ou de rappel en piscine de Morris ou dans le labyrinthe du Double-H.

3.4. Champ ouvert

3.4.1. Description du dispositif

Le Champ Ouvert était constitué de quatre parois en bois de 43,5 cm de hauteur disposées sur une surface de 65 x 65 cm divisée en 25 carreaux de taille égale (Figure 26). Ce dispositif est placé dans une pièce adjacente à celle où a lieu les injections. L'éclairage du dispositif est réalisé par une lumière blanche de 50 lux.

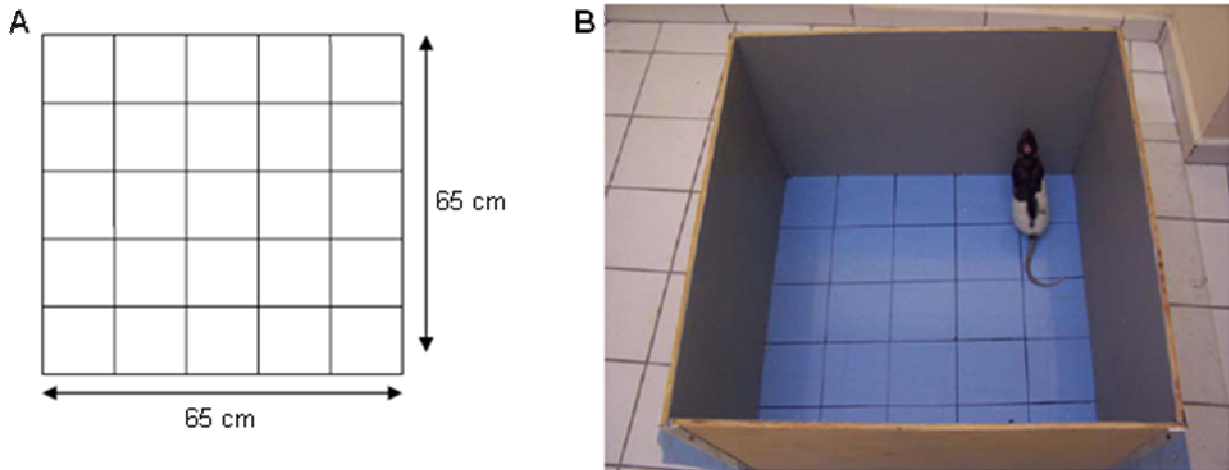


Figure 26. Schéma (A) et photographie (B) du test en champ ouvert (*Open field*).

3.3.2. Principe de la tâche

Le test en Champ Ouvert (*Open Field*) permet de mesurer des comportements générés par le placement de l'animal dans un nouvel environnement. Ces comportements sont induits par le simple fait de sortir l'animal de sa cage et de le placer dans un environnement ouvert et nouveau (Walsh et Cummins, 1976). Ainsi, ce dispositif est couramment utilisé pour mesurer l'activité locomotrice réactionnelle lorsque l'animal se trouve dans un environnement qui ne lui est pas familier. Le nombre de carreaux traversés durant un temps limité permet d'évaluer le niveau général d'activité locomotrice de l'animal et de suivre son habitude à la situation (Milot et Plamondon, 2008 ; Walsh et Cummins, 1976).

3.4.3. Protocole

Les instillations de LIDO, de MSC1 ou de PBS avaient lieu dans une pièce adjacente à la pièce de test 10 (LIDO) ou 30 (MSC1) min avant le passage de chaque rat dans le dispositif. Chaque rat était ensuite placé dans un coin du champ ouvert face aux murs. Il pouvait alors l'explorer librement. Le nombre de sections traversées, de redressements et de défécations étaient notés par un expérimentateur n'ayant pas connaissance du groupe expérimental auquel

le rat appartenait, et ce au cours d'une période de 10 min divisée en intervalles de 2 min. Avant le passage de l'animal suivant, le dispositif était nettoyé à l'alcool absolu de manière à uniformiser les traces olfactives. Chaque animal recevait le même traitement que celui administré lors des tests d'évaluation de la mémoire spatiale (Piscine de Morris et labyrinthe du Double-H).

3.5. Actographie ou test d'activité en cage familière

Il s'agit d'un test permettant d'enregistrer l'activité locomotrice spontanée de l'animal dans sa cage d'élevage (Figure 27). Ce test est particulièrement bien adapté pour étudier les effets des lésions sur de longue période d'enregistrement et complète l'évaluation locomotrice faite en champ ouvert. L'un des avantages d'un enregistrement sur 24 h est la possibilité d'étudier l'activité des animaux lors de l'habituation au dispositif (3 premières heures) ainsi que leur activité pendant la période nocturne et diurne. Chaque cage est traversée par deux faisceaux infrarouges ciblés sur deux réflecteurs qui les renvoient à un capteur de cellules photoélectriques. Ces faisceaux sont situés à 4,5 cm du sol et à 4 cm de chaque extrémité de la cage (elles sont donc séparées de 28 cm). Ces cellules sont reliées à un ordinateur qui enregistre le nombre de passages d'un bout à l'autre de la cage, un passage correspondant à l'interruption successive de deux faisceaux infrarouges.

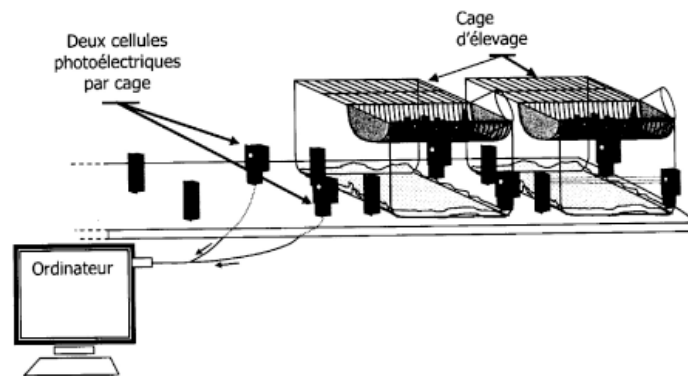


Figure 27. Représentation schématique du test d'actographie.

3.6. Evaluation du seuil de nociception mécanique

Certaines stimulations nociceptives, notamment mécaniques, entraînent une augmentation de l'expression de la protéine c-Fos au sein des neurones du noyau Re (Bullit 1990 ; Dotrovsky et Guilbaud, 1990 ; Gholami et coll., 2006). Ces données nous ont amenés à évaluer l'effet d'une inactivation des noyaux Re et Rh, par instillations de LIDO ou de MSC1, sur le seuil nociceptif mécanique par l'utilisation d'une pince calibrée (pour la validation du protocole

voir Luis-Delgado et coll., 2006). Le dispositif est constitué d'une pince reliée à un dynamomètre permettant de retenir la pression maximale exercée au niveau des pattes arrière de l'animal. Le protocole est constitué d'une période d'habituation au dispositif (contact entre la pince et les pattes arrière de l'animal et procédure de contention), suivie d'une période de 5 jours permettant d'établir une pression de référence pour chaque animal et enfin, d'une session de test permettant d'évaluer l'effet des inactivations. Lors de chaque session, une pression croissante est exercée avec la pince sur l'une des pattes arrière de l'animal jusqu'à ce que celui-ci retire sa patte. La pression enregistrée au moment du retrait de la patte détermine le seuil nociceptif. Pour chaque session, une mesure est effectuée trois fois sur chacune des pattes arrière de l'animal. Les mesures obtenues après instillations de MSC1 ou de LIDO sont comparées aux pressions de références afin de déterminer si l'inactivation a induit une modification du seuil de nociception mécanique.

Les données obtenues dans ce test n'ont pas été incluses dans les publications présentées dans la partie 'Contribution Expérimentale' de ce manuscrit de thèse. La figure 28 représente les principaux résultats obtenus lors de cette expérience réalisée en collaboration avec Alexandre Zeitler de l'Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégrées (INCI) de Strasbourg.

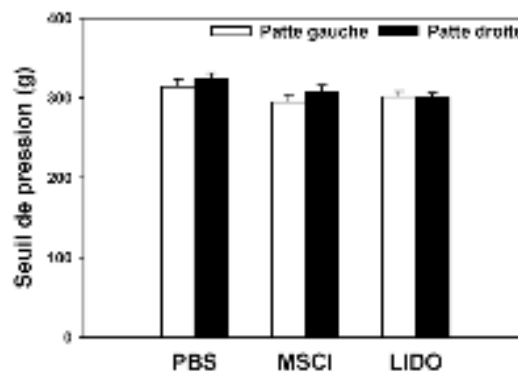


Figure 28. Effet d'une instillation de MSC1, de LIDO ou de PBS dans les noyaux Re et Rh du thalamus sur le seuil de nociception mécanique. L'inactivation des noyaux Re et Rh n'a pas modifié le seuil de détection de la pression mécanique nociceptive au niveau des deux pattes arrière.

4. Techniques histologiques et immunohistochimiques

Une analyse histologique du tissu cérébrale a été systématiquement réalisée afin de vérifier l'emplacement des canules lors des protocoles avec instillations intra-cérébrales. De plus, un marquage immunohistochimique de la protéine NeuN nous a permis d'estimer avec précision l'étendue des lésions des noyaux Re et Rh. Enfin, le marquage de la protéine c-Fos a été

réalisé dans le cadre de l'étude de l'implication des noyaux Re et Rh lors du rappel récent ou ancien d'une mémoire spatiale (Publication 2).

4.1. Euthanasie des rats et prélèvement des cerveaux

A l'issue des tests comportementaux, les rats recevaient une injection intra-péritonéale d'une dose létale de pentobarbital sodique (150 mg/kg). Une perfusion intra-cardiaque était alors réalisée par injection de 60 mL de paraformaldéhyde (4%) dissout dans un tampon phosphate (0,1 M) à 4°C afin de fixer les tissus cérébraux. Les cerveaux étaient ensuite extraits de la boîte crânienne, placés dans le même fixateur à 4°C pendant 4 h, puis transférés dans une solution de saccharose (20%) tamponnée et maintenue à 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

Lors des expériences d'inactivations, des coupes coronales de 30 µm étaient réalisées à l'aide d'un cryostat (Frigocut 2800), 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 la mise en œuvre de l'immunohistochimie, des coupes coronales de 40 µm étaient réalisées et récoltées dans une solution de cryoprotection, et conservées à -20°C.

4.3. Coloration au violet de Crésyl

La coloration au violet de Crésyl était réalisée dans un bain de 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, Saint-Louis, USA), d'eau distillée, 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 lamelles 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.

4.4. Evaluation de la diffusion de la Lidocaïne et du Muscimol

4.4.1. Principe

L'absence d'estimation de la diffusion des composées pharmacologiques, lors de protocole d'inactivation d'une région cérébrale, chez l'animal libre de ses mouvements constitue l'une des critiques majeures de cette technique. Afin de vérifier l'étendue des instillations au sein des régions que nous avons étudié pendant ma thèse, la diffusion des solutions de LIDO et de PBS a été évaluée par l'utilisation d'une méthode indirecte consistant en une instillation intracérébrale d'une solution de Bleu Evans (BE ; Merck, Darmstadt, Allemagne) contenant soit de la LIDO soit du PBS. Le choix du BE était approprié de par sa nature lipophile qui, malgré un poids moléculaire relativement important, permet à ce colorant une diffusion à travers le parenchyme. De plus, le BE est un colorant fluorescent qui, lorsqu'on l'excite à 355 nm par l'utilisation d'un microscope à fluorescence, émet une couleur rouge. Cette propriété permet une détection de la solution avec un seuil inférieur à celui obtenu par l'utilisation d'un microscope à transmission lumineuse. La diffusion du MSCFI a également été évalué par injection d'une solution contenant du MSCFI couplé à un fluorochrome (Bodipy, Invitrogen, USA, ref M23400).

4.4.2. Protocole

Le protocole d'instillation des solutions contenant des substances fluorescentes (BE et MSCFI-fluo) était strictement le même que celui réalisé lors des évaluations comportementales. Les rats étaient euthanasiés 10 min après injection de la solution contenant la LIDO ou le PBS et le BE, et 30 minutes après l'injection de la solution contenant le MSCFI fluorescent. Les euthanasies étaient réalisées comme décrit dans la partie 4.1 « Euthanasie des rats et prélèvement des cerveaux ».

4.5. Evaluation de l'étendue des lésions des noyaux Re et Rh : Marquage immunohistochimique de la protéine NeuN

En complément d'une analyse classique du tissu cérébral par coloration au crésyl violet, un marquage de la protéine NeuN (*Neuronal Nuclei*) a été réalisé pour quantifier l'étendue des lésions des noyaux Re et Rh. NeuN est une protéine nucléaire spécifique des neurones décrite pour la première fois en 1992 par Mullen et ses collaborateurs. Le marquage de NeuN a été utilisé dans nos expériences pour évaluer l'étendue des lésions excitotoxiques des noyaux Re et Rh réalisées par injection de NMDA. L'injection de NMDA induisant la mort des neurones, une absence du marquage neuronal de la protéine NeuN doit être observée au niveau du site

d'injection. Pour chaque rat, une coupe sur deux de la partie ventrale de la ligne médiane du thalamus était sélectionnée pour l'immunohistochimie et placée dans le puits d'une plaque de microtitration avec 250 μ L de PBS contenant 0,02% de merthiolate. Toutes les étapes de ce protocole étaient réalisées sous agitation lente à température ambiante et à volume constant. Les coupes flottantes étaient d'abord rincées trois fois au PBS merthiolate pendant 10 minutes avant que les sites antigéniques aspécifiques ne soient saturés avec du sérum d'âne (Abcys, S2170-100 ; 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 1 heure. Les coupes étaient ensuite incubées une nuit à température ambiante avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine NeuN (Millipore, France, ref MAB377), dilué à 1/2000^{ème} dans du PBS Triton. Le lendemain, les coupes étaient rincées trois fois au PBS merthiolate avant d'être incubées 1 h avec l'anticorps secondaire (Vector Laboratories International, Burlingame, CA, USA) dilué à 1/500^{ème} 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^{ème}. 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). La réaction était neutralisée 6 minutes plus tard par du PBS merthiolate. Après trois 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 24 h. 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 (ClearifyDiamond). Afin d'estimer l'étendue des lésions, celles-ci étaient dessinées en utilisant les plans adéquats d'un atlas stéréotaxique (Paxinos et Watson, 1998) et reproduites à l'aide d'un ordinateur et d'une tablette graphique de sorte à pouvoir compter de façon automatique les pixels au niveau des noyaux thalamiques. Enfin, l'aire d'un lésé d'un noyau thalamique était comparé à l'aire total de ce noyau et ceci sur plusieurs plans afin d'obtenir le

4.6. Marquage immunohistochimique de la protéine c-Fos

4.6.1. Principe

La quantification des protéines synthétisées à partir des ARNm de gènes précoces tels que *c-fos*, *zif268* ou *arc*, est souvent utilisée pour évaluer l'activation de neurones au sein d'une ou

plusieurs structures cérébrales. Ces gènes sont très rapidement traduits suite à une stimulation de la cellule nerveuse (d'où leur appellation de gène précoce) et servent de facteur de transcription d'autres gènes impliqués dans la plasticité cérébrale (Hughes et Dragunow, 1995). Les gènes, exprimés plus tardivement, contribuent à l'adaptation de la cellule à son environnement. Brièvement, une activité neuronale telle qu'un potentiel d'action ou la liaison d'un neurotransmetteur sur son récepteur membranaire déclenche une cascade cellulaire impliquant des seconds messagers, comme la Ca^{2+} , et l'activation de protéines kinases. Ceci provoquera la phosphorylation de CREB (cAMP Response-Binding Protein) induisant la transcription de gènes précoces tels que *c-fos*, suivie d'une traduction des protéines correspondantes (Figure 29). Certaines études ont montré que ces protéines sont à leur tour impliquées dans la plasticité synaptique, notamment dans la consolidation synaptique (Herrera et Robertson, 1996 ; Teather et coll., 2005 ; Kubik et coll., 2008). L'avantage du marquage de la protéine c-Fos par rapport à d'autres protéines issues de l'expression de gènes précoces, est que le niveau basal d'expression de c-Fos est très faible. De ce fait, l'expression de cette protéine est un indicateur fiable de l'activation des structures cérébrales étudiées. L'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas d'opération chirurgicale ni le maintien de l'animal comme c'est le cas lors des procédures d'instillations intra-cérébrales. D'autre part, elle permet d'étudier plusieurs régions cérébrales en même temps. De par l'induction de l'expression de c-Fos par des facteurs stressants, mais aussi le temps d'exposition aux stimuli ou encore les processus de navigation, il est important lorsque l'on veut étudier spécifiquement un processus cognitif, le rappel d'une mémoire spatiale dans le cadre de cette thèse, de constituer des groupes témoins. Ces groupes contrôles sont constitués de rats qui sont exposés aux mêmes conditions que les animaux dont on teste les capacités mnésiques. Le groupe témoin parfait étant difficile à obtenir, il est bien souvent nécessaire de prévoir plusieurs groupes témoins (voir Publication 2 pour les différents groupes témoins utilisés dans cette thèse).

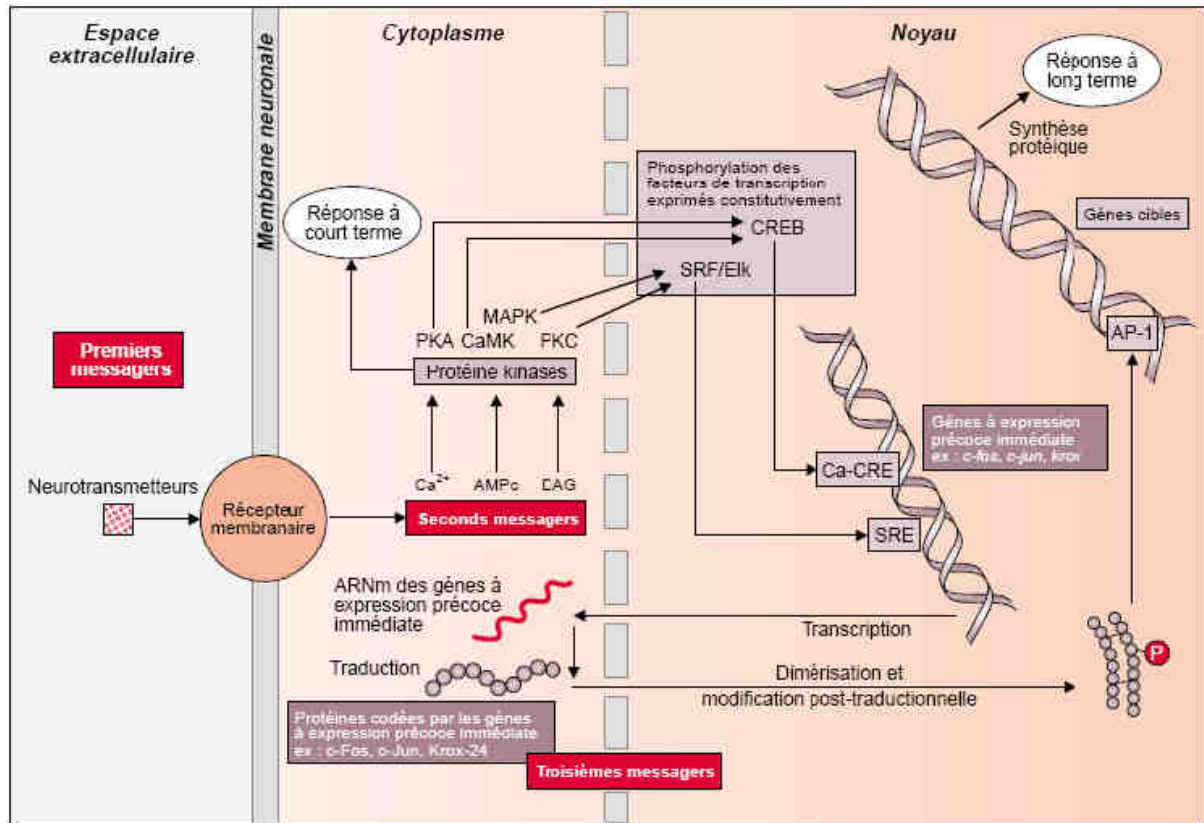


Figure 29. Mécanismes de l'expression des gènes précoces tels que *c-fos* (schéma de Buritova et Besson, 1999 adapté de Hughes et Dragunow, 1995).

4.6.2. Protocole

Le protocole de marquage de la protéine c-Fos est similaire à celui décrit pour le marquage de la protéine NeuN à l'exception de l'anticorps primaire (anticorps polyclonal de lapin CS-52, Santa Cruz, USA), dilué au 1/4000^{ème} dans du PBS Triton, et de l'anticorps secondaire (anticorps biotinylé de chèvre anti-lapin 111-065-144, Jackson ImmunoResearch, West Grove PA) dilué au 1/500^{ème} dans du PBS Triton. Les coupes marquées étaient ensuite observées à l'aide d'un microscope (Leica DM5500B) et numérisées par l'utilisation d'une caméra (Optonics Microfire) et d'un analyseur d'image (Explora Nova). En utilisant le logiciel Mercator (Explora Nova), les régions d'intérêts étaient délimitées et les neurones c-Fos positifs étaient comptés en sélectionnant un seuil de détection qui permet de comptabiliser les neurones sans tenir compte du fond des coupes et reproductible d'une coupe à l'autre.

Contribution Expérimentale

Publication 1

Publication 1

Etude de l'implication de l'hippocampe ventral dans l'acquisition et le rappel d'une mémoire spatiale

Les expériences présentées dans cette première publication avaient pour objectif d'étudier le rôle de l'hippocampe ventral (VHPC) dans l'acquisition et le rappel d'une mémoire spatiale. Pour cela, nous avons mis en œuvre une technique d'inactivation réversible par instillation intra-hippocampique de Lidocaïne. Les animaux étaient testés dans un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris et les instillations avaient lieu soit juste avant chaque session d'acquisition, soit juste avant le test de rétention effectués soit à 1 jour, soit à 5 jours après la fin de l'apprentissage. Les données obtenues après une inactivation de VHPC ont été comparé à celles obtenues après une inactivation de l'hippocampe dorsal (DHPC) dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus ont montré que l'instillation de Lidocaïne dans DHPC ou VHPC, juste avant le test de rétention (1 ou 5 jours), détériorait les performances des rats. De plus, l'inactivation de VHPC avant chaque session d'acquisition n'a affecté ni les performances d'apprentissage ni du test de rétention. En revanche, comme attendu, l'inactivation de DHPC avant l'acquisition a entraîné une diminution significative des performances des rats lors du test de rétention. Des tests complémentaires ont permis d'exclure l'influence d'une perturbation de la motivation, de la locomotion, des capacités sensori-motrices ou encore du niveau d'anxiété des animaux sur les résultats obtenus en piscine de Morris. En conclusion, l'ensemble de ces résultats indiquent que la mémoire spatiale peut être acquise uniquement avec le DHPC ou avec le VHPC, mais avec apprentissages moins efficaces lorsque seul le VHPC est fonctionnel. Enfin, le rappel d'une mémoire spatiale de référence nécessite les deux sous-régions hippocampiques lorsque l'apprentissage a été réalisé avec un hippocampe entièrement fonctionnel.

Brain Struct Funct (2012) 217:93–106
 DOI 10.1007/s00429-011-0333-y

ORIGINAL ARTICLE

The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory

Michael Loureiro · Lucas Lecourtier · Michel Engeln · Joëlle Lopez ·
 Brigitte Cosquer · Karla Geiger · Christian Kelche · Jean-Christophe Cassel ·
 Anne Pereira de Vasconcelos

Received: 2 February 2011 / Accepted: 21 May 2011 / Published online: 12 June 2011
 © Springer-Verlag 2011

Abstract Current views posit the dorsal hippocampus (DHipp) as contributing to spatial memory processes. Conversely, the ventral hippocampus (VHipp) modulates stress, emotions and affects. Arguments supporting this segregation include differences in (i) connectivity: the DHipp is connected with the entorhinal cortex which receives visuo-spatial neocortical inputs; the VHipp is connected with both the amygdala and hypothalamus, (ii) electrophysiological characteristics: there is a larger proportion of place cells in the DHipp than in the VHipp, and an increasing dorsoventral gradient in the size of place fields, suggesting less refined spatial coding in the VHipp,

and (iii) consequences of lesions: spatial memory is altered after DHipp lesions, less dramatically, sometimes not, after VHipp lesions. Using reversible inactivation, we report in rats that lidocaine infusions into the DHipp or VHipp right before a probe trial impair retrieval performance in a water-maze task. This impairment was found at two post-acquisition delays compatible with recent memory (1 and 5 days). Pre-training blockade of the VHipp did not prevent task acquisition and drug-free retrieval, in the contrary to pre-training blockade of DHipp, which altered performance in a subsequent drug-free probe trial. Complementary experiments excluded possible locomotor, sensorimotor, motivational or anxiety-related biases from data interpretation. Our conclusion is that a spatial memory can be acquired with the DHipp, less efficiently with the VHipp, and that the retrieval of such a memory and/or the expression of its representation engages the dorsoventral axis of the hippocampus when the task has been learnt with an entirely functional hippocampus.

M. Loureiro, L. Lecourtier and M. Engeln contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00429-011-0333-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Loureiro · L. Lecourtier · M. Engeln · J. Lopez ·
 B. Cosquer · K. Geiger · C. Kelche · J.-C. Cassel (✉) ·
 A. Pereira de Vasconcelos
 Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives,
 UMR 7237, Université de Strasbourg, CNRS, IFR 37 des
 Neurosciences, GDR CNRS 2905 Neuroim.,
 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France
 e-mail: jcassel@unistra.fr

Present Address:

M. Engeln
 Institut des Maladies Neurodégénératives, UMR 5293,
 Physiopathologie des Syndromes Parkinsoniens, Université
 Victor Segalen, Bordeaux 2, 146 rue Leo Saignat,
 33076 Bordeaux, France

Present Address:

J. Lopez
 Psychology Department, Stewar Biology Building,
 1205 Dr Penfield Avenue, Montreal, QC H3A 1B1, Canada

Keywords Spatial memory · Ventral hippocampus · Rat ·
 Morris water-maze · Lidocaine · Inactivation

Introduction

Current views regarding hippocampal functions posit the dorsal hippocampus (DHipp) as preferentially involved in spatial memory processes and the ventral hippocampus (VHipp) as modulating stress, emotions and affects (Bannerman et al. 2000; rev Moser and Moser 1998a). Arguments supporting this anatomo-functional segregation include: (i) evidence for strong connectivities between the DHipp and the entorhinal cortex, which receives visuo-spatial neocortical inputs, against strong interconnections

between the VHipp and both the amygdala and hypothalamus, but also the prefrontal cortex (rev Witter and Amaral 2004), (ii) specific segregation of the expression of several genes between the DHipp and the VHipp (Christensen et al. 2010; Dong et al. 2009), (iii) a larger proportion of place cells—which are believed to encode a representation of the environment (rev Moser et al. 2008)—in the DHipp than in the VHipp, (iv) an increasing dorsoventral gradient in the size of place fields, suggesting less refined spatial coding in the VHipp (Kjelstrup et al. 2008), (v) distinct long-term potentiation properties between the DHipp and VHipp (Maggio and Segal 2007), which correlate with spatial learning (Pastalkova et al. 2006; Whitlock et al. 2006), (vi) dramatic spatial memory alterations after DHipp lesions, but weaker or no such alterations after VHipp lesions, which in turn affect defensive responses, emotional reactions and motivational behaviors (e.g., Kjelstrup et al. 2002; McEown and Treit 2010; Moser et al. 1993). However, another point of view supports the idea of a functional continuum from the DHipp to the VHipp, considering (i) similarities in basic architecture of hippocampal circuitry/organization along the septo-temporal axis pointing towards intrinsic and extrinsic connections which favor interactions between hippocampal subregions (i.e., Amaral and Witter 1989), as well as (ii) the functional-anatomical links supporting functional differentiation and integration along the septo-temporal axis (Bast 2007; Bast et al. 2009). There is also a viewpoint proposing that the functional connectivity of the hippocampus to the prefrontal cortex and subcortical sites is important for the translation of hippocampus-dependent memories into adapted behaviors. Thus, at least for certain spatial memories, the role of the VHipp through its extrinsic connectivity might be to translate the memory representation stored in the DHipp into useful/adaptive behaviors (rev Bast 2011). In support of a participation of the VHipp in spatial memory processes, immediate early gene (*Fos*, *c-fos*, *Arc*) or 2-deoxyglucose imaging studies in mice (Bommerl et al. 1999; Maviel et al. 2004) and rats (Gusev et al. 2005) showed activations in both the DHipp and VHipp during the retrieval of a recently acquired spatial memory (i.e. tested 1 to a few days after the end of acquisition). Furthermore, VHipp lesions were occasionally found to disrupt the acquisition of a spatial memory (Broadbent et al. 2004; de Hoz et al. 2005) and the retrieval and/or the expression of the representation of this memory (Moser and Moser 1998b). A major drawback with permanent lesions performed before acquisition, however, is the impossibility to know if altered memory performance is due to the disruption of encoding, consolidation and/or retrieval processes. In this respect, reversible inactivations, which can be performed at any time during these processes, appear more informative. Although only two studies showed that

VHipp inactivation impaired acquisition of spatial reference memory (SRM) in the water maze (Floresco et al. 1996; Wang and Cai 2008), the question of a dorsoventral functional dissociation of the hippocampus in learning and memory retrieval has never been addressed directly with such techniques. Therefore, using lidocaine (LIDO) infusions, we compared the role of the VHipp and DHipp in the acquisition and retrieval of a Morris water-maze task at two post-training delays (1 or 5 days) compatible with recent memory. We demonstrate a crucial participation of the VHipp in the expression of a spatial memory representation while inactivation of this subregion before each daily training session had no significant effect on task acquisition.

Methods

Animals and surgery

Experiments were performed in 165 male Long-Evans rats (3 months) 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°57-7 for A.M.V and n°67-215 for J.C.C). Animals were housed individually under a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 a.m.) with ad libitum food and water. For surgery, they were anesthetized with a ketamine (63.8 mg/kg)-xylazine (0.85 mg/kg) mixture (i.p.). Stainless steel guide cannula (Ø 0.4 mm) were implanted bilaterally in the DHipp (AP -3.8, ML ±2.4, DV -2.2 from skull) or the VHipp (AP -5.6, ML ±5.1, DV -6.8 from skull) according to Paxinos and Watson (1998). Each guide cannula was secured to the skull by acrylic dental cement and stainless steel screws. A stainless steel mandrel (Ø 0.28 mm diameter) was inserted into the guide cannulae. Rats recovered under a warm lamp (for 20–30 min) before being placed back into their home cage. They were given a 7-day rest period before testing.

Intrahippocampal infusions of PBS or LIDO

Rats were first habituated to be handled and maintained for drug infusions over five consecutive days before the start of the experiments. For infusions, rats were gently restrained by hand, the mandrels were removed, and infusion needles (Ø 0.28 mm) were slowly inserted into the guide cannulae. The tip of each infusion needle protruded 1.0 mm beyond the tip of the guide cannulae. The needle was connected to a 10 µl Hamilton syringe by polyethylene tubing. To transiently block neural transmission and excitation, we used LIDO, a voltage-gated sodium channel blocker. Using

a microinjection pump (CMA/100), lidocaine hydrochloride (LIDO; Sigma, Saint-Louis, USA; 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in phosphate buffered saline (PBS)) was infused bilaterally (1 μL over 90 s). Controls received PBS (same volume). At the completion of infusion, the needles were left in place for 30 s before their retraction; mandrels were repositioned into the guide cannulae. Rats were then returned to their home cage until the start of the probe trial, 10 min later.

Morris water-maze testing: drug-free training and intra-DHipp or intra-VHipp LIDO infusions before the probe trial

The water maze consisted of a circular pool (diameter 160 cm; height 60 cm) filled with white-tinted water ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and the training/testing conditions were as in Pereira de Vasconcelos et al. (2006). Rats were given an 8-day drug-free training (4 consecutive trials/day) with a platform at the same location (NW) on each trial, over all days and for all rats and were subsequently allocated randomly to one of two treatment subgroups (i.e., PBS or LIDO). They were tested for retention in a probe trial, 10 min after a bilateral infusion, either 1 day or 5 days following the end of training. On the day following the probe trial, PBS or LIDO infusions were performed in a visible platform condition (4 consecutive trials) to assess the possible effects of LIDO on non-mnemonic parameters (i.e., sensorimotor capabilities, motivational state); treatment was the same as for probe testing. Data analyses considered during training were the distance travelled before reaching the platform and, during the probe trial, the time (in percent) spent in the target quadrant, the number of crossings above the annulus and the distance to first crossing of the annulus, corresponding to the size of the platform enlarged by a 10 cm wide annulus. Thigmotaxic behavior, i.e., the time spent swimming along the edge of the pool, and swim speed were also collected during both training and probe trial.

The two retention intervals (i.e., 1, 5 days) were chosen because they correspond to the extreme post-training delays to assess recent memory in most of the literature (e.g., 1 day: Frankland et al. 2004; Lecourtier et al. 2011; Maviel et al. 2004; Teixeira et al. 2006; 5 days: Bonhumi et al. 1999; Lecourtier et al. 2011; Lopez et al. 2008).

Open-field test and elevated plus maze

One week after water-maze testing, 10 rats from each group were randomly chosen to perform open field and elevated plus maze testing. Both tests were performed within 1 week interval. LIDO or PBS bilateral infusions were performed in an adjacent room 10 min before testing.

For both tests, rats received the same treatment (i.e., LIDO vs. PBS) as during the water-maze test.

Open field

Because of the connections of the VHipp with the nucleus accumbens (via the subiculum), we also assessed the effects of PBS versus LIDO infusions on locomotor activity in the open field. Indeed, locomotor effects of LIDO infusions could have biased cognitive measures. The open field was a wooden square arena with 45.5 cm high walls and a 65×65 cm floor divided into 25 equal squares. The illumination (50 lx) was provided by a neon lamp placed centrally 1.80 m above the device. Rats were then placed in one corner of the arena, facing the wall, and were left in the device for a 10-min-free exploration period. The number of squares crossed and the number of rearings were counted by an experimenter blind to the treatment conditions. The arena was cleaned with absolute ethanol between each animal.

Elevated plus maze

Because of the connections of the VHipp with the amygdala and therefore possible emotional biases of cognitive measures, we also assessed the effects of PBS versus LIDO infusions on anxiety in the elevated plus maze. Rats were tested 1 week after the open-field test. The elevated plus-maze was made of black plexiglas and consisted of four arms (50 cm long \times 10 cm wide) fixed to a central platform (10 \times 10 cm): two with 40-cm-high walls (closed arms) and two with 1.5-cm-high borders (open arms). The open and closed arms crossed at a right angle. The maze was elevated to a height of 73 cm from the floor. The testing room was equipped with four halogen lamps positioned on the "diagonals" of the plus maze (45° of each arm), in each corner of the room, at an identical distance from the central platform. Using a luxmeter, light adjustments were made such as to have the same intensity on both open arms (i.e., 10 lux; e.g., Koenig et al. 2008). Rats were infused with PBS or LIDO and moved to a plastic cage identical to their home cage but without sawdust, food and water. This cage was brought to the testing room immediately after, and the test was started 10 min later. Rats were placed individually in the center of the maze, their head facing a closed arm. The measures were taken over 5 min by an experimenter blind to treatment condition. Each rat was followed on a monitor connected to a camera (fixed on the roof, 180 cm above the floor level). An entry in a given arm was counted when the rat had all four paws in the arm. The total number of entries as well as the total time spent in open vs closed arms were recorded.

and analyzed. Between two rats, the apparatus was cleaned with absolute ethanol.

Morris water-maze testing: intra-VHipp LIDO infusions before training sessions followed by a drug-free probe trial

To verify the specificity of the VHipp involvement in retrieval processes, we made an additional experiment in which LIDO was infused in the VHipp prior to training sessions, before a drug-free probe trial 1 day later. To this end, a new batch of rats was bilaterally implanted with stainless steel guide cannulae in the VHipp exactly as described above. Subsequently, they were trained in the water-maze task, the hidden platform being placed in the NW quadrant such as in the previous experiment. On each of the five training days, rats were infused either with LIDO or PBS in the VHipp, 10 min prior to the first of the four consecutive trials. Performance was evaluated by analyzing the mean distance to the platform on each training day. One day after training, all rats received a drug-free probe trial during which the amount of time spent in the target quadrant (NW), the number of annulus crossings as well as the distance to the first annulus crossing were recorded and analyzed. Thigmotaxic behavior and swim speed were also measured.

Morris water-maze testing: intra-DHipp LIDO infusions before training sessions followed by a drug-free probe trial

To validate the data showing no detrimental effects of VHipp inactivation before acquisition, we made an additional experiment, using a separate batch of rats in which LIDO was infused in the DHipp before each training session, followed 1 day later by a drug-free probe trial, as described for the VHipp experiment (see above). Indeed, memory impairments were expected, such as previously shown (Riekkinen et al. 1999; Klur et al. 2009). If not, our data obtained after intra-VHipp inactivation would have become suspicious.

Placement of infusion devices and intraparenchymal liquid diffusion

After completion of each experiment, rats received an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, i.p.) and were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (in 0.1 M PBS; 4°C). The brains were removed, post-fixed 2 h in the same fixative and cryoprotected in a 20% sucrose solution (48 h, 4°C in 0.1 M PBS). They were frozen in isopentane at -40°C, sectioned (30 µm) in a cryostat (-20°C), and stained with cresyl violet to assess the location of the injector tips. The efficiency of the diffusion

of LIDO or PBS through the devices was assessed using an indirect method consisting in the intraparenchymal infusion of an Evans blue-containing LIDO or PBS solution. Evans blue was chosen because of its lipophilic nature; allowing, despite a relatively high molecular weight, a correct diffusion within the brain parenchyma. In addition, Evans blue produces a red color when excited at 355 nm under a fluorescence microscope, enabling the detection of the presence of the dye below the threshold of a light transmission microscope (Cosquer et al. 2005). In a series of preliminary experiments (Loureiro and Lecourtier, unpublished), we could establish that 10 min after an intraparenchymal infusion of LIDO (40 µg in 1 µL) in a 0.5% Evans blue solution, the dye had spread in all directions, up to about 1,000 µm from the infusion site. By comparison with data from studies which used other methods, we came to the conclusion that this simple technique could provide a realistic idea about whether a drug is actually diffusing into the parenchyma surrounding the infusion site and along the cannulae tracks, as well as an acceptable indication about the extent of the spreading at a given post-infusion delay. Indeed, in the relatively few experiments that focused on the diffusion of a drug infused intraparenchymally, the diffusion area reported was of 1,000–2,000 µm from the infusion site for a volume of 0.5–1.0 µL. This was shown in Allen et al. (2008) or Jo and Lee (2010) using fluorescent muscimol; we found similar extents of the diffusion area when fluorescent muscimol was infused into a thalamic nucleus (unreported observations). Edeline et al. (2002) or Corcoran et al. (2005) used [³H]muscimol. Martin (1991) used [¹⁴C]-glucose and [¹⁴C]-lidocaine. Sandkuhler et al. (1987) used lidocaine coupled to electrophysiological measures. Zhuravin and Bures (1991) and Klement et al. (2005) used Indian ink and/or tetrodotoxin. Our own observations based on [¹⁴C]-2-deoxyglucose metabolism experiments after intrahippocampal infusions of LIDO or TTX are also in line with the reported diffusion extents (Pereira de Vasconcelos et al. 2006). Therefore, in a separate cohort, rats (n = 12) were bilaterally implanted with cannulae in either DHipp or VHipp to demonstrate the ability of the device to allow diffusion of the solutions in the correct area, to assess liquid diffusion along the injection tract and to verify that liquid infusion in a given subregion did not result in spreading to the other one. Rats were allowed 1 week of post-surgical recovery before being infused with the solutions. On the day of the experiment, fresh solutions of PBS or LIDO (40 µg/µL) were prepared such as indicated above. Subsequently, Evans blue powder (Merck, Darmstadt, Germany) was incorporated to the solutions to obtain a final dye dilution of 0.5% (i.e., 0.5 mg/100 µL). Finally, the resulting dye solutions were filtered. During testing, rats received PBS on one side and LIDO on the opposite

side in the DHipp or the VHipp. The sides were chosen randomly for each rat. The volume and rate of infusion were identical to those used during the different experiments (1 μ L over 90 s); the infusion needles were left in place for 30 s before being slowly removed. To timely match to the infusion protocol used throughout the study, rats were put back in their home cage once the infusion terminated. After a 10-min delay, they were euthanized and brains processed as indicated above. Coronal sections (50 μ m) were immediately placed on gelatin-coated slides, dried at room temperature, and covered using Vectashield Hard Set (Abcys). The sections were observed under a fluorescence microscope.

