

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

**Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives**

**THÈSE** présentée par :

**Amélie GRESSIER**

soutenue le : **29 mars 2018**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**Le rôle des noyaux reuniens et rhomboïde de la  
ligne médiane du thalamus dans la consolidation  
d'un souvenir spatial chez le Rat : approches  
comportementales et moléculaires**

**THÈSE dirigée par :**

**Mme BOUTILLIER Anne-Laurence**  
**M CASSEL Jean-Christophe**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg  
Professeur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme CABOCHE Jocelyne**  
**M DAUPHIN François**

Directeur de recherche, Université Marie Curie  
Professeur, Université de Caen

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M WOLFF Mathieu**  
**M DUPUIS Luc**

Chargé de recherche, Université de Bordeaux  
Directeur de recherche, Faculté de médecine de Strasbourg



## *Remerciements*

---

Tout d'abord, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Laurette, Jean-Christophe, merci à vous pour l'encadrement de cette thèse.

JC, plus particulièrement merci pour l'aide concernant les lésions, pour le temps consacré à remettre en état l'étireuse de pipettes de verre, pour toutes les dissections de cerveaux et les maux de dos que vous en avez retirés, et pour l'attention discrète, mais efficace, que vous avez portée à mon travail. Vous avez contribué à me rendre plus précise dans l'utilisation des termes que j'emploie à l'écrit et cette thèse en est l'illustration. Merci également pour les innombrables parties de pétanque, les nombreuses victoires, et même pour toutes ces fois où vous avez tiré plutôt que pointer sur mes conseils... Merci pour tout ça.

Laurette, ça n'a pas toujours été une thèse facile, entre les biais techniques dans les Western blots (je ne sais pas combien de Western blots j'ai pu faire...), les anticorps qui marchent une fois sur deux, les résultats pas toujours reproductibles, et ceux qui, au premier abord, semblent incompréhensibles... Pour autant, même s'il m'est arrivé de perdre ma motivation, tu n'as jamais rien lâché, tu as toujours essayé de trouver une solution, de tester d'autres hypothèses, quand bien même je n'y croyais pas. Je voudrais te remercier pour cela, car si aujourd'hui je suis fière du travail que je présente, c'est en grande partie grâce à toi. Je tiens à te remercier tout particulièrement pour l'aide que tu m'as apportée pour la rédaction de cette thèse, pour la capacité que tu as eu à prendre tous ces résultats et à en faire ressortir quelque chose de cohérent, qui se tient. Enfin, avec JC, je vous remercie pour les nombreux fous rires que nous avons pu avoir durant nos réunions, qui traduisent la bonne humeur de notre petit groupe.

Je remercie, bien sûr, Brigitte, pour m'avoir appris la chirurgie stéréotaxique et pour son soutien durant la longue période de mise au point des lésions au picospritzer. Merci pour toutes les petites choses que tu m'as enseignées, avec ta bonne humeur quotidienne et ta gentillesse permanente. J'en profite également pour remercier Thibault, qui, avec Brigitte, a

été le premier à m'initier à l'art délicat des lésions du reuniens, ainsi qu'à la manipulation des rats.

Merci à Olivier pour m'avoir appris à faire des Western blots (maudits soient les Western blots !).

Je remercie également ceux partis avant moi et avec qui j'ai partagé un bout de chemin : Anne Anthony, Jyoti, Julien. Merci à Victor, pour les discussions (déprimantes) sur mon sujet de thèse et celles, beaucoup plus sympa, qu'on a partagées autour des cryostats.

Merci Anne, pour ton aide pour le comptage, pour le temps que tu m'a accordé à chaque fois que je suis venue te déranger, pour ta gentillesse et ta bonne humeur.

Merci aux membres semi-permanents du bureau 109a (le meilleur !), notamment à Pascal, pour y avoir mis ta bonne humeur et ton grain de folie et à Etienne, pour les discussions sur le reuniens, mais également pour le duo quasi-imbattable que nous avons formé à plusieurs reprises à la pétanque.

Raphaëlle, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, aussi bien durant mon master que par la suite. Je me suis identifiée à toi dès le début et, comme je te l'ai dit, tu as été mon modèle depuis lors. Je ne saurais te combien ce mail de septembre 2016 m'a touchée. Vraiment merci.

Caroline, Marie, Estelle, j'ai adoré nos soirées filles, nos discussions sur la thèse et le reste qui font du bien, les potins croustillants et votre soutien quand j'en avais besoin. Je suis vraiment heureuse d'avoir partagé ces moments avec vous, ça a rendu ma vie de thésarde plus facile... et d'autant plus difficile à quitter.

Le meilleur pour la fin. Un immense merci à Laurie, ma collègue de bureau, ma partenaire de fin de thèse, ma confidente, celle sans qui cette thèse aurait été bien différente. Je devais finir seule, mais par une chance improbable, tu as débarqué au labo, dans mon bureau, et même à la FENS ! Et comme le hasard fait bien les choses, on a toutes les deux été prolongées de six mois. Ensemble jusqu'au bout ! J'ai trouvé en toi mon *alter ego*, un vrai soutien. Pour tout ce qu'on a échangé, partagé, un énorme merci. Et j'espère de tout cœur que nos chemins continueront de se croiser.



Merci à ma maman, d'être ma maman, de s'être inquiétée pour moi depuis mon départ pour Strasbourg et d'être présente, tout simplement.

Enfin, merci Seb. Pour les magnifiques voyages qu'on a faits, petites parenthèses de bonheur dans ces années de thèse, pour partager mes hauts et mes bas, me faire sourire entre mes larmes, et pour m'avoir aidé à tenir face au stress de ces derniers mois, aussi. Merci d'être là et de m'aimer comme je suis.