Statistical analysis

Water-maze training performance in the experiment where DHipp and VHipp were inactivated during retention was evaluated using a four-way ANOVA with Region (DHipp and VHipp); Treatment (PBS and LIDO, to be administered); Delay: 1 and 5 days, as the between-subject factors and Day (1–8) as the repeated measure. Training performance in the experiments where VHipp or DHipp were inactivated during training was evaluated using a two-way ANOVA with Treatment (PBS and LIDO) as the between-subject factor and Day (1–5) as the repeated measure. Probe trial performance was analyzed using a three-way ANOVA (Region: DHipp, VHipp; Treatment: PBS, LIDO; Delay: 1 and 5 days) in the experiment where DHipp versus VHipp were inactivated during retention or with an one-way ANOVA with Treatment (PBS and LIDO; administered during training) as the factor, in the other experiments. The analyses were complemented with one-sample *t* tests to compare probe test performance of each group to chance level (i.e., 25%). Open-field and elevated plus-maze data were analyzed using two-way ANOVA with Region (DHipp and VHipp) and Treatment (PBS and LIDO) as the factors. Post hoc comparisons used the Newman–Keuls multiple range test where justified by the ANOVA. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Placement of the infusion devices and extent of PBS versus LIDO diffusions

Figure 1 shows the location of the injector tips in the DHipp and VHipp for each delay and group as verified in the rats given LIDO versus PBS before the probe trial, from the experiment where DHipp and VHipp were inactivated only before retention after drug-free acquisition. For VHipp, all injection sites were localized in the ventral part of the

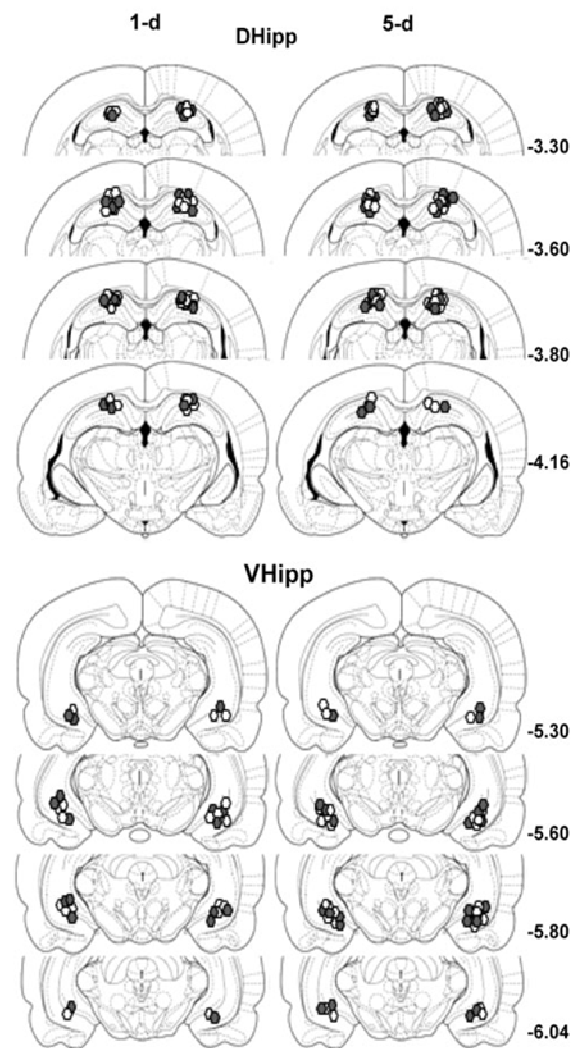


Fig. 1 Drawings of coronal brain sections indicating the locations of the infusion sites (injector tips for the PBS groups, white circles, LIDO groups gray circles) in the rats in which infusions were made before the probe trial. Numbers on the right indicate the distance of each section in mm from Bregma (plates modified from Paxinos and Watson 1998)

hippocampus, i.e., below the dorsoventral coordinates -5.8 to -6.0 mm from Bregma, which approximately corresponds to the upper limit of the VHipp as described in the mouse brain by Fanselow and Dong (2010). Figure 2 shows the intraparenchymal extent of the diffusion of Evans blue. After intra-DHipp infusions the dye remained confined to the DHipp (see Fig. 2b, e), whereas after intra-VHipp infusions, there was no stain detectable in DHipp (see Fig. 2c, f). This observation confirmed that the liquid infused in one hippocampal subregion did not spread out to the other one, and it is well possible that it was also the case for the active compound dissolved in PBS during the water-maze experiments. After removal of rats showing misplacement of at least one of the two injection

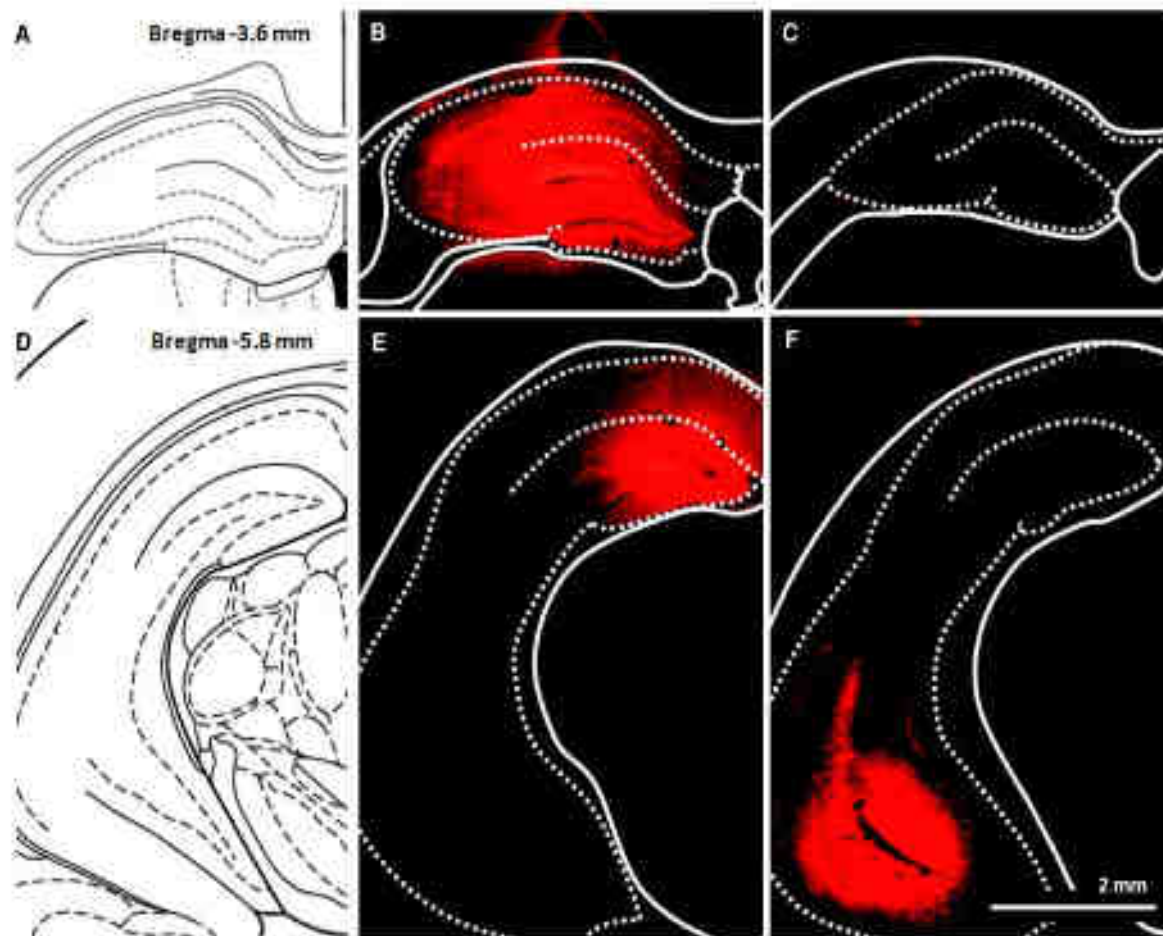


Fig. 2 Distribution of Evans blue 10 min after the infusion of a LIDO solution containing 0.5% of the dye into DHipp (b, e) or VHipp (c, f). D The diffusion area appears in red under a fluorescence microscope (excitation 355 nm). a, d The corresponding anatomy

levels (from Paxinos and Watson 1998). Structure limits shown in b, c, e and f were drawn and subsequently traced, according to photographs of the same sections taken under the same microscope; but using light transmission

sites, group sizes were as follows: in the experiment in which infusions were made prior to the probe trial: 1-day probe trial ($n_{\text{DHipp-PBS}} = 14$; $n_{\text{DHipp-LIDO}} = 11$; $n_{\text{VHipp-PBS}} = 8$; $n_{\text{VHipp-LIDO}} = 10$), 5-day probe trial ($n_{\text{DHipp-PBS}} = 13$; $n_{\text{DHipp-LIDO}} = 14$; $n_{\text{VHipp-PBS}} = 8$; $n_{\text{VHipp-LIDO}} = 8$). In the experiment, where VHipp or DHipp were inactivated during training: $n_{\text{VHipp-PBS}} = 13$; $n_{\text{VHipp-LIDO}} = 13$; $n_{\text{DHipp-PBS}} = 16$; $n_{\text{DHipp-LIDO}} = 15$ (see Figs. 5b, 6d for an illustration of the infusion sites).

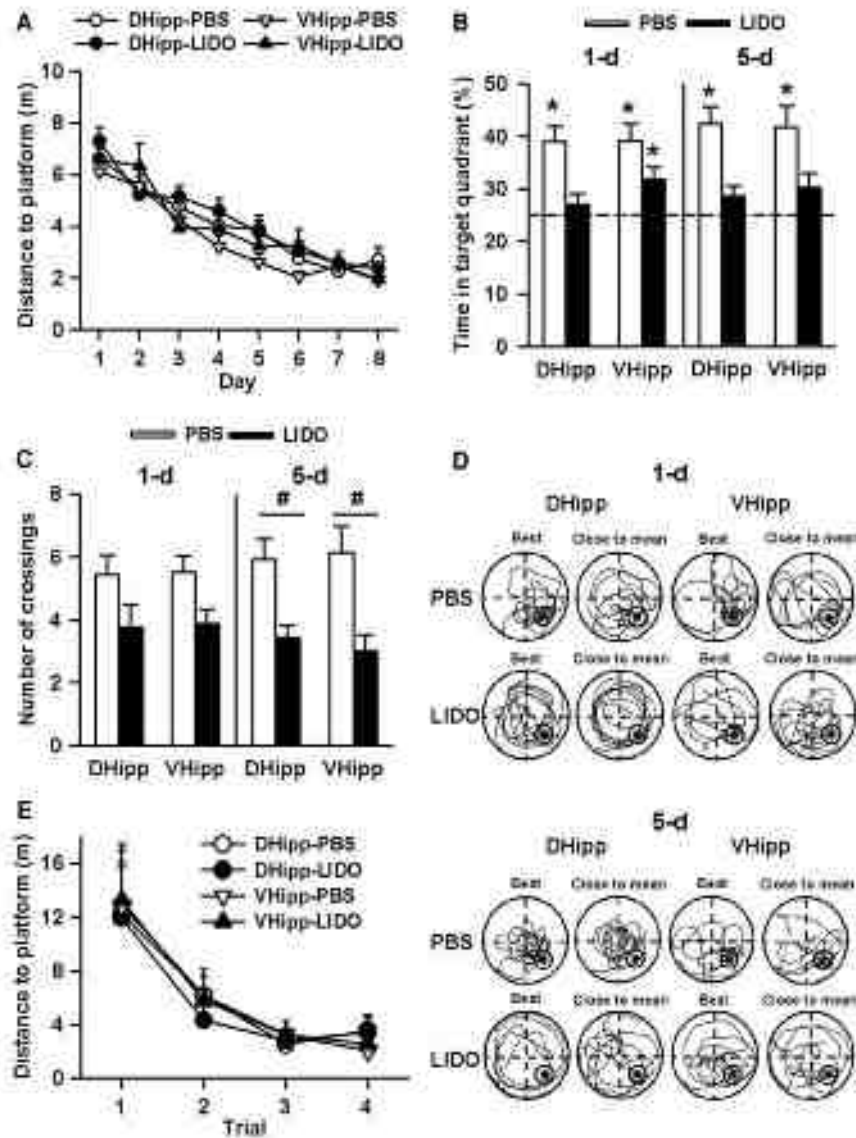
Behavioral results

Intra-DHipp and intra-VHipp LIDO infusion before retrieval impaired probe trial performance in the water maze

The results are shown in Fig. 3. During drug-free training, all groups similarly improved their performance over days

as shown by a significant day effect ($F_{(2,319)} = 61.66$, $p < 0.0001$) without any significant effect of the other factors (Region: $F_{(1,77)} = 1.71$; Treatment: $F_{(1,77)} = 0.63$; Delay: $F_{(1,77)} = 0.42$; $p > 0.1$ in each case) nor interactions between the different factors ($p > 0.1$ in each case) (Fig. 3a). According to the probe trial performance, there was a significant effect of Treatment ($F_{(1,77)} = 32.29$, $p < 0.0001$), but no significant effect of Delay ($F_{(1,77)} = 0.62$, $p > 0.1$) and Region ($F_{(1,77)} = 0.74$, $p > 0.1$) on the time spent in the target quadrant. At the 1-day delay, DHipp-LIDO rats did not remember the platform location ($p > 0.1$ vs. chance level), whereas DHipp-PBS, VHipp-PBS and VHipp-LIDO rats did ($p < 0.01$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively, vs. chance level) (Fig. 3b). At the 5-day delay, DHipp-LIDO and VHipp-LIDO rats did not remember the platform location ($p > 0.05$ vs. chance level), whereas DHipp-PBS and VHipp-PBS rats did ($p < 0.01$ vs. chance level) (Fig. 3b). The analysis of the

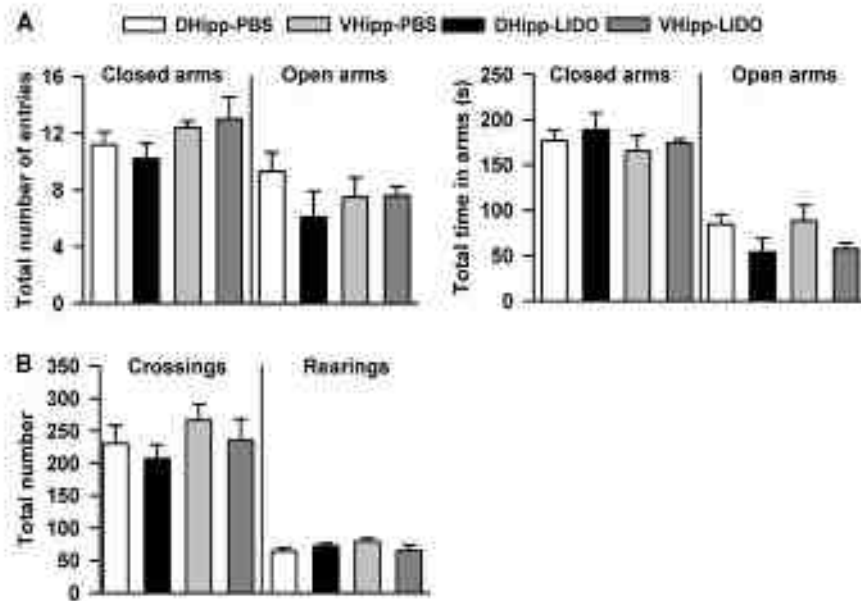
Fig. 3 Water-maze performance in the rats trained with a hidden platform and given PBS or LIDO before the probe trial (a–d) or before a one-training session with a visible platform (e): a Mean (\pm SEM) distance to the platform during the drug-free training phase. Groups are represented according to the treatment they subsequently received before the probe trial. b Percent time in the target quadrant during the probe trial; the shaded area represents chance level (i.e., 25%). * Significantly different from chance, $p < 0.05$, t Test (\pm SEM) of the number of crossings of an arm corresponding to the surface of the platform enlarged by a 10 cm wide annulus during the probe trial. * Significantly different from each other, $p < 0.05$. d Examples of swim paths during each probe trial. For a better illustration of our results, patterns from a rat showing the best performance, i.e., highest percentage of time spent in the target quadrant (left) and from a rat showing performance closest to the group mean (right) are shown for each group. e Mean (\pm SEM) distance to the platform over the four consecutive training trials using a visible platform (same rats as in a–d)



number of annulus crossings (Fig. 3c) and the distance to first annulus crossing (see additional data in Online Resource, Figure S1A) over the target area, an index of memory precision, confirmed the memory deficits in LIDO-infused groups. The ANOVA of the number of annulus crossings showed a significant effect of Treatment ($F_{(1,77)} = 28.55$, $p < 0.0001$) but no significant effect of Delay ($F_{(1,77)} = 0.02$, $p > 0.1$) and Region ($F_{(1,77)} = 0.024$, $p > 0.1$). Thigmotaxis was not significantly affected, whether during acquisition or during probe trial, whatever treatment or delay (not illustrated). Likewise, swim speed was not significantly different among groups (see additional data in Online Resource for swim speed

during retrieval, Figure S2A). Figure 3d shows examples (best and close to mean) of swim paths during each probe trial among the different groups. Together, these results suggest that DHipp inactivation impaired spatial memory retrieval at both delays. This was also the case with VHipp inactivation. When the rats were tested with a visible platform after LIDO infusions, they all performed well, excluding possible sensory, sensorimotor or motivational biases. Indeed, the analysis of the distance to reach the platform over the four trials with a three-way ANOVA showed a significant effect of Trial ($F_{(3,108)} = 109.78$, $p < 0.0001$), but no significant effect of the two other factors (Region, $F_{(1,36)} = 0.52$; Treatment, $F_{(1,36)} = 0.25$;

Fig. 4 **a** LIDO infusion in the DHipp or VHipp did not induce exacerbated anxiety levels in the plus maze; total number of entries (*left*) and time in arms (*right*) did not vary among groups. **b** LIDO infusion in the DHipp or VHipp did not affect locomotor activity (crossings) and rearings in the open-field. Values are given as mean (\pm SEM) over the 10 min recording period



$p > 0.1$ in each case) and no significant interaction between any of the factors ($p > 0.1$ in each case). This shows that all groups displayed similar performance across the four trials (Fig. 3e).

Intra-DHipp or intra-VHipp LIDO had no effect on elevated plus-maze scores

The results are shown in Fig. 4a. There was no effect of Region, Treatment and their interaction for the following variables studied: number of entries in open arms ($F_{(1,36)} = 1.26$, $F_{(1,36)} = 0.01$, $F_{(1,36)} = 1.42$ respectively, $p > 0.1$ in each case), number of entries in closed arms ($F_{(1,36)} = 0.03$, $F_{(1,36)} = 3.43$, $F_{(1,36)} = 0.55$ respectively, $p > 0.1$ in each case) and time in closed arms ($F_{(1,36)} = 0.53$, $F_{(1,36)} = 0.84$, $F_{(1,36)} = 0.008$ respectively, $p > 0.1$ in each case). According to the time in open arms, whereas there was no effect of Region ($F_{(1,36)} = 0.03$, $p > 0.1$), there was a significant effect of Treatment ($F_{(1,36)} = 5.33$, $p < 0.05$) but no interaction ($F_{(1,36)} = 0.00$, $p > 0.1$). Indeed, PBS-treated rats spent slightly, but significantly more time in open arms than LIDO-treated rats (Fig. 4a).

Intra-DHipp or intra-VHipp LIDO had no effect on open-field scores

The results are shown in Fig. 4b. Analysis of the number of square crossings and of rearings showed no significant effect of individual factors on both variables (square crossings: Region, $F_{(1,36)} = 1.42$; Treatment, $F_{(1,36)} = 0.99$; rearings:

Region, $F_{(1,36)} = 0.45$; Treatment, $F_{(1,36)} = 0.26$; $p > 0.1$ in each case) or of their interaction.

Intra-VHipp LIDO before training disrupted neither task learning nor subsequent retrieval

The results are shown in Fig. 5. Analysis of the training performance, i.e., distance to platform, showed no significant effect of Treatment ($F_{(1,24)} = 0.03$, $p > 0.1$), a significant effect of Day ($F_{(4,96)} = 19.32$, $p < 0.0001$) and no interaction between the two factors ($F_{(4,96)} = 0.49$, $p > 0.1$) (Fig. 5a). For the subsequent drug-free probe trial that was given 1 day later, analysis of performance showed no significant effect of Treatment (percent time in target quadrant: $F_{(1,24)} = 0.06$, $p > 0.1$; number of annulus crossings: $F_{(1,24)} = 0.67$, $p > 0.1$; Fig. 5b); distance to the first annulus crossing: $F_{(1,24)} = 0.01$, $p > 0.1$; see additional data given in Online Resource, Figure S1B). Thigmotaxis and swim speed were not significantly affected, whether during training or during the probe trial and whatever the treatment (thigmotaxis not illustrated and for swim speed during acquisition, see additional data in Online Resource, Figure S2B). One-sample t tests showed that performance of both groups, i.e., time spent in the target quadrant, were significantly above chance level ($p < 0.0001$ in each case) (Fig. 5b). Figure 5c shows examples (best and close to mean) of swim paths during the probe trial in both PBS and LIDO groups and Fig. S1 shows the location of the cannulae tips in the VHipp. Overall, those results show that inactivation of the VHipp prior to each daily training session did not hinder learning and further drug-free retention of a platform location.

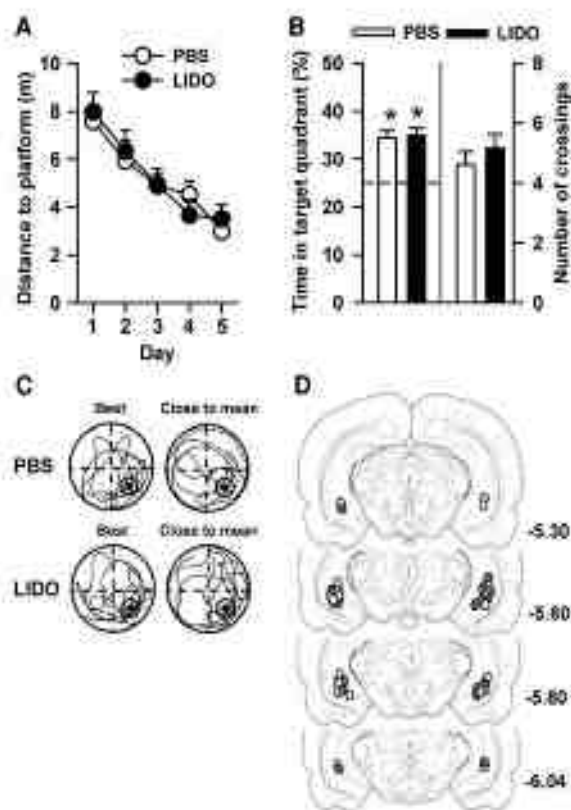


Fig. 5 Morris water-maze performance and PBS or LIDO infusion into the DHipp before each training daily session. Pre-test LIDO administration in the DHipp did not alter a mean (\pm SEM) distances to the platform during training, and b time in target quadrant or number of annulus crossings of the target area in the 1 day delay drug free probe trial. Dashed line in b represents chance level (i.e., 25%). * Significantly different from chance, $p < 0.05$. † Significantly different from distance, $p < 0.05$. c Typical examples of swim paths during the probe trial are shown for both groups. d Drawings of coronal brain sections indicating the location of the infusion sites (PBS white circles, LIDO grey circles). Numbers on the right indicate the distance of each section in mm from Bregma (plates modified from Paxinos and Watson 1998)

Intra-DHipp LIDO before training disrupted task learning and subsequent retrieval

The results are shown in Fig. 6. Analysis of training performance, i.e., distance to platform, showed no significant effect of Treatment ($F_{(1,23)} = 0.03$, $p > 0.1$), a significant effect of Day ($F_{(4,116)} = 12.47$, $p < 0.0001$) and no significant interaction between the two factors ($F_{(4,116)} = 1.78$, $p > 0.1$) (Fig. 6a). For the subsequent probe trial that was given 1 day later, analysis of performance showed a significant effect of Treatment (percent time in target quadrant: $F_{(1,29)} = 8.17$, $p < 0.05$; number of annulus crossings: $F_{(1,29)} = 6.62$, $p < 0.05$; Fig. 6b); distance to the first annulus crossing: $F_{(1,29)} = 10.16$, $p < 0.01$; see additional data given in Online Resource, Figure S1B).

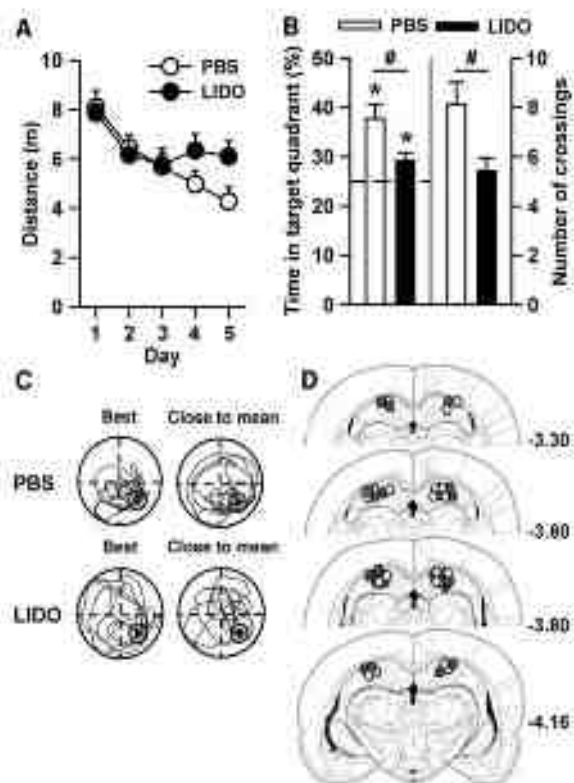


Fig. 6 Morris water-maze performance and PBS or LIDO infusions into the DHipp before each daily training session. Pre-test LIDO administration in the DHipp did not significantly alter a mean (\pm SEM) distances to the platform during training, but significantly reduced b time in target quadrant and number of annulus crossings in the 1 day-delay drug-free probe trial. Dashed line in b represents chance level (i.e., 25%). * Significantly different from chance, $p < 0.05$. † Significantly different from distance, $p < 0.05$. ‡ Significantly different from each other, $p < 0.05$. c Typical examples of swim paths during the probe trial are shown for both groups. d Drawings of coronal brain sections indicating the location of the infusion sites (PBS white circles, LIDO grey circles). Numbers on the right indicate the distance of each section in mm from Bregma (plates modified from Paxinos and Watson 1998)

Thigmotaxis and swim speed were not significantly affected, whether during training or during the probe trial and whatever the treatment (not illustrated for thigmotaxis, see additional data given in Online Resource for swim speed data during acquisition, Figure S2B). One-sample t tests showed that time spent in the target quadrant of both groups were significantly above chance level ($p < 0.0001$ for DHipp-PBS and $p < 0.05$ for DHipp-LIDO) (Fig. 6b). Figure 6c shows examples (best and close to mean) of swim paths during the probe trial in both PBS and LIDO groups and Fig. 6d shows the location of the cannulae tips in the DHipp. Overall, these results show that inactivation of the DHipp prior to each daily training session altered further drug-free retention of the platform location.

Discussion

This is the first study to directly compare the effects of DHipp and VHipp inactivation on the acquisition, retrieval and/or expression of a spatial reference memory (SRM), and to address a possible contribution of the VHipp to these processes. We found that reversible inactivation of the DHipp or VHipp before a probe trial after drug-free acquisition both impaired memory retrieval. Our conclusion is that SRM retrieval engages the entire or most of the dorsoventral axis of the hippocampus, and not only the DHipp, at least when a task has been acquired with the entire hippocampus. We also showed that LIDO infusions into the VHipp (same dose and volume as for the investigation of retrieval processes) did not disrupt task acquisition, suggesting that the DHipp is necessary and sufficient to support acquisition. Inactivation of the DHipp before each training session slightly impaired learning performance and resulted in drug-free retention deficits 24 h later. Because one major concern using reversible inactivation techniques is the area of diffusion of the drug, our data using pre-acquisition LIDO infusions leading to different effects on memory (i.e., only LIDO infused within the DHipp before each acquisition trial impaired subsequent drug-free probe trial performance) is a convincing argument in favor of a drug diffusion restricted to each targeted hippocampal subregion: the specific effects of VHipp inactivation before retrieval, which were not seen when the drug was infused before acquisition, cannot be due to a diffusion of LIDO to the DHipp. In addition, our data showing that the intraparenchymal spread of an Evans blue-LIDO mixture was limited to the targeted hippocampal subregion (i.e., DHipp or VHipp) are in line with our behavioral observations. One has to keep in mind, however, that the diffusion of Evans blue does not necessarily correspond to the functional spread of LIDO.

DHipp inactivation

Our data are consistent with previous findings showing impaired probe trial performance in a water maze after bilateral infusions of LIDO into the DHipp at post-acquisition delays from a few hours to 30 days (Broadbent et al. 2006; Klur et al. 2009; Pereira de Vasconcelos et al. 2006; Teixeira et al. 2006). Similar effects were obtained with the GABA_A receptor agonist muscimol (Moser and Moser 1998b) or the AMPA/kainate receptor antagonist LY326325 (Micheau et al. 2004; Riedel et al. 1999). In the five-arm maze, Maviel et al. (2004) also showed impaired performance after DHipp inactivation at a 1-day delay in mice. Finally, DHipp-LIDO inactivation was found to selectively impair place learning-based performance without affecting response learning-based performance in rats given sustained

(training in a cross maze task (Packard and McGaugh 1996)). Overall, DHipp inactivation before a probe test induces spatial memory retrieval deficits, even after a long delay (30 days; see Parson et al. 2001). This might be related to the necessity of an engagement of the DHipp when a precise memory, of which specific contextual information permits accurate navigation and path integration, needs to be retrieved (see Nadel and Hardt 2011; Winocur et al. 2010).

The key role of the DHipp in memory acquisition was previously evidenced using permanent lesions in various tasks exploring spatial memory (e.g., Morris et al. 1982; Moser and Moser 1998b; Potkinzen et al. 2004) or fear conditioning (e.g., Bannerman et al. 2004; Maren et al. 1997). Concerning DHipp inactivation before training sessions, only a few studies have been performed so far. Micheau et al. (2004) showed both altered acquisition and retrieval performances in a water-maze task when the DHipp was inactivated. However, these authors used a methodological option closer to permanent lesions than to reversible inactivations, as they chronically infused an AMPA/kainate antagonist from 14 days before training onwards. Riekkinen et al. (1999) used acute infusions of LIDO before each acquisition session and showed a marked disruption of spatial navigation during the acquisition and the subsequent probe trials. In this regard, it may seem surprising that pre-acquisition infusions of LIDO into the DHipp failed to induce a dramatic impairment of task acquisition in the current study. This failure, however, is in line with the outcome of our previous study (Klur et al. 2009). The fact that we found no clear impairments of acquisition performance when the DHipp was inactivated could suggest that the hippocampal subregions that were not affected by the drug (i.e., VHipp and intermediate hippocampus) might have been sufficient to support improvement of performance during task acquisition, although they were insufficient to permit optimal performance during the probe trial.

VHipp inactivation

The role of the VHipp in spatial memory has predominantly been assessed using permanent lesions performed before any training (Broadbent et al. 2004; de Hoz et al. 2003; Moser et al. 1995; Moser and Moser 1998b; Potkinzen et al. 2004). Studies revealing a functional dissociation between the DHipp and VHipp often pointed to minimal or no involvement of the VHipp in SRM (e.g., Moser et al. 1993, 1995; Potkinzen et al. 2004). Ferhntanu et al. (2003), however, found VHipp lesions to impair SRM, although far less than after DHipp lesions. Contrasting with the protocol of other studies, Moser and Moser (1998b) found retrieval deficits following post-training VHipp lesions. In addition, De Hoz et al. (2003) pointed to the

importance of the protocol used by showing that training spaced in time was able to attenuate differences between DHipp and VHipp lesion effects. Moreover, single-unit recordings from DHipp following lesions to the VHipp suggest that accurate retrieval of place codes by DHipp neurons is possible without the VHipp (Bast et al. 2009). These findings argue against a role of the VHipp in retrieval of spatial memory representations. Finally, Bast et al. (2009; rev Bast 2011) suggested that ventral to intermediate parts of the hippocampus may be important to relate spatial memory representations to organization/execution of behavior mediated by prefrontal and subcortical circuits, thereby making possible the translation of hippocampus-dependent spatial memory into appropriate behavior. However, such a key role of the VHipp in expression of a memory representation presumably stored in the DHipp might be restricted to memories formed after rapid-place learning or to working memory-related processes (Bast et al. 2009; Floresco et al. 1997). In case of incremental learning, rats left with only the dorsal, the intermediate or the ventral hippocampus can in fact acquire and express a spatial memory (Bast et al. 2009).

In most of these studies, however, permanent lesions were performed prior to training, thereby preventing any interpretation on the potential role of VHipp during the retrieval process. Reversible inactivation does not carry such a drawback, nor does it trigger synaptic reorganizations as occur after permanent lesions (Ambroggi, Lorenzini et al. 1999). However, none of the few water-maze studies published so far explored the effects of reversible VHipp inactivation on retrieval performance. Our data point for the first time to a role of the VHipp subregion in the retrieval and/or the expression of an SRM at post-acquisition time points that are considered in the literature compatible with recent memory (i.e., 1 and 5 days). Our data are in line with imaging studies using either immediate-early genes (Gusev et al. 2005; Maviel et al. 2004) or 2-deoxyglucose (Bontempi et al. 1999), and showing that the VHipp was engaged along with the DHipp in SRM retrieval tested 1 or 5 days post-acquisition.

When concerning reversible inactivation before training, Wang and Cai (2008) showed that bilateral muscimol-induced VHipp inactivation before training of a water-maze task significantly impaired both acquisition and drug-free retention tested at a 1-day post-acquisition delay. Our data are not in line with these results, but the use of muscimol by Wang and Cai, and this of an agent having a much longer action than LIDO (about 6 h vs. about 20 min, respectively) and that could therefore interfere with early consolidation processes, might account for this discrepancy. Floresco et al. (1996) using bilateral LIDO-induced VHipp inactivation showed alterations of performance in a similar task, but only when LIDO was infused

before a unique 8-trial acquisition session, and not when it was infused before a probe trial taxing short-term memory (30 min). Finally, Poncet et al. (1991) showed no disruption of *de*-learning a new location in a spatial exploration task following bilateral LIDO infusion into the intermediate to ventral CA3 region of the hippocampus. The lack of clear evidence for a role of the VHipp in spatial reference memory learning contrasts with its involvement in other tasks such as those taxing temporal order memory (Howland et al. 2008) or spatial working memory (Floresco et al. 1997; Wang and Cai 2008), and in which the effects of hippocampal inactivations point to a specific role of the VHipp in short-term processing of spatial information. Such prefrontal cortex-dependent tasks have been shown to involve VHipp afferents to the medial prefrontal cortex allowing transmission of information necessary to guide perspective search behavior (Floresco et al. 1997). Perbittanu et al. (2003) also proposed a role of the VHipp in processing spatial information when tasks are particularly demanding. Finally, as expected, the VHipp has also been shown to be specifically involved in a variety of fear conditioning tasks using either permanent lesions (e.g., Kjelstrup et al. 2002) or reversible inactivations (e.g., McEown and Treit 2009, 2010; Rogers et al. 2008).

Distributed retrieval of spatial memory in the hippocampus

Our data showed that, after drug-free training, SRM retrieval engages the entire or most of the dorsoventral axis of the hippocampus. When rats learn a memory task with an intact and fully functional hippocampus, critical modifications could be distributed throughout the whole hippocampus such that if part of that circuitry is disabled during a subsequent retention test, a memory impairment results. This is in line with Moser and Moser's data showing that spatial memory is normally encoded and retrieved by a widely distributed hippocampal network, although spatial tasks can be acquired with restricted parts of the hippocampus such as in case of partial inactivation or lesions (Moser and Moser 1998b; rev Moser and Moser 1998a). In addition, these authors suggested that hippocampal neurons that were active during encoding may be required also for retrieval performance. Finally, using permanent post-training lesions, Moser and Moser (1998b) showed, as in the present study, the necessity of the VHipp for retrieval and/or expression of a memory that was acquired before surgery in a Morris water-maze task. The role of the VHipp during retrieval might be related to the necessity of hippocampo-prefrontal cortex interactions in SRM retrieval. Indeed, recall can be viewed as a complex, effort-requiring situation which typically makes great demands on processes of organization, strategic search,

monitoring and verifications. Even if such interactions are crucial for learning, they might be more important during retrieval. According to Simons and Spiers (2003), they are vital for successful memory. Considering that these interactions involve the intermediate to ventral part of the hippocampus, it appears that our data showing a role of the VHipp, specifically during retrieval of a spatial memory and not during learning, are in line with this view. In addition, whereas specific disruption of spatial memory recall was shown after partial post-training hippocampal lesions, such lesions did not affect new learning (Moser and Maser 1998b). Likewise, whereas DHipp lesions affected spatial memory encoding, VHipp lesions had no effect (Moser et al. 1993, 1995). The same kind of lesions made after training, however, affected memory retrieval (Moser and Moser 1998a). All these data, including our present results, support the idea that the part of the hippocampus required for retrieval is larger than the one required for acquisition of a spatial memory.

Finally, our data also demonstrate that an SRM can be acquired with only a part of the hippocampus, although in our case, less efficiently with the VHipp than with the DHipp. Indeed, when an SRM is acquired with the DHipp (and thus under the condition of VHipp inactivation), the memory retrieved or expressed is as efficient as in PBS-infused rats. On the opposite, when the DHipp is inactivated during acquisition and the task acquired with the VHipp, the retrieval or expression of the memory, although above chance level, appears to lack on precision as clearly shown by a reduced number of annulus crossings as well as an increased distance to the first annulus crossing during the probe trial (see Fig. 6; Figure S1 in Online Resource).

Is there a dorsoventral hippocampal continuum in the processing of spatial memory retrieval?

Our results are in line with the view that at least some functions might be distributed along the longitudinal axis of the hippocampus. At first sight, this may seem puzzling, considering the extensive literature depicting differences between hippocampal subregions, including behavior, anatomical connections, electrophysiological properties, neurotransmitter patterns and gene expression. Overall, those would support a primary role of the DHipp in memory functions, while the VHipp would rather be involved in emotion and stress responses (see Fanselow and Dong 2010). In addition, recent gene expression studies proposed three molecular domains along the hippocampal longitudinal axis, i.e., dorsal, intermediate and ventral subregions, the intermediate hippocampus representing a functional link between the DHipp and VHipp and sharing part of both sub-regions' functional properties (Bast et al. 2009). However, there are also obvious

similarities between the DHipp and VHipp. For instance, the connectivity between the dentate gyrus, CA3 and CA1 is comparable, and might thus reflect common set of calculations. In addition, extensive intrahippocampal projections between principal cells as well as between principal cells and interneurons (Witter and Amaral 2004), which mediate excitatory transmission and synchronous neuronal activity (Bartesaghi et al. 1983; Gloveli et al. 2005; Helmeington et al. 1998), are found along the whole longitudinal extent of the hippocampus. These anatomical and functional interactions may represent a structural framework for the spatiotemporal distribution of activity within the hippocampus that may provide a unique insight into the role played by the hippocampus in cortical information processing and memory formation (Gloveli et al. 2005). Finally, a dialog between the DHipp and VHipp can be performed via other structures involved in the processing of SRM. For example, on the one hand, VHipp might communicate information to DHipp or modulate DHipp network through the perirhinal and posthinal cortices, as well as through the reticular nucleus of the midline thalamus (e.g., Lopez et al. 2000). On the other hand, DHipp might communicate information to the VHipp through the medial septal area and the supramammillary nucleus as depicted by Fanselow and Dong (2010).

Conclusion

In the light of the present results and the literature, we conclude that while the DHipp is sufficient to form an efficient memory trace, both the DHipp and VHipp contribute to the retrieval of spatial information when the task has been acquired with the entire hippocampus. However, we cannot rule out the possibility that these two areas participate in different but complementary processes necessary to achieve good retrieval performance, such as those underlying either accurate place localization and navigational performance (which would rely upon the DHipp via networks of place cells characterized by small place fields) or the expression of a memory representation (which would rely on the VHipp via connections to the prefrontal cortex and subcortical areas such as the medial dorsal striatum or accumbens nucleus).

Acknowledgments This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-NEURO-027-03), the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. We are grateful to O. Billouin, D. Egret, and G. Edingerweyl for their assistance in animal care.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Allen TA, Narayana NS, Kharbala-Smith DB, Zhao Y, Leubach M, Brown TH (2008) Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. *J Neurosci Methods* 171:30–38
- Arnold DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 21:571–591
- Ambrogio Lorenzini CG, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti D, Tassoni G (1999) Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem* 71:1–18
- Bannerman DM, Rawlins JND, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HHJ, Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28:275–283
- Barceloghi R, Gessi T, Spini L (1985) Intracellular transfer of impulses in the hippocampal formation. *Exp Neurol* 82: 520–567
- Bast T (2000) Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behaviour. *Rev Neurosci* 18:253–281
- Bast T (2011) The hippocampal learning-behavior translation and the functional significance of hippocampal dysfunction in schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 21:1–10
- Bast T, Wilson JA, Winer MP, Morris RGM (2009) From rapid place learning to behavioural performance: a key role for the intermediate hippocampus. *PLoS Biol* 7:736–746
- Bonjante B, Laurent-Demir C, Destria C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400:671–675
- Brodbeck NF, Squire LR, Clark RF (2004) Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14315–14320
- Brodbeck NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13:187–191
- Christensen T, Bisgaard CF, Nielsen HB, Wiborg O (2010) Transcriptional differentiation along the dorso-ventral axis in laser-captured microdissected rat hippocampal granular cell layer. *Neuroscience* 170:741–744
- Coccarin KA, Desmond TL, Frey KA, Maric S (2005) Hippocampal activation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J Neurosci* 25:8978–8987
- Cospas B, Pereira de Vasconcelos A, Jürg Prohlich, Cassel JC (2005) Blood-brain barrier and electromagnetic fields: effects of scopolamine methylbromide on working memory after whole-body exposure to 2.45 GHz microwaves in rats. *Behav Brain Res* 161:229–237
- de Hoz J, 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* 13:587–600
- Dang HW, Swanson LW, Chen L, Fanselow MS, Teng AW (2009) Gene-environment evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11794–11799
- Eskandar EN, Huns B, Hennevin E, Cattillon N (2002) Muscimol diffusion after intracerebral micro-injections: resolution based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol Learn Mem* 78:100–121
- Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65:1–19
- Feldhauer J, Key C, McDonald RI (2009) Both dorsal and ventral hippocampus contribute to spatial learning in Long Evans rats. *Neurosci Lett* 443:131–135
- Ferreiro SB, Szamans JK, Phillips AG (1996) Differential effects of lidocaine infusions into the ventral CA1/subiculum or the nucleus accumbens on the acquisition and retention of spatial information. *Behav Brain Res* 81:163–171
- Ferreiro SB, Szamans JK, Phillips AG (1997) Selective roles for hippocampal, perirhinal cortical, and ventral striata circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci* 17:1880–1890
- Frankland PW, Bontempi B, Tolton LE, Kennerly L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304:881–883
- Givelli T, Deglady T, Kontin DG, Traub RD, Menyer H, Henemann JJ, Wainwright MA, Kopell NJ (2005) Orthogonal arrangement of rhythm-generating microcircuits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13285–13290
- Grey PA, Cui C, Alkon DL, Gobin AN (2005) Topography of *Arg3.1* mRNA expression in the dorsal and ventral hippocampus induced by recent and remote spatial memory dissociation of CA1 and CA2 activation. *J Neurosci* 25:9384–9392
- Heithington PA, Austin KB, Shapiro ML (1994) Spatiotemporal afferent pathway in the dentate gyrus: an excitatory feed-back system that supports *N*-methyl-D-aspartate-dependent long-term potentiation. *Hippocampus* 4:422–438
- Howland JA, Harrison RA, Harrison DR, Phillips AG (2008) Ventral hippocampal involvement in temporal order but not recognition memory for spatial information. *Hippocampus* 18:251–257
- Ju YS, Lee J (2010) Disconnection of the hippocampal perirhinal cortical circuits severely disrupts object-place paired associative memory. *J Neurosci* 30:9850–9858
- Kjelstrup KI, Tuvnes FA, Stålanich HA, Mørton R, Moser EI, Moser MB (2007) Rodential fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10825–10830
- Kjelstrup KI, Solstad T, Brun VH, Hafting T, Leung S, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2008) Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science* 321:140–145
- Kramer D, Pantalkova E, Fenton A (2005) Tricordanol diffusion into the dorsal hippocampus blocks non-locomotor place cognition. *Hippocampus* 15:460–473
- Klar S, Müller C, Pereira de Vasconcelos A, Hallard T, Lopez J, Gribel R, Cerni U, Cassel JC (2009) Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: an approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* 19:800–816
- Koenig L, Cospas B, Cassel JC (2008) Activation of signal 5-HT_{1A} receptors alters spatial memory encoding, interferes with non-oscillations, but does not affect retrieval in rats subjected to a water-maze task. *Hippocampus* 18:99–118
- Lecourtier L, Pereira de Vasconcelos A, Leinny E, Coccarin B, Geiger K, Laitinen S, Cassel JC (2011) Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: sequent of upregulation of GABAergic and cholinergic neurons. *Hippocampus* (in press)
- Lopez J, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2008) Environmental cues saliency influences the vividness of a remote spatial memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90:285–289
- Lopez J, Wolf M, Laitinen L, Cospas B, Bontempi B, Delyempe-Allard J, Cassel JC (2009) The intralimbic thalamic nuclei contribute to remote spatial memory. *J Neurosci* 29:3302–3306
- Maggiù N, Segal M (2007) Unique regulation of long-term potentiation in the rat ventral hippocampus. *Hippocampus* 17:10–25

- Maren S, Ahissou G, Fanslow MS (1997) Neomaxic lesions of the dorsal hippocampus and pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88:251–254
- Martin JL (1991) Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 127:160–164
- Maviel T, Durkó T, Ménage F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96–99
- McEwen K, Tees D (2009) The role of the dorsal and ventral hippocampus in fear and memory of a shock-probe experience. *Brain Res* 1251:185–194
- McEwen K, Tees D (2010) Inactivation of the dorsal or ventral hippocampus with muscimol differentially affects fear and memory. *Brain Res* 1353:145–151
- Milten J, Riadé P, Evl, Rehné, Inghis J, Merck RGM (2004) Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behav Neurosci* 118:1022–1032
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681–683
- Moser MB, Moser EI (1988) 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
- Moser EI, Moser MB, Andersen P (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13:3916–3925
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RGM (1995) Spatial learning with a minitrial in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9697–9701
- Moser EI, Kropff E, Moser MB (2008) Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Ann Rev Neurosci* 31:69–89
- Nadel L, Harsh O (2011) Update on memory systems and processes. *Neuropsycholarmacol Rev* 36:251–273
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or nucleus accumbens with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65–72
- Pavoni C, Pouzet B, Székely A (2011) 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
- Postalkova E, Serrano P, Finkbeiner D, Willmore E, Fennig AA, Sackin TC (2006) Retrieval of spatial information by the mammalian mechanism of LTP. *Science* 313:1145–1148
- Palacios G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd edn. Academic Press, San Diego
- Perez de Vasconcelos A, Klur S, Müller C, Casqueiro B, Lopez J, Cerbasi C, Cassel JC (2009) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by introduction of lidocaine: a comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. *Neuroscience* 141:1659–1663
- Pothuizen HH, Zhang WS, Jenzen JE, Feldon J, Yee BK (2004) Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci* 19:765–773
- Pouzet B, Heymann T, Buisson MC (1991) Effects of short-lasting inactivations of the ventral hippocampus and medial septum on long-term and short-term acquisition of spatial information in rats. *Behav Brain Res* 44:53–58
- Riedel G, Michon J, Lam ACM, Roloff EVL, Martin SJ, Bridge JL, de Hoz L, Prybyl B, McCulloch J, Morris RGM (1999) Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nat Neurosci* 2:898–905
- Riekkinen P Jr, Riekkinen S, Auri J, Riekkinen M (1999) Tetrahydroaminoacridine and n-cyclohexane fail to alleviate the water maze spatial navigation defect induced by hippocampal inactivation. *Eur J Pharmacol* 366:13–19
- Reges H, Dummer MB, Kossner RP (2006) Effects of ventral and dorsal CA1 subregional lesions on trace fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 86:72–81
- Saad-Kabir J, Malsb E, Zimmernann M (1987) The use of local anesthetic microinjections to identify neural pathways: a quantitative evaluation of the time course and extent of the neuronal block. *Exp Brain Res* 68:166–178
- Simons DJ, Spiers HJ (2003) Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nature Rev Neurosci* 4:637–648
- Talbot CM, Bonaldi SR, MacI HR, Kao N, Franklin PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* 26:7515–7524
- Wang QW, Cai JX (2006) Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. *Behav Brain Res* 175:329–336
- Wang QW, Cai JX (2008) Reversible disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. *Neurobiol Learn Mem* 96:365–375
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006) Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093–1097
- Wintour G, Moscovitch M, Bannrup B (2010) Memory formation and long-term retention in humans and animals: convergent evidence in transgenic mice of hippocampal-cortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2339–2356
- Wise MP, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system*. Elsevier, Amsterdam, pp 635–704
- Zharov A, Dures 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

Supplementary data

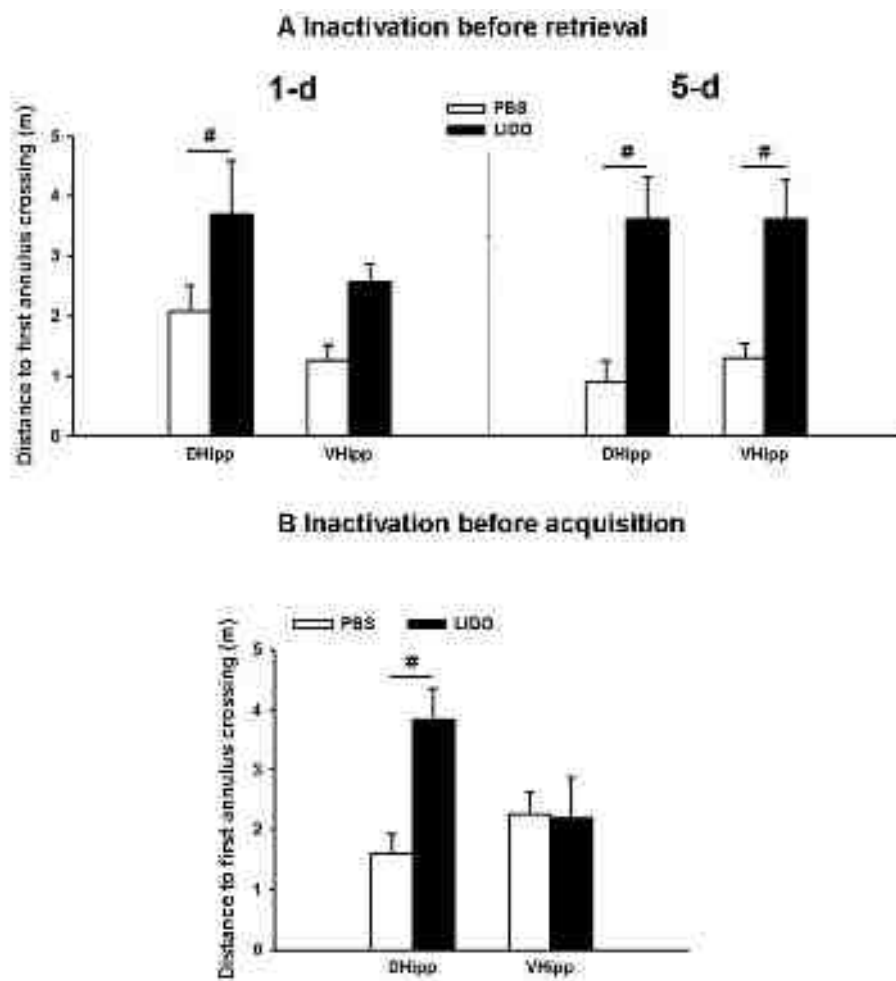


Figure S1

Fig. S1 Effect of DHipp or VHipp inactivation either before retrieval (A) or before acquisition (B) on the distance to the first annulus crossing during the probe test. **(A)** According to probe trial performance, there was a significant effect of Treatment (LIDO, PBS, $F_{(1,77)} = 29.73$, $p < 0.1$) but no significant effect of Delay (1day, 5 days, $F_{(1,77)} = 0.80$, $p > 0.1$) and Region (DHipp, VHipp, $F_{(1,77)} = 0.47$, $p > 0.1$) when LIDO was infused in DHipp and VHipp at 1-d and 5-d delay and no interaction between the three factors ($F_{(1,77)} = 0.01$, $p > 0.1$). **(B)** Analysis of performance showed a significant effect of Treatment ($F_{(1,47)} = 4.28$, $p < 0.1$), no significant effect of Region ($F_{(1,47)} = 0.91$, $p > 0.1$) but and a significant interaction between the two factors ($F_{(1,47)} = 4.79$, $p < 0.1$). # significantly different from each-other, $p < 0.05$.

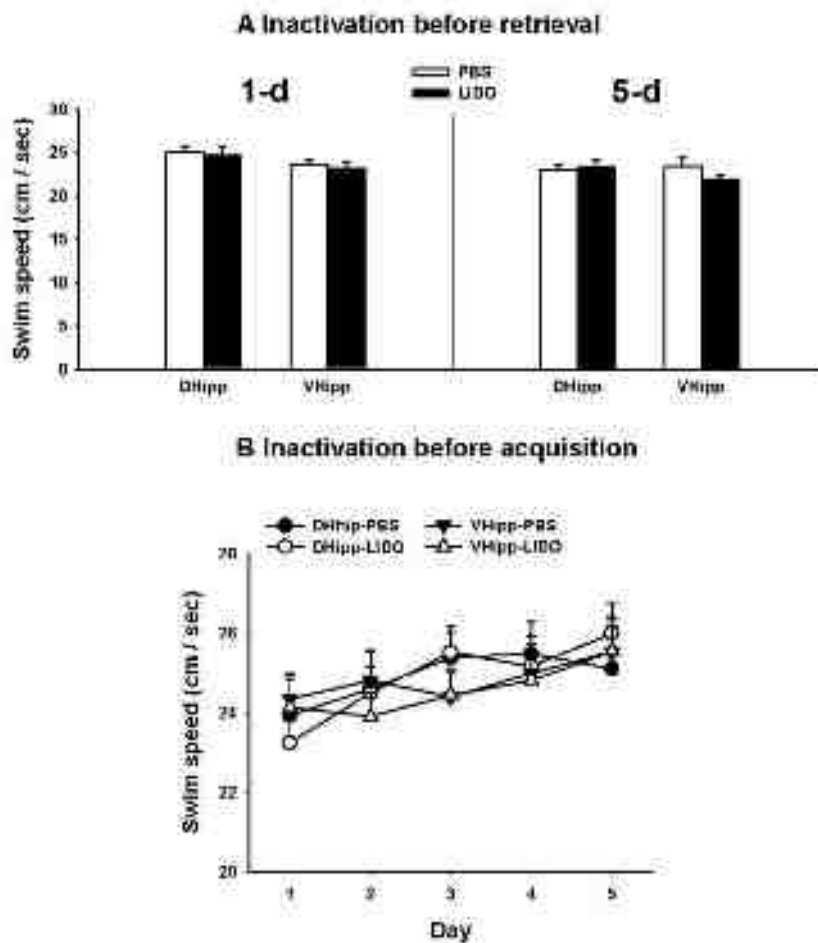


Figure S2

Fig. S2 Effect of DHipp or Vhipp inactivation before retrieval **(A)** or before acquisition **(B)** on swim speed in a water maze task. **(A)**, There was no effect of Treatment (LIDO, PBS, $F_{(1,77)} = 4.10$, $p > 0.1$), Delay (1day, 5 days, $F_{(1,77)} = 3.68$, $p > 0.1$) and Region (DHipp, Vhipp, $F_{(1,77)} = 2.48$, $p > 0.1$) when LIDO was infused before the probe trial at both delay (1 or 5 d). **(B)** There was no effect of Treatment ($F_{(1,77)} = 0.06$, $p > 0.1$), a significant effect of Day (1,2..... 5, $F_{(4,188)} = 4.25$, $p < 0.1$) and no significant interaction between the two factors ($F_{(4,188)} = 0.42$, $p < 0.1$) when inactivation was performed before each acquisition session.

Publication 2

Publication 2

Implication des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus (noyaux reuniens et rhomboïde) dans la persistance d'une mémoire spatiale chez le rat

La deuxième série d'expériences réalisées pendant ma thèse et présentée dans cette seconde publication avait pour objectif d'étudier le rôle des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans le rappel d'un souvenir spatial récent ou ancien. Pour cela, nous avons utilisé une combinaison d'approches incluant de l'imagerie cérébrale, pour la quantification de la protéine c-Fos, la réalisation de lésions excitotoxiques par injection de NMDA, et enfin, l'inactivation fonctionnelle réversible par instillation intra-cérébrale de Lidocaïne. Les animaux étaient entraînés dans un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris et testés soit à 5 jours (mémoire récente), soit à 25 jours (mémoire ancienne) après la fin de l'acquisition. Les résultats d'imagerie cérébrale ont montré une augmentation significative de la protéine c-Fos dans les noyaux reuniens (Re) et rhomboïde (Rh) lors du rappel à 25 jours, par rapport au rappel à 5 jours et aux groupes témoins (*home cage*, plateforme visible avec rideaux). La lésion excitotoxique des noyaux Re et Rh effectuée avant l'acquisition a détérioré les performances de rappel des rats au délai de 25 jours par rapport aux rats contrôles (sham), ce qui n'a pas été observé au délai de 5 jours où les performances des deux groupes (lésé et sham) sont similaires et supérieures au hasard. L'anxiété des animaux lésés, ainsi que leurs capacités locomotrices ont été évaluées et ont permis d'exclure une interaction possible entre ces comportements et la mauvaise performance des rats lors du test à 25 jours en piscine de Morris. Enfin, l'inactivation des noyaux Re et Rh effectuée juste avant le test de rétention n'a pas diminué les performances des animaux et ceci, quel que soit le délai, montrant ainsi que ces noyaux ne seraient pas indispensables au rappel d'une tâche mnésique. Cependant, l'augmentation de l'expression de la protéine c-Fos dans ces noyaux lors du test effectué à 25 jours indique qu'ils pourraient participer au rappel d'une mémoire spatiale ancienne mais que leur rôle ne serait pas crucial. Ainsi, nos données suggèrent que les conséquences de la lésion des noyaux Re et Rh ne sont pas dues à une perturbation du rappel, mais à une altération du processus de consolidation nécessaire à la persistance des souvenirs à long terme dont il a été démontré qu'elle nécessite un dialogue hippocampo-cortical impliqué dans la consolidation d'une trace mnésique au niveau des systèmes.

The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats

Michael Loureiro, Thibault Cholvin, Joëlle Lopez, Nicolas Merienne, Aama Latreche, Brigitte Cosquer, Karine Geiger, Christian Reiche, Jean-Christophe Cassel,^{1*} and Anne Pereira de Vasconcelos^{1*}

La Sorbonne d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Strasbourg, Institut Fédératif de Recherche IR 37 de Neurosciences, GDR 2005 ex-UMRS, Faculté de Psychologie, F-67083 Strasbourg, France

The formation of enduring declarative-like memories engages a dialog between the hippocampus and the prefrontal cortex (PFC). Electrophysiological and neuroanatomical evidence for reciprocal connections with both of these structures makes the reuniens and rhomboid nuclei (ReRh) of the thalamus a major functional link between the PFC and hippocampus. Using immediate-early gene imaging (*c-Fos*), fiber-sparing excitotoxic lesion, and reversible inactivation in rats, we provide evidence demonstrating a contribution of the ReRh to the persistence of a spatial memory. Intact rats trained in a Morris water maze showed increased *c-Fos* expression (vs home cage and visible platform groups: >300%) in the ReRh when tested in a probe trial at a 25 d delay, against no change at a 5 d delay; behavioral performance was comparable at both delays. In rats subjected to excitotoxic fiber-sparing NMDA lesions circumscribed to the ReRh, we found normal acquisition of the water-maze task (vs sham-operated controls) and normal probe trial performance at the 5 d delay, but there was no evidence for memory retrieval at the 25 d delay. In rats having learned the water-maze task, lidocaine-induced inactivation of the ReRh right before the probe trial did not alter memory retrieval tested at the 5 d or 25 d delay. Together, these data suggest an implication of the ReRh in the long-term consolidation of a spatial memory at the system level. These nuclei could then be a key structure contributing to the transformation of a new hippocampus-dependent spatial memory into a remote one also depending on cortical networks.

Introduction

The debate about memory systems in the brain, the number and type of neural ensembles which they engage, and the cellular/subcellular processes underlying memory persistence is still open (Frankland and Bontempi, 2005; Squire, 2009; Sutherland et al., 2010; Nadel and Hardy, 2011). One consensual idea is that the hippocampus is essential for the consolidation of declarative memories in humans and declarative-like ones in animals (Winocur et al., 2010). Another one is that the hippocampus is required for the retrieval of richly contextualized memories, especially when formed recently (Frankland and Bontempi, 2005; Sutherland et al., 2010). It is therefore not surprising that dys-

function of the hippocampus formation is associated with both anterograde and retrograde amnesia. Diencephalic lesions, as seen in Korsakoff syndrome (KS) or in thalamic strokes, are another cause of enduring memory dysfunctions, of which some features resemble those of temporal lobe amnesia (Aggleton and Brown, 1999; Kopelman, 2002; Aggleton et al., 2011; Carlesimo et al., 2011). Our understanding of the neuroanatomical bases of diencephalic amnesia is complicated by the fact that KS or stroke usually affects a relatively large number of thalamic and sometimes even extrathalamic nuclei (Van der Werf et al., 2000, 2003a,b; Carlesimo et al., 2011). Approaches in animals, which enable better circumscribed damage, suggest that intralaminar (ILN) and/or anterior thalamic nuclei lesions could be among the critical alterations accounting for diencephalic amnesia (Aggleton and Brown, 1999; Gold and Squire, 2006; Lopez et al., 2009). Thalamic nuclei that received much less attention are the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei. This apparent neglect is surprising given the connections between the ReRh and brain structures such as the hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC), which are both crucial to memory processing over time (Frankland and Bontempi, 2005; Sutherland et al., 2010; Winocur et al., 2010). Indeed, the ReRh is the major source of excitatory thalamic projections to the hippocampus (Woolfstedt et al., 1990; Dodeman-Van der Weel et al., 1997; Bertram and Zheng, 1999; Cavdar et al., 2008), and has dense bilateral connections with the PFC (Verres, 2002; Verres et al., 2008; Hoover and

Received Jan. 19, 2011; revised May 19, 2011; accepted June 14, 2011.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (ANR-09-NEUR-112-01) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (U1054). We thank M. L. J. C. and A. P. V. for technical assistance.

*M.L. and A.P.V. conceived the study; T.C., J.L., N.M., A.L., B.C., K.G., C.R., J.C.C., and A.P.V. designed the experiments; T.C., J.L., N.M., A.L., B.C., K.G., C.R., J.C.C., and A.P.V. performed the experiments and collected the data; T.C., J.L., N.M., A.L., B.C., K.G., C.R., J.C.C., and A.P.V. analyzed the data.

Correspondence should be addressed to Dr. Jean-Christophe Cassel, Institut Fédératif de Recherche IR 37 de Neurosciences, GDR 2005 ex-UMRS, Faculté de Psychologie, Université de Strasbourg, F-67083 Strasbourg, France.

E-mail: ccassel@unistra.fr.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.0767-11.2011

Copyright © 2011 the authors. 0270-6474/11/319917-11\$15.00/0

Vertes, 2012). Supported by electrophysiological findings (Di Felice and Vertes, 2008), this connectivity makes the ReRt a major link between the mPFC and the hippocampus (McKernin and Vertes, 2004; Vertes, 2006), whereby it may participate in the contribution of these two structures to recent and remote memory functions. Recent data even showed that a subpopulation of Re neurons had collateral projections to both the mPFC and hippocampus (Hoover and Vertes, 2012). In the following experiments, which used immediate early gene expression, fiber-optic excitotoxic lesion, and reversible functional inactivation approaches in rats, we aimed at investigating the contribution of the ReRt to recent and remote memory retrieval in a Morris water-maze task. We provide evidence demonstrating a contribution of the ReRt to spatial memory persistence.

Materials and Methods

Animals

The study adhered to the regulations specified by the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (reference for personal authorization: 2006-01707-7 for A.P.E.V. and 2007-213 for J.C.C.; the other authors are under the faculty's responsibility). All experiments were performed in male Long-Evans rats aged 3 months at their arrival in the laboratory (220–300 g). Animals were housed individually in quiet facilities, under a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 A.M.) with food and water ad libitum, controlled temperature, and a hygrometry of about 55%. Before any experiment (surgery or maze training), rats were individually handled for 2 min each day over 5 consecutive days.

c-Fos immunohistochemistry

Brain preparation and section processing. Ninety minutes after behavioral test completion, rats were killed by an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, i.p.) and then perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were removed, postfixed for 2 h (4% PFA, 4°C), and transferred to a 20% sucrose solution for 48 h at +4°C before being sliced (vibratome, thickness = 40 μ m) and stored at -30°C. Floating coronal sections (30 μ m) were cut using a vibratome (Reichert-Jung Frigostar 2000 Reicher) in serial sections within a block of tissue extending from -1.4 to -3.9 mm from bregma (Paxinos and Watson, 1998). Starting at a random position among the first four sections collected, every fourth section was selected for immunohistochemistry. All selected sections were processed at the same time with all group conditions equally represented (i.e., home cage [HC], Curran 5 d, Curran 25 d, and hidden platform 5 and 25 d) in each of the 24-well trays used for staining. These procedures avoided any technical bias. Neuron counting used immunostained sections included in a more narrow rostrocaudal window (i.e., -1.6 to -2.5 mm from bregma), in which both Re and Rt nuclei showed the largest extent in the dorsoventral (DV) and mediolateral (ML) planes (Paxinos and Watson, 1998). In most rats our quantifications could be performed on five sections. In four of them, however, one or at most, two sections had to be discarded because of damage during processing that was sufficient to compromise the legibility of information, reducing quantifications to four or three sections; at the least, thus, data considered for analysis were average values of at least three, four, or five sections.

Immunohistochemistry protocol. The protocol is that used by Lopez et al. (2011). Briefly, sections were rinsed three times during 10 min in a PBS-metabisulfite buffer before being soaked for 7 h in 5% normal donkey serum in PBS (metabisulfite) containing 0.5% Triton X-100. The sections were subsequently transferred into the primary anti-Fos rabbit polyclonal antibody (1:2000; Santa Cruz Technology) solution for 24 h at room temperature. Then, the sections were soaked in a buffer solution containing biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:200; Biotin-SP conjugated affinityPure Jackson ImmunoResearch). Staining was revealed with the avidin-biotin-peroxidase method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) coupled to diaminobenzidine.

Imaging and quantification. The quantitative analysis of c-Fos-positive nuclei was performed in the ventral midline nuclei (Re, Rt) (-1.6 to -2.5 mm from bregma; see Fig. 2) (Paxinos and Watson, 1998) by an

experimenter blind to the experimental conditions. In addition, at the same bregma levels, c-Fos-positive neurons in two additional control regions not known to be directly involved in spatial memory functions were also evaluated at the same bregma levels as Re and Rt nuclei: the primary somatosensory cortex barrel field (S1BF) and the ventromedial hypothalamus (VMH). Stained sections were observed under a Leica DM5500S light microscope ($\times 30$ objective lens) and digitalized online using a video camera (Optiprocam Microfire) with an image analyzer (Exploira Nova). The same intensity of light in the videoimage as well as the same parameters in the exposure time of the digital camera were used for all sections. Using the Metacater software (Exploira Nova), the regions of interest were delimited and c-Fos-positive nucleus counting was performed by selecting a threshold value that keeps all labeled immunopositive elements but no background. On each selected section, counting was performed in a rectangular frame (465 \times 437 μ m) (37 \times 304 μ m, for the Re and Rt, respectively) of which the center was positioned on the center of the area of interest. Depending on the anteriority of the section and according to Paxinos and Watson (1998), this frame covered 29–64% of the structure area, representing over all selected sections a mean of 39 and 49% of the Re and Rt surface, respectively. This procedure allowed us to standardize our counting areas between animals, groups, and section levels, and to take into consideration the variation of the size of each nucleus along the anteroposterior (AP) axis. The same principle was applied to counting in the S1BF and VMH, except that the rectangles were 166 \times 638 μ m and 310 \times 174 μ m, respectively.

Statistical analyses. Imaging data were analyzed using a two-way ANOVA, considering Group (HC, Curran 5 d, Curran 25 d, 5 d, and 25 d) and Region (Re, Rt, S1BF, and VMH) as factors. *Post hoc* comparisons used the Newman-Kuels multiple range test. The functional connectivity between the individual brain regions was characterized by regression analysis (Spearman correlations); all analyses considered a value of $p < 0.05$ significant.

Stereotaxic surgery

For permanent fiber-optic excitotoxic lesions of the ReRt, subjects were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and secured in a stereotaxic frame (Inceptor; 300 \times 3 mm). Neurotoxic lesions targeting the ventral midline thalamus (ReRt) were made using slow microinfusions (over 5 min) of 0.12 μ l NMDA (0.1 μ l/min; Sigma), dissolved in saline phosphate buffer, via an infusion needle (0.38 mm in diameter) connected to a motorized infusion pump. After leaving the needle in situ for an additional 5 min to ensure diffusion of NMDA into the target structure, it was slowly retracted. Infusion sites were as follows (in mm): AP = -1.6 and -2.5 (from bregma), DV = -7.0 (from skull), ML = \pm 2.0 (from midline of the sagittal suture) at an ML angle of 15° and AP = -3.0, DV = -7.0, and ML = \pm 1.0 at an ML angle of 10° (Paxinos and Watson, 1998). The sham-operated controls (SHAM) were infused with saline phosphate buffer instead of NMDA at the same coordinates.

For cannula implantation, subjects were anesthetized with a ketamine (6.35 mg/kg)-xylazine (0.83 mg/kg) mixture (intraperitoneally). A stainless steel guide cannula (0.4 mm in diameter) was implanted unilaterally in the ReRt (AP = -2.3, ML = 1.7, DV = -6.2 from skull, with a rostro-lateral angle of 10°; coordinates according to Paxinos and Watson, 1998). Each guide cannula was secured to the skull by acrylic dental cement and stainless steel screws. At the end of surgery, a sterile stainless steel cannula (0.25 mm in diameter) was inserted into the guide cannula.

All rats that underwent surgery were allowed to recover under a warm lamp for 30–45 min before being placed back into their HC. They were given a 1 (cannula implanted) or 0 week (permanent lesion) rest period before the start of behavioral testing.

Spatial testing in the Morris water maze

General behavioral apparatus and procedures. The specifications of the water maze and the testing procedures have been described previously (Lopez et al., 2011). In brief, the first pretraining day consisted of one four-trial session using a visible platform (diameter: 11 cm, painted black, 1 cm above the water surface) located in the southeast quadrant of the pool, starting randomly from each of the four cardinal points of the circle

of the pool. The rats were then given four successive acquisition trials per day (intertrial interval, 10–15 s) of a maximum duration of 60 s, starting randomly from each of the four cardinal points from the edge of the pool, to learn the location of a platform (diameter, 17 cm) hidden 1 cm below the water surface in the north-west quadrant. The distance traveled before reaching the platform as well as the thigmotactic behavior were recorded and subsequently integrated by a video-tracking system (Somarr-Pan Lab). At the end of the acquisition, rats were randomly allocated to a group of a random memory group to be tested in a probe trial 5 d or 25 d later, respectively. For this probe trial, no platform was placed in the pool. The rats were released from the northeast start point and allowed a 60 s swim time to explore the pool. The nine spots in the four virtual quadrants (Target quadrant = northwest quadrant, Opposite quadrant (Opp) = southeast, Adjacent to the target quadrant = northeast (Adj. L) and southwest (Adj. R) quadrants), as well as the number of crossings in the target area (i.e., size of the platform surface enlarged by a 30 cm wide annulus) were recorded; the second parameter was used as an index of memory precision (Lopez et al., 2012). Likewise, swim speed and thigmotaxis were also recorded during the probe trial. In addition, a recent report suggests that rats with thalamic lesions, despite spending less time than controls in the target quadrant, were able to swim to the correct quadrant as rapidly as the controls (Hocoman-van der Weel et al., 2009). This result was interpreted as a PFC-associated deficit and not as reflecting positive memory impairment. Therefore, in our rats subjected to lesions, we completed our analysis of the probe trial data by considering the distance and the latency to the first entrance in the target area, as well as the time spent in the so-called “Whishaw error” path (i.e., during the first swim to the target area, the percentage time spent in an 88 cm wide path looking the release point of the rat with the former location of the platform) (Whishaw, 1985).

Specific experimental protocols

The c-Fos imaging experiment used 31 intact rats. Fifteen of them were given 6 consecutive days of acquisition with the hidden platform at a fixed location and were tested in a probe trial either at a 5 d postacquisition delay ($n_{5d} = 8$) or at a 25 d postacquisition delay ($n_{25d} = 7$), in an additional group (control rats) ($n = 11$, including six rats tested at the 5 d delay and five rats tested at the 25 d delay) were trained with a plain shower curtain drawn all around the pool to prevent any access to visual cues. After the pretraining day with a visible platform, these rats were given four successive trials per day over 6 consecutive days, in which they had to swim to a visible platform. The location of this platform was changed after each trial. This condition prevented, or at least minimized, incidental encoding of spatial information and was used as the control condition for hidden platform groups (Lopez et al., 2012). Finally, in an additional control group, rats kept in their HC ($n_{HC} = 5$) were handled regularly, including the day preceding acquisition. Three of them were killed at the same time as the rats from the recent memory group (5 d), and 2 HC rats at the same time as the rats from the remote memory group (25 d).

The permanent lesion experiment used 54 rats (22 sham-operated and 32 Bthb lesioned). Rats were trained with the hidden platform over 5 consecutive days and tested in a probe trial assessing either recent memory (5 d postacquisition delay) or remote memory (25 d delay). After elimination of the rats in which the lesion was inappropriate (see Results), the final numbers of rats included in the lesion study were as follows: 5 d delay, $n_{5d,les} = 13$; 25 d delay, $n_{25d,les} = 11$; 25 d delay, $n_{25d,sh} = 11$.

Functional reversible inactivation of the Bthb. As previously described (Lopez et al., 2012), 38 implanted rats were habituated to be handled and maintained for drug infusions over 5 consecutive days before water-maze testing. For infusions, needles were slowly inserted into the guide cannula with the tip of the needle protruding 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula. Lidocaine hydrochloride (LIDO, 20 μ g in 0.1 μ l PBS; Sigma) was infused over 60 s; the needle was then left in place for an additional 30 s before its retraction. The choice of LIDO over other possible drugs to perform cuff bodies (e.g., muscimol or 6-azauracil) to acquire a 2–3-d (but not the 5-d) in passage was based on our quite extensive experience with this drug infused in various brain areas such as the dorsal

and ventral hippocampus and mPFC (Pereira de Vasconcelos et al., 2006; Klur et al., 2009; Lopez et al., 2012; Loureiro et al., 2012). In these experiments, using the 2-deoxyglucose method to map cerebral glucose metabolism and behavioral evaluations in parallel, we showed that the LIDO diffusion area was mostly confined around the cannula site without any major changes in surrounding or in some distant brain structures (Pereira de Vasconcelos et al., 2006; Lopez et al., 2012). In addition, the use of a drug that does not target a specific neurotransmitter system appeared most appropriate to us, because an imbalance between inhibition/excitation in some thalamic nuclei might have side effects other than only inhibition including triggering seizures (Steriade, 2000).

Thus, in the present study, after drug-free training over 8 consecutive days, rats received an intra-Bthb infusion of either LIDO ($n_{LIDO} = 30$) or PBS as a control (same volume, $n_{PBS} = 20$). Rats were returned to their HC until the start of the probe trial (5 min later). The total number of rats, after elimination of rats in which histological examinations showed evidence of cannula misplacement (seven rats were discarded) was as follows: 5 d delay, $n_{5d,les} = 13$, $n_{5d,sh} = 13$; 25 d delay, $n_{25d,les} = 12$, $n_{25d,sh} = 14$.

Additional behavioral tests

One week after water-maze testing, rats with permanent excitotoxic lesions of the Bthb were subjected to additional behavioral tests to assess potential side effects of the lesions that could bias performance in the Morris water-maze task. Thus, these tests aimed at ruling out any non-memorial effects of the thalamic lesions on water-maze performance. All rats were first subjected to an evaluation of locomotor activity over 24 h in their HC. Then, half of the rats were tested in a plus-maze test and the other half in an open field.

Baseline locomotor activity. As previously described (Lacour et al., 2010), locomotor activity was recorded over 24 h. Thus, rats ($n_{24h} = 22$, $n_{24h} = 25$) were brought with their HC in an unfamiliar experimental room. Each cage (eight cages per shift, 2 \times 4 shelves in the room) was traversed by two infrared light beams perpendicular to its width, each 4.5 cm above floor level and 24 cm apart along the length of the cage. The number of longitudinal cage crossings (superover beam interruptions) was monitored continuously by a computer, saved in 10 min intervals, and subsequently analyzed in 1 h bins. A cage crossing was scored each time a rat interrupted the two light beams consecutively (and thus went from one extremity of the cage to the other).

Activity during time elevated plus-maze. As previously described (Lacour et al., 2010; Loureiro et al., 2012), the elevated plus-maze was made of black Plexiglas and consisted of four arms (50 cm long \times 10 cm wide) fixed to a central platform (10 \times 10 cm) two with 40 cm high walls (closed arms) and two with 1.5 cm high borders (open arms). Light intensities were made to have the same intensity on both open arms (i.e., 10 lux). For testing, rats ($n_{24h} = 11$, $n_{24h} = 11$) were placed individually in the center of the maze, their head facing a closed arm (the same for all rats). The movements of the rats were followed by a computer-based video camera fixed on the ceiling 180 cm above the floor level. The measures were taken over 5 min. An entry in a given arm was counted when the rat had all four paws in the arm. The total number of entries as well as the total time spent in open versus closed arms were recorded and analyzed.

Open-field test. Rats ($n_{24h} = 11$, $n_{24h} = 11$) were tested over a 10 min free exploration period in an open field. The device consisted of a wooden square arena with 15.5 cm high walls and a 60 \times 60 cm floor divided into 25 equal squares (Loureiro et al., 2012). The number of squares crossed and the number of crossings were recorded by an experimenter blind to the treatment condition.

Histology and NADPH-d histochemistry for verification of permanent lesion placement/cannula placement of infusion devices, and intrapancreatic LIDO diffusion

Endothelium and brain processing. All rats were killed and perfused as for c-Fos immunohistochemistry. Their brains were snap frozen in isopentane at -50°C , and kept at -80°C until sectioning (50 μ m thick for brain and reversible inactivating experiments) using a cryostat (Reichert-Jung, Jung, Wieslab 3800 Reichert).

Cresyl violet staining. Sections from the region including the ventral midline thalamus were stained with cresyl violet for verification of per-

invariant lesion placements and extent or for identification of guide cannula placements and their infusion site locations.

NeuN immunostaining. To complete the histological characterization of the BARI lesions, a labeling of the NeuN protein was performed on every other section, and the remaining ones were stained with cresyl violet. The protocol was similar to the one used for *c-Fos* immunohistochemistry using a mouse NeuN antibody (1:2000, ref. MAB377; Millipore) as primary antibody, and a biotinylated anti-mouse horse antibody (1:500; Vector Laboratories) as secondary antibody.

Evans blue infusion. As previously described (Lourdes et al., 2012), the area of diffusion of LIDO was calculated in all rats implanted with a cannula. To this end, an indirect method used the intraperitoneal infusion of an Evans blue-containing LIDO solution 15 min before euthanasia. Briefly, Evans blue powder (Merck) was incorporated into a solution of 20 $\mu\text{g}/0.1 \mu\text{l}$ of LIDO to obtain a final dye dilution of 0.5%. Rats received the mixture of LIDO + Evans blue in the ReRh using the same volume and rate of diffusion as for the behavioral experiments (i.e., 0.3 μl over 60 s plus needle in place 30 s before slow removal). Evans blue produces a red color when excited at 325 nm under a fluorescence microscope, allowing the detection of the dye and its spread around the infusion site (see Fig. 7c) (Lourdes et al., 2012).

Statistical analyses for behavioral tests

For the *c-Fos* experiment, water-maze training performances were evaluated using a two-way ANOVA with Delay (5 d, 25 d) as the between-subject factor and Day (1, 2, ..., 5) as the repeated measure. Probe trial performances were analyzed using a one-way ANOVA considering the Delay (5 d, 25 d) as the factor. We also performed Spearman correlation comparisons between *c-Fos* expression in the different brain areas and the time spent in the target quadrant during the probe trial.

For the experiments using permanent lesion or reversible functional inactivation of the ReRh, water-maze training performances were evaluated using a three-way ANOVA with Group (Lesion or Sham or PBS vs LIDO or de-administered, depending on the experiment), Delay (5 d, 25 d) as the between-subject factors, and Day (1, 2, ..., 8) as the repeated measure. Probe trial performances were analyzed using a two-way ANOVA with Group and Delay as factors. For the lesion experiment, we also analyzed the data of the pretraining day in the Morris water-maze with a visible platform. To this end, we used a three-way ANOVA with Group (Lesion, Sham) and Delay (5 d, 25 d) as the between-subject factors and Trial (1, 2, 3, 4) as the repeated measure. Open-field and plus-maze data were analyzed using a one-way ANOVA considering Group (Lesion, Sham) as the factor. HC locomotor activity over 24 h was analyzed using a two-way ANOVA with Group (Lesion, Sham) as the between-subject factor and Hour (1, 2, ..., 24) as the repeated measure.

Finally, for all water-maze experiments, probe trial performance analyses were computed by one-sample Student's *t* test to compare the average time spent in the target quadrant in each group to chance level (i.e., 15 s in the target quadrant). For all behavioral experiments, when required, post hoc comparisons were done using the Newman–Keuls multiple comparison test. All analyses considered a value of $p < 0.05$ significant.

Results

Ventral midline thalamus (ReRh) activation coincides with the retrieval of a remote spatial memory, but not with that of a recent one

To evidence a possible role of the ventral midline thalamus in spatial memory, we first assessed expression of the activity-regulated gene *c-Fos* 90 min after the completion of a probe trial in a water-maze task. Indeed, the expression of this immediate early gene is correlated with the level of neuronal activity and can be used to track changes in the organization of memories at different times after learning (Frankland et al., 2004; Mayavi et al., 2004; Teixeira et al., 2006). Therefore, we first used *c-Fos* immunohistochemistry to evaluate whether the Re and Rh were activated during retrieval of a recent versus remote spatial memory. Rats were trained to find a hidden platform at a fixed location in the pool and memory was assessed in probe trials either 5 d (re-

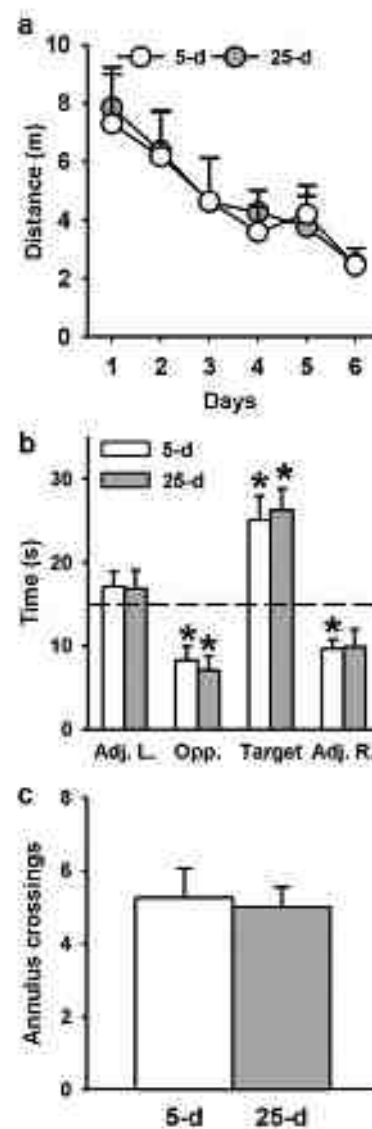


Figure 1. Spatial memory performance during acquisition and probe trial in the water-maze task with a hidden platform. *a*, Average distance (\pm SEM) to reach the platform during water-maze training in rats subsequently tested for recent (5 d, $n = 11$) or remote (25 d, $n = 7$) memory retrieval. All rats were subjected to four daily trials over 6 consecutive days. There were no significant differences between the two delay groups. *b*, *c*, Mean performance (\pm SEM) during probe trials performed 5 d (recent memory) or 25 d (remote memory) after the end of training. Probe trial performance is expressed as the time (in seconds) spent in the four virtual quadrants of the pool (0) and the number (\pm SEM) of crossings over the target annulus. The dotted line is chance level (chance level, 50 trials). *Significantly different from chance (i.e., 15 s), $p < 0.05$. All rats remembered the platform location and concentrated their searches in the target quadrant where the platform was located during task acquisition. *d*, *e*, Spatially-athetic delay 25 d, 25 d postacquisition delay. Adj. L., quadrant at the left of the target quadrant; Opp., quadrant opposite to the target quadrant; Adj. R., quadrant at the right of the target quadrant; Target, quadrant where the platform was located during training.

cent memory) or 25 d (remote memory) later. Over the 6 consecutive days of training in the water-maze, the distance to reach the platform decreased progressively over days ($F_{(5,44)} = 16.33$, $p < 0.0001$; Fig. 1*a*), as well as the time spent swimming near the wall

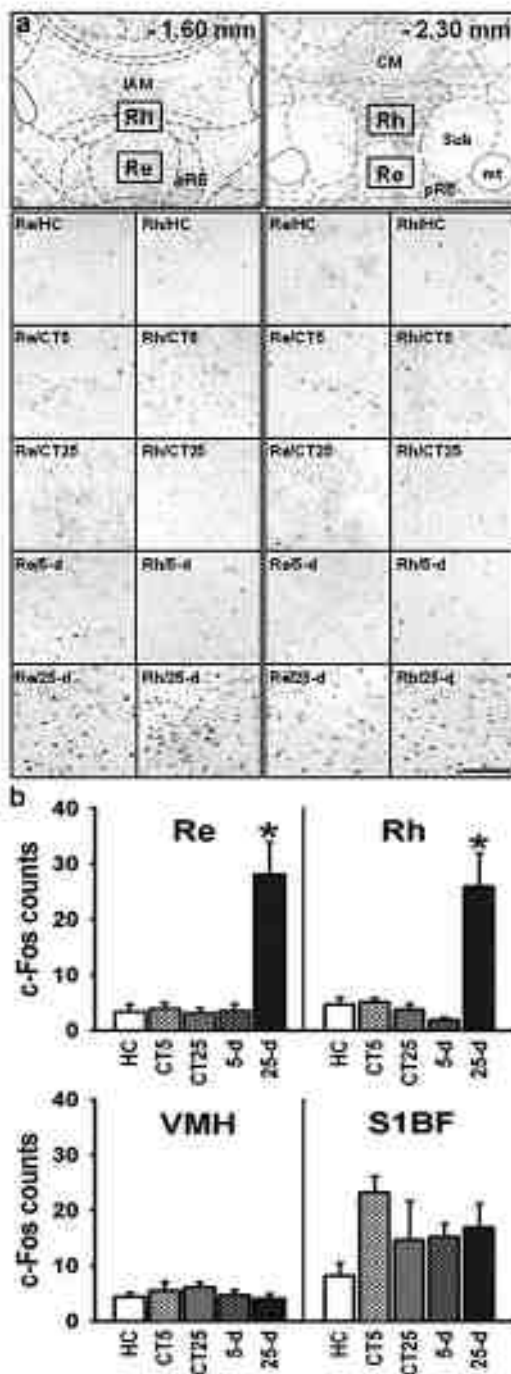


Figure 2. a, Coronal sections through the vertical midline (dashed) and schematic delineation of several nuclei (dotted) found in Paxinos and Watson (1998) at two AP levels (top). Typical examples of c-Fos expression patterns in the Re and Rh are shown in the photographs (bottom); their location corresponding to the rectangular strain in the box for the two control conditions: HC ($n_{Re} = 3, n_{Rh} = 6$), CT5 ($n_{Re} = 2, n_{Rh} = 3$) and at the two probe delays: 5 d (5 d) for rats trained with the hidden platform in the water maze ($n_{Re} = 8, n_{Rh} = 7$). CM, cerebral cortex; thal, thalamus; CT, cingulate; HC, home cage; IAM, interpeduncular nucleus; nAcc, nucleus accumbens; pIR, posterior insular; Re, rears nucleus; Rh, rhomboid nucleus; S1BF, subgranular layer of the primary somatosensory cortex; 5-d, 5-day postacquisition delay; 25-d, 25-day postacquisition delay. b, Quantification of c-Fos-positive neurons in the two nuclei (midline thalamic nuclei) (Re

(rhombus) ($F_{(1,15)} = 12.06, p < 0.0001$, data not shown), reflecting significant learning of the platform's location. There was no significant difference in the distance swam to the platform between recent and remote delay groups and no significant Day \times Delay interaction ($F_{(1,15)} = 0.07; F_{(1,15)} = 0.21$, respectively; ns for both). This training schedule produced a stable and long-lasting spatial memory: rats showed a strong bias for the area of the pool where the platform was previously located during training in both recent and remote memory tests. We quantified this spatial bias by measuring the time spent in each of the four quadrants (Fig. 1b). The ANOVA showed no significant Group effects (whatever the quadrant [Adj. $R^2_{(1,15)} = 0.01$], Opp., $F_{(1,15)} = 0.67$; Target quadrant, $F_{(1,15)} = 0.08$; Adj. $R^2_{(1,15)} = 0.01$). The time spent in the target quadrant was significantly above chance level at both delays ($p < 0.05$ vs chance level), indicating that rats spent more time in the target quadrant, as compared to the three other quadrants, and thus showing a good recall of the platform's location. The time spent in the southeast quadrant (Opp.) in both delay groups as well as the time spent in the quadrant right to the target quadrant (Adj. $R^2_{(1,15)}$) in the 5-d delay group were significantly below chance level. Analysis of the number of annulus crossings, an index of memory precision, also showed no significant difference between the two delay groups ($F_{(1,15)} = 0.06$; ns) (Fig. 1c). Swim speed and thigmotaxis during the probe trial were not significantly different between groups tested at each delay ($F_{(1,15)} = 0.78$ for swim speed; $F_{(1,15)} = 0.12$ for thigmotaxis) (ns for both) (data not shown). Thus, these behavioral data pointed to an absence of difference between the 5 and 25 d delay during both acquisition and retention of platform location.