<b>INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>1</b>
<i>Cadre générale de la thèse.....</i>	<i>1</i>
<i>Objectifs de la thèse .....</i>	<i>2</i>
<i>Structure de la thèse.....</i>	<i>3</i>
<b>PARTIE 1 : CONTEXTE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>4</b>
<b>CHAPITRE 1 : LA MEMOIRE .....</b>	<b>4</b>
<b>1 – Définition de la mémoire.....</b>	<b>4</b>
<b>2 – Classification des différents systèmes de mémoire .....</b>	<b>4</b>
2.1 – La mémoire à court terme.....	4
2.2 – La mémoire à long terme .....	5
2.3 – Cas particulier de la mémoire spatiale .....	7
<b>3 – La consolidation mnésique .....</b>	<b>9</b>
3.1 – La consolidation synaptique .....	9
3.2 – Bases moléculaires de la plasticité synaptique et de la mémoire.....	13
3.2 – La théorie du « tagging » synaptique et de la capture .....	23
3.3 – La consolidation systémique .....	26
<b>CHAPITRE 2 : LA BOUCLE HIPPOCAMPO-CORTICO-THALAMIQUE.....</b>	<b>33</b>
<b>1 – L’hippocampe .....</b>	<b>33</b>
1.1 - Organisation anatomique .....	33
1.2 - Connexions de la formation hippocampique .....	34
1.3 - Les fonctions de l’hippocampe et de la formation hippocampique .....	35
<b>2 – Le cortex préfrontal médian .....</b>	<b>39</b>
2.1 - Description anatomique et connexions .....	39
2.3 - Fonctions .....	40
<b>3 – Les noyaux reuniens et rhomboïde de la ligne médiane du thalamus .....</b>	<b>40</b>
3.1 - Organisation neuroanatomique.....	40
3.2 - Neurotransmission .....	41
3.3 - Connexions.....	42
3.4 - La boucle hippocampo-cortico-thalamique .....	46
<b>CHAPITRE 3 : DU GENE A LA PROTEINE .....</b>	<b>50</b>
<b>1 – Généralités .....</b>	<b>50</b>
<b>2 – La transcription.....</b>	<b>51</b>
2.1 – L’initiation.....	51

2.2 – L'élongation .....	53
2.3 – La terminaison .....	54
2.4 – Les modifications post-transcriptionnelles .....	54
<b>3 – La traduction .....</b>	<b>55</b>
3.1 – L'initiation.....	56
3.2 – L'élongation .....	59
3.3 – La terminaison .....	60
<b>4 – Les modifications épigénétiques .....</b>	<b>61</b>
4.1 - Les modifications post-traductionnelles des histones .....	62
4.2 – Régulations épigénétiques et processus mnésiques.....	64
<b>PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>66</b>
<b>1 - Animaux.....</b>	<b>66</b>
<b>2 - Chirurgie stéréotaxique.....</b>	<b>66</b>
2.1 - Principe.....	66
2.2 - Protocole expérimental.....	67
<b>3 - La piscine de Morris .....</b>	<b>68</b>
3.1 - Description du dispositif.....	68
3.2 - Protocole expérimental.....	69
<b>4 - Histologie et Immunohistochimie .....</b>	<b>70</b>
4.1 - Mise à mort des rats.....	70
4.2 - Préparation des coupes.....	71
4.3 - Immunohistochimie de la protéine NeuN.....	71
4.4 - Immunohistochimie de la protéine c-Fos.....	73
<b>5 – Stéréologie .....</b>	<b>73</b>
<b>6 - Biologie moléculaire : analyses protéiques et génomiques .....</b>	<b>75</b>
6.1 - Extraction des protéines totales .....	75
6.2 - Western blot.....	76
6.3 - Extraction des ARN totaux .....	77
6.4 - Rétro-transcription et PCR quantitative.....	78
<b>7 – Analyses statistiques.....</b>	<b>78</b>
<b>PARTIE 3 : CONTRIBUTIONS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>79</b>
<b>PARTIE 1 : LESIONS ET TEST COMPORTEMENTAL .....</b>	<b>79</b>
<b>1 – Contexte.....</b>	<b>79</b>

<b>2 – La lésion des noyaux ReRh.....</b>	<b>80</b>
<b>3 – Tâche comportementale : la piscine de Morris .....</b>	<b>83</b>
3.1 – Expérience 1 .....	84
3.2 – Expérience 2 .....	87
3.3 – Expérience 3 .....	88
<b>PARTIE 2 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES .....</b>	<b>91</b>
<b>1 - Le séquençage de CA1 dorsal .....</b>	<b>91</b>
1.1 – Sélection des échantillons à séquencer.....	91
1.2 – Premiers résultats et ajustements .....	93
1.3 – Analyse des résultats.....	96
1.4 – Conclusion générale sur le séquençage des ARNm de CA1 dorsal.....	113
<b>2 – Le séquençage de CA1 ventral .....</b>	<b>115</b>
2.1 – Evaluation de la qualité de la sous-dissection.....	115
2.2 – Analyse des résultats.....	116
2.3 – Conclusion générale sur le séquençage des ARNm de CA1 ventral .....	130
<b>3 – Analyse de l'expression des gènes dans le CPFm.....</b>	<b>131</b>
3.1 – Contexte scientifique.....	131
3.2 – Résultats .....	132
3.3 – Conclusion sur l'expression des gènes dans le CPFm.....	135
<b>PARTIE 3 : ANALYSE DE L'ACTIVATION DES STRUCTURES PENDENT L'APPRENTISSAGE EN REPONSE A LA</b>	
<b>LESIONS DES NOYAUX ReRh : PRODUCTION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION C-FOS ET ZIF268.....</b>	<b>137</b>
<b>1 – Contexte scientifique.....</b>	<b>137</b>
<b>2 – Quantifications par Western blot.....</b>	<b>137</b>
2.1 – La lésion des noyaux ReRh provoque une augmentation des niveaux de la protéine c-Fos dans CA1 dorsal en réponse à l'apprentissage .....	138
2.2 – La lésion des noyaux ReRh provoque une augmentation des niveaux de la protéine c-Fos dans le CPFm en réponse à l'apprentissage .....	139
<b>3 – Quantifications stéréologiques de la protéine c-Fos.....</b>	<b>139</b>
3.1 – La lésion des noyaux ReRh provoque une augmentation des niveaux de c-Fos dans CA1 dorsal en réponse à l'apprentissage .....	139
3.2 – La lésion des noyaux ReRh provoque une augmentation des niveaux de c-Fos dans le CCA en réponse à l'apprentissage.....	140
<b>4 – Conclusion générale sur l'activité de CA1 dorsal et du CPFm au cours de la formation d'une mémoire spatiale .....</b>	<b>142</b>