Although performance was similar in the recent and remote memory tests, we found that c-Fos expression in the Re and Rh thalamic nuclei was significantly higher after the remote probe trial than after the recent one (Fig. 2). The Group \times Region ANOVA showed significant Group ($F_{(1,15)} = 19.24, p < 0.0001$) and Region ($F_{(1,15)} = 16.27, p < 0.0001$) effects, and a significant interaction between the two factors ($F_{(1,15)} = 5.10, p < 0.0001$). The Group effect was due to a much higher number of c-Fos-positive neurons in the 25 d group as compared to the four other groups (HC, Curtain 5 d, Curtain 25 d, and 5 d). The Region effect can be explained by a much higher overall number of c-Fos-positive neurons in the S1BF than in any of the three other regions ($p < 0.0005$ for all) and a lower number of c-Fos-positive neurons in the VMH as compared to Rh ($p < 0.05$) and Re ($p = 0.038$) as revealed by the Newman–Keuls multiple range test. The significant interaction between Group and Region was due to a higher number of c-Fos-positive neurons in the Re, Rh, and S1BF at the 25 d delay, but also in S1BF of the Curtain 5 d group, as compared to all other groups, whatever the region (S Newman–Keuls test; $p < 0.05$ for all comparisons). Most interestingly, the only significant interdelay difference was observed in the Re and Rh: the number of c-Fos-positive neurons was much higher at the 25 d than at the 5 d delay (Newman–Keuls test; $p < 0.0005$; Fig. 2b). Regression analyses among c-Fos expression values at the different structures showed no significant

and Rh) and in two other nucleus, the VMH and the primary somatosensory cortex (S1BF), under different control conditions (HC, CT5, and CT25) and after recent (5 d) or remote (25 d) memory retrieval in the rats trained with a hidden platform. Data are shown as the mean \pm SEM (abscissa) ($p < 0.05$ versus all other groups, * marked increase in c-Fos expression was observed only in the Re and Rh after retrieval of a remote spatial memory in the rats trained with the hidden platform as compared to all other groups (HC, CT at both delays, and remote memory). No such increase occurred in the two control structures, i.e., the VMH and S1BF.

correlation, except between Re and Rh ($r = 0.95$, $p < 0.01$). We found no significant correlation between *c-Fos* expression in Re and Rh and behavioral performance during the probe test, whatever the delay ($p > 0.1$ in all cases *ns*). Altogether, these results indicate an implication of the ventral midline thalamus in the processing of memory but not recent spatial memory.

ReRh lesion disrupted expression of a remote spatial memory placement and extent of the lesion

Serial sections throughout the thalamus were stained with NeuN to visualize the lesion placement and extent. Lesions were drawn using the relevant plates of the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1998) and replicated on electronic copies of the atlas so that auto-mated pixel counts of the thalamic nuclei in the target regions could be used to estimate lesion extent. Acceptable lesions were defined as having $>50\%$ damage to the Re area and $>25\%$ damage to the perigeniculate (pRe) and Rh, but no more than 10% damage to the adjacent thalamic region. According to Grottenoweg and Witter (2004), the main mass of the Re is bordered by the so-called pRe. As for the Re, the pRe has connections with limbic structures, particularly the mPFC (Hoover and Verres, 2012). Figure 3a shows the largest and smallest ReRh lesions observed in the rats that were included in the behavioral analyses. Seven ReRh rats (three from the 5 d group, four from the 25 d group) had insufficient damage to the Re area ($<50\%$) and were discarded from the analyses. Final sample sizes were as follows: 5 d group, $n_{\text{ReRh}} = 13$, $n_{\text{Sham}} = 11$; 25 d group, $n_{\text{ReRh}} = 12$, $n_{\text{Sham}} = 11$. No significant differences in the extent of the ReRh lesion were found between the 5 and 25 d delay groups ($F_{(1,22)} = 2.28$ for Re; $F_{(1,22)} = 2.41$ for Rh; *ns* for both). In the selected 13 ReRh rats of the 5 d delay group, there was a median of 69.68% damage to the Re (range, 52.25–89.58%), 37.7% to the left pRe (range, 31.46–45.29%), 42.2% to the right pRe (range, 29.8–57.56%), and 34.53% damage to the Rh region (range, 25.12–43.94%). In the selected 12 ReRh rats of the 25 d delay group, there was a median of 68.55% damage to the Re (range, 60.19–82.5%), 39.32% to the left pRe (range, 28.28–54.66%), 38.81% to the right pRe (range, 29.80–57.65%), and 35.03% damage to the Rh (range, 27.86–47.67%). Damage to thalamic structures other than ReRh, including midline nuclei, was generally minimal to modest. The median damage was always $<5.0\%$ in both groups for each of the following regions: submedian nucleus, centromedian nucleus, interanteromedial thalamic nucleus, and mediodorsal nucleus (with a maximum value of 9.36 and 9.98% for the submedian nucleus in the 5 d and 25 d delay groups, respectively). So, our lesions were highly specific to the ReRh region, with minimal damage to other adjacent thalamic nuclei and produced through the AP extent, about two-thirds

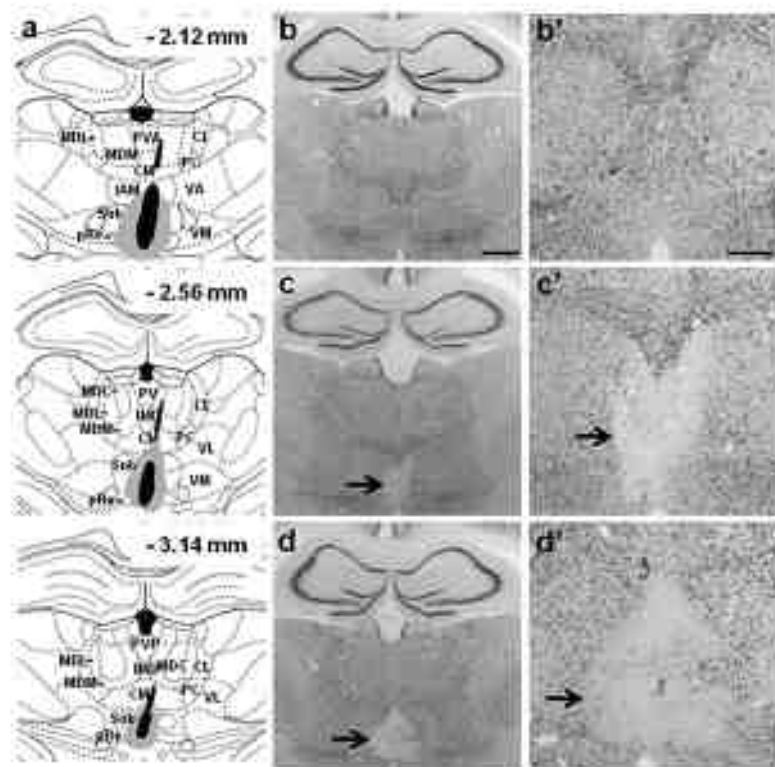


Figure 3. Evaluation of the placement and extent of ReRh lesions. *a*, Histologic representation of the analysis (black ink) including the visible part of the coronal nuclei and larger (gray) extent of the ventral midline thalamic nuclei (Re and Rh) in the rats tested before the probe test (5 d) or before memory (25 d) remote memory after the delay of acquisition (Fig. 4, behavioral data). The numbers indicate the distance in millimeters from bregma according to Paxinos and Watson (1998). CL, centrolateral thalamic nucleus; CM, central medial thalamic nucleus; PAM, anteromedial thalamic nucleus; PVN, paraventricular thalamic nucleus; PVA, paraventricular thalamic nucleus; PV, paraventricular thalamic nucleus; PVL, paraventricular thalamic nucleus; PVP, paraventricular thalamic nucleus; Sst, submedian thalamic nucleus; SM, medial septal thalamic nucleus; VL, ventrolateral thalamic nucleus; VM, ventromedial thalamic nucleus. *b–d*, Photomicrographs showing typical examples of each intracerebral brain section, from a rat of the Sham group (*b*), from a rat showing a small ReRh lesion (*c*), and from a rat with a large ReRh lesion (*d*). Scale bar, 1 mm. Photomicrographs (*b'–d'*) represent a large magnification of the regions including the ReRh nuclei as shown in *b–d*, respectively. Scale bar, 500 μ m. Black areas correspond to the ink. The quantitative level of ReRh lesion is described in the Results section with respect to damage to surrounding thalamic nuclei.

and one-third damage of Re and Rh nucleus, respectively. Moreover, incidental (unilateral) damage—one cannula lowered at an angle—to overlying areas of the ILN and mediodorsal thalamic nuclei, hippocampus, and cortex was also very limited. Therefore, the significant spatial memory impairment in the lesioned rats could be attributed to damage restricted to the ReRh (Fig. 3a–d).

ReRh lesion disrupted remote spatial memory performance

To further investigate the role of the ventral midline thalamus in spatial memory processing, we next tested whether a pre-acquisition excitotoxic lesion of the ReRh disrupted the formation and/or expression of a spatial memory. In this experiment, lesioned rats were trained over 8 consecutive days to locate a hidden platform, and then tested in a probe trial either 5 d or 25 d later. Because a ReRh lesion might impact some non-mnemonic aspects of the water-maze task, we first analyzed the performance during the habituation phase (pretraining day), which consisted of four consecutive trials with a visible platform. The distance to

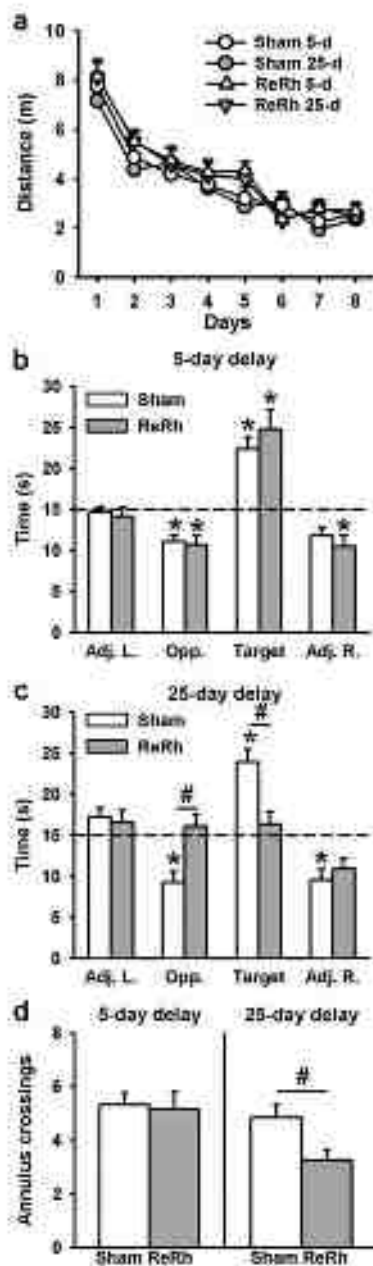


Figure 4. Effects of a pre-acquisition ReRh lesion on spatial memory performance during acquisition and retrieval in the hidden version of the water-maze task. **a**, Average distance ($n = 50$) to reach the platform during water-maze acquisition in the rats who were tested for recent (5 d) or remote (25 d) memory in Sham and ReRh groups. Rats were subjected to four daily training trials per consecutive days. There were no significant differences between the four groups. **b–d**, Mean performance ($n = 50$) during recent and remote memory probe trials, expressed as the time (in seconds) spent in the four arena quadrants of the pool, **c**, and the number ($n = 50$) of crossings over the target area (**d**) at the 5 day (left) and 25 day (right) postacquisition delay. The dashed line represents chance level ($n = 3$ s; Statistics: $p < 0.05$, versus Sham; significantly different from chance, $p < 0.05$, than intervention of the platform location and concentrated their searches in the target quadrant where the platform was located over training. In contrast, ReRh lesion rats, both at the 5 day delay, even though they kept exploring the pool, the number of crossings at 5 day delay ($n_{\text{Sham}} = 5.5$, $n_{\text{ReRh}} = 11$; 25 day delay, $n_{\text{Sham}} = 5.0$, $n_{\text{ReRh}} = 3.5$) at postacquisition delay. 25 d, 25 d postacquisition delay; Adj. L., quadrant at the left of the target quadrant; Opp., quadrant opposite to the

target quadrant; Adj. R., quadrant at the right of the target quadrant; Target, quadrant where the platform was located during training.

much the visible platform decreased progressively showing a significant effect of Trial ($F_{(7,201)} = 62.30$, $p < 0.0001$). No effects of the Group (Lesion, Sham) or of the Delay (5 d, 25 d) were observed (Group: $F_{(1,42)} = 1.64$; Delay: $F_{(1,42)} = 0.27$) (ns for both) (data not shown). Thus, this cue, used to reflect the occurrence of any gross sensorimotor and/or motivation deficiencies, showed no effect of the ReRh lesion, as previously shown (Dolleman-van der Weel et al., 2009). During training, the distance to reach the platform progressively declined over days ($F_{(7,201)} = 62.50$, $p < 0.0001$) showing progressive learning of the hidden platform location (Fig. 4a). The statistical analysis of the distance traveled by each rat during the acquisition phase also revealed no effect of the Group (Lesion, Sham), the Delay (5 d, 25 d), or the Group \times Delay interaction (Group: $F_{(1,42)} = 1.64$; Delay: $F_{(1,42)} = 0.27$; interaction: $F_{(1,42)} = 0.45$; ns for all). All rats showed a decrease in thigmotactic behavior over days ($F_{(7,201)} = 37.58$, $p < 0.0001$), with no effect of Group or Delay ($F_{(1,42)} = 1.87$ and $F_{(1,42)} = 0.066$, respectively; ns). Thus, a ReRh lesion had no impact on the acquisition of the platform location in the water maze. According to the probe trial performance, for the time spent in the target quadrant (Fig. 4b), there was no significant effect of the Group ($F_{(1,42)} = 1.94$; ns), of the Delay ($F_{(1,42)} = 2.34$; ns), but we found a significant interaction between Delay and Group ($F_{(1,42)} = 7.04$; $p < 0.05$). The interaction effect was due to a significant difference between the two groups (Sham vs Lesion) at the 25 d delay ($p < 0.05$) as revealed by the Newman–Keuls multiple range test. Indeed, at the 25 d delay, rats with a ReRh lesion did not remember the platform location ($p > 0.1$ vs chance level) whereas Sham rats did ($p < 0.001$ vs chance level) (Figs. 4b, 5d). On the opposite, for recent memory, both groups (Sham, Lesion) showed a strong bias for the area of the pool where the platform was previously located during training as shown by the time spent in the Target quadrant ($p < 0.001$ vs chance level for both groups) (Figs. 4b, 5c). The statistical analyses for the three other quadrants showed for the Adj. L. quadrant, a significant effect of the Delay ($F_{(1,42)} = 3.34$, $p < 0.05$), no effect of the Group ($F_{(1,42)} = 0.3$; ns), and no interaction between Delay and Group ($F_{(1,42)} = 0.003$; ns) for the Adj. R. quadrant, no significant effect of the Group, Delay, or interaction between the two factors ($F_{(1,42)} = 0.00$, $F_{(1,42)} = 0.49$, and $F_{(1,42)} = 1.14$, respectively; ns) and for the Opposite quadrant, no significant effect of the Delay ($F_{(1,42)} = 2.14$; ns), but a significant Group effect ($F_{(1,42)} = 6.84$, $p < 0.05$) and a significant Group \times Delay interaction ($F_{(1,42)} = 8.85$, $p < 0.05$). The Group and interaction effects in the Opposite quadrant (southern quadrant) were due to the fact that in the ReRh group at the 25 d delay, performance was not different from chance level (ns). Analysis of the number of annulus crossings confirmed the performance deficits in the ReRh group at the 25 d delay (Fig. 4c). Indeed, the number of crossings showed a significant effect of Delay ($F_{(1,42)} = 6.74$, $p < 0.05$) but no significant effect of the Group or of the interaction between Group and Delay ($F_{(1,42)} = 3.18$, $F_{(1,42)} = 5.89$; ns for both, respectively). The analysis of the percentage of time spent by the rats inside the corridor corresponding to the Whishaw error before the first target area entrance (Fig. 5e) showed a significant effect of the Group ($F_{(1,42)} = 4.23$, $p < 0.05$), no significant effect of the Delay ($F_{(1,42)} = 1.32$; ns), and a significant interaction between Group and Delay ($F_{(1,42)} = 4.60$, $p < 0.05$). These differences were due to a significantly longer time spent by the 25 d delay group in the corridor of the

target quadrant; Adj. R., quadrant at the right of the target quadrant; Target, quadrant where the platform was located during training.

within error ($p < 0.05$). The statistical analysis of the distance traveled for the first target area entrance (Fig. 5b) showed a significant effect of the Group ($F_{(1,41)} = 4.64$, $p < 0.05$), of the Delay ($F_{(1,41)} = 5.29$, $p < 0.05$), and a significant interaction between the two factors ($F_{(1,41)} = 4.76$, $p < 0.05$). The Newman–Kuels *post hoc* comparisons revealed that these differences were due to a significantly larger distance traveled in the 25 d delay group for the first target area entrance ($p < 0.05$). Concerning the latency to the first target area entrance (Fig. 5c), there were no significant Group, Delay, or a significant interaction between the two factors ($F_{(1,41)} = 0.63$; ns; $F_{(1,41)} = 0.72$; ns; $F_{(1,41)} = 1.66$, ns, respectively). Finally, swim speed and thigmotaxis during the probe trial were not significantly different between groups ($F_{(1,41)} = 0.65$ for swim speed; $F_{(1,41)} = 0.73$ for thigmotaxis; ns for both) and delays ($F_{(1,41)} = 0.55$ for swim speed; $F_{(1,41)} = 0.01$ for thigmotaxis; ns for both), and the Group \times Delay interaction was not significant ($F_{(1,41)} = 0.43$ for swim speed; $F_{(1,41)} = 0.19$ for thigmotaxis; ns for both; data not shown) (Fig. 5d, illustration of swim paths showing no evident thigmotactic behavior in ReRh lesioned 25 d delay group). These data suggest no influence on water-maze performance of non-mnemonic factors such as gross sensorimotor, motivational, or anxiety alterations. Thus, all of these behavioral data might point to a specific effect of the ReRh lesions on remote memory, with no effect of such lesions on task acquisition or retrieval of recent memory.

Effects of a ReRh lesion on spatial memory formation were not related to any alteration in anxiety level or locomotor activity

To confirm that the ReRh lesion had no impact on some non-mnemonic effect that could explain the deficits observed at the 25 d delay in the lesioned group, we used more specific and thus more direct behavioral tests targeting anxiety and locomotor activity levels. Thus, in an elevated plus maze, ReRh-lesioned rats did not show any alteration in anxiety-related behavior, as compared to Sham rats. Indeed, no difference between these two groups could be evidenced in the number of entries in open arms and closed arms ($F_{(1,22)} = 1.80$; $F_{(1,22)} = 0.64$, respectively; ns), as well as in the time spent in open arms and closed arms ($F_{(1,22)} = 3.40$; $F_{(1,22)} = 0.55$, respectively; ns) (Fig. 6a). Likewise, in the plus maze, locomotor activity, estimated by the total number of arm entries, showed no significant difference between Sham and Lesion rats ($F_{(1,22)} = 0.078$, ns; data not shown). Moreover, in an open-field arena, the number of square crossings and rearings showed no significant effect of the Group (Lesion, Sham) (square crossings: $F_{(1,22)} = 0.55$; rearings: $F_{(1,22)} = 0.54$; ns for both) (Fig. 6b). Finally, locomotor activity assessed in IIC over 24 h, also showed no significant effects of the Group ($F_{(1,47)} = 0.007$; ns), a significant effect of Hour ($F_{(23,407)} = 12.86$, $p < 0.001$),

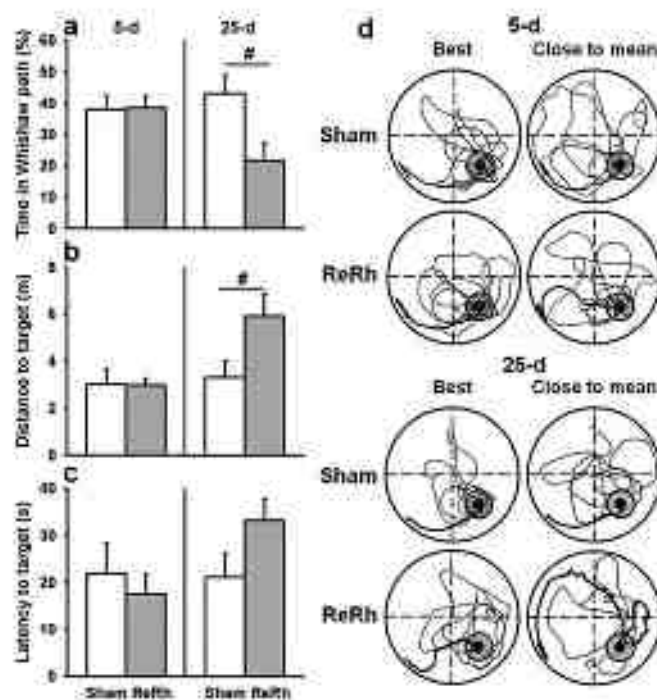


Figure 5. Effects of a pre-acquisition ReRh lesion on spatial memory in the hidden version of the water-maze task. *a–c*, Analysis of the path initially traced by the rat during the probe trial at the 5 d (left) and 25 d (right) post-acquisition delay. *a*, Time in the whisker zone (path close to the platform) as a percentage (line) of the distance traveled by the rat before crossing (width) from the start point to the frame location of the platform before its first entry in the large area. *b*, Average distance (\pm SEM) for the first entry to the target area. *c*, Latency to the first target area crossing. $p < 0.05$. *d*, Examples of detailed swim paths during each probe trial from a rat showing the best performance, i.e., highest percentage of time spent in the large quadrant (left) and from a rat showing performance close to the mean (right) for each group at each delay (5 d, remote memory; 25 d, recent memory). Paths kindly taken by us are it would note that, except for the 25 d delay ReRh lesion 'close to mean' group, all swim paths showed that rats were spending significantly more time in the large quadrant versus the three other ones and thus, in the center of the platform location.

but no significant interaction between the two factors ($F_{(23,407)} = 0.35$; ns). Hour effect was due to an increased activity during the nocturnal period in both groups (Fig. 6c). These latter data showing no effects of the ReRh lesion on locomotor activity are in accordance with Prasad et al. (2012).

Reversible inactivation of the ReRh had no impact on retrieval of a recent or remote spatial memory in rats having acquired the task with an intact thalamus

During the probe trial performed at the 25 d delay, we found memory deficits in the rats subjected to ReRh lesions. These deficits could be the consequence of alterations of long-term consolidation and/or of retrieval of remote memory. Therefore, we next asked whether functional reversible inactivation during the probe trial would impair performance in rats having learned the location of a hidden platform without any prior treatment. To this end, we infused LIDO or PBS (control) 15 min before the probe trial, which occurred either 5 d or 25 d after the end of acquisition. For indications on cannula placement and drug diffusion, see Figure 7. Our behavioral data showed that during acquisition, the four groups improved over days (Fig. 8a; $F_{(7,22)} = 55.98$, $p < 0.0001$) and no significant between-Group and Delay differences in the distance to reach the platform were observed (Group: $F_{(3,27)} = 1.89$; Delay: $F_{(1,27)} = 0.00$; ns for both); there was no Delay \times Group \times Day interaction ($F_{(7,220)} = 0.65$; ns). Thigmot-

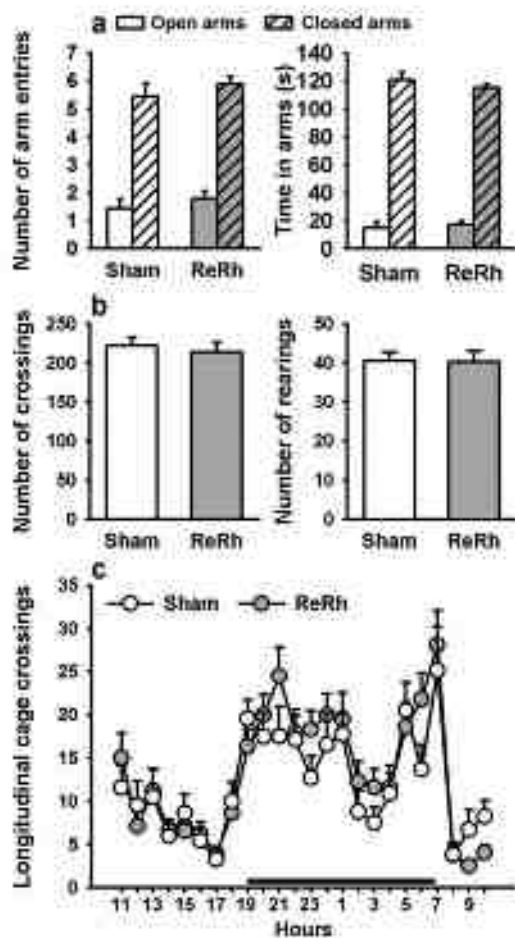


Figure 6. Effects of a beta lesion on anxiety and exploratory activity. *a*, In the plus maze, the total number of open- and closed-arm entries (left), as well as the total time spent in open- and closed arms (right) did not differ among the two groups. Thus, the thalamic lesion did not affect anxiety-related behavior ($n_{\text{open}} = 11$, $n_{\text{closed}} = 12$). *b*, In the open-field test, the beta lesion did not affect locomotor activity (number of square crossings, left) or number of rearings (right) ($n_{\text{cross}} = 11$, $n_{\text{rear}} = 10$). *c*, HC locomotor activity over a 24 h period did not differ due to deafferentation effects on the total number of longitudinal cage crossings during both the light and dark periods. For each hour (asterisks above the axis) indicates the duration of the dark period ($n_{\text{dark}} = 2$), $n_{\text{light}} = 25$.

active behavior decreased in all rats over days ($F_{(27,315)} = 53.28$, $p < 0.0001$), with no effect of the Group or Delay ($F_{(1,47)} = 0.34$, $F_{(1,47)} = 0.55$, respectively; ns) (data not shown). According to the probe trial performance, for the time spent in the target quadrant (Fig. 8*b*), there was no significant effect of Group ($F_{(1,47)} = 0.03$; ns). We found a significant effect of Delay ($F_{(1,47)} = 6.65$, $p < 0.05$) but no interaction between Delay and Group ($F_{(1,47)} = 0.03$; ns). The Delay effect was due to a significant decrease in performance at the 25 d delay in both LIDO and PWS rats as compared to the 5 d delay ($p < 0.05$). At both delays and for both groups, however, performances were significantly above chance level ($p < 0.05$ for all), and the significant bias for the area of the pool where the platform was previously located during training attended for memory of the platform location in all treatment groups. The statistical analyses of the three other quadrants showed the following: for the Adj. R. quadrant, a significant effect of the Delay ($F_{(1,47)} = 4.73$, $p < 0.05$) but no effect

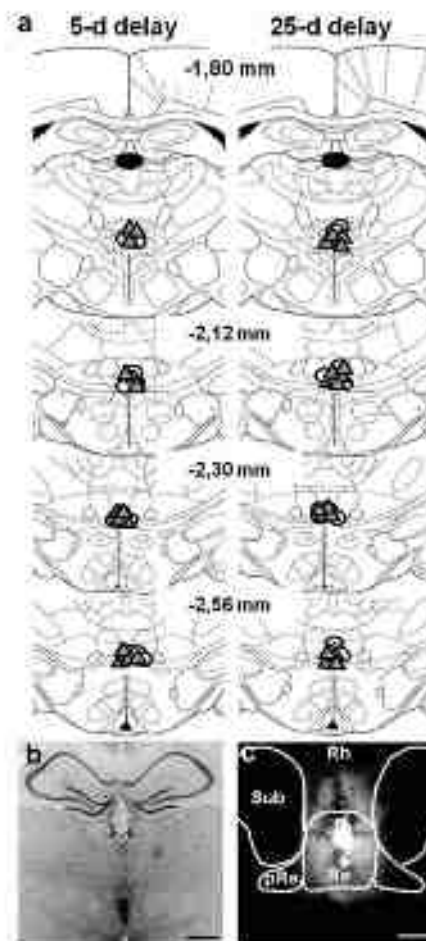


Figure 7. *a*, Schematic representation of the infusion sites on coronal sections through the midline thalamus in rats subjected to PBS or LIDO infusion before the probe trial. Behavioral performance is shown in Figure 8. Coordinates are given in millimeters from bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each injection site is represented by open circles (PBS) or gray circles (LIDO), the asterisks indicate the approximate location of the tip of the injection needle. *b*, Photomicrograph showing a representative injection site on a brain section stained with cresyl violet. Scale bar, 1 mm. *c*, Fluorescence micrograph showing the injection of a LIDO solution containing 0.5% of the dye into the betaH. Scale bar, 500 μm . The rhombus area appears in red under a fluorescence microscope (excitation 355 nm). Dashed lines indicate the limits of the nucleus reticularis (Ret), subthalamic nucleus (Sub), and anterior nucleus (Ant). Rh, mammillary nucleus.

of the Group ($F_{(1,47)} = 0.19$; ns) and no Group \times Delay interaction ($F_{(1,47)} = 1.10$; ns); for the Adj. R. quadrant, no significant effect of the Treatment, Delay, or the interaction between the two factors ($F_{(1,47)} = 0.52$, $F_{(1,47)} = 1.20$, $F_{(1,47)} = 1.20$, respectively; ns); for the Opposite quadrant, no significant effect of the Delay ($F_{(1,47)} = 3.22$; ns), Group ($F_{(1,47)} = 0.73$, $p < 0.1$; ns), or the Group \times Delay interaction ($F_{(1,47)} = 0.56$, $p < 0.1$; ns). The significant preference for the target quadrant was confirmed by the analysis of the number of animal crossings, which showed a significant effect of the Delay ($F_{(1,47)} = 11.52$, $p < 0.05$) but no significant Group effect ($F_{(1,47)} = 2.04$; ns) and no interaction between Delay and Group ($F_{(1,47)} = 0.53$; ns) (Fig. 8*c*). As for the time spent in the target quadrant, the delay effect was due to a decrease in performance for both LIDO and PWS rats at the 25 d delay, as compared to the performance found at

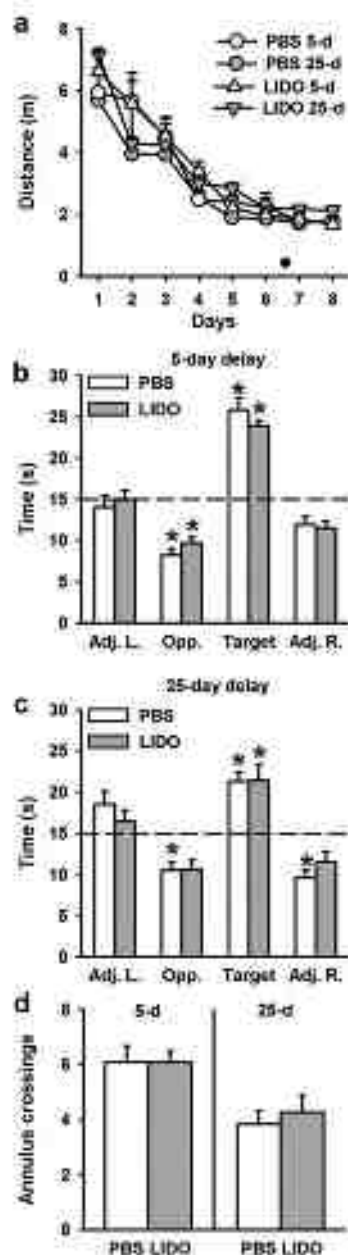


Figure 8. Effects of ReRh reversible LIDO inactivation on spatial memory in the heated version of the water-maze task. *a*, Day 1–8 acquisition expressed as average distance to reach the platform (\pm SEM) in the rats that were subsequently tested for recent (5 d) or remote (25 d) memory after bilateral LIDO or vehicle (PBS) injection into the ReRh. All rats were subjected to four daily trials over 8 consecutive days. There were no significant differences among the four groups. *b–d*, Mean performance (\pm SEM) during remote and recent memory probe trials in PBS and LIDO groups, expressed as the time (s) spent in the four quadrants of the pool (*b*, *c*) and the number of crossings in the target area (*d*), at the 5 (left) and 25 day (right) post-acquisition delay. The dashed line represents chance level (i.e., 7.5 s). Statistics: *Significantly different from chance, $p < 0.05$. All rats (LIDO and PBS) recombined the platform location and recombined their searches in the target quadrant when the platform was located during acquisition. At the 25 day delay, searches for the platform were also probe trials at the 5 day delay, but there was no difference between PBS and LIDO rats. The number of trials was as follows: 25 day delay ($n_{PBS} = 13$, $n_{LIDO} = 12$) and 25 day delay ($n_{PBS} = 13$, $n_{LIDO} = 12$). LIDO, lidocaine; PBS, phosphate buffered saline; 5-d, 5 days post-acquisition delay; 25-d, 25 days post-acquisition delay; P.M.,

the 5 d delay. However, *post hoc* comparisons revealed that these differences were not significant. Swim speed and thigmotaxis were not significantly affected by ReRh inactivation ($F_{(1,47)} = 0.01$ for swim speed; $F_{(1,47)} = 0.81$ for thigmotaxis; ns for both), by Delay ($F_{(1,47)} = 1.29$ for swim speed; $F_{(1,47)} = 0.27$ for thigmotaxis; ns for both), or by the interaction between these two factors, Group \times Delay ($F_{(1,47)} = 0.01$ for swim speed; $F_{(1,47)} = 4.11$ for thigmotaxis; ns for both) (data not shown). Thus, these behavioral data showed an absence of effect of ReRh functional inactivation during the probe trial, whatever the post-acquisition delay. This points to a nonessential role of these nuclei for spatial memory retrieval per se, although, based on our imaging data, ReRh nuclei appeared to be activated during the retrieval of a remote memory.

Discussion

The present study shows, for the first time and in a water-maze, a specific implication of the ReRh thalamic nuclei in memory persistence. *c-Fos* expression was increased in the ReRh during remote but not recent memory retrieval. Excitotoxic ReRh lesions, which prevented neither task acquisition nor recent memory recall, impaired remote memory performance in the probe trial. Behaviors such as locomotor activity or those related to anxiety were not altered by the lesion. Finally, acute drug-free acquisition, reversible ReRh inactivation had no impact on retrieval performance, whatever the delay. The discordance between the effects of pre-acquisition thalamic lesion and of reversible inactivation at the 25 d post-acquisition delay points to a contribution of the ventral midline thalamus in the establishment of a remote spatial memory. In addition, the increase in *c-Fos* expression in ReRh at the 25 d delay, contrasting with the absence of inactivation effects during retrieval, reinforces the idea of a possible role of these thalamic nuclei in remote memory consolidation, most probably via a functional participation in a neuronal network that includes at least the hippocampus and the mPFC (Lavenex et al., 2012).

The ventral midline thalamus and memory

Evidence of a thalamic contribution to memory functions exists in patients with diencephalic damage (Van der Werf et al., 2003a,b). Although some neuropsychological symptoms of diencephalic amnesia are akin to those of temporal lobe damage, and others resemble deficits characteristic of PFC dysfunctions (Van der Werf et al., 2003; Aggleton, 2008), the contribution of the thalamic subregions to memory awaits further clarification. Thalamic nuclei best known to participate in memory are the anterior thalamus and the medial thalamus, including ILN and mediodorsal nuclei. Interestingly, the former is highly connected with the hippocampus, while the latter has major connections with the PFC (Van der Werf et al., 2003a,b). Considering the key position of the ReRh nuclei at the interface between the hippocampus and the mPFC (Hoover and Vertes, 2012), the relatively small number of studies that paid attention to their functional implications remains surprising. Dolleman-van der Weel et al. (2009) showed in rats that ReRh lesions did not prevent water-maze acquisition, but impaired performance in a delayed (24 h) probe trial. This impairment was attributed to a too rapid shift of strategy after an initial search oriented toward the correct quadrant, possibly as a consequence of maladaptations to enri-

quadrant at the left of the target quadrant; Opp., quadrant opposite to the target quadrant; Adj. R., quadrant at the right of the target quadrant; Target, quadrant where the platform was located during training.

environmental constraints or of mPFC dysfunction. Our results showing no effect of the ReRh lesion on recent memory retrieval appear contradictory. However, the results of Dolleman-van der Weel et al. (2009) show that the rats with ReRh lesions performed above chance level, and thus remembered the platform location. Another study assessed reference and working memory performance in a water maze after ReRh inactivation, but conclusions were unclear as controls did not remember the platform location (Davoodi et al., 2009). Hembrook et al. (2012) reported that lesions or functional inactivation of the ReRh altered performance in spatial working memory tasks requiring an interaction between the hippocampus and the mPFC, while memory performance in tasks requiring only one of these structures was normal (Hembrook and Mair, 2011). Likewise, high-frequency stimulation of the Rh in mice impaired normal acquisition of trace eyeblink conditioning and object recognition, which both involve the hippocampus and mPFC (Eleme et al., 2011). Thus, our present data showing a specific effect of the ReRh lesion on remote spatial memory (Figs. 4, 5), which, at the system level, depends on coordinated interactions between the hippocampus and mPFC (Frankland and Bontempi, 2005; Wilson et al., 2010), are in line with a potential role of these thalamic nuclei in the formation of remote memories.

The ventral midline thalamus: a key relay for hippocampocortical interactions?

The memory impairment found in the present study might be explained by a disconnection of the hippocampus from the mPFC. There are no direct projections from the mPFC to the hippocampus (Vertes, 2004). On the contrary, there is a direct unilateral pathway connecting the hippocampus to the mPFC via CA1 and the subiculum and terminating in the prelimbic cortex (Thierry et al., 2000). Anatomical and electrophysiological data support the idea of a major role of the ReRh in the information flow between the hippocampus and the mPFC (Vertes, 2006; Vertes et al., 2007; Hoover and Vertes, 2012). Indeed, the ReRh densely projects to the mPFC, ventral CA1, and subiculum. The Rh also innervates these areas and additionally has connections with other cortices (e.g., sensorimotor), the ventral striatum, and the amygdala (St and Bentivoglio, 1998; Dolleman-van der Weel and Witter, 1996; Vertes et al., 2006). Recently, Hoover and Vertes (2012) showed that a significant proportion of ReRh neurons project to both structures via axon collaterals, placing the ReRh at a critical position to influence the hippocampus and mPFC. Interestingly, stimulations of ReRh excite neurons in CA1 but also hippocampal projections to the mPFC (Dolleman-van der Weel et al., 1997; Bertram and Zhang, 1999; di Prieto and Vertes, 2006), demonstrating that ReRh nuclei may functionally influence hippocampal projections to mPFC (Vertes, 2006; Vertes et al., 2007). The present study extends the findings reported by Hembrook et al. (Hembrook and Mair, 2011; Hembrook et al., 2012) about the specific role of the ReRh in behavioral tasks depending upon hippocampus–mPFC interactions to the consolidation of a spatial memory at the system level. Indeed, we, as other authors, previously showed that remote spatial memory retrieval in a water maze required the hippocampus and the mPFC, while recent memory retrieval was possible with only the hippocampus (Clark et al., 2003; Broadbent et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Witzgen et al., 2010; Lopez et al., 2012). According to the main system consolidation theories (i.e., standard and multiple trace), a memory trace is initially encoded within hippocampal–neocortical networks and, over

time, is progressively consolidated in cortical networks. This process requires repeated and coordinated reactivation of hippocampocortical networks to increase the strength and stability of corticocortical connections (Frankland and Bontempi, 2005; Wilson et al., 2010). The mPFC appears to play a prominent role in these processes (Frankland and Bontempi, 2005). Thus, considering (1) our *c-Fos* data indicating an ReRh activation for the retrieval of a remote memory, (2) normal recent and remote memory performance despite the inactivation of the ReRh, and (3) ReRh lesion-induced alteration of only remote memory performance, the hypothesis of a specific role of the ReRh nuclei in the consolidation of a spatial memory at the system level appears highly plausible. Given the neuroanatomical evidence, these nuclei are in a key position to influence the hippocampocortical interactions leading to the reorganization of a memory trace from its initial stage of hippocampal dependency to its final stage involving (also) neocortical modules. The high *c-Fos* expression in the ReRh after retrieval of a remote memory suggests that those thalamic nuclei may participate in the reactivation of hippocampocortical interactions required for remote memory retrieval. The absence of inactivation effects on this retrieval, however, indicates that this participation is not crucial, or it could alternatively be the result of less complete activity suppression in the ReRh than after the lesions.

Toward a role of the “nonspecific” thalamus in memory consolidation at the system level

The results of the present study may be compared to those obtained after lesions of the LN/lateral thalamic (LT) nuclei (Lopez et al., 2009). Indeed, in a similar water-maze task, the preacquisition lesion of the LN/LT had no impact on either acquisition or retrieval of a spatial memory tested at a 5-d delay, but prevented retrieval at 25 d. This suggests a key role of the LN/LT and the ventral midline thalamus (the present study) within an extrahippocampal network critically involved in the time-dependent reorganization of a spatial memory. These two sets of thalamic nuclei, which belong to the nonspecific thalamus, (1) send relatively diffuse projections to superficial cortical areas, (2) are involved in cortical synchronous activity via thalamocortical and corticothalamic relay cells, and thus, (3) are able to activate one or more cortical neural assemblies (Miller, 1996; Jones, 2001; Lluis and Steriade, 2006). In the context of memory formation, cortical neuronal assemblies have been proposed as the substrate for the consolidated memories resulting from hippocampocortical as well as corticocortical reactivation/replay sequences, temporally linked and mostly occurring during sleep (Hebb, 1949; Sirotta et al., 2003; Bartaglia et al., 2011). Our data clearly and for the first time demonstrate that the “nonspecific thalamus,” which plays a key role in cortical arousal, awareness, and motivation, particularly via its strong projections to the mPFC and anterior cingulate cortex (Van der Werf et al., 2002; Lluis and Steriade, 2006), actively participates in processes underlying the long-term consolidation of a memory. This most probably occurs via its involvement in the hippocampocortical and corticocortical dialog necessary to the progressive reorganization of a memory trace at the system level.

References

- Aggleton JP (2008) EPS Mid-Career Award 2006. Understanding memory: from amygdala disconnections and hippocampal lesions. *Q J Exp Psychol* 61:1441–1471.
- Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the

- hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 23:425–444 (discussion 444–488).
- Aggleton JP, Dunbar JR, Warburton EC (2011) Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: a review. *Learn Mem* 18:584–620.
- Bettagli PP, Boocanning K, Smith A, Primatez CMA, Wiener SI (2011) The hippocampus may be critical for working communication for memory. *Trends Cogn Neurosci* 115:310–316.
- Bertoni FF, Zingg CX (1999) Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA1 stimulation. *Neuroscience* 92:13–26.
- Boudreau N, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13:387–391.
- Carvalho GA, Costa A, Serra L, Buzsáki M, Padoa-Schioppa C (2011) Prospective memory in thalamic amnesia. *Neuropsychologia* 49:2159–2206.
- Cerdeza S, Omit PY, Cakirak YO, Yonishi H, Galgani M, Akay B (2008) The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reticular nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat. *J Anat* 212:249–256.
- Clark RE, Broadbent DE, Squire LR (2005) Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15:260–272.
- Davoudi F, Moravcsik E, Naghibi K, Akbari F (2004) Effect of reversible inactivation of the reticular nucleus on spatial working and memory in rats using M-cholinergic muscimol. *Behav Brain Res* 150:130–135.
- De Prins G, Vervaeke RP (2006) Excitatory actions of the ventral midline thalamus (Rhomboid/reticular) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60:45–55.
- Dodman-Via De Wolf JM, Witter MP (1996) Projections from the nucleus reticularis thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. *J Comp Neurol* 370:257–269.
- Dollman-Via de Wolf JM, Lopes de Silva FH, Witter MP (1997) Nucleus reticularis thalami: modulates activity in hippocampal field CA1 (omnipotential excitatory and inhibitory mechanisms). *J Neurosci* 17:5640–5650.
- Dollman-van der Wolf JM, Morris RG, Witter MP (2001) Neurotoxic lesions of the thalamic reticular or midline nuclei in rats affect non-mnemonic aspects of water-maze learning. *Brain Struct Funct* 210:229–242.
- Elmer L, Lopez-Ramos JC, Guerra-Narboño B, Delgado-García JM (2013) Role of reticular nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. *PLoS One* 8:e73738.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 8:119–130.
- Frankland PW, Bontempi B, Tzourzouzis L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memories. *Science* 304:887–893.
- Gold B, Squire LR (2005) The anatomy of amnesia: neurobiological analysis of three new cases. *Learn Mem* 12:699–710.
- Greenberg ME, Witter MP (1994) Thalamus. In: *The rat nervous system*, Vol 1 (Paxinos G, ed), pp 607–632. San Diego: Academic.
- Hall D (1999) The organization of behavior: a neuropsychological theory. Wiley, New York.
- Hirshbark R, Mair RG (2011) Lesions of reticular and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze with shift performance. *Hippocampus* 21:815–826.
- Lambrecht B, Onge JAJ, Mair RG (2012) Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus* 22:883–890.
- Loewer WB, Vervaeke RP (2011) Collateral projections from nucleus reticularis of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct* 217:191–209.
- Louis BC (2002) The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci* 25:595–601.
- Mur S, Müller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani B, Ceta U, Cassel JC (2009) Hippocampal-dependent spatial memory function might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* 19:859–876.
- Kopelman MD (2002) Disorders of memory. *Brain* 125:2153–2160.
- Leutner L, Pereira de Vasconcelos AP, Cougnet B, Cassel JC (2010) Combined lesions of CA3/hippocampus and cholinergic septal neurons increase locomotor activity and potentiate the locomotor response to amphetamine. *Behav Brain Res* 213:175–182.
- Lima RL, Striade M (2006) Bursting of thalamic neurons and status of vigilance. *J Neurophysiol* 95:3297–3308.
- Lopez J, Wolff M, Lavenex J, Cougnet B, Bontempi B, Dalrymple-Allen JF, Cassel JC (2009) The intralaminar thalamus nuclei contribute to remote spatial memory. *J Neurosci* 29:3302–3306.
- Lopez J, Herbretz K, Cougnet B, Engelt M, Müller C, Lavenex C, Kefauver C, Bontempi B, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos AP (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22:827–841.
- Lopes de Silva FH, Cougnet B, Engelt M, Lopes J, Cougnet B, Geiger K, Kefauver C, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A (2012) The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct Funct* 217:93–106.
- Mavroul T, Durkin TP, Muregha B, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 306:86–89.
- McKenna JT, Verhey BP (2001) Afferent projections to nucleus reticularis of the thalamus. *J Comp Neurol* 430:115–141.
- Miller R (1996) Neural assemblies and laminar interactions in the cerebral cortex. *Biol Cybern* 75:234–261.
- Nadel L, Ehrlich O (2011) Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology Rev* 36:211–223.
- Palmon G, Watson C (1996) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Ed 4. San Diego: Academic.
- Pereira de Vasconcelos A, Mur S, Müller C, Cougnet B, Lopez J, Ceta U, Cassel JC (2008) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: A comparative study on cerebral functional activity and motor-coordination in the Rat. *Neuroscience* 151:1649–1663.
- Pezard LA, Magregori DM, Chudasama Y (2012) Lesions of the thalamus reticularis cause impulsive but not compulsive responses. *Brain Struct Funct*. Advance online publication. Retrieved January 24, 2012. doi:10.1007/s00429-012-0173-2.
- Sicco A, Casarini I, Buhl D, Busaki G (2013) Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *PLoS Natl Acad Sci U S A* 100:2005–2009.
- Squire LR (2009) The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* 61:6–9.
- Striade M (2006) Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* 137:1067–1086.
- Su HS, Serdyukov M (1996) Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus reticularis, amygdala, and hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 287:382–393.
- Sutherland RJ, Sackellar JT, Lehmann H (2010) Hippocampal and neocortical activity in the rat model: a rodent protocol for the simulation of systems consolidation. *Neuropsychologia* 48:2377–2389.
- Talbot CM, Poremba MR, Mair RG, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* 26:7535–7544.
- Thiéry AM, Gibboni F, Inganäs E, Giordano J (2008) Hippocampal-prefrontal pathways: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 18:411–429.
- Vander Wolf CD, Witter MP, Dalling HB, Jolles J (2006) Neuropsychology of inactivations in the thalamus: a review. *Neuropsychologia* 44:615–627.
- Vander Wolf CD, Witter MP, Giordano E (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus: anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res Rev* 40:107–140.
- Vander Wolf CD, Jolles J, Witter MP, Dalling HB (2005a) Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex* 41:1047–1062.
- Vander Wolf CD, Schabus P, Lindhauer J, Witter MP, Dalling HB, Jolles J (2005b) Effects of memory-evoked flow/attention and attention flow/attention in the thalamus: a study of 22 cases with localized lesions. *Neuropsychologia* 43:1330–1340.

Damasio, A.R. • *Lesion of the Human Amygdala*

J. Neurosci., 1994, 14(12):3208-3212

- Varley RP (2002) Analysis of the projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reticularis. *J Comp Neurol* 442:61-80.
- Varley RP (2004) Differential projections of the subthalamic and prethalamic nuclei in the rat. *Synapse* 51:32-38.
- Varley RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:99-120.
- Varley RP, Hoover WB, Du Yuh AC, Swanson LW, Rajchman J (2000) Efferent projections of the nucleus reticularis (medial nucleus) of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 429:708-730.
- Varley RP, Hoover WB, Seligsohn K, Lavenex C (2007) Nucleus reticularis of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull* 77:600-605.
- Whishaw IQ (1985) Cholinergic receptor blockade in the rat causes locale but not route strategies for place navigation in a swimming pool. *Behav Neurosci* 99:979-1005.
- Wigger B, Zhou M, Cai Y, Babel J, Karlson MG, Parvizi SN, Li W, Silva AJ (2016) The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol* 26:1326-1334.
- Winters C, Moscovitch M, Berman D (2010) Memory formation and long-term retention in humans and animals converges towards a fundamental mechanism of hippocampal-neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2239-2256.
- Winters BD, Saldana L, Witter MP (1999) Projections from the thalamus nucleus reticularis to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phalloidin vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 416:179-205.

Publication 3

Publication 3

Rôle des noyaux reuniens et rhomboïde dans le changement de stratégie lors d'une tâche de mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe et du cortex préfrontal médian

Dans ce manuscrit sont présentés les résultats d'expériences qui avaient pour objectif d'étudier le rôle des noyaux Re et Rh dans une tâche nécessitant le rappel d'une mémoire spatiale associé à un changement de stratégie (égocentrique versus allocentrique). Pour cela nous avons testés nos animaux dans un nouveau test, le labyrinthe du double-H, et des inactivations fonctionnelles réversibles des noyaux Re et Rh ont été réalisées juste avant le test de rétention, effectué 24h après la fin d'un apprentissage de 2 ou 4 jours. Dans le même test et les mêmes conditions, nous avons testé l'implication de l'hippocampe dorsal (dHipp), bien connu pour son rôle dans la navigation spatiale, et du cortex préfrontal médian (mPFC), impliqué dans le changement de stratégie. Les résultats ont montré que l'inactivation de dHipp ou du mPFC, comme celle des noyaux Re et Rh ont altéré les performances de rappel dans le double-H. Enfin, les résultats obtenus dans le labyrinthe du double-H ont été comparés à ceux obtenus après une inactivation de ces trois régions cérébrales juste avant le test de rétention effectué à 1 jour dans un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris. Deule l'inactivation de dHipp a altéré les performances de rappel à 24 h en piscine de Morris, l'inactivation du mPFC comme celle des noyaux Re et Rh n'a pas eu de conséquences lors du rappel dans ce test. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent l'implication des noyaux Re et Rh dans un test de navigation spatial dépendant à la fois de l'hippocampe et du mPFC lorsque le test nécessite une flexibilité comportementale pour être réalisé avec succès. Ces données confirment et étendent celles observées par Hembrook et Mair (2011) et Hembrook et coll. (2012) en mémoire de travail et proposant un rôle-clé des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans les processus mnésiques nécessitant des interactions hippocampo-préfrontales.

The ventral midline thalamus is crucial for strategy-shifting in a memory task engaging cortico-hippocampal interactions

Abbreviated title: Ventral midline thalamus and strategy shifting

Authors: Michaël Loureiro^{1,2}, Thibault Cholvin^{1,2}, Raphaëlle Cassel^{1,2}, Brigitte Cosquer¹, Karine Geiger¹, Christian Kelche¹, Anne Pereira de Vasconcelos¹, Jean-Christophe Cassel^{1,3}.

¹ Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives
UMR 7237, Université de Strasbourg – CNRS,
IFR 37 de Neurosciences – GDR 2905 du CNRS
Faculté de Psychologie
12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France

² With equivalent contribution to this work

Number of manuscript pages: 29

Number of figures: 8

Number of words in abstract: 249, introduction: 500, discussion: 1489

³ **Corresponding author:** Dr. Jean-Christophe Cassel, Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. E-mail: jcassel@unistra.fr

Conflict of interest: We have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements: This work was supported by the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). We are grateful to O. Bildstein, D. Egesi, and G. Edomwonyi for their assistance in animal care.

Abstract

Electrophysiological and neuroanatomical evidence for reciprocal connections with the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus make the reuniens and rhomboid (ReRh) thalamic nuclei a major functional link for regulations of cortico-hippocampal interactions. In a first experiment, using a new water escape device for rodents, the double-H maze, we demonstrate in rats that a bilateral muscimol inactivation of the mPFC or the dorsal hippocampus (dHip) induces major deficits in a strategy shifting/spatial memory retrieval task. By way of comparison, in a classical spatial memory task in the water maze, only dHip inactivation impaired recall. In a second experiment, we show that ReRh inactivation, which did not alter memory recall in the water maze, produces an as large strategy shifting/memory retrieval deficit as mPFC or dHip inactivation in the double-H maze. It is concluded that behavioral adaptations to modifications of task contingency requiring a shift towards the use of a memory for place operates in a distributed circuit encompassing the mPFC as the possible shift-triggering structure, the hippocampus as the probable substrate from where the place memory is retrieved, as well as the ventral midline thalamus, and therein the ReRh, as a potent coordinator of these operations. The results of the current experiments provide a significant extension of our understanding of the cognitive contributions of the ventral midline thalamus. They point to a role of the ReRh in the regulation of the dynamic interactions between the mPFC and the hippocampus and further elucidate the functional connectivity underlying behavioral flexibility.

Keywords

Executive functions – hippocampus – place memory – prefrontal cortex – rat – response memory – reuniens nucleus – rhomboid nucleus – thalamus

Introduction

Diencephalic lesions induce cognitive symptoms resembling those of hippocampal amnesia or prefrontal dysfunctions (Aggleton et al., 2011; Carlesimo et al., 2011; Van der Werf et al., 2003). Experiments in animals suggest that damage to intralaminar or/and anterior thalamic nuclei might take part in such symptoms (e.g., Aggleton and Brown, 1999; Gold and Squire, 2006), and that intralaminar nuclei contribute to spatial memory persistence in rats (Lopez et al., 2009). Anatomical and electrophysiological evidence points to a role of the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei in the information flow between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (Eleore et al., 2011; Hoover and Vertes, 2012; Vertes, 2006; Vertes et al., 2007). While the Re projects to the mPFC, ventral CA1 and subiculum, the Rh has additional connections with other cortices, ventral striatum and amygdala (Su and Bentivoglio, 1990; Dolleman-van der Weel and Witter, 1996; Vertes et al., 2006). Recently, Hoover and Vertes (2012) described Re neurons projecting to both structures via axon collaterals, placing the Re at a critical position to influence hippocampo-mPFC interactions. Along this line, Hembrook et al. (Hembrook and Mair, 2011; Hembrook et al., 2012) found a specific implication of the ReRh in cognitive tasks requiring hippocampo-mPFC interactions, not in those requiring only one of these structures. We recently found that reversible inactivations of the ReRh did not influence memory retrieval in the water-maze, a hippocampus-dependent task (Loureiro et al., 2012). The effects of ReRh lesions, however, demonstrated that these nuclei contributed to the transformation of a recent memory into a remote one, a process requiring off-line hippocampo-cortical interactions (Loureiro et al., 2012). The mPFC has a crucial role in executive functions, behavioral flexibility and strategy shifting (e.g., Floresco et al., 2008; Ragozzino et al., 2003). We therefore hypothesized that in a task requiring both memory for location and strategy selection/shifting, and thus hippocampo-cortical interactions, rats subjected to inactivation of the ReRh would be impaired, while keeping the capacity to perform a spatial navigation task. Using a novel testing device named the double-H maze (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012), we designed a training protocol in which rats had to learn two escape response sequences (right-left or left-left turns) and to use them according to where in the maze they were released. Subsequently, in a misleading probe trial, they were tested for their ability to shift to a strategy based on a memory for place upon negative feedback. A first experiment evaluated, in the

double-H maze, the sensitivity of our task protocol to bilateral muscimol inactivations of the mPFC or dorsal hippocampus (dHip); we expected and found identical effects. A second experiment, using the same test/task, tested the effects of ReRh inactivation. Before this, all rats trained drug-free in a classical water maze task were given a probe trial following inactivation of the dHip, mPFC or ReRh. Our results show that whereas only dHip inactivation affected probe trial performance in the water maze, inactivations of the mPFC, dHip or ReRh all disrupted performance in the double-H maze in very comparable ways.

Materials and Methods

Subjects

The study adhered to the regulations specified by the European Committee Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (references for personal authorization licenses are n°67-7 for A.PdV., 67-217 to C.K. 67-358 to K.G., and n°67-215 for J-C.C.; the other authors under the formers' responsibility). All experiments were carried out in 81 male Long-Evans rats aged of 3 months at their arrival at the laboratory (250-300 g). Animals were housed individually in quiet facilities, under a 12 h light-dark cycle (light on at 7:00 am) with free access to food and water, controlled temperature and a hygrometry of about 55%. Before any experiment (surgery or maze training), rats were individually handled for 2 min each day over 5 consecutive days in their housing room. All rats were maintained in this room, which was different from the testing room, for the whole duration of the experiment. Rats were brought to the testing room about 1 minute before the start of the first training trial on each day, as was also done for each of the different probe trials (see below).

Surgical procedure

Rats were anesthetized with a ketamine (6.38 mg/kg)-xylazine (0.85 mg/kg) mixture (i.p.). A stainless steel guide cannula (0.4 mm in diameter) was implanted bilaterally in the medial prefrontal cortex (mPFC) or in the dorsal hippocampus (dHip), and unilaterally in the ReRh. Coordinates were AP: +2.7 mm, ML: \pm 0.7 mm, and DV: -3.2 mm for the mPFC, AP: -3.8 mm, ML: \pm 2.4 mm, and DV: -2.2 mm for the dHip, and AP: - 2.3 mm, ML: +/- 1.7 mm, DV: - 6.2 mm from skull, with a mediolateral angle of

15°, for the ReRh. All coordinates are given according to Paxinos and Watson (1998). Each guide cannula was secured to the skull by acrylic dental cement and stainless steel screws. At the end of surgery, a sterile stainless steel mandrel (0.28 mm in diameter) was inserted into each guide cannula. After the operation, all rats were allowed to recover under a warm lamp for 20-30 min before being placed back into their home cage. They were given a 1-week rest period before the start of behavioral testing.

The water maze task

The specifications of the water maze and the testing procedures have been described previously (Lopez et al., 2012). In brief, the first pre-training day consisted in one 4-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, painted black, protruding 1 cm above the water surface) located in the South-East quadrant of the pool, starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool: a blue curtain surrounded the pool to avoid any access to distal cues. The rats were then given four successive acquisition trials per day (inter-trial interval, 10-15 s) of a maximum duration of 60 s, starting randomly from each of the four cardinal points from the edge of the pool, to learn the location of a platform (diameter 11 cm) hidden 1 cm below the water surface in the North-West quadrant. Training extended over 8 consecutive days. The distance traveled before reaching the platform as well as the thigmotactic behavior were recorded and subsequently computed by a videotracking system (PanLab, Smart). At the end of the acquisition, rats were randomly allocated to the group to be subjected to an inactivation (-INAC) or to be used as control (-CONT). For this probe trial, no platform was placed in the pool. Ten minutes after the infusion (see paragraph below for drug infusion protocols), the rats were released from the North-East start point and allowed a 60-s swim time in the pool. We recorded the time spent in each target quadrant and the number of crossings over the target area (corresponding to the size of the platform surface enlarged by a 10 cm wide annulus); the second parameter was used as an index of memory precision (Lopez et al., 2012). Likewise, swim speed and thigmotaxis were also recorded during the probe trial.

The double-H maze task

Testing apparatus. The apparatus has been conceived, constructed and validated *intramuros* by J-C.C. It was located in a 3.64 x 6.52 m large room as illustrated in Figure 1a. In a bird view, the general layout of the apparatus roughly corresponds to the shape of two contiguous Hs (Fig. 1a). The double-H maze is made of three parallel run arms, 160 cm in length and 20 cm wide, connected to each other at the level of their centre by a 160 cm long and 20 cm wide central alley (see Fig. 1a; a photograph of the device can be found in Pol Bodetto et al., 2011). Each of these arms is delimited by transparent side walls, 35 cm high. By convention, the two opposing arms in the middle are designed as north (N) and south (S), respectively. One of these arms is used as the start arm, but can be S or N depending on the training protocol used (see below). The extremities of both other pairs of side arms correspond to our four potential target locations. They are termed north-west (NW), north-east (NE), south-west (SW) and south-east (SE) hereafter (see Fig. 1a). All elements of the apparatus are made of transparent Plexiglas. The double-H device was placed on a table, 80 cm from the floor, in a large room with several well-contrasted cues on the walls (black disk, black triangles, orange-painted heating ducts...).

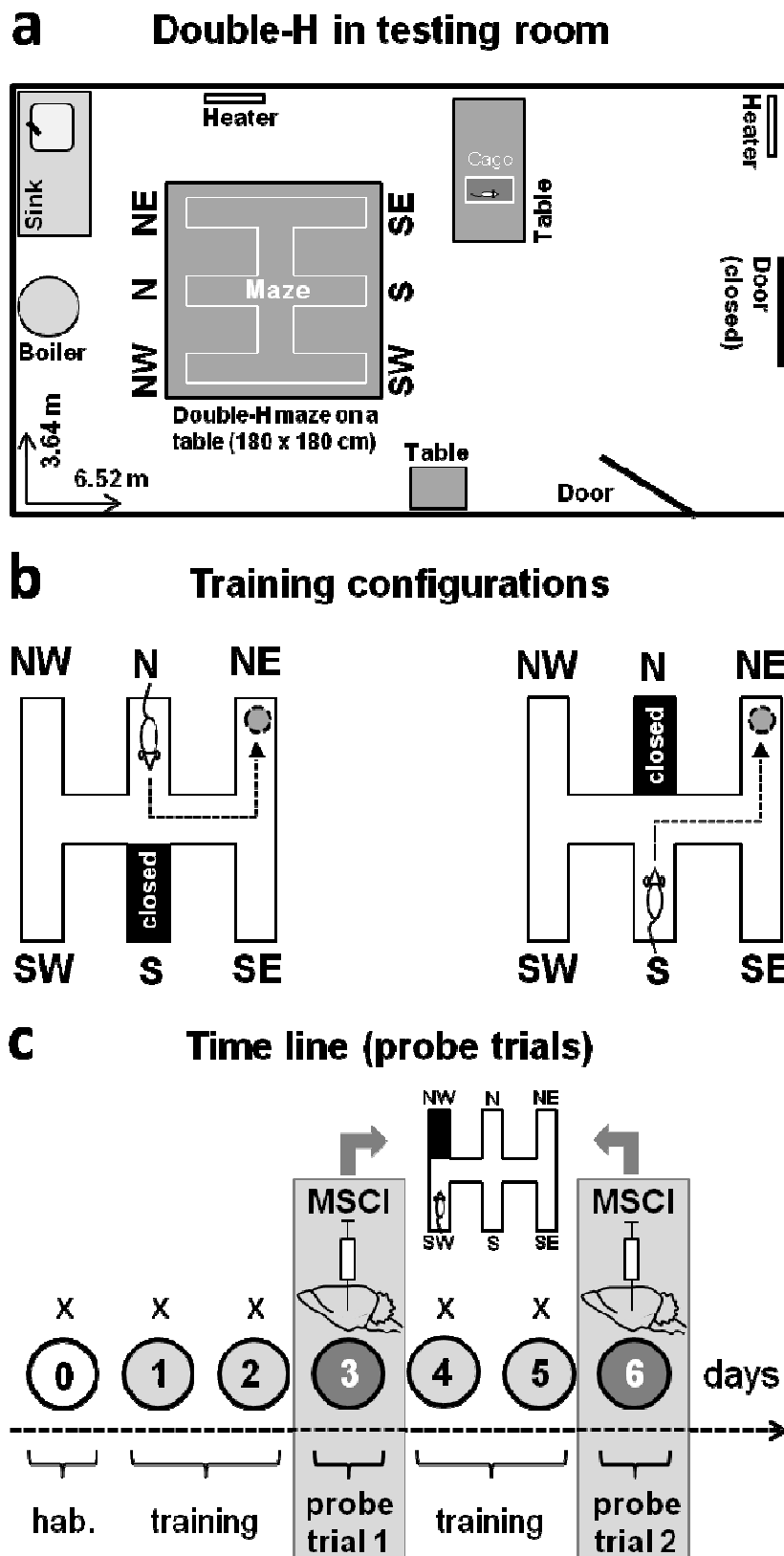


Figure 1

The double-H test, training and functional reversible inactivation protocols. **(a)** Bird view drawing of the overall organization of the room in which the double-H device was installed (Maze). For a picture of the device, see Pol-Bodetto et al. (2011). **(b)** Illustration of the configurations used during maze

training. The rats were given 4 daily trials for which they were released twice from the S and twice from the N (in a randomized order; e.g. N,S,S,N, then S,N,S,N...). The platform was always located in the NE arm. The arm opposite to the one in which the rats were placed at the start of a trial was always closed by a transparent guillotine door (it corresponds to the black-filled arm). **(c)** Time line of the training days and probe trials. After a habituation day (0), rats were trained for two consecutive days (1,2), given a first 24h-delayed probe trial (3), trained for two additional days (4,5) and given a second 24h-delayed probe trial (6). Thirty min before each probe trial, about half the rats were infused with 0.25 µg/1 µL muscimol in the mPFC or dHip, or with 0.25 µg/0.3 µL muscimol in the ReRh, the other half being infused with an equivalent volume of PBS as a control. For both probe trials, rats were released from the SW arm, the NW one was closed by a guillotine door (see illustration in Fig. 1c) and the platform had been removed from the device.

Training protocol. The double-H was flooded with an approximate volume of 170 L water (21°C) to a height of 15 cm. The water was made opaque by addition of powdered milk (about 1.5 g/L). A platform, 11 cm in diameter, 14 cm high, was immersed 1 cm underneath the water surface at the extremity of the NE arm (see Fig. 1b for detail). For each rat, the task consisted in learning to swim from the start point – which was changed randomly between S and N – to the escape platform, which was always located at the extremity of the NE arm. A first day of pre-training aimed at habituating the rats to the testing device and the water. For only this pre-training session, the water was left without milk, the platform protruded 1 cm above the water surface, and the rats were given four consecutive trials, for which the platform was located at the end of the SW arm and the rats were released from the NW. A transparent guillotine door blocked the access to the central alley, so that rats could only swim straight to the opposite arm. Over the four following training days, the rats were also given four daily trials, but now the water was opaque and the platform immersed (at the extremity of the NE arm). These trials were separated from each other by a 10-s gap. The rats were released in the maze either from the N or the S arm in a randomized order (e.g., S,N,S,N on day 1, S,N,N,S on day 2...). When being released from the S, the rats had to turn once right and then left to reach the platform. When released from the N, the correct sequence consisted in two consecutive left turns. When the rats were released from the N, the S arm was closed by a transparent guillotine door to prevent any entry, and vice versa. Each trial, whatever the protocol, lasted for a maximum of 60 s. When the rat did not reach the platform within this delay, it was gently guided to the platform by the experimenter. Once a rat had climbed on the platform, it was left there for 10 s before the next trial was started.

Probe trial. Two probe trials were used, one 24 hours after two days of learning, and another one 24 hours after two additional days of learning (Fig. 1c). For both probe trials, the platform was removed from the water maze. The probe trial duration was of 60 s. All rats were released from the SW arm, with the entry of NW arm closed by a guillotine door. This procedure **i)** prevented a repeat of the behavior displayed during maze habituation (i.e., swim directly from SW to NW), **ii)** made one of both successive turn sequences learned impossible (i.e., the left-left sequence), **iii)** did not disable the right-left sequence, **iv)** allowed rats to shift from a strategy based on the right-left movements sequence to a spatial approach of the task (search in target arm). It is noteworthy that because rats were released from the SW arm, which corresponds to a translation of their start place in the device relative to the testing environment of only 60 cm to the rats' left, the visuo-spatial context at the start of the probe trial was relatively comparable to that of the training trials. Thereby, the misleading potential of the probe trial was extremely high. Indeed, in our previous experiments, we found that following such a weak translation of the start point, about 90% of the rats first behaved as if they had been released from the usual training arm (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012). For their first swim track, rats thus had the possibility to engage into the right-left turn sequence (leading them to the N arm) or immediately engage into the use of a cognitive map, leading them to the arm of the former platform location, namely the NE one. In case of a right-left turn as their first approach of the task, as the probe trial duration was of 60 s, they could also subsequently correct for a spatial memory-based search, which is usually manifested by an increased time spent in the target arm as compared to the other ones (Pol-Bodetto et al., 2011). Whether the shift to a spatial strategy was immediate or not, evidence for searching the platform at the correct place can only be interpreted as the consequence of a strategy shift. The variables recorded and analyzed were the first arm chosen, the time spent in the former target arm (i.e., NE, termed the place arm hereafter), the time spent in the arm to which successive right-left turns were leading (i.e., N, termed response arm hereafter), as well as a place visit index. This index was obtained by dividing the time spent in the place arm by the sum of this latter time and the time spent in the response arm. When this index was not different from 0.5, rats spent an equivalent time in each arm. When it was significantly above 0.5, they spent more time in the place than in the response arm.

Functional reversible inactivation by lidocaine or muscimol infusions

Within anaesthetics other than lidocaine or tetrodotoxin, muscimol has the reputation to induce a deep inactivation of neurons in its diffusion radius without changing the excitability of the fibers *en passage* therein (e.g., Edeline et al., 2002; van Duuren et al., 2007). As **i)** we had to make several infusions (1 before the probe trial in the water maze and one before each of the two probe trials of the double-H maze), **ii)** in former experiments, we generated water maze data using intracortical and intrahippocampal lidocaine infusions, with which to compare our current water maze data (e.g., Lopez et al., 2012; Loureiro et al., 2012), **iii)** the GABA_A receptor, which is the target of muscimol, is known to undergo downregulation and allosteric uncoupling in the presence of its intrinsic ligand, but unfortunately also in that of muscimol (e.g., Klein et al., 1995; Mehta and Ticku, 1992; Roca et al., 1990), of which the effects are known to last for several hours (e.g., van Duuren et al., 2007), and finally **iv)** we wanted to minimize any risk for crossover effects between the pharmacological contexts of the probe trials in both tasks, we decided to use lidocaine as the inactivating agent for the water maze test and subsequently muscimol as the inactivating agent for the double-H maze test.

As previously described (Lopez et al., 2012; Loureiro et al., 2012), over 5 consecutive days before the start of maze training, all rats were habituated to be handled and maintained as for drug infusions. For the infusions, rats were gently restrained by hand, the mandrels were removed, and infusion needles (Ø 0.28 mm) were slowly inserted into the guide cannula with the tip of the needle protruding 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula. The needle was connected to a 10 µL Hamilton syringe by polyethylene tubing. As summarized in Table 1, using a micropump (CMA/100), lidocaine or muscimol (LIDO or MSCl; Sigma, Saint-Louis, USA; dissolved in phosphate-buffered saline [PBS]) was infused over 60 s to induce inactivation (INAC). In mPFC and dHip, rats received on each site 40 µg LIDO in 1 µL PBS before the probe trial in the water maze and, subsequently, 0.25 µg MSCl in 1 µL PBS before each probe trial in the double-H maze. In the ReRh group, they received 20 µg LIDO in 0.3 µL PBS before the probe trial in the water maze and 0.25 µg MSCl in 0.3 µL PBS before each probe trial in the double-H maze. All controls (-CONT) received an infusion of an identical volume of PBS. Hereafter, -INAC is standing for inactivation, regardless of the drug used. After the infusion, the needle was left in place for an additional 30 s before being slowly retracted. All infusions were

performed in the room in which the rats were maintained for the whole duration of the experiment. The rats were brought to the testing room about one minute before the start of the test, as for training. After the infusion, the rats were returned to their home cage until the start of the probe trial, which occurred 10 min post-infusion in the water maze and 30 min post-infusion in the double-H maze.

Targeted structure	Probe trial in the water maze		Probe trial in the double-H maze	
	PBS	LIDO	PBS	MSCI
dHip	1 μ L	40 μ g in 1 μ L	1 μ L	0.25 μ g in 1 μ L
mPFC	1 μ L	40 μ g in 1 μ L	1 μ L	0.25 μ g in 1 μ L
ReRh	0.3 μ L	20 μ g in 0.3 μ L	0.3 μ L	0.25 μ g in 0.3 μ L

Table 1: Drugs and quantities infused to inactivate the structures of interest before the water maze and double-H maze probe trials. The dHip rats were subjected to an infusion into the dorsal hippocampus, the mPFC rats into the medial prefrontal cortex and the ReRh rats into the reuniens and rhomboid nuclei. Infusion speed was of 1 μ L/min for all. Abbreviations: LIDO; lidocaïne, MSCI; muscimol, PBS; phosphate-buffered saline. The infusion stereotaxic coordinates are indicated in the Methods section.

Histological verifications

Ten minutes after an infusion of fluorescent muscimol (Invitrogene, Oregon, USA) using identical amounts as those used for the experiments in the double-H maze, the rats were killed by injection of an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, ip) and transcardially perfused with a 4% phosphate-buffered (0.1 M) paraformaldehyde solution (4°C). Brains were removed, post-fixed for 2 h in the same fixative at 4°C, and transferred to a 20% phosphate-buffered (0.1 M) sucrose solution for 48 h at +4°C before being snap-frozen (isopentane, -40°C) and stored at -80°C. Coronal sections (50 μ m) were cut using a cryostat (Reichert Jung, Frigocut 2,800) in serial sections which, in the respective regions of interest delimited according to Paxinos and Watson (1998), were collected on gelatin-coated slides and either processed for cresyl violet staining to be assessed under a light microscope or directly observed under a fluorescence microscope to determine muscimol diffusion around the infusion site. Fluorescent muscimol produces a red color when excited at 544 nm under a fluorescence microscope, enabling the detection of both the intraparenchymal presence and diffusion radius of the drug.

Statistical analyses

Unless otherwise specified and depending on the experiment, data analyses used a two- or three-way analysis of variance (ANOVA), with repeated measures where appropriate: training phases in both mazes considered the factor Day and, in the double-H maze, there were two probe trials. For performance during the training phase, the between-subject factor, namely Group, had four levels in the first experiment (mPFC-CONT, mPFC-INAC, dHip-CONT, dHip-INAC) and two levels in the second one (ReRh-CONT, ReRh-INAC). For the probe trials, for which rats were subjected to infusions in different regions, this single between-subject Group factor analysis was split in an analysis considering the Region (mPFC vs. dHip) and the Inactivation (PBS vs. LIDO or MSCI), which were crossed. Where appropriate, all these analyses were complemented by multiple comparisons using the Newman-Keuls test. The time spent in the target quadrant (water maze) or in the target arm (double-H) during the probe trials was also compared to chance (i.e., 15 s in the water maze and 8.2 s in the double-H maze) using a one sample t-test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. A χ^2 analysis was used to compare categorical variables in the double-H maze.

Results

Experiment 1: only inactivation of the dHip impaired performance in the water maze probe trial, while in the double-H maze, performance was altered to comparable extent by dHip or mPFC inactivation

Location of the infusion sites and diffusion radius of the drug.

Figures 2a and 2c show the location of the injector tips in the mPFC and dHip for each group as verified in the rats given MSCI vs. PBS before the probe trial in the double-H maze. For mPFC, all injection sites were centered in the prelimbic cortex, i.e., between the anteroposterior coordinates 3.7 to 2.8 mm, dorsoventral coordinates -3.2 to -4.6 mm and mediolateral coordinates 0.2 to 1.0 mm from Bregma. Figure 2b shows a typical example of intraparenchymal extent of the diffusion of fluorescent MSCI in the mPFC. Thus, after intra-mPFC infusions, the fluorescent solution remained confined to the mPFC with a maximum of fluorescence in the prelimbic cortex. For dHip, all injection sites were localized between the anteroposterior

coordinates -3.3 to -4.2 mm, dorsoventral coordinates -2.4 to -3.4 mm and mediolateral coordinates 0.8 to 2.6 mm from Bregma. The extent of the fluorescent MSCl in the dHip is illustrated in Figure 2d. The spread of the solution was strictly confined to the dHip and did not extent through the cortex above the dHip. After removal of 7 rats showing misplacement of at least one of the two injection sites, group sizes were as follows: in the water maze experiment, $n_{\text{mPFC-CONT}} = 13$, $n_{\text{mPFC-INAC}} = 11$, $n_{\text{dHip-CONT}} = 11$, $n_{\text{dHip-INAC}} = 10$; in the double-H maze experiment, $n_{\text{mPFC-CONT}} = 12$, $n_{\text{mPFC-INAC}} = 12$, $n_{\text{dHip-CONT}} = 11$, $n_{\text{dHip-INAC}} = 10$. The difference between group sizes in the water maze and double-H maze was due to reallocations of rats between both tests. For the test in the double-H, the groups were made such as to include for about one half rats that were given LIDO in the water maze and for the other half rats subjected to PBS infusions. More detail is given in Table 2.

TEST	-CONT						-INAC					
	mPFC		dHip		ReRh		mPFC		dHip		ReRh	
Water maze	13		11		10		11		10		13	
Double-H maze	6	6	6	5	5	6	7	5	5	5	5	7

Table 2: Breakdown plan of the groups of rats tested in the water-maze task after PBS (-CONT) or LIDO (-INAC) infusion into groups further tested in the double-H maze after PBS (-CONT) or MSCl (-INAC) infusion. As an illustration of how this table reads, from the 13 rats tested in the water maze after control infusions into the medial prefrontal cortex (-CONT, mPFC), six were kept as controls (-CONT, mPFC) and 7 were infused with MSCl (-INAC, mPFC) before double-H maze testing.

NB: The numbers of rats given in the table are those included in the final statistical analysis after exclusion of rats with cannula misplacement (see corresponding paragraph in the result section).

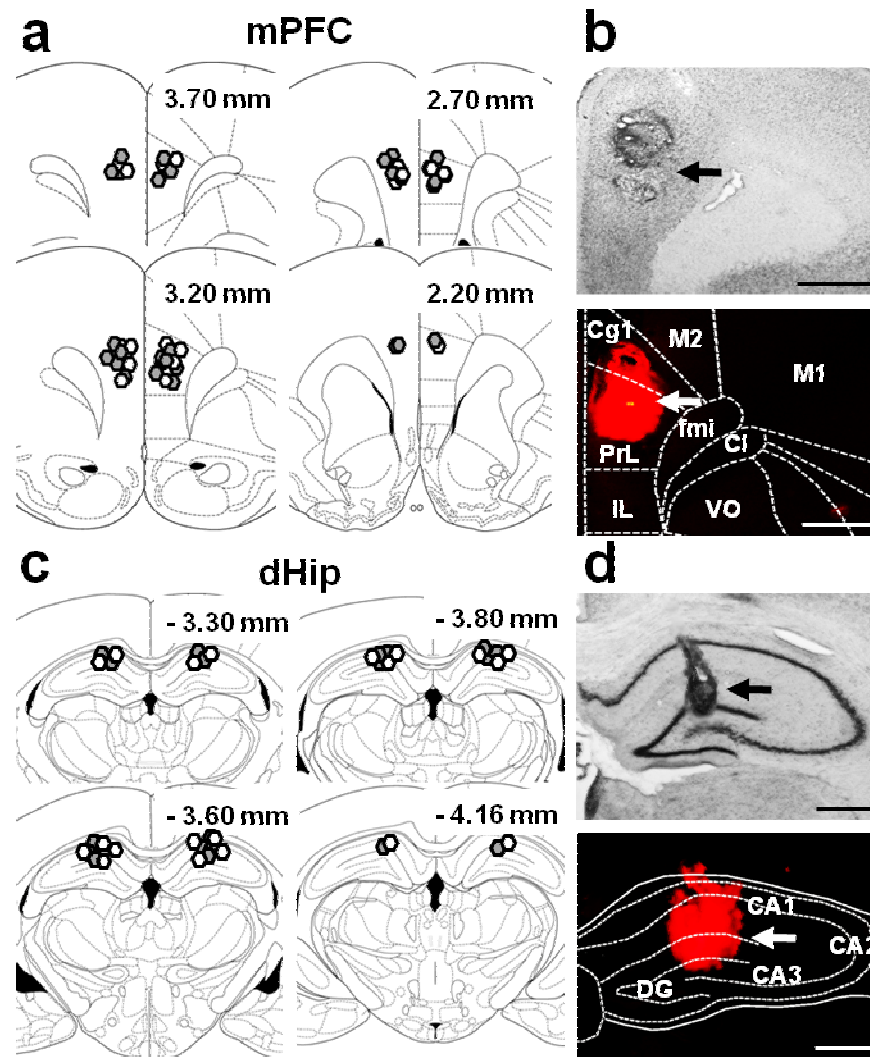


Figure 2

Schematic representation of the infusion sites on coronal sections through the prefrontal cortex, mPFC (a) or the dorsal hippocampus, dHip (c) in rats subjected to PBS (open circles) or MSCl (grey-filled circles) infusions before the probe trials in the double-H maze. Coordinates are given in mm from Bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each infusion site corresponds to the location of the tip of the infusion needle. (b) and (d) Photomicrographs showing a representative location of the infusion site in the mPFC (b) and dHIP (d) on a brain section stained with cresyl violet (arrow on top photograph) and of the diffusion of fluorescent muscimol on the same section (bottom; excitation 355 nm), scale bar = 1 mm. Dashed lines in (b) delineate the limits of the cingulate cortex, region 1 (Cg1), the prelimbic cortex (PrL), the infralimbic cortex (IL), regions 1 and 2 of the motor cortex (M1, M2), the forceps minor of the corpus callosum (fmi), the ventral orbital cortex (VO) and the claustrum (CI). Dashed lines in (d) follow the limits of the dorsal hippocampus and, therein, of the dentate gyrus (DG). Hippocampal subregions are indicated by CA1 to CA3.