## **PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....144**

<b>PREAMBULE A LA DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>144</b>
<b>1 – La lésion des noyaux reRh.....</b>	<b>144</b>
1.1 - ... un parcours du combattant.....	144
1.2 - ... un modèle pertinent ?.....	145
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>150</b>
<b>1 – Hypothèse d'un changement de métabolisme dans CA1 dorsal.....</b>	<b>150</b>
<b>2 – La lésion des noyaux ReRh abaisse l'expression du bdnf dans le CPFm .....</b>	<b>153</b>
<b>3 – Dynamique d'activation du gène immédiat c-Fos au cours d'un apprentissage spatial ...</b>	<b>156</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>161</b>

## **ANNEXES.....163**

<b>ANNEXE 1 .....</b>	<b>163</b>
<b>1 – Contexte scientifique.....</b>	<b>163</b>
<b>2 – Méthodes .....</b>	<b>163</b>
2.1 – La piscine de Morris.....	164
2.2 – Mise à mort et dissections .....	165
2.3 – Analyses biochimiques .....	165
2.4 – Analyses statistiques .....	165
<b>3 – Résultats – Cinétique « Acquisition » .....</b>	<b>165</b>
3.1 – Piscine de Morris .....	165
3.2 – Analyse de l'expression des gènes .....	166
3.3 – Analyse de l'acétylation des histones au cours de l'apprentissage .....	171
3.3 – Conclusion sur l'expression des gènes et l'acétylation des histones induites par l'apprentissage spatial.....	173
<b>4 – Résultats – Cinétique « Post-acquisition ».....</b>	<b>174</b>
4.1 – Piscine de Morris .....	174
4.2 – Analyse de l'expression des gènes dans CA1 dorsal et le CPFm .....	174
4.3 – Analyse de l'expression protéique dans le CPFm.....	177
4.3 – Conclusion sur l'expression des gènes et des protéines induite après un apprentissage spatial .....	177
<b>5 – Conclusion générale sur l'effet de l'apprentissage sur l'expression génique et protéique</b>	<b>178</b>
<b>ANNEXE 2 .....</b>	<b>180</b>
<b>1 – Contexte scientifique.....</b>	<b>180</b>

<b>2 – Méthodes .....</b>	<b>180</b>
2.1 – Chirurgie stéréotaxique .....	180
2.2 – Piscine de Morris .....	181
2.3 – Mise à mort .....	181
2.4 – Analyses biochimiques .....	181
2.5 – Analyses statistiques .....	181
<b>3 – Résultats.....</b>	<b>181</b>
3.1 – Piscine de Morris .....	181
3.2 – Absence de persistance de l’expression des gènes immédiats dans le CPFm de rats opérés.....	183
3.3 – Absence de production de c-Fos dans le CPFm après un délai de 20 jours .....	184
<b>4 – Conclusion sur l’activité transcriptionnelle et protéique dans le CPFm de rats opérés .....</b>	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>187</b>





## Liste des figures

---

Figure 1 : Modèle d'organisation des sous-systèmes de mémoire à long terme. ....	7
Figure 2 : Schéma simplifié des événements intracellulaires conduisant à l'expression des gènes immédiats tel que c-fos.....	15
Figure 3 : Structure du gène du bdnf et ses transcrits. Les exons sont représentés par des rectangles blancs.....	17
Figure 4 : Voies de signalisation intracellulaires déclenchées par l'activation du récepteur TrkB par le BDNF. ...	18
Figure 5 : La voie des MAPK. ....	19
Figure 6 : L'activation d'ERK induit la transcription de gènes en lien avec la plasticité synaptique et structurale. ....	22
Figure 7 : Théorie du « tagging » synaptique et de la capture.....	24
Figure 8 : Activité métabolique cérébrale au cours du rappel d'un souvenir récent et ancien.....	29
Figure 9 : Modèle standard de la consolidation systémique.....	30
Figure 10 : Théorie des traces multiples.....	32
Figure 11 : Boucle trisynaptique de l'hippocampe. ....	34
Figure 12 : Les cellules spécialisées dans le codage spatial de l'environnement.....	37
Figure 13 : Organisation anatomique des noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus. ....	41
Figure 14 : Afférences du noyau reuniens (Re).....	43
Figure 15 : Afférences du noyau rhomboïde (Rh).....	44
Figure 16 : Efférences du noyau reuniens (Re).. ....	45
Figure 17 : Efférences du noyau rhomboïde (Rh). ....	46
Figure 18 : Initiation de la transcription.....	53
Figure 19 : Le tableau du code génétique.. ....	56
Figure 20 : Initiation de la traduction.....	58
Figure 21 : Elongation de la traduction.....	60
Figure 22 : Les différents états de la chromatine.....	64
Figure 23 : Schéma du dispositif d'instillation.....	68
Figure 24 : Illustration de pièce d'expérimentation.....	69
Figure 25 : Illustration d'un rat sur une plate-forme cachée et sur une plate-forme visible.....	70
Figure 26 : Exemple d'une lésion des noyaux ReRh.....	81
Figure 27 : Récapitulatif de l'étendue des lésions des rats de l'expérience 1.....	81
Figure 28 : Récapitulatif de l'étendue des lésions des rats de l'expérience 2.....	82
Figure 29 : Récapitulatif de l'étendue des lésions des rats de l'expérience 3.....	82
Figure 30 : Résultat du jour d' « habitude » - Expérience 1.....	85
Figure 31 : Récapitulatif des différents paramètres évalués au cours de la tâche comportementale – Expérience 1.....	86
Figure 32 : Résultat du jour d' « habitude » - Expérience 2.....	87

<i>Figure 33 : Récapitulatif des différents paramètres évalués au cours de la tâche comportementale – Expérience 2</i>	88
<i>Figure 34 : Résultat du jour d' « habitude » - Expérience 3.</i>	89
<i>Figure 35 : Récapitulatif des différents paramètres évalués au cours de la tâche comportementale – Expérience 3.</i>	90
<i>Figure 36 : Evaluation de l'enrichissement en CA1 par RT-qPCR.</i>	92
<i>Figure 37 : Evaluation de l'enrichissement en HD par RT-qPCR.</i>	92
<i>Figure 38 : Tableau du nombre de gènes significativement modulés avec les 24 échantillons.</i>	93
<i>Figure 39 : Distance entre chaque échantillon.</i>	94
<i>Figure 40 : Evaluation de l'enrichissement en CA1 après séquençage.</i>	95
<i>Figure 41 : Evaluation de la sous-dissection dorso-ventrale après séquençage, par région et par échantillon.</i>	95
<i>Figure 42 : Tableau du nombre de gènes significativement modulés avec 17 échantillons.</i>	96
<i>Figure 43 : Résultats statistiques des comparaisons entre « Sham » et « Lésés ».</i>	97
<i>Figure 44 : Tableau des gènes surexprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh.</i>	98
<i>Figure 45 : Tableau des gènes sous-exprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh.</i>	98
<i>Figure 46 : Résultats statistiques des comparaisons entre les différents groupes « Sham ».</i>	100
<i>Figure 47 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes de la comparaison « PTCS vs HCS ».</i>	101
<i>Figure 48 : Relation fonctionnelle entre des gènes surexprimés de la comparaison « PTCS vs HCS ».</i>	101
<i>Figure 49 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes de la comparaison « PTVS vs HCS ».</i>	102
<i>Figure 50 : Relation fonctionnelle entre les gènes surexprimés de la comparaison « PTVS vs HCS ».</i>	102
<i>Figure 51 : Résultats statistiques des comparaisons entre les différents groupes « Lésés ».</i>	103
<i>Figure 52 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes surexprimés de la comparaison « PTCL vs HCL ».</i>	104
<i>Figure 53 : Mise en évidence du cluster « Ribosome » chez le groupe PTCL.</i>	104
<i>Figure 54 : Résultats de la quantification des gènes eif3m et eif2α par RT-qPCR.</i>	105
<i>Figure 55 : Résultats de la quantification des gènes immédiats c-fos, arc et egr1 par RT-qPCR.</i>	105
<i>Figure 56 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes surexprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».</i>	106
<i>Figure 57 : Mise en évidence des clusters fonctionnels de la comparaison « PTVL vs HCL ».</i>	106
<i>Figure 58 : Dendrogrammes des gènes ribosomiques surexprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».</i>	107
<i>Figure 59 : Dendrogramme des échantillons en fonction des gènes mitochondriaux surexprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».</i>	107
<i>Figure 60 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes sous-exprimés de la comparaison « PTCS vs HCS ».</i>	109
<i>Figure 61 : Clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes sous-exprimés de la comparaison « PTCS vs HCS ».</i>	110
<i>Figure 62 : Exemples de clusters obtenus avec les gènes sous-exprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».</i>	111

Figure 63 : Clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes sous-exprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».	111
Figure 64 : Clusters propres au groupe « Lésés » obtenus à partir des gènes sous-exprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».	112
Figure 65 : Evaluation de l'enrichissement en CA1 par RT-qPCR.	115
Figure 66 : Evaluation de l'enrichissement en HV par RT-qPCR.	116
Figure 67 : Tableau du nombre de gènes significativement modulés pour les différentes comparaisons.	117
Figure 68 : Distance entre chaque échantillon.	117
Figure 69 : Evaluation de l'enrichissement en CA1 après séquençage.	118
Figure 70 : Evaluation de la sous-dissection dorso-ventrale après séquençage.	118
Figure 71 : Résultats statistiques des comparaisons entre « Sham » et « Lésés ».	119
Figure 72 : Tableau des gènes surexprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh.	120
Figure 73 : Tableau des gènes sous-exprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh.	120
Figure 74 : Résultats statistiques des comparaisons des groupes « Sham ».	121
Figure 75 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes de la comparaison « PTCS vs HCS ».	122
Figure 76 : Relation fonctionnelle entre les gènes surexprimés dans la comparaison « PTCS vs HCS ».	122
Figure 77 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes de la comparaison « PTVS vs HCS ».	123
Figure 78 : Relation fonctionnelle entre les gènes surexprimés dans la comparaison « PTVS vs HCS ».	123
Figure 79 : Relation fonctionnelle entre les gènes surexprimés dans la comparaison « PTCL vs HCL ».	124
Figure 80 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes de la comparaison « PTVL vs HCL ».	124
Figure 81 : Relation fonctionnelle entre les gènes surexprimés dans la comparaison « PTVL vs HCL ».	125
Figure 82 : Croisement entre CA1 dorsal et CA1 ventral des listes de gènes surexprimés dans chaque condition.	127
Figure 83 : Tableau des gènes sous-exprimés en réponse à l'apprentissage chez le groupe « Sham ».	128
Figure 84 : Tableau des gènes sous-exprimés en réponse à l'apprentissage chez le groupe « Lésés ».	129
Figure 85 : Croisement entre CA1 dorsal et CA1 ventral des listes de gènes sous-exprimés dans chaque condition.	130
Figure 86 : Expression des gènes immédiats dans le CPFm.	132
Figure 87 : Expression des différents transcrits du bdnf dans le CPFm.	134
Figure 88 : Variations des quantités des FT c-Fos et Zif268 en fonction de l'apprentissage et/ou de la lésion dans CA1 dorsal.	138
Figure 89 : Variations des quantités des FT c-Fos en réponse à l'apprentissage et/ou la lésion dans le CPFm.	139
Figure 90 : Immunohistochimie de la protéine c-Fos dans CA1 dorsal de rats « Sham » et « Lésés » et quantification.	140
Figure 91 : Immunohistochimie de la protéine c-Fos dans le cortex cingulaire antérieur de rats « Sham » et « Lésés » et quantification.	141
Figure 92 : Illustration des différentes techniques possibles pour cibler une population neuronale par l'approche optogénétique.	147