Lidocaine inactivation of the dHip, not of the mPFC, impaired retrieval of the platform location in a water maze after drug-free learning

In this experiment, all rats had been equipped with infusion devices before any behavioral training. Starting one week post-surgery, they were given 4 daily trials over 8 consecutive days to learn the location of an escape platform hidden in a water maze. After a 1-day post-acquisition delay, they were tested in a probe trial. During training, the distance to reach the platform declined over days ($F_{(7,343)} = 70.76$, $p < 0.0001$) showing progressive learning of the platform location (Fig. 3a). The statistical analysis of the distance traveled by each rat during the acquisition phase revealed no overall effect of Group ($F_{(3,49)} = 1.72$, *ns*), and there was no significant Group X Day interaction ($F_{(21,343)} = 1.24$, *ns*). The analyses of the latencies yielded a similar pattern of effects (not illustrated). All rats showed a decrease of thigmotactic behavior over days ($F_{(7,343)} = 54.65$, $p < 0.001$; not illustrated), with no effect of Group or interaction between the two factors ($F_{(3,49)} = 2.50$ and $F_{(21,343)} = 1.21$, *ns*, respectively). Thus, learning was comparable among the four groups.

ANOVA of the time spent in the target quadrant during the probe trial (Fig. 3b) showed a significant effect of Inactivation ($F_{(1,49)} = 4.64$, $p < 0.05$), of Region ($F_{(1,49)} = 14.08$, $p < 0.01$), and a significant interaction between the two factors ($F_{(1,49)} = 4.78$, $p < 0.05$). Post hoc comparisons showed that only dHip-INAC rats were impaired in comparison with their controls, or with each of both other groups ($p < 0.05$). Comparison of performance in each group with chance level further supported the presence of a deficit in only dHip-INAC rats. Indeed, performance significantly exceeded chance in mPFC-CONT, mPFC-INAC and dHip-CONT rats ($p < 0.05$), but did not differ from it in dHip-INAC ones. Analysis of the number of annulus crossings confirmed a performance deficit restricted to dHip-INAC rats (Fig. 3c), as post hoc comparisons showed that only dHip-INAC rats were impaired in comparison with their controls ($p < 0.05$). During the probe trial, thigmotaxis and swim speed were not significantly affected by the inactivation (not shown; see Fig. 3d for an illustration of typical swim paths in the different groups).

Thus, following drug-free learning of the platform location in the water maze, which is considered a typical hippocampus-dependent task, the capability to retrieve a spatial memory was altered by the inactivation of the dHip, but left unaffected by that of the mPFC. This observation is in complete accordance with earlier findings, thereby strengthening their support (e.g., Lopez et al., 2012; Teixeira et al., 2006).

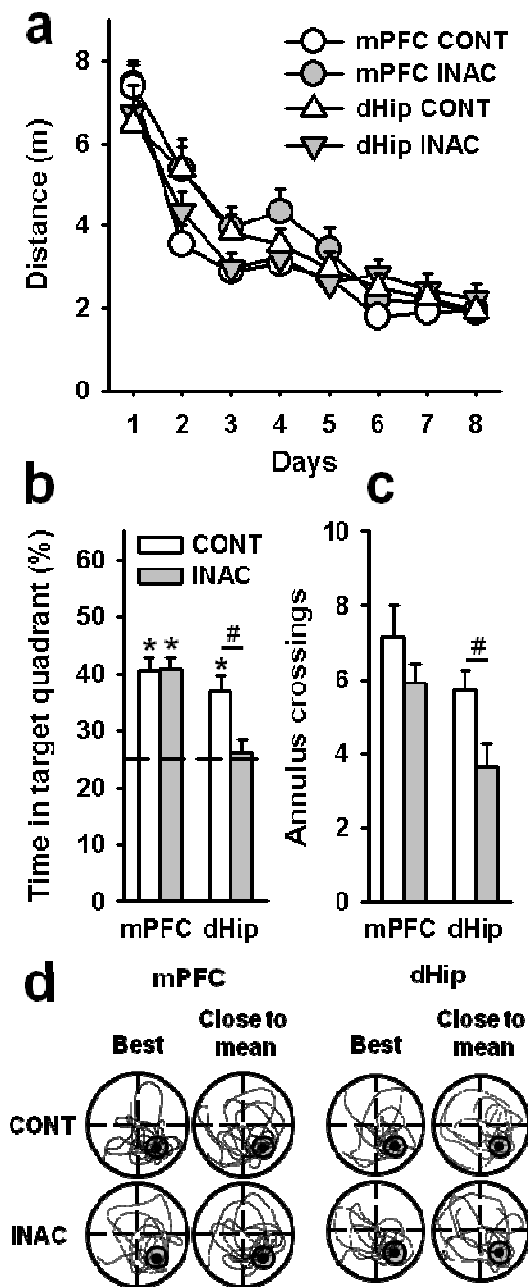


Figure 3

Effects of dHip or mPFC LIDO inactivation on spatial memory retrieval in the hidden version of the water-maze task. **(a)** Drug-free acquisition expressed as average distance to reach the platform (+ SEM) in the rats that were subsequently tested for a probe trial following bilateral LIDO (INAC) or PBS (CONT) infusions. All rats were subjected to 4 daily trials over 8 consecutive days. There was no significant difference among the 4 groups on the last 4 days. Mean performance (+ SEM) during the probe trials were expressed as percent time in the target quadrant **(b)** and number of crossings in the target area **(c)**. The dashed line in **(b)** represents chance level (i.e., 25%). *Statistics*: * significantly different from chance (i.e., 25%), $p < 0.05$; # significantly different, $p < 0.05$. All rats but dHip-INAC ones remembered the platform location and concentrated their searches in the target quadrant where the platform was located during acquisition. Representative swim paths are shown in **(d)**. The examples are from a rat that showed the best performance, i.e., highest percentage of time spent in

the target quadrant (*left*), and from a rat showing performance closest to the group mean (*right*) in each structure group. Abbreviations: dHip-CONT, PBS in the dorsal hippocampus; dHip-INAC, LIDO in the dorsal hippocampus; mPFC-CONT, PBS in the medial prefrontal cortex; mPFC-INAC, LIDO in the medial prefrontal cortex.

Muscimol inactivation of the dHip or the mPFC both disrupted performance in the double-H maze probe trial after drug-free learning

One week after the probe trial in the water maze, we started drug-free training in the double-H maze. This training was organized over two 2-day periods, each ending up with a probe trial after a 1-day rest (see Fig. 1c). Before each probe trial, rats were subjected to muscimol or PBS infusions into the dHip or the mPFC. During training, the distances swum and latencies before reaching the platform shortened over days ($F_{(3,144)} = 118.96$ and 118.97 , respectively, $p < 0.0001$), indicating learning (Fig. 4a,b). There was no significant difference among the four groups, as attested by the absence of significant Group ($F_{(3,48)} = 0.38$ and 0.46 , *ns*) and Group x Day interaction ($F_{(9,144)} = 0.58$ and 0.35 , *ns*) effects. The swim velocities (Fig. 4c) and their increase over days were comparable among all groups ($F_{(9,144)} = 1.23$, *ns*).

The very first 2-movement swim sequence displayed in the first probe trial consisted in a succession of right and left turns, leading rats to the N arm, in 79% rats, while 11% swam directly to the former location of the platform (i.e., NE arm), the other ones reaching another arm, with no significant difference among groups (Chi² statistic). For the second probe trial, they were more than 67% to show such behavior, less than 10% to show a direct swim to the former platform location (i.e., to the NE arm); the other rats swam to the SE or S arms. This behavioral pattern did not differ significantly among mPFC-CONT, mPFC-INAC, dHip-CONT and dHip-INAC groups, whatever the probe trial (Chi² statistic). However, in terms of quantitative variables, clear-cut differences emerged during probe trials, especially during the second one (Fig. 4d-g). The 2 X 2 X 2 ANOVA of the time spent in the place target (NE) showed significant Inactivation ($F_{(1,48)} = 21.22$, $p < 0.001$) and Probe trial ($F_{(1,48)} = 5.49$, $p < 0.05$) effects. None of the interactions was significant. Multiple comparisons showed that the inactivation induced a marked deficit, whatever the region, as compared to control rats, which showed able to search for the platform in the appropriate target, especially during the second probe trial. Indeed, in mPFC-CONT and dHip-CONT rats, performance was significantly above chance ($p < 0.05$), whereas in mPFC-INAC and dHip-INAC rats, it was not different from chance. mPFC-

CONT rats were the only ones to also show above-chance performance in the first probe trial. The analysis of the time spent in the response target (N) showed significant Region ($F_{(1,48)} = 5.19, p < 0.05$), Probe trial ($F_{(1,48)} = 4.17, p < 0.05$) and Region X Probe trial interaction ($F_{(1,48)} = 12.46, p < 0.01$) effects, but no overall Inactivation effect ($F_{(1,48)} = 0.00, ns$) nor any other significant interaction with Inactivation. These effects were essentially due to mPFC rats, whether infused with PBS or MSCl, performing significantly below chance level during the second probe trial in this arm. In the two other groups performance did not differ from chance, whatever the probe trial. Finally, the analysis of the place visit index (Fig. 4f) showed significant effects of Inactivation ($F_{(1,48)} = 9.80, p < 0.01$), Region ($F_{(1,48)} = 4.44, p < 0.05$), Probe trial ($F_{(1,48)} = 5.20, p < 0.05$), and Region X Probe trial interaction ($F_{(1,48)} = 4.20, p < 0.05$) effects. No other interaction was significant. These effects can be explained by performances which, in the second probe trial, were significantly above chance in both control groups, and did not differ thereof in the rats subjected to the inactivation. Swim tracks from a representative rat of each group are shown in Fig. 4g.

Thus, following two learning days, rats from the two control groups did not search for the platform as accurately as after two additional learning days. The inactivation of the mPFC or of the dHip both disabled searching in the appropriate arm.

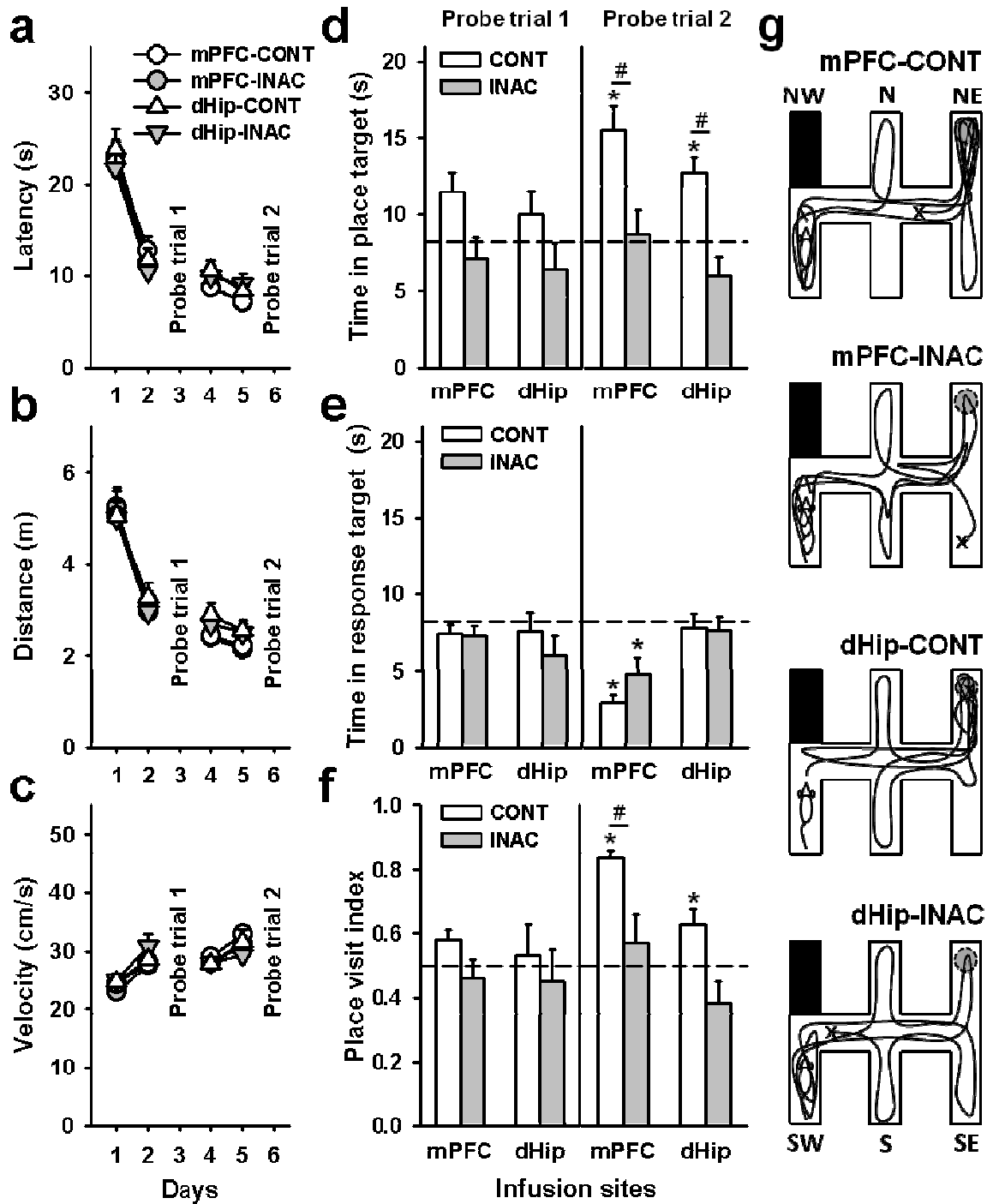


Figure 4

Effects of dHip or mPFC MSCI inactivation on performance in the double-H maze task. Drug-free acquisition expressed as average latency (**a**) and distance (**b**) to reach the platform (+ SEM), as well as swim velocity (**c**). All rats were subjected to 4 daily trials on days 1, 2, 4 and 5. On days 3 and 6, they were given a probe trial after bilateral infusion of MSCI (INAC) or PBS (CONT). Probe trial performance is expressed as the time spent in the place target arm (NE arm) (**d**), the time spent in the response arm (N arm) (**e**), and as a place visit index (**f**) (see details in the method section). Representative swim paths are shown in (**g**) for each group; the letter “x” indicates where the rat was taken out of the maze at the end of the 60-s probe trial. Abbreviations: CONT, PBS infusion; INAC, MSCI inactivation; mPFC, medial prefrontal cortex; dHip, dorsal hippocampus; N, north; NE, north-

east; NW, north-west; S, south; SE, south-east; SW, south-west. Statistics: # significant difference, $p < 0.05$; * significantly different from chance level (indicated by hatched line in d-f), $p < 0.05$.

Experiment 2: inactivation of the ReRh did not impair performance in the water maze probe trial, while altering performance in the double-H maze

Location of the infusion sites and diffusion radius of the drug.

Almost all infusion sites were found to be localized in the ReRh, for most between anteroposterior coordinates -1.8 to 2.6 mm from Bregma (Fig. 5a). Figure 5c shows a typical example of MSCI diffusion after intra-ReRh infusion of fluorescent MSCI (compare with cresyl violet-stained section in Fig. 5b). The MSCI extended to the Rh nucleus. After removal of 6 rats, because of a misplaced cannula, group sizes were as follows: in the water maze experiment, $n_{\text{ReRh-CONT}} = 10$, $n_{\text{ReRh-INAC}} = 13$; in the double-H maze experiment, $n_{\text{ReRh-CONT}} = 11$, $n_{\text{ReRh-INAC}} = 12$.

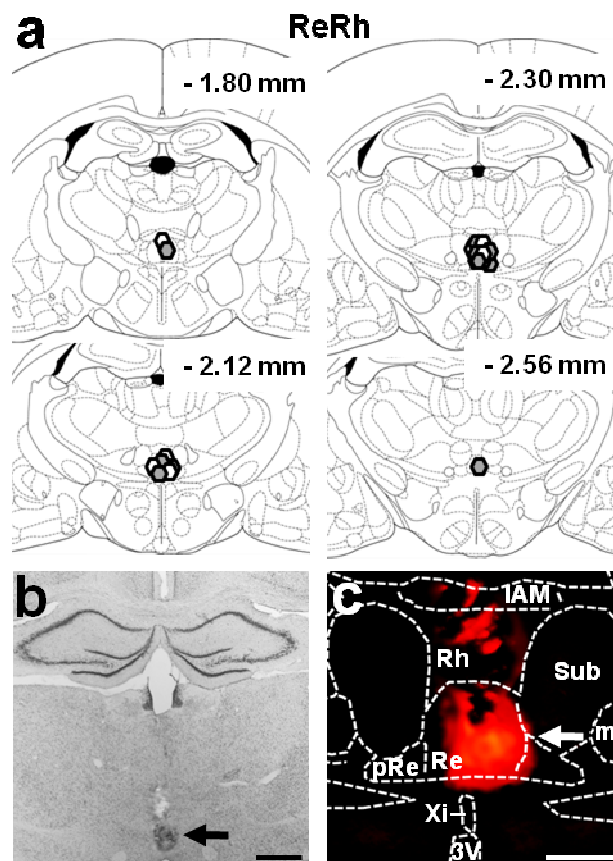


Figure 5

(a) Schematic representation of the infusions sites on coronal sections through the midline thalamus in rats subjected to PBS or MSCI infusion before the probe trial. Behavioral performances are shown in Figures 6 and 7. Coordinates are given in mm from Bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each infusion site is represented by open circles (PBS) or grey triangles (MSCI), the centre of which corresponds to the location of the tip of the infusion needle. (b) Photomicrograph showing a

representative location of the infusion site on a brain section stained with cresyl violet, scale bar = 1 mm. **(c)** Distribution of the fluorescent muscimol solution into ReRh. Scale bar = 500 μ m. The diffusion area appears in red under a fluorescence microscope (excitation 544 nm). Dashed lines delineate the limits of the reuniens nucleus (Re), perireuniens (pRe), submedius nucleus (Sub) interanteromedial nucleus (IAM), xiphoid nucleus (Xi), mammillothalamic tract (mt) and the third ventricle (3V). Rh stands for rhomboid nucleus.

Lidocaine inactivation of the ReRh had no effect on retrieval of the platform location in a water maze task after drug-free learning

As in experiment 1, starting one week post-surgery, the rats were first trained over 8 consecutive days to locate a hidden platform in the water maze. They were subsequently tested in a probe trial with a 24 h post-acquisition delay. During training, the distance to reach the platform declined over days ($F_{(7,182)} = 26.36$, $p < 0.0001$) showing progressive learning of how to reach the location of hidden platform (Fig. 6a). The statistical analysis of the distance traveled by each rat during the acquisition phase revealed no effect of Group (CONT vs. INAC; $F_{(1,26)} = 0.51$, *ns*), and no significant Group X Day interaction ($F_{(7,182)} = 0.42$, *ns*). The analyses of the latencies yielded a similar pattern of effects (not illustrated). All rats showed a decrease in thigmotactic behavior over days ($F_{(7,182)} = 16.90$, $p < 0.001$), with no effect of Group ($F_{(1,26)} = 0.65$, *ns*) (data not shown). Thus, there was equivalent learning in both groups.

ANOVA of the time spent in the target quadrant during the probe trial (Fig. 6b) showed no significant effect of Inactivation ($F_{(1,26)} = 0.19$, *ns*). Comparison of performance in each group with chance level further supported the absence of deficit, as both groups exhibited performance that was significantly above this level ($p < 0.01$). This conclusion was definitely confirmed by an analysis of the number of annulus crossings ($F_{(1,26)} = 0.48$, *ns*; Fig. 6c). During the probe trial, thigmotaxis and swim speed were not significantly affected by Inactivation (not illustrated; see Fig. 6d for an illustration of typical swim paths in both groups). Thus, following drug-free learning of the platform location in a water maze, inactivation of the ReRh did not alter the capability to retrieve a spatial memory usually presented as depending upon the hippocampus.

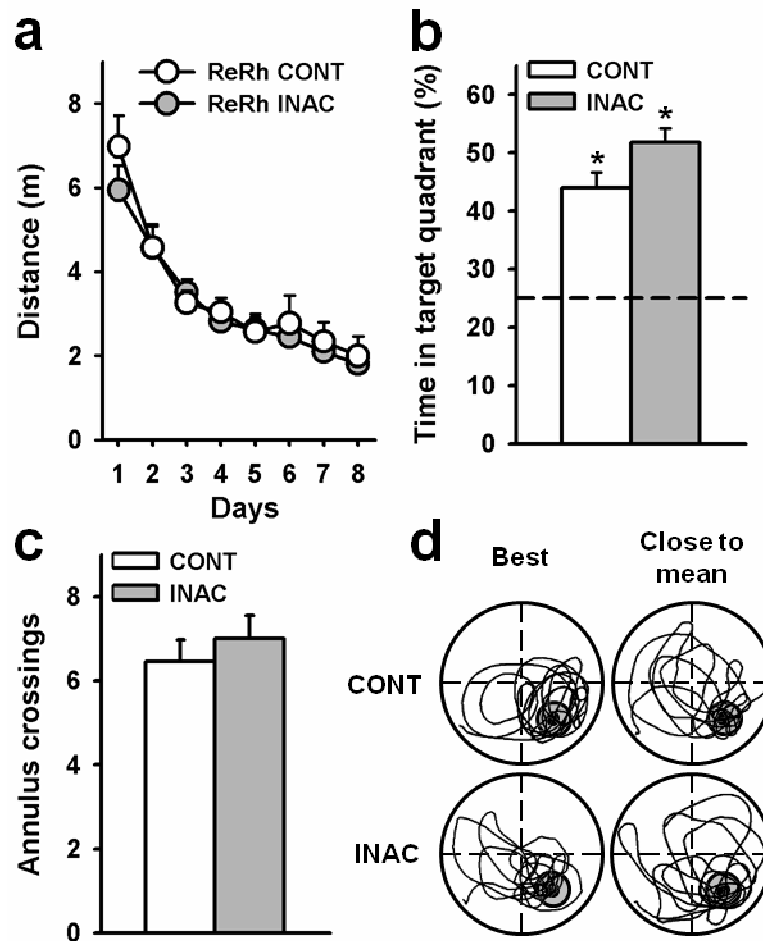


Figure 6

Effects of ReRh LIDO inactivation on spatial memory retrieval in the hidden version of the water-maze task. **(a)** Drug-free acquisition was expressed as average distance to reach the platform (+ SEM) in the rats that were subsequently tested for a probe trial following LIDO (INAC) or PBS (CONT) infusion. All rats were subjected to 4 daily trials over 8 consecutive days. There were no significant differences between the two groups. Mean performance (+ SEM) during the probe trial were expressed as percent time in the target quadrant **(b)** and the number (+ SEM) of crossings in the target area **(c)**. The dashed line in **(b)** represents chance level. * significantly different from chance (i.e., 25%), $p < 0.05$. **(d)** Examples of detailed swim paths during the probe trial. Patterns are shown from rat showing the best performance, i.e., highest percentage of time spent in the target quadrant (*left*), and from a rat showing performance closest to the mean (*right*).

Muscimol inactivation of the ReRh disrupted performance in the probe trial of the double-H maze after drug-free learning

During training, the distances swum and latencies before reaching the platform decreased over days ($F_{(3,63)} = 76.96$ and 71.48 , respectively, $p < 0.0001$), indicating learning (Fig. 7a,b). There was no significant difference among the two groups, as attested by the absence of significant Group ($F_{(1,21)} = 0.08$ and 0.11 , *ns*) and Group x Day interaction ($F_{(3,63)} = 0.79$ and 1.48 , *ns*) effects. The swim velocities and their

increase over days were comparable among the all groups ($F_{(3,63)} = 0.87$, *ns*) (Fig. 7c).

The very first 2-movement swim sequence displayed in the first probe trial consisted in a succession of right and left turns, leading rats to the N arm, in 83% of rats, while 9% swam directly to the former location of the platform, the other ones reaching another arm, with no significant difference among groups (Chi² statistic). For the second probe trial, they were also 83% of rats showing such behavior (i.e., to go to the N arm), less than 10% to show a direct swim to the former platform location (i.e., to the NE arm); the other rats swam to the SE or S arms. This behavioral pattern did not differ significantly among ReRh-CONT and ReRh-INAC groups, whatever the probe trial (Chi² statistic). However, in terms of quantitative variables, clear-cut differences emerged during the probe trials, especially during the second one (Figs. 7d-f). The 2 X 2 ANOVA of the time spent in the place target (NE) showed no significant overall Inactivation ($F_{(1,21)} = 2.96$, *ns*) and Probe trial ($F_{(1,21)} = 2.29$, *ns*) effects (Fig. 7d). The interaction between both factors was significant ($F_{(1,21)} = 5.73$, $p < 0.05$). Multiple comparisons showed that the inactivation induced a marked deficit as compared to control rats during the second probe trial ($p < 0.01$). In ReRh-CONT rats, performance of the second probe trial was significantly above chance ($p < 0.05$), whereas in ReRh-INAC it was not. The analysis of the time spent in the response target (N) showed no significant Inactivation ($F_{(1,21)} = 0.80$, *ns*) and Probe trial ($F_{(1,21)} = 0.06$, *ns*) effects, and the interaction between the two factors was not significant ($F_{(1,21)} = 0.13$, *ns*) (Fig. 7e). Performance in ReRh-INAC rats was significantly below chance level. Finally, the analysis of the place visit index (Fig. 7f) showed a significant effect of the Inactivation ($F_{(1,21)} = 6.12$, $p < 0.05$). ReRh-CONT rats were significantly better than their counterparts and, contrary to the latter, showed performance that was significantly higher than chance level. Swim tracks from a representative rat of each group are shown in Fig. 7g.

Thus, following two learning days, rats from the two groups did not search for the platform as accurately as did the ReRh-CONT rats after two additional learning days. The inactivation of the ReRh clearly disabled searching in the appropriate arm.

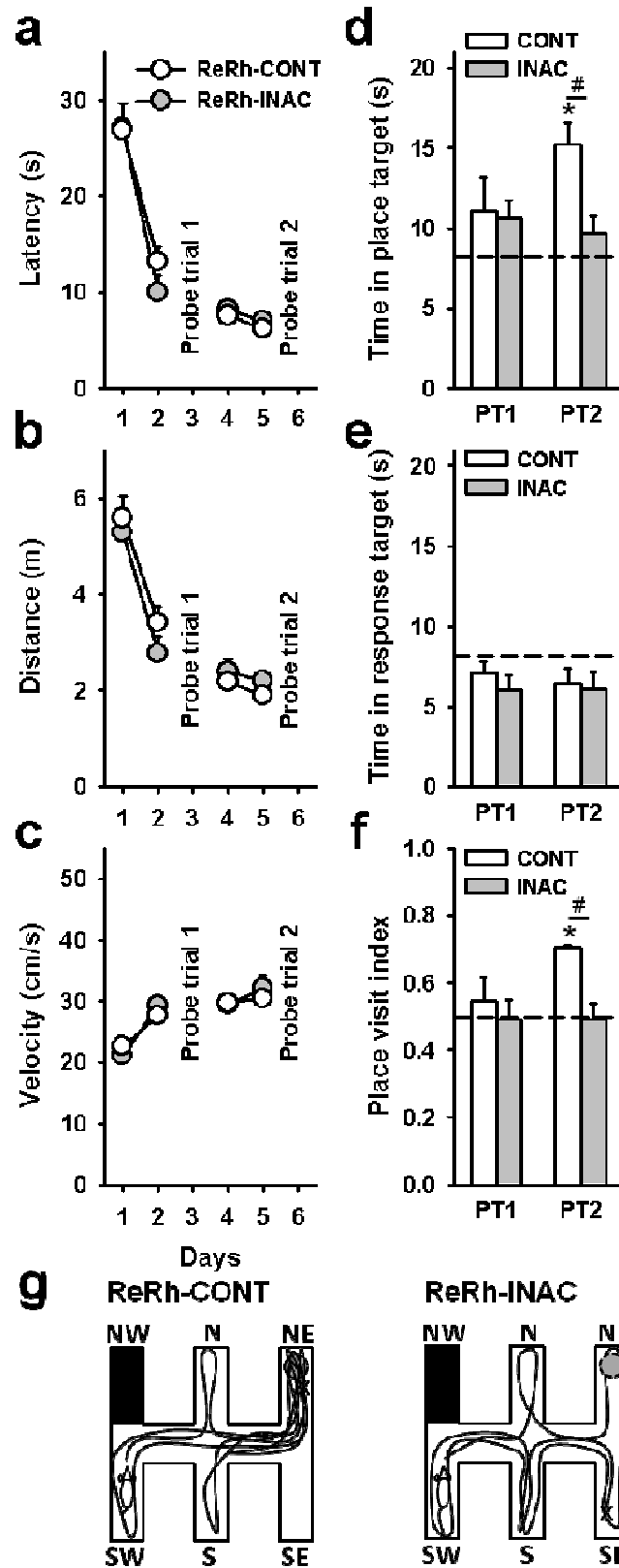


Figure 7

Effects of ReRh MSCI inactivation on performance in the double-H maze task. Drug-free acquisition was expressed as average latency (a) and distance (b) to reach the platform (+ SEM), as well as swim

velocity (**c**). As in experiment 1, all rats were subjected to 4 daily trials on days 1, 2, 4 and 5. On days 3 and 6, they were given a probe trial after bilateral infusion of MSCI (INAC) or PBS (CONT). Probe trial performance was shown as the time spent in the place target arm (NE arm) (**d**), time spent in the response arm (N arm) (**e**), and as a place visit index (**f**). Representative swim paths were shown in (**g**); the letter “x” indicating where the rat was taken out of the maze at the end of the 60-s probe trial. For abbreviations see legend of Figure 4, ReRh = reuniens and rhomboid nuclei of the ventral midline thalamus. *Statistics*: # significant difference, $p < 0.05$; * significantly different from chance level (indicated by hatched line in d-f), $p < 0.05$.

Discussion

Using the water maze, we confirmed that reversible inactivation of the dHip disrupts retrieval of a recently acquired spatial memory. As can be expected from the literature, this effect was mimicked neither by mPFC nor by ReRh inactivation. In the double-H maze, however, we show for the first time that the inactivation of the ReRh induces performance alterations which are closely mimicked by dHip or mPFC inactivation. Such dissociations among tasks/regions demonstrate that while the dHip – not the mPFC or ReRh – is essential for retrieving a recently acquired spatial memory, all three structures participate, most probably in a cooperative way, in behavioral adaptations to negative feedback requiring a shift from a response strategy, which was affected by none of the inactivations, to a strategy engaging the use of a memory for place. The fact that inactivation of the mPFC and ReRh had no detectable effects on water maze performance suggests that, in the double-H maze, it is not the spatial memory system per se which is affected by the inactivation of the ReRh, but most probably the process triggering the shift from the inappropriate to the appropriate strategy. This cognitive operation might require a coordinated interaction between the mPFC, as the potential set-shifting structure, and the dHip, as the spatial memory substrate. Given the reciprocal connectivity of the ReRh with both structures, we propose a role for the ReRh in the regulation of strategy shifting underlying behavioral flexibility and thus adaptations to modifications of environmental demands.

Hippocampal, not medial prefrontal or reuniens-rhomboid nuclei inactivation alters spatial memory retrieval in the water maze

As concerns mPFC and dHip inactivation effects and as long as recent memory is concerned, our data from the water maze task are fully in line with the literature (Broadbent et al., 2006; Klur et al., 2009; Lopez et al., 2012; Teixeira et al., 2006).

Regarding the ReRh, Doleman van der Weel et al. (2009) found that its lesion did not obliterate the ability to learn a water maze task and to subsequently remember the platform location in a probe trial. Probe trial performance, however, was below that observed in controls. To this difference the authors proposed a nonmnemonic interpretation considering that rats with ReRh encountered problems in strategy shifting. In the current study, we did not confirm this observation, as was also the case in our former study which compared recent to remote memory recall after permanent or reversible ReRh lesions (Loureiro et al., 2012). In both our studies, probe trial performance tested either 1 or 5 days post-acquisition was extremely similar in inactivated and control rats. The absence of spatial memory deficits in the water maze probe trial provides a strong demonstration that the lidocaine- or muscimol-induced inactivation of the ReRh neither disrupted cognitive processes supporting recent spatial memory retrieval, nor produced arousal, sensorimotor, cue-processing or motivation deficiencies impacting on performance (see also Loureiro et al., 2012).

Inactivation of the prefrontal cortex, hippocampus, or ventral midline thalamus induce comparable deficits in the double-H maze

The double-H maze is a novel device in which we recently validated a series of response or place learning tasks, and checked their sensitivity to either amnestic drugs or protocol manipulations (Cassel et al., 2012; Pol-Bodetto et al., 2011). In one of these protocols, we trained rats from a constant start (S) to a constant target arm (NE). When subsequently tested in a misleading probe trial (with a 60-cm translation to the left of the start arm, as in the present experiments), most rats first engaged a behavior driven by response memory, but then shifted to a behavior driven by place memory, indicating a high degree of flexibility in their cognitive processing of the situation (Cassel et al., 2012). In the current study, the training protocol was slightly different from the one used by Cassel et al (2012). Rats had to use one out of two efficient response sequences depending on the arm from which the trials were started. For the probe trials, however, they had no constraint hindering the shift to place memory-driven behavior. Furthermore, all rats were given two probe trials, one after two training days (which were not sufficient to enable focused search in the target arm) and another one after two additional days. Interestingly, in all three control groups, the shift to place memory-driven behavior eventually occurred in the

second probe trial, as control rats, whatever the infusion site, spent more time in the former target arm than in the other ones, and therein performed significantly above chance level. This focused search pattern was not observed after dHip, mPFC, or ReRh inactivation, suggesting a disruption of either spatial memory processing or of strategy shifting. The fact that dHip-INAC rats were also impaired in the water maze suggests that these rats could have had trouble in retrieving the spatial memory in both tasks. We have no arguments to exclude a genuine spatial memory retrieval deficit in the double-H after dHip inactivation. The fact that mPFC-INAC and ReRh-INAC rats performed normally in the water maze indicates that neither mPFC nor ReRh contributes significantly to recent spatial memory retrieval, so that an alternative interpretation must be proposed. In many experiments, it was shown that functional alterations of the mPFC do not induce dramatic alterations of learning and memory functions but rather affect the capability of shifting to the correct strategy when task contingencies or environmental conditions are modified (e.g., Block et al., 2007; Dias and Aggleton, 2000; Oualian and Gisquet-Verrier, 2010; Ragozzino et al., 1999). Therefore, it is well possible that following mPFC inactivation, rats just became unable to properly manage this shift to a place memory-based behavior despite their intact memory for the training location of the platform. Why then the same effects after ReRh inactivation? An adapted behavior supposes not only the mPFC-dependent shift to be operated, but also the memory for place to be conjointly retrieved, a process for which the hippocampus is important. In other words, the most adapted behavior requires interactions between mPFC (for shifting) and dHip (for memory retrieval). In all tasks requiring such interactions and in which the effects of ventral midline thalamus lesion or inactivation have been explored, deficits were found. Hembrook et al. (2012) found evidence for impaired delayed nonmatching to position performance in operant chambers after ReRh inactivation, a task sensitive to either mPFC or hippocampal lesions. These authors also reported that permanent ReRh lesions altered win-shift performance in a radial maze, a task requiring coordinated activation of mPFC and hippocampus (Hembrook and Mair, 2011). Finally, we recently found that permanent ReRh lesions did not prevent water maze acquisition or recent memory retrieval, but obliterated memory persistence (Loureiro et al., 2012), for which cortico-hippocampal interactions are crucial (e.g. rev Frankland and Bontempi, 2005). All these findings along with the current ones are in complete agreement with neuroanatomical and electrophysiological findings. First,

neurons from the reuniens and rhomboid nuclei have, among others, dense overlapping terminal fields in region CA1 of the hippocampus and in the mPFC (Vertes et al., 2006). A recent study even found a subpopulation of Re neurons with axon collaterals in each terminal field (Hoover and Vertes, 2012). As there are direct projections from the hippocampus to the mPFC, but no return projection from the mPFC to the hippocampus, the ReRh thus appears as a crucial relay in cortico-hippocampo-cortical interactions (see Figure 8). Second, Di Prisco and Vertes (2006) reported that stimulation of the ReRh induced strong, monosynaptic activations in the PFC (see also Eleore et al., 2011). Dolleman-Van der Weel (1997) had shown earlier that stimulation of the Re induced activity changes in the CA1 region of the hippocampus. Furthermore, Zhang et al. (2012) reported that systemic blockade of NMDA receptors by ketamine produced a coherent increase of activity in both the reuniens and hippocampus, and blockade of the reuniens by muscimol infusion reduced the ketamine-induced changes in the hippocampus.

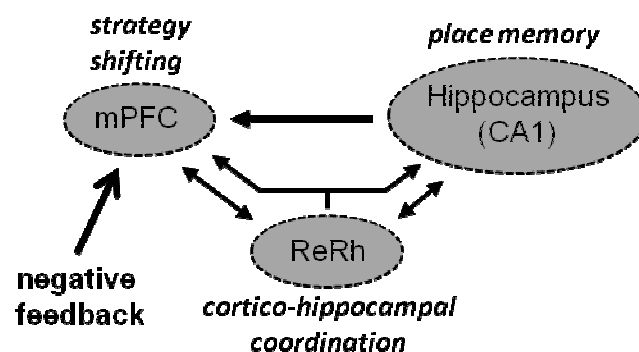


Figure 8

Proposed functional model of hippocampo-cortico-thalamic interactions underlying strategy-shifting in the double-H maze test. The hippocampus (CA1), the medial prefrontal cortex (mPFC) and the reuniens/rhomboid nuclei (ReRh) of the ventral midline thalamus belong to a system characterized by a connectivity encompassing direct projections from the hippocampus to the mPFC, without any direct return projections, reciprocal connections of the ReRh with the mPFC and with the hippocampus, and, in the Re, neurons having an axon projecting collaterals in each of the cortical and hippocampal terminal fields (Hoover and Vertes, 2012). Our double-H maze data are compatible with a functional model in which negative feedback may trigger a mPFC-dependent shift towards a hippocampus-dependent strategy engaging a place memory. The crucial functional relay in this cooperation could be one or both nuclei of the ventral midline thalamus, namely the reuniens nucleus or/and the rhomboid nucleus.

Conclusions

Altogether, our current data indicate that, in the double-H maze, a behavioral adaptation to a task contingency modification requiring a shift towards the use of a

memory for location might operate in a distributed circuit encompassing the mPFC as the possible shift-triggering (or inappropriate strategy inhibiting) structure, the hippocampus as the substrate from where the place memory is retrieved, as well as the ventral midline thalamus, and therein the ReRh, as a potential coordinator of this processing. Therefore, the ReRh could be a crucial conductor of the dynamic interactions between the mPFC and the hippocampus and thus a major subcortical actor of behavioral flexibility. Beside their fundamental interest, these findings provide a significant contribution to our understanding of the cognitive alterations characterizing diencephalic amnesia associated with stroke or Korsakoff's syndrome. Our results could also be of some interest regarding our interpretation of cognitive symptoms seen in schizophrenia. Indeed, the Re was recently proposed as a possible link of a loop contributing to the psychotic break in schizophrenic patients (Lisman et al., 2010; Zhang et al., 2012). Finally, these results might shed further light on our understanding of neurological or psychiatric diseases characterized by symptoms of cognitive flexibility failures.

References

- Aggleton JP, Dumont JR, Warburton EC (2011) Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: a review. *Learn Mem* 18: 384-400.
- Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22: 425-444.
- Block AE, Dhanji H, Thompson-Tardif SF, Floresco SB (2007) Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting. *Cereb Cortex* 17(7): 1625-1636
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13: 187-191.
- Carlesimo GA, Costa A, Serra L, Bozzali M, Fadda L, Caltagirone C (2011) Prospective memory in thalamic amnesia. *Neuropsychologia* 49: 2199-2208.
- Cassel R, Kelche C, Lecourtier L, Cassel JC (2012) The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats. *Behav Brain Res.* 230(2): 333-342.
- Di Prisco GV, Vertes RP (2006) Excitatory actions of the ventral midline (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60(1): 45-55.
- 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 behavioral flexibility. *Eur J Neurosci* 12: 4457-4466.
- Dolleman-van der Weel MJ, Witter MP (1996) Projections from the nucleus reuniens thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. *J Comp Neurol* 364: 637-650.
- Dolleman-Van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP (1997) Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J Neurosci.* 17(14): 5640-5650.
- Dolleman-van der Weel MJ, Morris RGM, Witter MP (2009) Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Struct Funct* 213: 329-342.

- Edeline JM, Hars B, Hennevin E, Cotillon N (2002) Muscimol diffusion after intracerebral microinjections : a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol Learn Mem* 78: 100-124.
- Eleore L, Lopez-Ramos JC, Guerra-Narbona R, Delgado-Garcia JM (2011) Role of reuniens nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. *Plos one* 6(8): e23538.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nature Rev Neurosci* 6: 119-130.
- Floresco SB, Block AZ, Tse MT (2008) Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behav Brain Res.* 90(1): 85-96.
- Gold JJ, Squire LR (2006) The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learn Mem* 13: 699-710.
- Hembrook JR, Mair RG (2011) Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21: 815-826.
- Hembrook JR, Onos KD, Mair RG (2012) Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the Rat. *Hippocampus* 22: 853-860.
- Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct* 217: 191-209.
- Klein RL, Mascia MP, Harkness PC, Hadingham KL, Whiting PJ, Harris RA (1995) *J Pharmacol Exp Ther.* 274(3): 1484-1492.
- Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard J, 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: 800-816.
- Lisman JE, Pi HJ, Zhang Y, Otmakhova NA (2010) A thalamo-hippocampal-ventral tegmental area loop may produce the positive feedback that underlies the psychotic break in schizophrenia. *Biol Psych* 68: 17-24.
- 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 *J Neurosci* 29: 3302-3306.

- Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22: 827-841.
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A (2012) The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J Neurosci*, in press.
- Mekta AK, Ticku MK (1992) Chronic GABA exposure down-regulates GABA-benzodiazepine receptor-ionophore complex in cultured cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 16(1-2): 29-36.
- Oualian C, Gisquet-Verrier P (2010) The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioral flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task. *Learn Mem* 17(12): 654-668.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Ed 4. San Diego: Academic Press.
- Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, Geiger K, Cassel JC (2011) The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav Brain Res*. 218: 138-151.
- Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP (1999) Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *J Neurosci* 19(11): 4585-4594.
- Ragozzino ME, Kim J, Hassert D, Minniti N, Kiang C (2003) The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behav Neurosci*. 117(5): 1054-1065.
- Roca DJ, Rozenberg I, Farrant M, Farb DH (1990) Chronic agonist exposure induces down-regulation and allosteric uncoupling of the gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex. *Mol Pharmacol*. 37(1) 37-43.