<i>Figure 93 : Différence de signature neuronale selon les conditions.</i>	151
<i>Figure 94 : Illustration du rôle du lactate dans la formation d'une mémoire à long terme.</i>	152
<i>Figure 95 : Illustration du type de métabolisme du glucose associé à l'expression de gènes de plasticité synaptique (glycolyse aérobie) ou de gènes de transmission synaptique (glycolyse oxydative) au cours du développement.</i>	153
<i>Figure 96 : Modèle proposé par Bramham et collaborateurs sur le rôle de Arc dans la consolidation de la PLT soutenue par le BDNF.</i>	155
<i>Figure 97 : Hypothèses du rôle du retour du CPFm via les noyaux ReRh sur le contrôle de l'expression de c-Fos dans l'hippocampe, au cours de la formation d'un souvenir spatial.</i>	158
<i>Figure 98 : Décours temporel de la cinétique « Acquisition ».</i>	164
<i>Figure 99 : Décours temporel de la cinétique « Post-acquisition ».</i>	164
<i>Figure 100 : Distance moyenne parcourue pour atteindre la plate-forme au cours de l'acquisition.</i>	166
<i>Figure 101 : Expression de trois gènes immédiats dans l'HD au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.</i>	167
<i>Figure 102 : Expression de six gènes tardifs dans l'HD au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.</i>	169
<i>Figure 103 : Expression de trois gènes immédiats dans le CPFm au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.</i>	170
<i>Figure 104 : Expression de six gènes tardifs dans le CPFm au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.</i>	170
<i>Figure 105 : L'acétylation des histones H2B et H3 dans l'HD ne varie pas au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.</i>	171
<i>Figure 106 : Evolution de l'acétylation des histones H2B, H3 et H4 dans le CPFm au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.</i>	172
<i>Figure 107 : Distance moyenne parcourue pour atteindre la plate-forme.</i>	174
<i>Figure 108 : Expression de trois gènes immédiats dans CA1 dorsal au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.</i>	175
<i>Figure 109 : Expression de gènes tardifs dans CA1 dorsal au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.</i>	175
<i>Figure 110 : Expression de trois gènes immédiats dans le CPFm au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.</i>	176
<i>Figure 111 : Expression de gènes tardifs dans le CPFm au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.</i>	176
<i>Figure 112 : Expression de protéines dans le CPFm au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.</i>	177
<i>Figure 113 : Distance moyenne parcourue pour atteindre la plate-forme visible au cours du jour d' « habitude ».</i>	182
<i>Figure 114 : Récapitulatif des différents paramètres évalués au cours de la tâche comportementale.</i>	183
<i>Figure 115 : Expression des gènes immédiats c-fos, zif268 et arc dans le CPFm.</i>	184
<i>Figure 116 : Expression de la protéine c-Fos dans le CPFm.</i>	184

## *Principales abréviations*

---

**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AGm** : cortex agrulaire médian  
**AMPA** :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazol acide ropionique  
**AP-1** : activator protein 1  
**Arc** : activity-regulated cystoskeleton-associated protein  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**ARNpolIII** : ARN polymérase II  
**ARNt** : ARN de transfert  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**BDNF** : brain-derived neurotrophic factor  
**CaMKII** : calcium calmodulin-dependent kinase II  
**CBP** : CREB binding protein  
**CCA** : cortex cingulaire antérieur  
**CI** : complexe d'initiation  
**CPFm** : cortex préfrontal médian  
**CPI** : complexe de pré-initiation  
**CRE** : cAMP responsive element  
**CREB** : cAMP response element binding protein  
**DLT** : dépression à long terme  
**eEF** : eukaryotic elongation factor  
**Egr1** : early growth factor 1  
**eIF** : eukaryotic initation factor  
**Elk-1** : E twenty-six-like transcription factor  
**eRF** : eukaryotic release factor  
**ERK** : extracellular signal-regulated kinase  
**FT** : facteur de transcription  
**GABA** :  $\gamma$ -aminobutyric acid  
**GAP** : GTPases-activating proteins

**GEF** : guanyl nucleotide exchange factors  
**GD** : gyrus denté  
**GTP** : guanosine triphosphate  
**HD** : hippocampe dorsal  
**HV** : hippocampe ventral  
**IEG** : immediate early genes  
**IL** : cortex infralimbique  
**KO** : knock-out  
**MAPK** : mitogen-activated protein kinases  
**MEK** : MAPK/ERK kinase  
**miARN** : micro ARN  
**MRE** : myocyte enhancer factor 2 binding site  
**MSK** : mitogen- and stress-activated kinase  
**NMDA** : *N*-méthyl-*D*-aspartate  
**Pb** : paire de bases  
**PL** : cortex prélimbique  
**PLT** : potentialisation à long terme  
**Re** : noyau reuniens  
**Rh** : noyau rhomboïde  
**SARE** : synaptic-activity responsive element  
**siARN** : small interfering ARN  
**SRE** : serum responsive element  
**SRF** : serum response factor  
**TBP** : TATA binding protein  
**TCF** : ternary complex factor  
**TRE** : tetradecanoyl phorbol acetate response element  
**TrkB** : tropomyosin receptor kinase B

*Introduction générale et objectifs*

*de la thèse*

## *Introduction générale et objectifs de la thèse*

---

### **Cadre générale de la thèse**

Une des caractéristiques les plus fascinantes du cerveau est sa capacité à former des souvenirs et à les conserver durablement, des semaines, des mois, toute la vie. La formation des souvenirs n'est pas instantanée. Elle implique une réorganisation progressive des réseaux neuronaux à l'échelle des systèmes afin de stabiliser la trace mnésique initialement labile. Ce processus se nomme la consolidation systémique.

La théorie standard de la consolidation systémique propose que l'encodage des souvenirs épisodiques commence par une activation des régions corticales sensorielles, qui transfèrent ensuite l'information à l'hippocampe qui la réorganise en une trace mnésique cohérente, mais labile. La stabilisation de cette trace repose sur la réactivation des connexions entre l'hippocampe et les aires corticales et a lieu principalement au cours des périodes de sommeil. Ces réactivations renforceraient les connexions cortico-corticales, permettant un désengagement progressif de l'hippocampe au profit d'un encreage durable du souvenir dans le cortex (Marr, 1971 ; Frankland et Bontempi, 2005). La consolidation des souvenirs nécessite donc un dialogue important entre l'hippocampe et le cortex, notamment le cortex préfrontal médian (CPFm) dont l'implication dans la consolidation des souvenirs a été montrée à plusieurs reprises (Frankland et al., 2004 ; Maviel et al., 2004 ; Teixeira et al., 2006). Ce dialogue suppose des interactions physiques entre ces deux structures. Cependant, les connexions anatomiques entre l'hippocampe et le CPFm ne sont pas réciproques. L'hippocampe projette vers le CPFm (Swanson, 1981 ; Ferino et al., 1987) mais le CPFm doit passer par des structures intermédiaires pour projeter à l'hippocampe. L'un des relais possibles est le noyau reuniens associé au noyau rhomboïde. En effet, ces noyaux sont connectés de manière réciproque, d'une part à l'hippocampe et d'autre part au CPFm (Vertes et al., 2012 ; Vertes et al., 2007 ; Varela et al., 2014) et sont capables de moduler l'activité de ces deux structures (Dolleman-Van der Weel et al., 1997 ; Bertam et Zhang, 1999 ; Di Prisco et Vertes, 2006). Des études ont également montré que les noyaux ReRh sont impliqués dans des tâches nécessitant l'implication conjointe de l'hippocampe et du CPFm (Hembrook et al., 2012 ; Hallock et al., 2013, 2016, Xu et Südhof, 2013 ; Layfield et al.,



## ***Introduction générale***

2015). Au laboratoire, il a été montré qu'une lésion des noyaux ReRh perturbait la consolidation d'un souvenir spatial puisque des rats lésés, bien que capables de rappeler un souvenir à long terme récent (5 jours post-acquisition), ne parviennent pas à rappeler un souvenir à long terme ancien (25 jours post-acquisition) (Loureiro et al., 2012 ; Ali et al., 2017). Les noyaux ReRh participeraient donc au dialogue hippocampo-cortical permettant la réorganisation de la trace mnésique au sein du cortex. Néanmoins, les mécanismes employés par ces noyaux au cours de la consolidation du souvenir restent, à ce jour, encore inconnus.

La consolidation systémique repose sur une consolidation synaptique, qui prend place parallèlement dans l'hippocampe et le CPFm. Cette consolidation synaptique est induite par l'activité neuronale, tel que l'apprentissage, et permet une réorganisation locale (au sein d'une structure cérébrale) du réseau de neurones. Elle débute par l'activation de récepteurs membranaires qui déclenchent une cascade d'éléments intracellulaires, conduisant à l'activation quasi-immédiate de la transcription de gènes, nommés gènes immédiats. La plupart d'entre eux codent pour des protéines jouant le rôle de facteur de transcription (FT), c'est-à-dire qui favorisent l'expression de gènes, dits « tardifs » (car exprimé plus tardivement après la stimulation neuronale), qui vont conférer au neurone la capacité d'encoder et de consolider le souvenir. Les plus connus sont les FT c-Fos, Zif268 (Egr1) ou encore Arc. L'expression de ces gènes immédiats reflète donc l'activité neuronale et est nécessaire pour la mise en place d'une plasticité synaptique, support de la consolidation mnésique à long terme. Une dérégulation de leur expression peut donc être néfaste pour les processus qu'ils sous-tendent.

## **Objectifs de la thèse**

Ma thèse a pour objectif d'étudier le rôle des noyaux ReRh sur les mécanismes moléculaires - régulations transcriptionnelles et protéiques – qui prennent place au sein de l'hippocampe et du CPFm au cours de la formation d'un souvenir spatial. Pour cela, j'ai travaillé avec des rats dont les noyaux ReRh ont été lésés par injection stéréotaxique de NMDA. Ces rats ont été entraînés durant trois jours dans un test de mémoire spatial (piscine de Morris) afin d'étudier l'expression des gènes et des protéines qui prend place au cours de l'encodage/consolidation du souvenir, au sein de l'hippocampe et du CPFm. Une étude de

## ***Introduction générale***

l'expression des gènes a notamment été réalisée par séquençage des ARNm de l'hippocampe. Une étude visant à quantifier les niveaux de protéines du gène immédiat c-Fos dans l'hippocampe et le CPFm a également été réalisée. Cela a permis de dégager quelques hypothèses quant au rôle des noyaux ReRh dans la formation des souvenirs, afin d'essayer d'apporter des réponses aux raisons de l'absence de rappel d'un souvenir à long terme ancien.