- Su HS, Bentivoglio M (1990) Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 297: 582-593.
- 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: 7555-7564.
- Van Der Werf YD, Jolles J, Witter MP, Uylings HBM (2003) Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex* 39: 1047-1062.
- van Duuren E, van der Plasse G, van der Blom R, Joosten RN, Mulder AB, Pennartz CM, Feenstra MG (2007) Pharmacological manipulation of neuronal ensemble activity by reverse microdialysis in freely moving rats: a comparative study of the effects of tetrodotoxin, lidocaine, and muscimol. *J Pharmacol Exp Ther.* 323: 61-69.
- 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. *J Comp Neurol* 499: 768-796.
- Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranth C (2007) Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull* 71: 601-609.
- Zhang Y, Yoshida T, Katz DB, Lisman JE (2012) NMDAR antagonist action in thalamus imposes delta oscillations on the hippocampus. *J Neurophysiol* : in press.

Discussion Générale et Perspectives

Discussion Générale et Perspectives

Cette thèse avait pour objectif d'étudier l'implication de l'HPC ventral et des noyaux Re et Rh du thalamus dans les processus cognitifs qui sous-tendent la mémoire spatiale. Par la mise en œuvre d'une technique d'inactivation fonctionnelle réversible par instillation intra-hippocampique de lidocaïne, nous avons pu mettre en évidence l'implication spécifique de l'HPC ventral dans le rappel d'une mémoire spatiale de référence récente (24h et 5 jours) en piscine de Morris, tout en confirmant le rôle crucial de l'HPC dorsal à la fois dans l'acquisition et le rappel (Publication 1). De plus, nous avons montré, et ceci pour la première fois, un rôle probable des noyaux Re et Rh du thalamus dans la persistance d'une mémoire spatiale chez le Rat. Cette hypothèse est appuyée par des données que nous avons obtenus à partir : 1) de la quantification de l'expression du gène précoce c-fos dans les noyaux Re et Rh à deux délais post-acquisition (5 vs 25 jours) dans le test de la piscine de Morris ; 2) de l'étude des conséquences d'une lésion excitotoxique des noyaux Re et Rh dans le même test de mémoire spatiale ; et 3) des effets d'une inactivation fonctionnelle réversible par instillation intra-thalamique de lidocaïne, réalisée juste avant un test de rappel effectué soit à 5 ou 25 jours après la fin de l'acquisition (Publication 2). Enfin, nous avons démontré l'implication des noyaux Re et Rh dans le labyrinthe du double-H, un test mettant en jeu la mémoire spatiale, dépendant de l'HPC dorsal, et des capacités d'adaptations comportementales, impliquant le mPFC (Publication 3).

1. Le rappel d'une mémoire spatiale nécessite l'engagement d'un réseau distribué au sein de l'hippocampe

Depuis la publication d'une revue influente, écrite par Moser et ses collaborateurs en 1998, l'idée d'une ségrégation anatomique des fonctions hippocampiques avec un HPC dit « froid », impliqué dans les processus cognitifs, et un HPC dit « chaud », impliqué dans le traitement des émotions, a donné lieu à de nombreuses expériences qui ont, en partie, validé cette hypothèse. Selon ces auteurs, l'HPC dorsal serait impliqué de façon privilégiée dans le traitement et la rétention des informations spatiales alors que l'HPC ventral serait plutôt impliqué dans le traitement des émotions. L'idée d'une implication différentielle de ces deux sous-régions hippocampiques, dorsale pour la cognition et ventrale pour le traitement des émotions, s'est appuyée sur trois arguments principaux. Premièrement, les connexions

anatomiques de l'HPC avec le cortex entorhinal se font selon un gradient dorso-ventral qui a pour conséquence une arrivée vers l'HPC dorsal des principales informations sensorielles corticales nécessaires au codage de l'information spatiale (Fanselow et Dong, 2010 ; Witter et Amaral, 2004). En effet, l'HPC dorsal reçoit des informations visuo-spatiales en provenance de la partie dorso-latérale du cortex entorhinal. De plus, cette région du cortex entorhinal possède des cellules de la grille beaucoup plus précises dans leur codage de l'espace par rapport aux cellules de la grille de la partie ventro-médiane du cortex entorhinal, une région corticale connectée à l'HPC ventral. Ces caractéristiques anatomiques sont en adéquation avec le fait que les cellules de lieu de l'HPC dorsal possèdent des champs d'activité beaucoup moins étendus, donc probablement plus précis, par rapport aux cellules de lieu de l'HPC ventral (Kjelstrup et coll., 2008 ; Maurer et coll., 2008 ; Moser et Moser, 1998 ; Poucet et coll., 1994). Deuxièmement, la lésion de l'HPC dorsal entraîne une diminution significative des performances des rats dans le test de la piscine de Morris, ce qui n'est pas observé lorsque l'HPC ventral est lésé (Moser et Moser, 1995). Ces résultats peuvent également être observés dans le test du labyrinthe radial (Pothuizen et coll., 2004). Troisièmement, une lésion de l'HPC ventral, et non de l'HPC dorsal, entraîne des modifications du niveau d'anxiété des animaux (Kjelstrup et coll., 2002). Ces observations à propos de l'implication fonctionnelle de l'HPC ventral sont confortées par des données neuroanatomiques, à savoir les connexions de cette sous-région hippocampique avec l'amygdale, l'hypothalamus et l'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien, des régions et circuits neuroendocriniens bien connus pour participer au traitement des émotions et aux effets physiologiques qui les accompagnent (Jay et coll., 1989). Cependant, à côté de ces différences, l'HPC dorsal et l'HPC ventral partagent aussi des similitudes, particulièrement au niveau du fonctionnement de la boucle tri-synaptique intra-hippocampique (Witter et Amaral, 2004). En effet, les connexions entre le gyrus denté, CA3 et CA1 sont comparables du pôle septal au pôle temporal de l'HPC. De plus, l'HPC possède des connexions intrinsèques permettant aux sous-régions hippocampiques de communiquer entre elles et de ce fait, susceptibles d'engager l'intégralité de l'HPC dans un processus unique de traitement des informations corticales, en particulier des informations de nature spatiale.

En ce qui concerne la mémoire, au moment où nous avons commencé notre étude, certains travaux suggéraient cependant que l'HPC ventral pourrait contribuer au traitement de l'information spatiale, en particulier au rappel de ce type d'information. En effet, plusieurs travaux expérimentaux ont montré que l'HPC ventral seul peut permettre l'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale en piscine de Morris lorsque le protocole est adapté (De Hoz

et coll., 2003). Dans l'étude de De Hoz et coll. (2003), les auteurs ont évalué les performances de rats ayant des lésions partielles de l'HPC, laissant 20 à 40 % de la partie septale ou temporale de l'HPC intacte. Pour ce faire, ils les ont testés en piscine de Morris en utilisant un protocole de mémoire spatiale de référence identique à celui que Moser et Moser ont utilisé dans leur travail publié en 1995 (8 essais par jour pendant 6 jours). Les performances relevées dans ce test ont été comparées à celles de rats pour qui le protocole d'apprentissage était plus long avec des essais plus espacés dans le temps (4 essais par jour pendant 8 jours). Les résultats du test de rétention ont montré qu'en utilisant le second protocole, les animaux ayant l'HPC ventral intact développaient une préférence de place pour le quadrant de la piscine dans lequel se situait la plateforme lors de l'acquisition de la tâche. Ces données suggèrent donc que l'HPC ventral est suffisant pour sous-tendre l'apprentissage et la rétention d'une mémoire spatiale de référence (De Hoz et coll., 2003). Par ailleurs, l'étude de l'activation du gène précoce *c-fos* montre que l'HPC ventral est activé de la même manière que l'HPC dorsal lors d'un test de mémoire spatiale de travail (Vann et coll., 2000). De plus, Gusev et ses collaborateurs (2005) ont montré une augmentation significative de l'expression du gène précoce *Arc/Arg 3.1* au niveau de l'HPC ventral lors du rappel récent (24h) d'une mémoire spatiale de référence. Ces auteurs ont également montré que cette augmentation ne persistait pas dans le temps. En effet, lorsque les rats étaient testés à un délai plus long (1 mois), l'expression du gène *Arc/Arg3.1* dans l'HPC ventral était significativement moins importante que lors du test à 24h. Des données similaires ont été obtenues à partir d'une quantification de l'expression du gène précoce *zif268* ou d'une évaluation de la consommation de 2-deoxyglucose, un marqueur de l'activité métabolique, au niveau de l'HPC ventral, dans des tests évaluant la mémoire spatiale (Maviel et coll., 2004 ; Bontempi et coll., 1999). Concernant l'implication de l'HPC ventral dans le rappel d'une mémoire spatiale en fonction de l'ancienneté du souvenir, les données de la littérature concernant l'effet d'une lésion diffèrent par rapport aux données d'imagerie cérébrale présentées ci-dessus. En effet, la lésion de l'HPC ventral chez le Rat affecte le rappel aussi bien à un délai récent (24h) qu'à un délai ancien (au-delà d'un mois) dans un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris (Martin et coll., 2005), mais également dans un test de peur conditionnée au contexte ou au son (Sutherland et coll., 2008 ; 2010).

Les expériences effectuées lors de ma première année de thèse (Publication 1) viennent compléter ces données concernant l'implication de l'HPC ventral dans le rappel récent d'une mémoire spatiale de référence. En effet, l'objectif principal de cette étude était d'examiner le

rôle de l'HPC ventral par rapport à celui de l'HPC dorsal, dans l'acquisition et le rappel d'une mémoire spatiale de référence dans le test de la piscine de Morris. L'originalité de notre étude consistait à comparer, et ce pour la première fois dans une même étude, le rôle des deux sous-régions hippocampiques, à la fois sur l'acquisition et le rappel d'une mémoire spatiale de référence, et cela en utilisant une approche d'inactivation fonctionnelle réversible par instillation intra-cérébrale de lidocaïne. Les études précédentes avaient, pour l'essentiel, utilisé des lésions permanentes. Ainsi, nous avons mis en évidence l'implication spécifique de l'HPC ventral dans le rappel d'une mémoire spatiale de référence en piscine de Morris aux deux délais testés, soit 1 et 5 jours post-apprentissage. Nous avons pu établir que l'inactivation de l'HPC ventral juste avant chaque session d'acquisition n'avait pas altéré les performances d'apprentissage des animaux. De plus, nous avons confirmé le rôle essentiel de l'HPC dorsal à la fois lors de l'acquisition et du rappel d'une mémoire spatiale de référence (voir Figure 3, 5 et 6 de la Publication 1).

Ainsi, les données obtenues après une inactivation des sous-régions hippocampiques juste avant les tests de rétention confirment l'existence d'un réseau distribué au sein de l'HPC, selon son axe longitudinal, impliqué dans le rappel d'un souvenir spatial. Lorsque l'HPC est intacte lors de l'acquisition, c'est l'ensemble de l'HPC qui serait nécessaire au rappel d'une mémoire spatiale, une proposition qu'avaient déjà évoquée Moser et Moser en 1998. Cependant, l'acquisition de la tâche est possible avec seulement l'une ou l'autre des sous-régions hippocampiques, bien que de manière moins efficace lorsque c'est l'HPC dorsal qui est temporairement inactivé ; en effet, les performances de rappel à 24h étaient altérées chez les rats dont l'HPC dorsal a été inactivé au cours de l'apprentissage, comparativement à celles relevées chez les rats dont l'HPC ventral a été inactivé. Ces conclusions permettent de supposer que lorsque l'une ou l'autre région était inactivée, la partie hippocampique restée opérationnelle fonctionnait normalement et que la zone d'inactivation demeurait limitée à la sous-région ciblée. La dissociation que nous avons observée quant aux effets d'une instillation de lidocaïne dans les deux sous-régions hippocampiques avant chaque session d'acquisition est un argument en faveur de la préservation du fonctionnement de l'HPC dorsal lorsque l'HPC ventral était inactivé. En effet, l'inactivation de l'HPC ventral n'a pas eu de répercussions sur les capacités des animaux à apprendre la localisation d'une plateforme en piscine de Morris. Si l'instillation de lidocaïne dans l'HPC ventral avait entraîné des perturbations du fonctionnement de l'HPC dorsal, nous aurions dû observer le même profil de perturbation après l'inactivation de chacune des deux sous-régions hippocampiques. Or, tel

n'a pas été le cas. Enfin, l'examen qualitatif de l'étendue de la diffusion de la lidocaïne par l'utilisation d'une solution contenant du bleu Evans a permis d'exclure une possible diffusion de la substance dans l'HPC dorsal lorsque les instillations étaient réalisées dans l'HPC ventral (voir Figure 2 de la Publication 1). Il est à noter toutefois qu'il n'est pas possible d'être certain que l'étendue de la diffusion de la lidocaïne est strictement comparable à celle du bleu Evans.

Hypothèse d'un continuum dorso-ventral lors du rappel d'une mémoire spatiale.

Nos données ne confirment pas l'idée d'une ségrégation anatomique stricte des fonctions hippocampiques. Elles seraient plutôt compatibles avec celle d'un réseau distribué au sein de l'HPC, au moins pour ce qui concerne la mémoire spatiale. Cependant, on ne peut exclure l'hypothèse d'un rôle de l'HPC ventral qui pourrait être différent de celui de l'HPC dorsal, bien que l'inactivation des deux sous-régions hippocampiques ait perturbé de façon similaire le rappel. Par leurs propriétés anatomiques et électrophysiologiques, chaque sous-région pourrait être engagée dans une composante distincte du processus de rappel d'un souvenir. Ainsi, l'opération consistant à localiser un endroit précis de même que les processus de navigation pourraient impliquer plutôt l'HPC dorsal, et notamment les cellules de lieux présentes dans cette région. Par contre, le contrôle comportemental nécessaire à une bonne réalisation de la tâche pourrait impliquer préférentiellement l'HPC ventral. Ainsi, les connexions entre l'HPC et les régions cérébrales qui participent au contrôle comportemental nécessaire à la réalisation d'une performance mnésique montrent un gradient inverse à celui observé avec le cortex entorhinal et la précision du traitement des informations spatiales. En effet, les connexions avec le mPFC, le noyau accumbens, le striatum médiodorsal, l'amygdale, l'hypothalamus et les modulations de la transmission dopaminergique via l'aire tegmentale ventrale se font principalement avec la partie ventrale de l'HPC et non avec sa partie dorsale (Andersen et coll., 2007 ; Bast, 2007). En accord avec ces données anatomiques, de nombreuses fonctions impliquées dans le contrôle comportemental incluant l'activité locomotrice et les processus liés à la peur et l'anxiété sont plus fortement modulées par des manipulations (lésions ou inactivations) de l'HPC ventral par rapport à des manipulations du même ordre de l'HPC dorsal (Bast, 2007 ; Bannerman et coll., 2004 ; Bast et Feldon, 2003). De plus, l'activité neuronale corrélée à l'anxiété et à l'intégration d'une récompense est plus prononcée dans la partie temporale en comparaison à la partie septale de l'HPC. Pour résumer (voir Figure 30), alors que l'HPC dorsal, notamment par l'intermédiaire de ses interactions avec le cortex entorhinal dorsolatéral, participerait de façon privilégiée aux

traitements et à la rétention d'information spatiale, l'HPC ventral serait plus impliqué dans le contrôle comportemental impliquant des fonctions sous-tendues par le mPFC, des régions sous-corticales et la transmission dopaminergique via des projections vers l'aire tegmentale ventrale (Bast et coll., 2007 ; Bast, 2011).

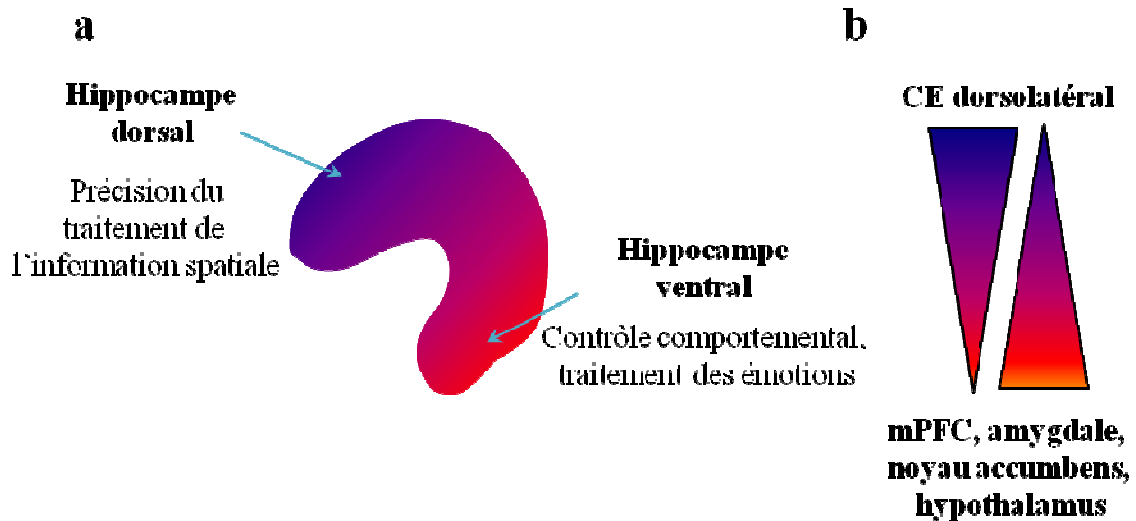


Figure 30. Continuum dorso-ventral dans les processus cognitifs qui sous-tendent la mémoire spatiale. (a) L'hippocampe dorsal (en bleu) est impliqué de façon privilégiée dans la navigation spatiale alors que l'hippocampe ventral (en rouge) est plus connu pour son rôle dans le contrôle comportemental et le traitement des émotions. (b) Ces distinctions fonctionnelles sont sous-tendues par des gradients de connexions anatomiques montrant une densité importante de connexions entre le cortex entorhinal (CE) dorsolatéral (relayant les informations visuo-spatiales) et l'hippocampe dorsal et un gradient inverse pour ce qui concerne les connexions entre l'hippocampe ventral et les régions impliquées dans le contrôle comportemental et le traitement des émotions.

La connexion unidirectionnelle de l'HPC ventral vers le mPFC est particulièrement intéressante dans le cadre de cette discussion. En effet, certaines cellules du mPFC ont pour particularité de coder l'emplacement d'objectifs au sein d'un environnement exploré par un animal (Hok et coll., 2005). Cette capacité du mPFC à encoder l'objectif que le rat doit atteindre est un processus indispensable pour planifier la trajectoire que l'animal va suivre lors d'un test de navigation spatiale. Récemment, Burton et ses collaborateurs (2009) ont montré qu'une lésion de l'HPC ventral altère cette modulation de l'activité des neurones du mPFC en lien avec l'objectif à atteindre. Ainsi, dans notre étude, l'inactivation de l'HPC ventral a pu perturber le transfert d'information vers le mPFC, nécessaire pour une stratégie de recherche efficace lors du test de rappel en piscine de Morris. L'importance des interactions entre le lobe temporal médian et le cortex préfrontal, lors de l'encodage et du recouvrement d'informations de type épisodique (sous-système de mémoire associé à un contexte spatio-temporel précis), a également été démontrée chez l'Homme, et ceci dans plusieurs tâches mnésiques (pour revue voir Siemons et Spiers, 2003). Enfin, au sein de

l'HPC, un dialogue entre les deux sous-régions dorsale et ventrale est rendu possible par leurs connexions intrinsèques (Amaral et Witter, 1989), mais également par le biais de structures extra-hippocampiques telles que les cortex périrhinal et postrhinal, ou encore l'amygdale, le cortex préfrontal, voire le noyau reuniens du thalamus (Witter et Amaral, 2004 ; Vertes et coll., 2007 ; Fanselow et Dong, 2010). L'altération fonctionnelle de l'HPC ventral pourrait donc perturber de façon directe ou indirecte le traitement de l'information spatiale réalisé au niveau de l'HPC dorsal. En conclusion, les particularités anatomo-fonctionnelles de ces deux sous-régions hippocampiques pourraient favoriser l'échange d'information de l'une vers l'autre, et par ce biais permettre la réalisation de fonctions cognitives complexes impliquant des processus différents mais complémentaires. Nos données étayent donc l'idée d'un continuum dorso-ventral plutôt que celle d'une ségrégation stricte des fonctions hippocampiques selon son axe longitudinal, au moins pour le rappel d'une information spatiale, avec l'idée que ces deux sous-régions puissent participer à des processus complémentaires indispensables à une performance optimale.

2. Rôle des noyaux reuniens et rhomboïde dans les processus cognitifs nécessitant une interaction entre l'hippocampe et le cortex préfrontal médian

2.1 Implication des noyaux Re et Rh dans la persistance d'une mémoire spatiale de référence

Les amnésies diencéphaliques faisant suite à des lésions du thalamus, comme par exemple, celles qui caractérisent le syndrome de Korsakoff ou font suite à des accidents vasculaires thalamiques, ont amené les chercheurs à s'intéresser aux noyaux thalamiques pouvant être à l'origine des amnésies diencéphaliques (voir par exemple : Aggleton, 2011 ; Aggleton et Brown, 1999 ; Carlesimo et coll., 2011 ; Kopelman, 2002). Ces amnésies présentent des similitudes avec les amnésies dites hippocampiques pour une partie (pour revue voir Aggleton et Brown, 1999) ou avec celles liées à un dysfonctionnement du cortex préfrontal pour l'autre (Savage et coll., 1997 ; Bailey et Mair, 2005 ; Mitchell et Dalrymple-Alford, 2005 ; Wolff et coll., 2008 ; Moreau et coll., 2012). Les études cliniques ainsi que celles utilisant des modèles animaux ont permis de mettre en avant l'implication d'une atteinte des noyaux antérieurs du thalamus, ces derniers étant fortement connecté à l'HPC, mais aussi celle d'une atteinte des noyaux intralaminaires du thalamus, connectés aux aires corticales, et en particulier au mPFC (Berendse and Groenewegen, 1991 ; Van der Werf et coll., 2002), dans l'acquisition et la persistance des souvenirs (Aggleton et Brown, 1999 ; Gold et Squire, 2006 ; Lopez et coll.,

2009). Cependant, sur le plan neuroanatomique, les noyaux Re et Rh de la partie ventrale de la ligne médiane du thalamus sont également bien positionnés pour influencer la mémorisation de nouvelles informations, voire leur consolidation. Par leurs connexions réciproques avec le mPFC d'une part, et l'HPC d'autre part (Vertes, 2002 ; Vertes et coll., 2006 ; Hoover et Vertes, 2012), l'hypothèse d'une implication de ces deux noyaux thalamiques dans les processus mnésiques, et en particulier ceux qui sous-tendent la consolidation d'une mémoire de type déclaratif au niveau des systèmes, méritait d'être testée. En effet, selon les différentes théories de la consolidation systémique (pour revue voir Frankland et Bontempi, 2005 ; Winocur et coll., 2010 ; Nadel et Hardt, 2011), la stabilisation dans le temps d'une trace mnésique nécessite une réactivation des connexions hippocampo-corticales. Ces réactivations, qui se produisent « *off-line* », principalement pendant le sommeil, mais aussi pendant l'éveil (Carr et coll., 2011 ; Born et Wilhelm, 2012), conduiraient à un renforcement des connexions hippocampo-corticales initialement engagées dans l'encodage des informations, puis cortico-corticales avec un désengagement progressif de l'hippocampe en fonction de la nature et de l'ancienneté du souvenir. Ainsi, ces théories suggèrent l'existence d'un échange bidirectionnel d'informations entre l'HPC et le mPFC (Frankland et Bontempi, 2005 ; Sutherland et coll., 2010 ; Winocur et coll., 2010). Cependant, bien qu'une connexion directe, et donc monosynaptique, entre l'HPC ventral et le mPFC soit bien décrite dans la littérature (Thierry et coll., 200 ; Vertes et coll., 2006), il n'existe pas de connexion monosynaptique en retour du mPFC vers l'HPC. Ainsi, la position anatomique des noyaux Re et Rh est un argument majeur quant à la possibilité pour ces deux noyaux d'influer sur les processus de consolidation systémique. Cet argument est renforcé par des données électrophysiologiques montrant que les noyaux Re et Rh ont un impact sur l'activité neuronale des cellules de l'HPC et du mPFC. Par exemple, une stimulation tétanique des neurones du Re peut engendrer un phénomène de plasticité synaptique à long terme (LTP) au niveau des neurones de la région CA1 de l'HPC (Bertram et Zhang, 1999). De plus, les noyaux Re et Rh peuvent également moduler l'activité du mPFC. En effet, des stimulations répétées des noyaux Re et Rh entraînent des phénomènes de facilitation, c'est-à-dire une augmentation progressive de l'amplitude des potentiels de champs enregistrés au niveau du mPFC, suite à une première stimulation (Viana di Prisco et Vertes, 2006 ; Eleore et coll., 2011). Ainsi, les noyaux Re et Rh peuvent moduler à court et à long terme la plasticité synaptique au niveau du mPFC et de l'HPC, des étapes cellulaires nécessaires à la stabilisation des souvenirs au niveau systémique (Redondo et Morris, 2011).

Au moment où nous avons débuté nos travaux, à savoir en 2009, peu d'études avaient abordé le rôle des noyaux Re et Rh dans les fonctions mnésiques. Seules deux articles présentaient des résultats concernant l'implication des noyaux Re et Rh dans les processus sous-tendant la mémoire spatiale de référence testée à 24h. Ces études ont débouché sur des résultats menant à des conclusions différentes. Ainsi, la lésion excitotoxique des noyaux Re et Rh, réalisée avant l'acquisition par Dolleman-Van Der Weel et ses collaborateurs (2009) n'a pas empêché les animaux d'acquies et de rappeler une représentation de l'emplacement d'une plateforme cachée dans un test de mémoire de référence en piscine de Morris. On note toutefois qu'au test de rappel, les performances étaient significativement inférieures à celles des animaux contrôles. Après une astucieuse analyse de la stratégie utilisée par les animaux lors du test de rétention, les auteurs ont conclu à une implication des noyaux Re et Rh dans les changements de stratégies, et plus particulièrement dans la suppression d'un comportement inadapté, cette fonction cognitive étant sous-tendue par le mPFC et l'HPC ventral (Chudasama et coll., 2012). Dans la seconde étude, Davoodi et ses collaborateurs (2009) ont utilisé une méthode d'inactivation fonctionnelle réversible. Ils ont mis en évidence, disent-ils, une implication des noyaux Re et Rh dans l'acquisition, la consolidation et le rappel d'une mémoire spatiale de référence. Cette étude souffrait toutefois d'un problème méthodologique majeur : si les rats ayant subi l'inactivation étaient significativement moins performants que leurs témoins, les performances de ces derniers ne différaient pas du hasard, traduisant donc un rappel nul. Qui plus est, le dispositif utilisé pour l'instillation apparaissait relativement grossier et avait occasionné de sérieux dégâts dans l'hippocampe dorsal comme dans d'autres noyaux thalamiques, et ce chez tous les animaux. Il résulte de ces défauts que l'interprétation des résultats apparaît difficilement défendable.

Les résultats obtenus à partir des expériences réalisées au cours de ma thèse apportent donc les premiers arguments en faveur de l'implication spécifique des noyaux Re et Rh dans la persistance d'une mémoire spatiale de référence chez le Rat (Publication 2) plutôt que dans un processus d'acquisition ou de consolidation d'un souvenir récent. En effet, bien que la lésion des noyaux Re et Rh n'ait pas altéré l'acquisition de la localisation d'une plateforme dans la piscine de Morris ou le rappel d'un souvenir récemment acquis (test effectué 5 jours après la fin de l'acquisition ; des résultats identiques mais non publiés ont été obtenus à un délai de 24 h), les animaux lésés ont été dans l'incapacité de rappeler l'emplacement de la plateforme lors du test effectué à 25 jours, démontrant une association entre la lésion des noyaux Re et Rh avec la stabilisation et/ou le rappel à long terme d'un souvenir spatial (voir Figure 4 de la

Publication 2). L'étude de l'expression du gène précoce c-fos au moment du rappel est en faveur d'une implication de ces noyaux dans le rappel d'une information spatiale ancienne. En effet, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de la protéine c-Fos chez les rats testés à 25 jours en comparaison aux rats testés 5 jours après la fin de l'acquisition (voir Figure 2 de la Publication 2). Cependant, l'absence d'effet de l'inactivation des noyaux Re et Rh juste avant le rappel, quel que soit le délai post-acquisition, va à l'encontre d'un rôle essentiel de ces noyaux thalamiques dans le processus même de recouvrement des informations (voir Figure 5 de la Publication 2). Si l'augmentation de c-Fos observée dans notre étude reflète un engagement des noyaux Re et Rh lors du rappel à 25 jours, leur implication ne serait donc pas indispensable au vu des résultats obtenus à partir de l'inactivation de ces noyaux. Cette hypothèse est surprenante compte tenu du fait que l'HPC et le mPFC sont tous deux impliqués dans le rappel d'une mémoire spatiale au délai de 25 jours. En effet, par la mise en œuvre d'une inactivation fonctionnelle réversible et la quantification de la protéine c-Fos, l'implication de ces deux régions a été démontrée au sein du laboratoire dans un protocole de mémoire spatiale de référence en piscine de Morris (Lopez et coll., 2012). Une autre explication pourrait être que les noyaux Re et Rh soient bien impliqués dans le rappel d'un souvenir spatial ancien mais que le degré d'inactivation par instillation de lidocaïne, à la concentration utilisée dans nos expériences, n'ait pas été suffisant pour altérer les performances des animaux. Ce dernier point nécessiterait des expériences complémentaires utilisant, par exemple, une concentration plus élevée de lidocaïne et/ou d'autres substances, telles que le muscimol ou le CNQX, pour compléter notre approche avec des composés plus sélectifs par rapport aux neurones « résidents » au sens où ils ne toucheraient pas l'activité des fibres en passage dans la ou les structures inactivées.

Ainsi, en considérant i) l'ensemble des données de la littérature sur le plan anatomique et électrophysiologique pour les croiser avec nos propres observations démontrant une capacité des neurones des noyaux Re et Rh d'influencer l'activité du mPFC et de l'HPC, et ii) les différentes théories de la consolidation systémique, l'idée du rôle essentiel des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans les processus de consolidation mnésique paraît plausible. Cependant, des expériences complémentaires seront indispensables pour comprendre quels sont les processus mnésiques et neurobiologiques qui ont été altérés chez les animaux lésés et ainsi valider l'hypothèse concernant l'implication spécifique des noyaux Re et Rh dans le processus de consolidation. En effet, la lésion ayant été réalisée avant l'acquisition de la tâche mnésique, cette approche ne semble pas la plus pertinente pour se

mettre à l'abri de la critique suivante : les rats auraient pu, du fait de la lésion, apprendre la tâche d'une manière différente de celle des témoins, et cette différence aurait pu influencer la manière dont l'information serait ultérieurement consolidée. En effet, on ne peut pas exclure que cette lésion pré-acquisition a pu perturber 'l'étiquetage' des réseaux corticaux qui se fait lors de l'apprentissage, une étape nécessaire à la réactivation ultérieure des réseaux hippocampo-cortico et cortico-cortico permettant la stabilisation à long terme des informations de type épisodique (Lesburguères et coll., 2011).

Implication des noyaux non-spécifiques du thalamus dans la consolidation systémique

Les résultats obtenus à partir des expériences lésionnelles, d'inactivations et de quantifications de la protéine c-Fos apportent des arguments en faveur d'une implication des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans la persistance à long terme d'une mémoire spatiale. Ces données complètent les résultats obtenus récemment au laboratoire à propos de l'implication des noyaux intralaminaires (ILN) du thalamus dans la persistance d'un souvenir spatial (Lopez et coll., 2009). Dans l'étude de Lopez et coll., les animaux ayant subi préalablement une lésion des ILN étaient entraînés à l'aide d'un protocole identique à celui que nous avons utilisé pour nos rats ayant subi une lésion des noyaux Re et Rh. Les résultats obtenus dans l'étude de Lopez et coll. (2009) sont similaires à ceux que nous avons observés après une atteinte des noyaux Re et Rh (Figure 31). En effet, la lésion des noyaux intralaminaires du thalamus a détérioré les performances de rappel des rats au test de rétention effectué 25 jours après la fin de l'acquisition, alors que les performances d'acquisition et de rétention à 5 jours n'étaient pas différentes de celles des animaux témoins.

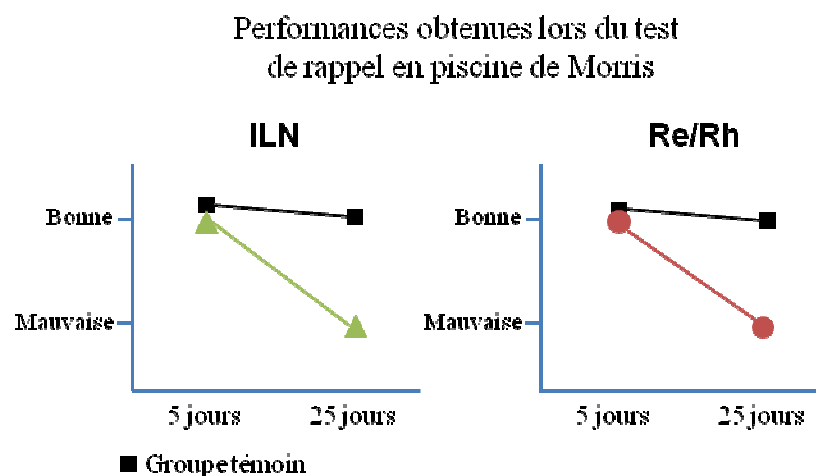


Figure 31. Effets d'une lésion des noyaux intralaminaires (ILN) et des noyaux Re et Rh du thalamus sur les performances de rappel obtenues à deux délais post-acquisition (5 et 25 jours) en piscine de Morris.

Ces deux groupes de noyaux, les ILN comprenant notamment les noyaux para-centraux et centro-latéraux, ainsi que les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus (les noyaux Re et Rh) appartiennent aux noyaux dit non-spécifiques du thalamus. Ces différents noyaux thalamiques sont bien connus pour leurs implications dans les processus d'attention, de conscience et de motivation, notamment via leur connexions avec le cortex cingulaire antérieur (Van der Werf et coll., 2002 ; Llinàs et Steriade, 2006) et les noyaux du tronc cérébral impliqué dans la régulation des états de vigilance (Van der Werf et coll., 2002), possèdent des connexions relativement diffuse vers différentes aires corticales et sont impliqués dans la synchronisation de l'activité corticale (Miller 1996 ; Jones, 2001 ; Llinàs et Steriade, 2006). Ces caractéristiques sont particulièrement intéressantes dans le cadre de la consolidation systémique dans la mesure où la stabilisation des informations nécessite la réactivation des réseaux de neurones corticaux ayant été engagés lors de l'encodage (Sirota et coll., 2003 ; Battaglia et coll., 2011). Ainsi, d'après nos données expérimentales et celles de la littérature, les noyaux intralaminaires et les noyaux Re et Rh du thalamus pourraient être impliqués dans la stabilisation des informations, très probablement via leurs implications dans la régulation du flux d'informations arrivant au cortex et plus particulièrement dans la communication entre le mPFC et l'HPC, un échange hippocampo-cortical indispensable à la consolidation des informations au niveau des systèmes cérébraux.

2.2. Implication des noyaux Re et Rh dans le changement de stratégie et la flexibilité comportementale

Un certain nombre d'expériences évaluant les effets d'une altération du fonctionnement du mPFC ont montré que cette altération ne perturbait pas l'apprentissage et la mémoire, mais plutôt la capacité des rats à utiliser la bonne stratégie lorsque, par exemple, les animaux doivent passer d'une stratégie allocentrique à une stratégie égocentrique dans un labyrinthe en croix (Block et coll., 2007 ; pour d'autres tâches comportementales, voir : Dias et Aggleton, 2000 ; Oualian et Gisquet-Verrier, 2010 ; Ragozzino et coll., 1999). Très récemment, l'équipe de Chudasama et ses collaborateurs (2012) a mis en évidence que le contrôle de l'inhibition comportementale impliquait à la fois le mPFC et l'HPC ventral. Pour cela, les auteurs ont évalué les conséquences d'une lésion unilatérale du mPFC et de l'HPC ventral soit dans le même hémisphère (ipsilatérale), soit dans les deux hémisphères (controlatérale). Ils ont constaté que la déconnexion entre le mPFC et l'HPC ventral a entraîné des comportements impulsifs et compulsifs dans le test du temps de réaction sérielle à 5 choix (*5-choice serial reaction time task*), un test évaluant l'attention visuelle soutenue et les processus

de contrôle inhibiteur du comportement. Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont montré qu'une lésion du noyau Re du thalamus, connecté de façon réciproque au mPFC et à l'HPC ventral, entraînait des comportements impulsifs chez le rat, et ce dans la même tâche comportementale (Prasad et coll., 2012). En ce qui concerne les noyaux de la ligne ventrale du thalamus, dans l'étude évaluant les effets d'une lésion excitotoxique du noyau Re dans un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris, Dolleman-Van der Weel et ses collaborateurs (2009) ont montré que si la lésion n'avait pas empêché le rappel lors du test de rétention, les rats avaient montré une approche différente de la tâche. En effet, les animaux lésés recherchaient plus rapidement une nouvelle localisation de la plateforme lors du test de rappel par rapport aux animaux contrôles. Ainsi, bien que les animaux aient eu des performances supérieures au hasard, ils passaient significativement moins de temps dans le quadrant cible. Les auteurs ont interprété ces résultats en faisant référence à des perturbations de la capacité à changer de stratégie et en proposant que les rats avec une lésion du noyau Re représentaient probablement une altération des mécanismes de contrôle inhibiteur de leur comportement. D'un point de vue comportemental, cela se traduisait, pour les rats lésés, par une trajectoire initiale directe entre le point de lâcher et l'emplacement de la plateforme. Toutefois, après cette navigation parfaitement correcte, les rats lésés persistaient moins dans leur recherche de la plateforme que ne le faisaient les rats témoins. Cette interprétation est à mettre en lien avec les connexions du noyau Re avec le mPFC, mais aussi l'HPC ventral, deux structures impliquées dans l'inhibition d'une stratégie inadéquate (Floresco et coll., 2008 ; Chudasama et coll., 2012).

Les données que nous avons obtenues concernant l'implication des noyaux Re et Rh dans le test du double-H semble effectivement confirmer l'existence d'un rôle de ces noyaux dans des tâches nécessitant une flexibilité comportementale engageant à la fois l'HPC et le mPFC. Récemment validé au sein du laboratoire (Pol Bodetto et coll., 2011 ; Cassel et coll., 2012), l'originalité de ce test est de permettre d'étudier avec un même protocole, l'utilisation d'une stratégie égocentrique ou allocentrique dans une tâche consistant à retrouver une plateforme immergée. Mais surtout, elle permet d'explorer dans quelle mesure un rat a la capacité de passer de la première à la seconde lorsqu'une modification du point de lâcher rend la stratégie égocentrique inadaptée. Nous avons exploité cette particularité dans l'optique de tester l'implication des noyaux Re et Rh dans une tâche mettant en jeu à la fois la mémoire spatiale (allocentrique) et la mémoire procédurale (égocentrique), mais surtout la nécessité pour le rat de basculer d'une approche égocentrique de la tâche vers une approche allocentrique. Le

protocole que nous avons mis en place impliquait que les rats apprennent à utiliser deux trajectoires différentes (tourner à droite puis à gauche ou tourner deux fois de suite à gauche) en fonction du point de lâcher dans le labyrinthe. Lors du test de rétention, les rats étaient lâchés dans une branche différente de celles utilisées lors de l'apprentissage de la tâche (la branche Sud-Ouest). Plus précisément, le nouveau point de lâché correspondait à une translation de 60 cm vers la gauche par rapport à l'une des branches utilisées pendant l'acquisition (la branche Sud (S) dans notre expérience, voir Figure 1b et 1c de la Publication 3). Lors de ce test, la majorité des rats reproduisent d'abord le parcours appris à partir de la branche S (droite-gauche), ce qui les conduit dans la mauvaise branche. Une fois l'erreur intégrée, les animaux témoins se dirigent vers la branche-cible et y passent significativement plus de temps par rapport au temps passé dans les autres branches du labyrinthe. Dans cette expérience, l'inactivation soit du mPFC, de l'HPC dorsal ou des noyaux Re et Rh par instillation intracérébrale de muscimol a entraîné une incapacité des animaux à retrouver la branche cible (Publication 3). Cependant, l'analyse de la première branche choisie par ces animaux a montré que l'utilisation initiale d'une stratégie égocentrique (les conduisant à une erreur) n'a pas été perturbée. Ces données indiquent que, dans le test du double-H, c'est l'adaptation comportementale à une modification de la tâche (translation du point de lâché de 60 cm) requérant un changement de stratégie d'utilisation des informations spatiales qui nécessite l'intégrité d'un circuit comprenant : 1) le mPFC, probablement impliqué dans l'inhibition de la mauvaise stratégie et le passage à celle permettant de réussir la tâche ; 2) l'HPC dorsal, la structure fournissant les informations spatiales nécessaire à l'engagement de la stratégie allocentrique ; et 3) les noyaux Re et Rh potentiellement impliqués dans la coordination entre le changement de stratégie et l'utilisation de l'information spatiale (Figure 32).

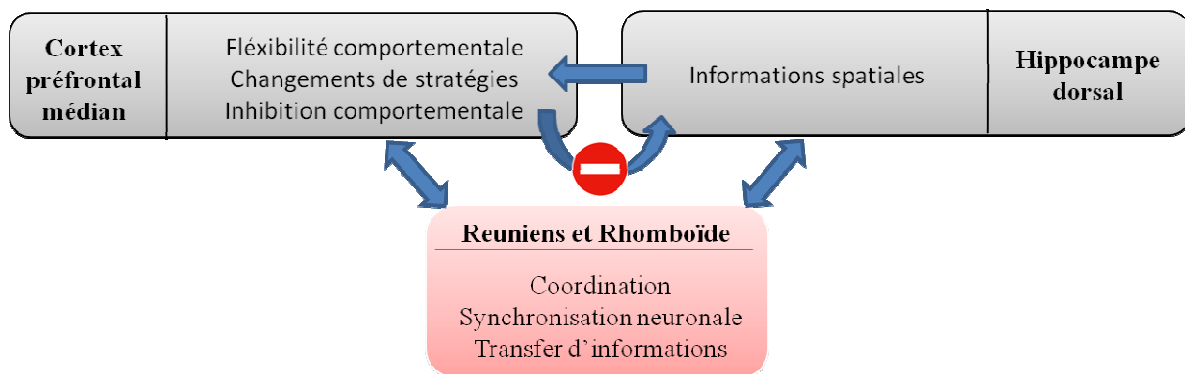


Figure 32. Schéma récapitulatif des fonctions sous-tendues par le cortex préfrontal médian, l'hippocampe dorsal et les noyaux Re et Rh, impliquées dans le test du double-H, et des relations anatomiques au sein de ce circuit.