## **Structure de la thèse**

La première partie de ma thèse, « Contexte scientifique », s'attache à présenter les concepts importants sur lesquels mon travail s'est basé. Dans un premier chapitre, je présente les différents systèmes de mémoire, en développant plus particulièrement la consolidation synaptique et systémique et ses bases moléculaires. Le deuxième chapitre décrit l'organisation anatomique des trois structures que j'ai étudiées, à savoir l'hippocampe, le CPFm et les noyaux ReRh, ainsi que les relations anatomo-fonctionnelles qui les relient. Enfin, une description générale des mécanismes de la transcription et de la traduction fait l'objet du dernier chapitre. Dans la deuxième partie, « Contributions expérimentales », je présente les résultats que j'ai obtenus, qui s'axent principalement autour de l'analyse des séquençages effectués dans l'hippocampe, de l'expression des gènes dans le CPFm et de la production protéique du facteur de transcription c-Fos dans ces deux structures. Cette thèse se clôt avec la partie « Discussion générale et perspectives » où, en tenant compte de l'ensemble des résultats obtenus, j'émet des hypothèses sur les mécanismes possiblement affectés par la lésion des noyaux ReRh afin de mieux comprendre leur rôle dans le dialogue hippocampo-cortical, avant de conclure en abordant les perspectives amenées par ce travail de thèse.





# **Partie 1 : Contexte** **scientifique**



# Chapitre 1 : La mémoire





## **1 – Définition de la mémoire**

La mémoire peut être définie par l'ensemble des processus mentaux réalisés dans le but d'acquérir, de conserver et de restituer de l'information ou une expérience. La mémoire est une composante indispensable à toutes les espèces vivantes car elle nous permet de réagir de manière adaptée à l'environnement.

La mémorisation se construit en trois étapes successives. La première, l'encodage, permet l'enregistrement de l'information et sa transformation en une représentation mémorisable. L'étape de consolidation assure une stabilité durable à la trace mnésique. Cette étape repose sur deux processus complémentaires : la consolidation synaptique qui engendre la synthèse de nouvelles protéines permettant la création de nouvelles synapses, et la consolidation systémique qui réorganise la trace à l'échelle des systèmes, notamment des circuits hippocampo-corticaux. Finalement, le rappel du souvenir permet de récupérer l'information gardée en mémoire.

## **2 – Classification des différents systèmes de mémoire**

Avec les découvertes issues de cas cliniques, il a été possible de distinguer différents types de mémoire. Plusieurs critères peuvent être utilisés pour effectuer une classification : l'échelle temporelle (mémoire à court terme ou mémoire à long terme), le format des représentations mentales (déclaratives ou non déclaratives) ou le mode de récupération de la trace (explicite ou implicite). Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, le développement de la psychologie cognitive a apporté de nombreux résultats expérimentaux sur la mémoire humaine. Cela a amené Atkinson et Shiffrin (1971) à proposer leur modèle modal de la mémoire.

### **2.1 – La mémoire à court terme**

Selon le modèle de Atkinson et Shiffrin, l'information est d'abord apportée par les sens (ouïe, audition, vue) et peut être maintenue sur une période de quelques millisecondes sous forme d'un registre sensoriel qui constitue la voie d'entrée de l'information (Atkinson and Shiffrin, 1971). Pour que celle-ci passe dans le registre de la mémoire à court terme, un effort mental ou une focalisation attentionnel est nécessaire.

La mémoire à court terme permet un stockage de l'information pendant quelques secondes à quelques minutes. Sa capacité de stockage, ou empan mnésique, est limitée à  $7 \pm 2$  items (Miller, 1994). Il existe également un effet de primauté et de récence. Par exemple, si dans une épreuve de rappel verbal, une liste de 15 mots est présentée à des participants qui doivent les restituer dans l'ordre souhaité (Postman and Phillips, 1965), les mots présentés au début (effet de primauté) et à la fin (effet de récence) seront mieux rappelés que ceux du milieu de la liste. Lorsque l'information maintenue en mémoire à court terme fait l'objet d'une manipulation mentale (par exemple restituer une suite de nombres à l'envers ou effectuer un calcul mental), on parle de mémoire de travail. Si l'information stockée en mémoire à court terme n'est pas particulièrement pertinente pour le sujet, associée à une charge émotionnelle forte et/ou répétée régulièrement, elle sera rapidement oubliée. Dans le cas contraire, elle passe dans le registre de la mémoire à long terme.

## **2.2 – La mémoire à long terme**

La mémoire à long terme est sous-divisée en deux catégories selon le type d'information mémorisée : la mémoire non-déclarative et la mémoire déclarative (Figure 1).

### **2.2.1 - La mémoire non déclarative**

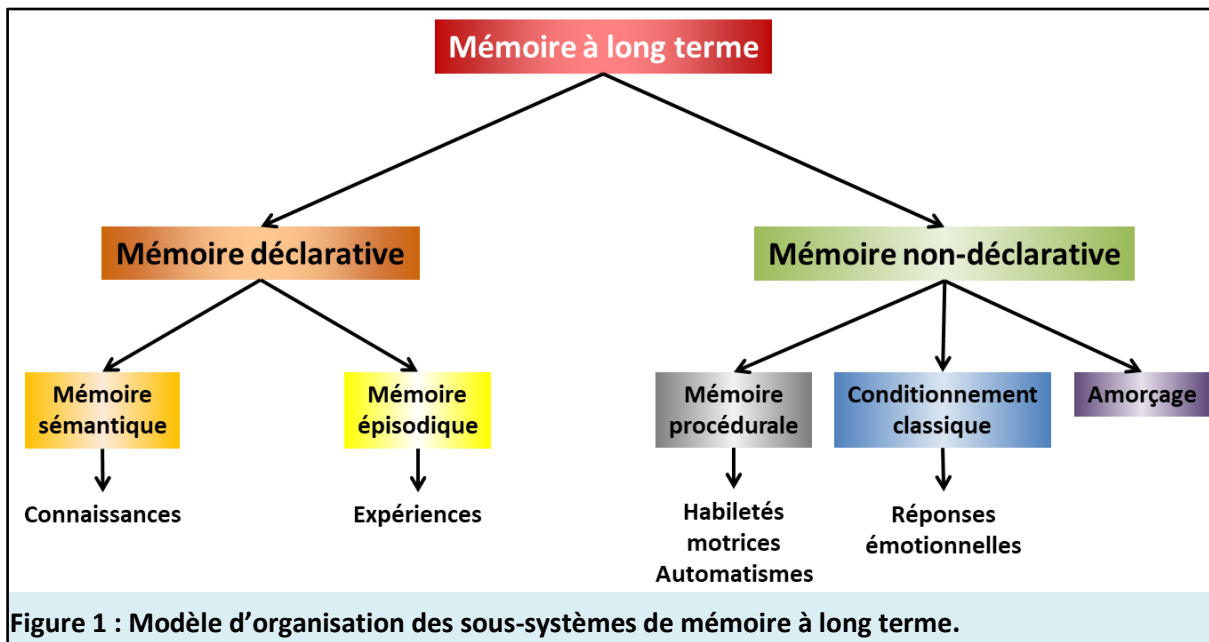
Le rappel des souvenirs stockés en mémoire non-déclarative ne nécessite pas un accès conscient à l'information. Ce système regroupe différents types de mémoire tels que les apprentissages procéduraux (aussi appelés habiletés motrices ou automatismes). Ceux-là recouvrent, par exemple, le fait de se brosser les dents, de faire de la bicyclette ou le conditionnement classique (ou Pavlovien) qui définit l'association entre un élément neutre pour l'individu à un élément ayant une valence particulière (par exemple émotionnelle) de telle sorte que l'élément neutre finisse par induire la même réponse que l'élément auquel il a été associé précédemment (alors qu'en l'absence d'association jamais il n'aurait induit cette réponse). La mémoire non déclarative n'est pas, ou difficilement, verbalisable. Les structures sur lesquelles elle repose sont notamment les ganglions de la base (globus pallidus, putamen et noyau caudé), le cervelet, l'amygdale ou encore le cortex frontal.