Fondée sur des données anatomiques, l'hypothèse proposée par Vertes (2006) à propos du rôle des noyaux Re et Rh dans des fonctions cognitives engageant à la fois le mPFC et l'HPC a été confirmée récemment par Hembrook et Mair (2011 ; 2012). Dans leurs deux études, l'inactivation fonctionnelle des noyaux Re et Rh entraînait des perturbations du comportement dans une tâche de conditionnement opérant nécessitant l'intégrité de l'HPC dorsal et du mPFC pour être réalisée. En revanche, dans un protocole mis en œuvre dans un labyrinthe radial à 8 branches et pour lequel seul l'HPC dorsal est indispensable, l'instillation de muscimol ciblée sur les noyaux Re et Rh n'a pas entraîné de modification des comportements. Les données présentées dans la Publication 3, obtenues dans le labyrinthe du double-H et la piscine de Morris, sont une démonstration expérimentale supplémentaire confirmant l'implication spécifique des noyaux ventraux du thalamus dans des processus cognitifs nécessitant à la fois l'HPC et le mPFC.

3. Conclusion

Les expériences réalisées à l'appui de ma thèse étaient fondées sur l'implication d'un circuit hippocampo-préfronto-thalamique dans les processus cognitifs sous-tendant la mémoire spatiale chez le Rat. Par l'utilisation de différentes méthodes (inactivations pharmacologiques, lésion excitotoxique, imagerie cérébrale), j'ai pu contribuer : 1) à une meilleure compréhension du rôle des deux sous-régions hippocampiques (dorsale et ventrale) dans le traitement de l'information spatiale, avec une implication spécifique de l'HPC ventral lors du rappel d'une mémoire spatiale de référence à des délais récents ; 2) à proposer, et ce pour la première fois, un rôle des noyaux Re et Rh du thalamus dans la persistance d'un souvenir spatial ; et 3) à démontrer l'implication des noyaux Re et Rh dans une tâche comportementale nécessitant l'utilisation conjointe d'informations spatiales allocentriques, impliquant l'HPC dorsal, et une flexibilité comportementale optimale, impliquant le mPFC. L'ensemble de ce travail ouvre ainsi de nombreuses perspectives pour mieux comprendre le rôle des noyaux non-spécifiques du thalamus dans les processus cognitifs perturbés chez l'Homme, comme c'est le cas, par exemple, dans le syndrome de Korsakoff ou dans des amnésies diencephaliques consécutives à un accident vasculaire.

4. Perspectives

4.1. Confirmer l'implication des noyaux Re et Rh du thalamus dans le processus de consolidation d'une mémoire spatiale comparativement à celle d'une mémoire contextuelle

Déjà mentionnée plus haut dans cette discussion générale, la détérioration des performances des rats lors du rappel d'un souvenir spatial ancien (25 jours) suite à une lésion excitotoxique des noyaux Re et Rh, réalisée avant l'acquisition de la tâche, ne permet pas de conclure avec certitude quant au type de processus mnésique (acquisition, consolidation, rappel) altéré. En effet, bien que les performances lors de l'acquisition n'aient pas été différentes de celles des animaux témoins, les processus de plasticité synaptique permettant l'étiquetage des réseaux corticaux impliqués lors de l'encodage, et nécessaires à la réactivation ultérieure de ces derniers, a pu être endommagé. Lesburguères et ses collaborateurs (2011) ont ainsi montré que l'inactivation du cortex orbito-frontal lors de l'acquisition empêchait le rappel d'une mémoire à long terme (1 mois). Ces auteurs ont montré également que le processus d'étiquetage impliquait des mécanismes épigénétiques au sein du cortex orbito-frontal. Les déficits observés après lésions étaient associés à une détérioration des marqueurs de plasticité synaptique (une baisse notamment de la densité des épines dendritiques) en lien avec la consolidation à long terme. De par la position privilégiée des noyaux Re et Rh entre l'HPC et le mPFC, ces noyaux thalamiques pourraient être impliqués dans les modifications cellulaires précoces au niveau des réseaux corticaux impliqués lors de l'encodage. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier les effets d'une inactivation des noyaux Re et Rh réalisée à différents moments de la période d'apprentissage, soit pendant l'acquisition, soit juste après l'acquisition sur plusieurs jours consécutifs (12 jours dans l'expérience de Lesburguères et coll., 2011), et d'en étudier les effets sur le rappel à 25 jours, ainsi que sur la plasticité corticale associée (par ex. comptage d'épines dendritiques).

Nos études concernant les noyaux Re et Rh ont été entièrement réalisées en utilisant une tâche de navigation spatiale, la piscine de Morris. Par les connexions entre les noyaux Re et Rh avec l'amygdale (et notamment le noyau basolatéral (BLA)), l'HPC ventral et le mPFC, les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus pourraient également être impliqués dans la consolidation d'une mémoire émotionnelle, notamment si cette dernière se rapporte au contexte d'une expérience vécue. En effet, ces trois régions (BLA, HPC ventral et mPFC) sont connues pour leurs implications dans des tests de conditionnement de peur à un contexte ou à une odeur (Lauzon et coll., 2009 ; 2011 ; Sutherland et coll., 2010 ; Tan et coll., 2011).

Ainsi, il conviendrait d'étudier les effets d'une lésion ou d'une inactivation précoce de ces noyaux thalamiques sur la formation et le rappel d'un conditionnement de peur. Cette expérience permettrait de savoir si les noyaux Re et Rh sont impliqués dans la consolidation systémique de manière générale, plutôt que plus spécifiquement dans celle de tâches de navigation spatiale. Elle permettrait également d'éclaircir le rôle des noyaux Re et Rh dans le processus de recouvrement d'informations corticales à un délai ancien (25, 30 jours) par rapport à une implication dans l'apprentissage de la tâche mnésique. Même si nos observations nous poussent à privilégier la thèse d'une participation des noyaux Re et Rh dans les opérations-mêmes qui sous-tendent le processus de consolidation à l'échelle des systèmes, les autres pistes ne peuvent être exclues pour l'heure.

4.2 Etude du circuit hippocampo-cortico-thalamique dans le cadre de la consolidation systémique et de la mémoire spatiale chez le Rat

Mes travaux de thèse ont consisté à étudier séparément l'implication de l'une ou l'autre des régions faisant partie du circuit hippocampo-cortico-thalamique dans la mémoire spatiale. Dans la poursuite de ce projet de recherche, notamment en ce qui concerne le rôle des noyaux Re et Rh dans les processus mnésiques et la cognition spatiale, il serait pertinent d'évaluer les conséquences d'une lésion ou d'une inactivation des noyaux Re et Rh sur la plasticité synaptique au niveau de l'HPC et du mPFC. En effet, Lesburguères et ses collaborateurs (2011) ont montré que la consolidation d'une préférence alimentaire est accompagnée par des modifications structurales des neurones, notamment de la croissance d'épines dendritiques, au niveau de l'HPC et du mPFC. De même, Restivo et ses collaborateurs (2009) ont montré qu'une lésion de l'HPC dorsal réalisé avant l'acquisition d'un conditionnement de peur au contexte entraînait une altération des performances de rappel lors d'un test réalisé 36 jours après l'acquisition de la tâche. L'augmentation du nombre des épines dendritiques normalement observé à ce délai dans le mPFC était absente, suggérant que la lésion de l'HPC dorsal a empêché, dans le mPFC, la plasticité synaptique nécessaire au processus de consolidation. La lésion des noyaux Re et Rh entraînant des déficits comportementaux similaires en piscine de Morris, une altération des marqueurs de plasticité synaptique, par exemple de la GAP-43, une protéine pré-synaptique impliqué dans la potentialisation à long terme (Routtenberg et coll., 2000), et des mécanismes épigénétiques sous-tendant la consolidation au sein de l'HPC et/ou du mPFC est très probable. Cette possibilité mériterait aussi une vérification expérimentale.

4.3 Impact d'une lésion des noyaux Re et Rh sur l'activité des cellules du mPFC et de l'HPC impliquées dans la navigation

Toujours dans le cadre des interactions entre les noyaux Re et Rh avec l'HPC et le mPFC, il serait tout à fait intéressant d'étudier l'impact des lésions ou des inactivations de ces noyaux thalamiques sur l'activité cellulaire des neurones impliqués dans la navigation spatiale. En effet, une seule étude, présentée très récemment lors du congrès américain des neurosciences, indique un effet de la lésion des noyaux Re et Rh sur la modulation de la fréquence de décharge des cellules de lieu de CA1 en fonction de la trajectoire de l'animal, et ce lors d'un test d'alternance dans un labyrinthe en 8 (Ito et coll., 2012). Pour comprendre les déficits que nous avons observés dans le labyrinthe du double-H, il serait crucial de savoir si l'inactivation des noyaux Re et Rh modifie également l'activité des cellules codant l'objectif que l'animal doit atteindre, ce qui semble impliquer des cellules présentes dans le mPFC (Hok et coll., 2005). Enfin, les noyaux Re et Rh, via leurs connexions vers le cortex entorhinal (Vertes et coll., 2006), pourraient modifier l'activité des cellules de la grille présentes dans cette région corticale et ainsi moduler un type de traitement des informations spatiales parvenant à et/ou sortant de l'HPC.

Bibliographie

Bibliographie

-A-

Abrahams S, Morris RG, Polkey CE, Jarosz JM, Cox TC, Graves M, Pickering A (1999) Hippocampal involvement in spatial and working memory: a structural MRI analysis of patients with unilateral mesial temporal lobe sclerosis. *Brain Cogn* 41(1): 39-65.

Addis DR, Moscovitch M, Crawley AP, McAndrews MP (2004) Recollective qualities modulate hippocampal activation during autobiographical memory retrieval. *Hippocampus* 14: 742-762.

Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22: 425-444.

Aggleton JP, Pearce JM (2001) Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356: 425-489.

Aggleton JP, Dumont JR, Warburton EC (2011) Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: a review. *Learn Mem* 18: 384-400.

Aguirre GK, Detre JA, Alsup DC, D'Esposito M (1996) The parahippocampus subserves topographical learning in man. *Cereb Cortex* 6: 823-829.

Aguirre GK, D'Esposito M (1999) Topographical disorientation: a synthesis and taxonomy. *Brain* 122 (9): 1613-1628.

Aujla H, Beninger RJ (2001) Hippocampal-prefrontocortical circuits: PKA inhibition in the prefrontal cortex impairs delayed nonmatching in the radial maze in rats. *Behav Neurosci.* 2001 115(6):1204-1211.

Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.

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

Atkinson RC, Shiffrin RM (1968) Human memory : a proposed system and its control processes. (Kenneth W Spence et Janet Taylor Spence) *The psychology of learning and motivation*. pp. 90-197. London: Academic Press.

-B-

Baddeley AD, Hitch G (1974) Working memory. In G.H. Bower (Ed.). *The psychology of learning and motivation: Advances in research and theory* Vol. 8, pp. 47-89. New York: Academic Press.

Baddeley, AD (2000). The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends in Cognitive Science* 4: 417-423.

Baldi E, Lorenzini CA, Corrado B (2003) Task solving by procedural strategies in the Morris water maze. *Physiol Behav* 78(4-5):785-793.

- Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HHJ, Feldon J (2004) Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28:273–283.
- Barrash J, Damasio H, Adolphs R, Tranel D (2000) The neuroanatomical correlates of route learning impairment. *Neuropsychologia* 38(6): 820-836.
- Bast T (2007) Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behaviour. *Rev Neurosci* 18:253–281.
- Bast T (2011) The hippocampal learning-behavior translation and the functional significance of hippocampal dysfunction in schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 21:1–10.
- Bast T, Feldon J. (2003) Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog Neurobiol* 70(4):319-345.
- Battaglia FP, Benchenane K, Sirota A, Pennartz CMA, Wiener SI (2011) The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn Neurosci* 15: 310-318.
- 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.
- Baisan RH, Hoover DB (1979) Cells of origin of the hippocampal afferent projection from the nucleus reuniens thalami: a combined Golgi-HRP study in the rat. *Cell Tiss Res* 203: 387-392.
- Beckstead RM (1979) An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *Brain Res* 184(1):43-62.
- Berendse HW, Groenewegen HJ (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J Comp Neurol* 299:187-228.
- Berendse HW, Groenewegen HJ (1991) Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience* 42:73–102.
- Bertram EH, Mangan PS, Zhang DX, Scott CA, Williamson JM (2001) The midline thalamus: alterations and a potential role in limbic epilepsy. *Epilepsia* 42: 967-978.
- Bertram EH, Zhang DX (1999) Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92:15-26.
- Bethus I, Tse D, Morris RG (2010) Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *J Neurosci* 30(5):1610-168.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-39.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2):331-56.

- Block AE, Dhanji H, Thompson-Tardif SF, Floresco SB (2007) Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting. *Cereb Cortex* 17(7): 1625-1636.
- Bohbot VD, Iaria G, Petrides M (2004) Hippocampal function and spatial memory: evidence from functional neuroimaging in healthy participants and performance of patients with medial temporal lobe resections. *Neuropsychology* 18(3): 418-425.
- Bolhuis JJ, Stewart CA, Forrest EM (1994) Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum. *Q J Exp Psychol B* 47(2):129-150.
- Bontempi B, Laurentdemir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400:671-675.
- Born J, Wilhelm I. (2012) System consolidation of memory during sleep. *Psychol Res* 76(2):192-203.
- Boutros NN, Arfken C, Galderisi S, Warrick J, Pratt G, Iacono W (2008) The status of spectral EEG abnormality as a diagnostic test for schizophrenia. *Schizophr Res* 99(1-3):225-237.
- Brewer JB, Mghedar A (2002) Imaging the medial temporal lobe: exploring new dimensions. *Trends in Cognitive Neuroscience* 6(5): 217-223.
- Brooks LR (1968) Spatial and verbal components of the act of recall. *Canadian Journal of Psychology* 22: 349-368.
- Brun VH, Leutgeb S, Wu HQ, Schwarcz R, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2008) Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex. *Neuron* 57(2):290-302.
- Buchanan SL, Thompson RH, Maxwell BL, Powell DA (1994) Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. *Exp Brain Res* 100(3):469-483.
- Bullitt E (1990) Expression of c-Fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296: 517-530.
- Burton BG, Hok V, Save E, Poucet B (2008) Lesion of the ventral and intermediate hippocampus abolishes anticipatory activity in the medial prefrontal cortex of the rat. *Behav Brain Res.* 199(2):222-34.
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002) The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35:625-641.
- Burgess N (2006) Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. *Trends Cogn Sci.* 10(12): 551-557.

-C-

Carlesimo GA, Costa A, Serra L, Bozzali M, Fadda L, Caltagirone C (2011) Prospective memory in thalamic amnesia. *Neuropsychologia* 49:2199-2208.

- Carr MF, Jadhav SP, Frank LM (2011) Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat Neurosci.* 14(2):147-153.
- Carr DB, Sesack SR (1996) Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J Comp Neurol* 369(1):1-15.
- Cassel R, Kelche C, Lecourtier L, Cassel JC. (2012) The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats. *Behav Brain Res.* 230(2):333-342.
- Cavada C, Llamas A, Reinoso-Suárez F (1983) Allocortical afferent connections of the prefrontal cortex in the cat. *Brain Res* 260(1):117-120.
- Chudasama Y, Doobay VM, Liu Y (2012) Hippocampal-prefrontal cortical circuit mediates inhibitory response control in the rat. *J Neurosci* 32(32):10915-10924.
- Cipolotti L, Shallice T, Chan D, Fox N, Scahill R, Harrison G, Stevens J, Rudge P (2001) Longterm retrograde amnesia..... the crucial role of the hippocampus. *Neuropsychologia* 39: 151–172.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005) Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15: 260-272.
- Clementz BA, Sponheim SR, Iacono WG, Beiser M (1994) Resting EEG in first-episode schizophrenia patients, bipolar psychosis patients, and their first-degree relatives. *Psychophysiology* 31(5):486-494.
- Cohen BM, Wan W, Froimowitz MP, Ennulat DJ, Cherkerzian S, Konieczna H (1998) Activation of midline thalamic nuclei by antipsychotic drugs. *Psychopharmacol* 135:37-43.
- Colombo PJ, Wetsel WC, Gallagher M (1997) Spatial memory is related to hippocampal subcellular concentrations of calcium-dependent protein kinase C isoforms in young and aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(25):14195-14199.
- Conrad R, Hull AJ (1964) Information, acoustic confusion and memory span. *British Journal of Psychology* 55:429-432.
- Corkin S (2002) What's new with the amnesic patient H.M.? *Nature Reviews Neuroscience* 3:153-160.
- Cosquer B, Galani R, Kuster N, Cassel JC (2005) Whole-body exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields does not alter anxiety responses in rats: a plus-maze study including test validation. *Behav Brain Res* 156(1):65-74.

-D-

- Davoodi FG, Motamedi F, Akbari E, Ghanbarian E, Jila B (2011) Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on memory processing in passive avoidance task. *Behav Brain Res* 221:1-6.

- 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. *Behav Brain Res* 198: 130-135.
- Dawson GR, Tricklebank MD (1995) Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci* 16(2):33-36.
- Day M, Langston RF, Morris RGM (2003) Glutamate receptor dependent encoding and retrieval of paired associate learning. *Nature* 424:205–209.
- D'Hooge R, De Deyn PP Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.* 2001 Aug;36(1):60-90.
- 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 Renzi E, Faglioni P (1962) Spatial disorientation in cerebral lesions. *Sist Nerv.* 14:409-36.
- Deadwyler SA, Hampson RE (1999) Anatomic model of hippocampal encoding of spatial information. *Hippocampus* 9(4):397-412.
- Dempsey EW, Morison RS (1942) The production of rhythmically cortical recurrent potentials after localized thalamic stimulation. *Am J Physiol* 135:293-300.
- 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 behavioral flexibility. *Eur J Neurosci* 12:4457-4466.
- Dolleman-van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP (1997) Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J Neurosci* 17:5640-5650.
- Dolleman-van der Weel MJ, Morris RGM, Witter MP (2009) Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Struct Funct* 213:329-342.
- Dolorfo CL, Amaral DG (1998) Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *J Comp Neurol* 398(1):49-82.
- Dostrovsky JO, Guilbaud G (1990) Nociceptive responses in medial thalamus of the normal and arthritic rat. *Pain* 40: 93-104.
- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram. *Ann Rev Psychol* 55:51-86.

-E-

Ebbinghaus H (1885) *Memory: A Contribution to Experimental Psychology*. Translated by Henry A. Ruger & Clara E. Bussenius (1913) Originally published in New York by Teachers College, Columbia University.

Edeline JM, Hars B, Hennevin E, Cotillon N (2002) Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol Learn Mem* 78(1):100-124.

Eichenbaum H (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109-20.

Eichenbaum H, Cohen NJ (2001). *From conditioning to conscious recollection: Memory systems of the brain*. Oxford University Press.

Eleore L, Lopez-Ramos JC, Guerra-Narbona R, Delgado-Garcia JM (2011) Role of reuniens nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. *Plos One* 6:1-11.

Eustache F, Desgrandes B (2008) MNESIS: towards the integration of current multisystem models of memory. *Neuropsychol Rev.* 18(1):53-69.

-F-

Fanselow MS, Dong HW (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures ? *Neuron* 65(1):7-19.

Fehr T, Kissler J, Moratti S, Wienbruch C, Rockstroh B, Elbert T (2001) Source distribution of neuromagnetic slow waves and MEG-delta activity in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 50(2):108-116.

Ferino F, Thierry AM, Glowinski J (1987) Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat. *Exp Brain Res* 65(2):421-6.

Floresco SB, Block AE, Tse MT (2008) Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behav Brain Res* 190(1):85-96.

Floresco SB, Braakma DN, Phillips AG (1999) Thalamic-cortical-striatal circuitry subserves working memory during delayed responding on a radial arm maze. *J Neurosci* 19(24):11061-11071.

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 a delay. *J Neurosci* 17(5):1880-1890.

Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nature 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(5672):881-883.

Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, Kirkwood A, Silva AJ (2001) Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* 411(6835):309-313.

Fukushima T, Hasegawa I, Miyashita Y (2004) Prefrontal neuronal activity encodes spatial target representations sequentially updated after nonspatial target-shift cues. *J Neurophysiol.* 91(3):1367-1380.

Fuster JM (2001) The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron* 30(2):319-33.

Fyhn M, Molden S, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305(5688):1258-1264.

-G-

Gholami S, Lambertz D, Hoheisel U, Mense S (2006) Effects on c-Fos expression in the PAG and thalamus by selective input via tetrodotoxin-resistant afferent fibres from muscle and skin. *Neuroscience Res* 56:270-278.

Gold JJ, Squire LR (2006) The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learn Mem* 13:699–710.

Goldman-Rakic PS, Selemon LD, Schwartz ML (1984) Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience* 12(3):719-743.

Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2011) Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell* 147(3):678-689.

Groenewegen HJ, Witter MP (2004) Thalamus. In: *The Rat Nervous System*, Elsevier Academic Press, Ed 3, Paxinos G (Ed). pp 407-453.

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.

-H-

Habib M, Sirigu A (1987) Pure topographical disorientation: a definition and anatomical basis. *Cortex* 23(1):73-85.

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

- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436(7052):801-806.
- Harker KT, Whishaw IQ (2002) Place and matching-to-place spatial learning affected by rat inbreeding (Dark-Agouti, Fischer 344) and albinism (Wistar, Sprague-Dawley) but not domestication (wild rat vs. Long-Evans, Fischer-Norway). *Behav Brain Res* 134(1-2):467-477.
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27(6):555-579.
- Hembrook JR, Mair RG (2011) Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21:815-826.
- Hembrook JR, Onos KD, Mair RG (2012) Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the Rat. *Hippocampus* 22:853-860.
- Henke PG (1990) Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain Res Bull.* 25(5):691-5.
- Herkenham M (1978) The connections of the nucleus reuniens thalamus : evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol* 177:589-610.
- Hirayasu Y, Wada JA (1992) N-methyl-D-aspartate injection into the massa intermedia facilitates development of limbic kindling in rats. *Epilepsia* 33:965-970.
- Hirayasu Y, Wada JA (1992) Convulsive seizures in rats induced by N-methyl-D-aspartate injection into the massa intermedia. *Brain Res* 577:36-40.
- Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res* 3(3-4):167-181.
- Hok V, Save E, Lenck-Santini PP, Poucet B (2005) Coding for spatial goals in the prelimbic/infralimbic area of the rat frontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22;102(12):4602-4607.
- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212(2):149-179.
- Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct* 217:191-209.
- Hughes P, Dragunow M (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47(1):133-178
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 308:249-276.

-I-

Irle E, Markowitsch HJ (1982) Widespread cortical projections of the hippocampal formation in the cat. *Neuroscience* 7(11):2637-2647.

Ito HT, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2012) Representation of behavioral context in the nucleus reuniens for CA1 place cells Abstract. Society for Neurosciences Annual Meeting, New Orleans.

-J-

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

Jay TM, Burette F, Laroche S (1995) NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat. *Eur J Neurosci* 7(2):247-250.

Jay TM, Glowinski J, Thierry AM (1989) Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 505(2):337-340.

Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313(4):574-586.

Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S (2001) A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 4(3):289-296.

Jay TM, Glowinski J, Thierry AM (1989) Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Research* 505:337-340.

Jones EG (2001) The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci* 24: 595-601.

Jones, E.G. (2007). *The Thalamus*, 2nd Edn, Vol.1-2. Cambridge: Cambridge University Press.

Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci* 14(12):7347-7356.

-K-

Kase CS, Troncoso JF, Court JE, Tapia JF, Mohr JP (1977) Global spatial disorientation. Clinicopathologic correlations. *J Neurol Sci* 34(2):267-78.

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

Kim JJ, Clark RE, Thompson RF (1995) Hippocampectomy impairs the memory of recently, but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. *Behav Neurosci* 109(2):195-203.

Kinsbourne M, Wood F (1975) Short-term memory processes and the amnesic syndrome. In J.A. Deutsch (Ed.), Short-term memory. New York: Academic Press.

Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach HA, Murison R, Moser EI, Moser MB (2002) Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10825–10830.

Kjelstrup KB, Solstad T, Brun VH, Hafting T, Leutgeb S, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2008) Finite scale of spatial representation in the hippocampus. *Science* 321:140–143.

Koenig J, Cosquer B, Cassel JC (2008) Activation of septal 5-HT_{1A} 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.

Kolb B, Whishaw IQ (1996) Fundamentals of human neuropsychology (4^{ème} edition). New York: WH Freeman.

Kopelman MD (2002) Disorders of memory. *Brain* 125: 2152-2190.

Krout KE, Belzer RE, Loewy AD (2002) Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 448: 53-101.

Krout KE, Loewy AD (2000) Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 428: 475-494.

-L-

Laroche S, Davis S, Jay TM (2000) Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10(4):438-446.

Laroche S, Jay TM, Thierry AM (1999) Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. *Neurosci Lett* 114(2):184-190.

Lauzon NM, Ahmad T, Laviolette SR (2011) Dopamine D4 Receptor Transmission in the Prefrontal Cortex Controls the Salience of Emotional Memory via Modulation of Calcium Calmodulin-Dependent Kinase II. *Cereb Cortex* In press.

Lauzon NM, Bishop SF, Laviolette SR (2009) Dopamine D1 versus D4 receptors differentially modulate the encoding of salient versus nonsalient emotional information in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 29(15):4836-4845.

Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304(5672):839-843.

Lesburguères E, Gobbo OL, Alaux-Cantin S, Hambucken A, Trifilieff P, Bontempi B (2011) Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. *Science* 331(6019):924-928.

Levine DN, Warach J, Farah M (1985) Two visual systems in mental imagery: dissociation of "what" and "where" in imagery disorders due to bilateral posterior cerebral lesions. *Neurology* 35(7):1010-108.

Llinas RL, Steriade M (2006) Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol* 95: 3297–3308.

Lomber SG (1999) The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *J Neurosci Methods* 86(2):109-117.

Lopez J, de Vasconcelos AP, Cassel JC (2008) Environmental cue saliency influences the vividness of a remote spatial memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90(1):285-289.

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. *J Neurosci.* 29(10):3302-3306.

Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22: 827-841.

Loureiro M., Cholvin T., Lopez J., Merienne N., Cosquer B., Geiger K., Cassel J.C., Pereira de Vasconcelos A. (2012) The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory. *Journal of Neuroscience.* 32(29):9947-9959.

Loureiro M., Lecourtier L., Engel M., Lopez J., Cosquer B., Geiger K., Kelche C., Cassel J.-C., Pereira de Vasconcelos A. (2012) The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct and Funct* 217: 96-106.

Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau JL, Schott G, Benbouzid M, Poisbeau P, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F (2006) Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain* 7(1):32-39.

-M-

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.

Maguire EA, Frackowiak RS, Frith CD (1996) Learning to find your way: a role for the human hippocampal formation. *Proc Biol Sci* 263(1377):1745-1750.

Maguire EA, Frackowiak RS, Frith CD (1997) Recalling routes around London: activation of the right hippocampus in taxi drivers. *Proc Biol Sci* 263(1377):1745-1750.

Maguire EA, Burgess N, Donnett JG, Frackowiak RS, Frith CD, O'Keefe J (1998) Knowing where and getting here: a human navigation network. *Science* 280(5365):921-924.

Maguire EA, Burgess N, O'Keefe J (1999) Human spatial navigation: cognitive maps, sexual dimorphism, and neural substrates. *Curr Opin Neurobiol* 9(2):171-177.

- Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS, Frith CD (2000) Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8): 4398-4403.
- Maguire EA, Frith CD (2003) Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. *J Neurosci* 23(12):5302-5307.
- Malpeli JG (1999) Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J Neurosci Methods* 86(2):119-128.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88(2):261-274.
- Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Phil Trans R Soc Lond B* 262: 23-81.
- Marslen-Wilson WD, Teuber HL (1975) Memory for remote events in anterograde amnesia: recognition of public figures from newsphotographs. *Neuropsychologia*. 13(3):353-364.
- Martin SJ, de Hoz L, Morris RG (2005) Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* 43(4):609-624.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96-99.
- Mayes AR, Montaldi D, Spencer TJ, Roberts N (2004) Recalling spatial information as a component of recently and remotely acquired episodic or semantic memories : an fMRI study. *Neuropsychologia* 18(3):426-441.
- McCormick LM, Brumm MC, Beadle JN, Paradiso S, Yamada T, Andreasen N (2012) Mirror neuron function, psychosis, and empathy in schizophrenia. *Psychiatry Res* 201(3):233-239.
- McDonald RJ, White NM (1994) Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav Neural Biol* 61(3):260-270.
- McGaugh JL (2002) Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* 25(9):456.
- McKenna JT, Vertes RP (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol* 480: 115-142.
- McNaughton BL, Mizumori SJ, Barnes CA, Leonard BJ, Marquis M, Green EJ (1994) Cortical representation of motion during unrestrained spatial navigation in the rat. *Cereb Cortex* 4(1):27-39.
- McNaughton BL, Battaglia FP, Jensen O, Moser EI, Moser MB (2006) Path integration and the neural basis of the 'cognitive map'. *Nat Rev Neurosci* 7(8):663-678.

- Mellet E, Briscoigne S, Tzourio-Mazoyer N, Ghaem O, Petit L, Zago L, Etard O, Berthoz A, Mazoyer B, Denis M (2000) Neural correlates of topographic mental exploration: the impact of route versus survey perspective learning. *Neuroimage* 12(5):588-600.
- Milot M, Plamondon H (2008) Ischemia-induced hyperactivity: effects of dim versus bright illumination on open-field exploration and habituation following global ischemia in rats. *Behav Brain Res* 192(2):166-172.
- Miller R (1996) Neural assemblies and laminar interactions in the cerebral cortex. *Biol Cybern* 75: 253-261.
- Milner B (1962) *Physiologie de l'hippocampe*. P. Passouant, ed. (Paris: Centre National de la Recherche Scientifique) p. :257-272.
- Miller JW, Ferrendelli JA (1990) Characterization of GABAergic seizure regulation in the midline thalamus. *Neuropharmacol* 29(7):649-655.
- Miller JW, Hall CM, Holland KD, Ferrendelli JA (1989) Identification of a median thalamic system regulating seizures and arousal. *Epilepsia* 30(4):493-500.
- 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. *Eur J Neurosci* 22:973–985.
- Moody SL, Wise SP, di Pellegrino G, Zipser D (1998) A model that accounts for activity in primate frontal cortex during a delayed matching-to-sample task. *J Neurosci* 18(1):399-410.
- Morales GJ, Ramcharan EJ, Sundararaman N, Morgera SD, Vertes R (2007) Analysis of the actions of nucleus reuniens and the entorhinal cortex on EEG and evoked population behaviour of the hippocampus. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2007:2480-2484.
- Moreau PH, Tsenkina Y, Lecourtier L, Lopez J, Cosquer B, Wolff M, Dalrymple-Alford J, Cassel JC (2012) Lesions of the anterior thalamic nuclei and intralaminar thalamic nuclei: place and visual discrimination learning in the water maze. *Brain Struct Funct*. In press.
- Morris RGM (1981) Spatial localization does not depend on the presence of local cues. *Learning and Motivaion* 12:681-683.
- Morris RGM (2006) Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 23(11):2829-2846.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297(5868):681-683.
- Moser MB, Moser EI (1998a) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608–619.

Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andresen P, Morris RG (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9697–9701.

Mumby DG, Astur RS, Weisend MP, Sutherland RJ (1999) Retrograde amnesia and selective damage to the hippocampal formation: memory for places and object discriminations. *Behav Brain Res* 106(1-2):97-107.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116(1):201-211.

Muller GE, Pilzecker A (1900) Experimentelle beitrage zur lehre vom gedachtnis. *Zeitschriftfur Psychologie und Physiologie der Sinnesorganne*, S1, 1–288.

Muller RU, Kubie JL (1987) The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J Neurosci* 7(7): 1951-1968.

-N-

Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 7: 217-227.

Nadel L, Hardt O (2011) Update on Memory Systems and Processes. *Neuropsychopharmacol Rev* 36: 251–273.

Luo J, Niki K (2002) Role of medial temporal lobe in extensive retrieval of task-related knowledge. *Hippocampus* 12(4):487-494.

-O-

O’Keefe, Dotrovsky 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.

Ohtake T, Yamada F (1989) Efferent connections of the nucleus reuniens and the rhomboid nucleus in the rat: an anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci Res* 6: 556-568.

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

Oualian C, Gisquet-Verrier P (2010) The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioral flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task. *Learn Mem* 17(12): 654-668.

-P-

- 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(3):439-46.
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem.* 1996 Jan;65(1):65-72.
- Parslow DM, Rose D, Brooks B, Fleminger S, Gray JA, Giampietro V, Brammer MJ, Williams S, Gasston D, Andrew C, Vythelingum GN, Loannou G, Simmons A, Morris RG (2004) Allocentric spatial memory activation of the hippocampal formation measured with fMRI. *Neuropsychology* 18(3), 450-461.
- Patel S, Millan MH, Meldrum BS (1988) Decrease in excitatory transmission within the lateral habenula and the mediodorsal thalamus protects against limbic seizures in rats. *Exp Neurol.* 101(1):63-74.
- 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 Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* (4th ed.) San Diego: Academic Press.
- Pereira de Vasconcelos A, Bartol-Munier I, Feillet CA, Gournelen S, Pevet P, Challet E (2006) Modifications of local cerebral glucose utilization during circadian food-anticipatory activity. *Neuroscience* 139(2):741-748.
- Petrovich GD, Canters NS, Swanson LW (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev* 38:247-289.
- Piolino P, Desgranges B, Clarys D, Guillery-Girard B, Taconnat L, Isingrini M, Eustach F (2006) Right ventral frontal hypometabolism and abnormal sense of self in case of disproportionate retrograde amnesia 21: 510-525.
- Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, Geiger K, Cassel JC (2011) The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav Brain Res.* 218:138-151.
- Porter MC, Burk JA, Mair RG (2000) A comparison of the effects of hippocampal or prefrontal cortical lesions on three versions of delayed non-matching-to-sample based on positional or spatial cues. *Behav Brain Res* 109(1):69-81.
- Porter MC, Mair RG (1997) The effects of frontal cortical lesions on remembering depend on the procedural demands of tasks performed in the radial arm maze. *Behav Brain Res* 87(2):115-125.
- Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Relo AL, Feldon J, Yee BK (2004) Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci* 19:705-712.

Poucet B, Thinus-Blanc C, Muller RU (1994) Place cells in the ventral hippocampus of rats. *Neuroreport* 5(16): 2045-2048.

Prasad JA, MacGregor EM, Chudasama Y (2012) Lesions of the thalamic reuniens cause impulsive but not compulsive responses. *Brain Struct Funct*, in press.

-R-

Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP (1999) Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *J Neurosci* 19(11):4585-4594.

Ragozzino ME, Kim J, Hassert D, Minniti N, Kiang C (2003) The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behav Neurosci.* 117(5): 1054-1065.

Ranck JB (1984) Head direction cells in the deep cell layers of dorsal presubiculum in freely moving rats. *Soc Neurosc Abst* 10:599.

Rassnick S, Hoffman GE, Rabin BS, Sved AF (1998) Injection of corticotrophin-releasing hormone into the locus coeruleus or foot shock increases neuronal Fos expression. *Neuroscience* 85: 259-268.

Redondo RL, Morris RG (2011) Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 12(1):17-30.

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. *J Neurosci* 29(25):8206-8214.

Ribeiro S, Mello CV, Velho T, Gardner TJ, Jarvis ED, Pavlides C (2002) Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *J Neurosci* 22(24):10914-10923.

Ribot T (1881) *Les maladies de la mémoire*. Paris : Eds. G. Baillière.

Risold PY, Swanson LW (1996) Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science* 272:1484-1486.

Room P, Russchen FT, Groenewegen HJ, Lohman AH (1985) Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. *J Comp Neurol* 242(1):40-55.

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 Neurosci* 3: 1044-1048.

Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U (2000) Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7657-7662.

Rudy JW, Biedenkapp JC, O'Reilly RC (2005) Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: an alternative view. *Learn Mem* 12: 445-446.

-S-

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.

Save E, Poucet B (2003) Hippocampal-parietal cortical interactions in spatial cognition. *Hippocampus* 10(4):491-499.

Save E, Poucet B (2009) Role of the parietal cortex in long-term representation of spatial information in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 91(2):172-178.

Schumacher A, de Vasconcelos AP, Lecourtier L, Moser A, Cassel JC (2011) Electrical high frequency stimulation in the dorsal striatum: Effects on response learning and on GABA levels in rats. *Behav Brain Res* 222(2):368-374.

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

Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1995) Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 109(6):1063-1073.

Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1998) D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *J Neurosci* 18(4):1613-1621.

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290(2):213-242.

Shallice T, Warrington EK (1970) Independent functioning of verbal memory stores: a neuropsychological study. *Q J Exp Psychol* 22: 261-273.

Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW, Kogan JH (1998) Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol Learn Mem* 70(1-2):44-61.

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

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

Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsaki G (2003) Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2065-2067.

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

Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5: 169-177.

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

Spiers HJ, Burgess N, Hartley T, Vargha-Khadem F, O'Keefe J (2001) Bilateral hippocampal pathology impairs topographical and episodic memory but not visual pattern matching. *Hippocampus* 11(6): 715-725.

Steriade M (2006) Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* 137: 1087-1106.

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(1):27-42.

Sutherland RJ, O'Brien J, Lehmann H (2008) Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. *Hippocampus* 18(7):710-8.

Sutherland RJ, Sparks FT, Lehmann H (2010) Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model: a modest proposal for the situation of systems consolidation. *Neuropsychologia*. (8):2357-2369.

Swanson LW (1981) A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 217(1):150-154.

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.

-T-

Takagishi M, Chiba T (1991) Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res* 566(1-2):26-39.

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.

Tan H, Lauzon NM, Bishop SF, Chi N, Bechard M, Laviolette SR (2011) Cannabinoid transmission in the basolateral amygdala modulates fear memory formation via functional inputs to the prelimbic cortex. *J Neurosci* 31(14):5300-5312.

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: 7555-7564.

Taube JS (1998) Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Prog Neurobiol* 55(3): 225-256.

Teng E, Squire LR (1999) Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400(6745):675-677.

Teyler TJ, DiScenna P (1987) Long-term potentiation. *Annu Rev Neurosci* 10:131-161.

Thierry AM, Gioanni Y, Degenetais E, Glowinski J (2000) Hippocampo-prefrontal cortex 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.
- Tomita H, Ohbayashi M, Nakahara K, Hasegawa I, Miyashita Y (1999) Top-down signal from prefrontal cortex in executive control of memory retrieval. *Nature* 401(6754):699-703.
- Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG (2007) Schemas and memory consolidation. *Science* 316(5821):76-82.
- Tse D, Takeuchi T, Kakeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, Bito H, Morris RG (2011) Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science* 333(6044):891-335.
- Tulving E (1972) Episodic and semantic memory. (Tulving E, Donaldson W, Eds.) *Organization of memory*. pp. 381-403. New York: Academic Press.
- Tulving E (1983) *Elements of episodic memory*. New York: Oxford University Press.
- Tulving E (1995) *Organization of memory: Quo Vadi?* Gazzaniga, MS, Editor. *The Cognitive Neuroscience*, Cambridge, MA: MIT Press, 839-847.
- Tulving E (2001) Episodic memory and common sense: how far apart? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 356: 1505-1515.

-U-

- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146(1-2):3-17.

-V-

- Van Duuren E, van der Plasse G, van der Blom R, Joosten RN, Mulder AB, Pennartz CM, Feenstra MG (2007) Pharmacological manipulation of neuronal ensemble activity by reverse microdialysis in freely moving rats: a comparative study of the effects of tetrodotoxin, lidocaine, and muscimol. *J Pharmacol Exp Ther* 323(1):61-69.
- Vaisanen J, Ihalainen J, Tanila H, Castren E (2004) Effects of NMDA-receptor antagonist treatment on c-fos expression in rat brain areas implicated in schizophrenia. *Cell Mol Neurobiol* 24:769-779.
- 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 der Wolf CH, Leung L-WS, Cooley RK (1985) Pathways through cingulate, neo and entorhinal cortices mediate atropine-resistant hippocampal rhythmical slow activity. *Brain Res* 347:58-73.
- Vann SD, Brown MW, Aggleton JP (2000a) Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests. *Neuroscience* 101:983-991.

- Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP (2000b) Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *J Neurosci* 20:2711-2718.
- Vann SD, Aggleton JP (2002) Extensive cytotoxic lesions of the rat retrosplenial cortex reveal consistent deficits on tasks that tax allocentric spatial memory. *Behav Neurosci* 116(1):85-94.
- Vann SD, Aggleton JP (2004) Testing the importance of the retrosplenial guidance system: effects of different sized retrosplenial cortex lesions on heading direction and spatial working memory. *Behav Brain Res* 155(1):97-108.
- Van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10(4):272-282.
- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M (1997) *Science* 277(5324):376-380.
- Vertes RP (2002) Analysis of the projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J Comp Neurol* 442:163-187.
- 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. *J Comp Neurol* 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 Res Bull* 71:601-609.
- Vertes RP, Linley SB, Hoover WB (2010) Pattern of distribution of serotonergic fibers to the thalamus of the rat. *Brain Struct Funct* 215:1-28.
- Viana Di Prisco G, Vertes RP (2006) Excitatory actions of the ventral midline thalamus (Rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60:45-55.
- Viskontas IV, McAndrews MP, Moscovitch M (2000) Remote episodic memory deficits in patients with unilateral temporal lobe epilepsy and excisions. *J Neurosci* 20(15):5853-5857.

-
- Walsh RN, Cummins RA (1976) The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83(3):482-504.
- Wang SH, Tse D, Morris RG (2012) Anterior cingulate cortex in schema assimilation and expression. *Learn Mem* 19(8):315-318.
- Watkins MJ, Tulving E (1975) Episodic memory: When recognition fails. *Journal of Experimental Psychology* Vol 104(1):5-29.
- Wiltgen BJ, Silva AJ (2007) Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* 14(4):313-317.
- Winocur G (1990) Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. *Behav Brain Res* 38: 145-154.
- 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.
- Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M (2007) Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature Neurosci* 10: 555-557.
- Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B (2010) Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48: 2339-2356.
- Witter MP, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. In: Paxinos G (ed) *In the rat nervous system*, Elsevier, Amsterdam, pp 635–704.
- Witter MP, Ostendorf RH, Groenewegen HJ (1990) heterogeneity in the dorsal subiculum of the rat: distinct neuronal zones project to different cortical and subcortical targets. *Eur J Neurosci* 2: 718-725.
- Wilson MA, McNaughton BL (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261(5124): 1055-1058.
- 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.
- Wood ER, Dudchenko PA, Robitsek RJ, Eichenbaum H (2000) Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. *Neuron* 27(3):623-633.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP (1990) Projection from the nucleus reunions thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296:179-203

Zhang Y, Fukushima H, Kida S (2011) Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain* 4:4:1-11.

Zola-Morgan S, Squire LR (1990) The primate hippocampal formation: Evidence for a time-limited role in memory storage. *Science* 250:288–290.