### **2.2.2 - La mémoire déclarative**

A l'inverse de la mémoire non déclarative, la récupération des informations gardées en mémoire déclarative est consciente et verbalisable. En 1972, Tulving introduisit une distinction entre deux catégories de mémoire déclarative : la mémoire épisodique et la mémoire sémantique (Tulving et al., 1972).

La **mémoire épisodique** regroupe l'ensemble des événements vécus par un individu au cours de sa vie. Ces souvenirs sont associés à un contexte spatial et temporel précis. Ainsi, les souvenirs épisodiques sont constitués des trois composantes suivantes : le « quoi », le « où » et le « quand ». Leur rappel nécessite un effort conscient de la part de l'individu. Les souvenirs épisodiques sont le fondement de l'identité de tout individu puisqu'ils racontent son histoire. Cette mémoire repose sur l'hippocampe pour le contexte spatio-temporel, l'amygdale pour la composante émotionnelle et le cortex frontal.

La **mémoire sémantique** regroupe les connaissances générales, les faits, les concepts, les règles qui gèrent le bon fonctionnement d'une communauté qu'un individu acquiert au cours de sa vie. Ces informations sont dénuées de contexte spatio-temporel. En effet, on se souvient d'une information (Lima est la capitale du Pérou, Phnom Penh celle du Cambodge), mais nous pouvons difficilement associer une date et un lieu au moment où nous avons appris cette information. Cette mémoire est dépendante des régions corticales comme le lobe frontal qui guide nos comportements en fonction des connaissances acquises, et le lobe temporal qui code les informations factuelles.



## 2.3 – Cas particulier de la mémoire spatiale

La mémoire spatiale regroupe les informations sur l'environnement d'un individu. Cette mémoire permet de se localiser, de s'orienter et de naviguer dans un environnement connu, mais également d'encoder tout nouvel environnement. Cette mémoire permet à la partie du règne animal qui en est dotée de savoir où se trouve son lieu de vie, les ressources alimentaires, mais également les prédateurs afin de les éviter. Elle a donc un rôle important dans la survie des espèces, ce qui explique que les mécanismes permettant le traitement de l'information spatiale soient fortement conservés au cours de l'évolution.

La mémoire spatiale peut dépendre de deux types de représentations de l'espace : une représentation égocentrée ou allocentrée. O'Keefe et Nadel, dans leur ouvrage « The Hippocampus as a Cognitive Map » (1978) parlent d'un système de « routes » pour le premier et d'un système de « cartes » pour le second.

### 2.3.1 - La représentation égocentrée

La représentation égocentrée est relative au placement du corps de l'individu dans l'espace et de la perception directe qu'il a de son environnement. Cela veut dire qu'il considère les indices visuels par rapport à sa propre position. Ainsi, pour atteindre son but, l'individu effectue une série de mouvements dont l'enchaînement est automatique (pour aller de chez moi au laboratoire, où je me rends quasi quotidiennement depuis 4 ans). Ce traitement de l'information est économique en termes de quantité d'informations à traiter et mémoriser,

mais peu flexible puisque tout changement sur le trajet conduit à la désorientation. Il ne nécessite pas la mise en œuvre d'un processus conscient de navigation reposant sur un échantillonnage fréquent au cours du trajet.

### **2.3.2 - La représentation allocentrée**

La représentation allocentrée positionne de manière relative les indices visuels entre eux, et est donc indépendante de la position du corps dans l'environnement. Cette représentation permet à l'individu de se former une « carte mentale » (ou cognitive, pour reprendre le terme de Tolman) de l'environnement et d'y naviguer même lorsqu'il ne s'y trouve pas physiquement afin de choisir l'itinéraire le plus approprié pour atteindre son but. Ce système est donc beaucoup plus flexible que le système de « routes » puisque tout changement sur le trajet entraînera uniquement un ajustement du parcours sans pour autant désorienter l'individu puisqu'il a accès à tous les chemins possibles. Selon O'Keefe et Nadel (1978), la formation d'une « carte mentale » commence toujours par une représentation égocentrée. Seule la répétition de la navigation dans l'environnement permet de placer les indices visuels les uns par rapport aux autres et ainsi de constituer une représentation allocentrée.

Chez le rongeur, la mémoire spatiale est souvent considérée comme un bon modèle de mémoire épisodique humaine. La mémoire spatiale nécessite la création de liens entre les différents indices spatiaux pour faciliter l'orientation, tout comme la mémoire épisodique crée des liens entre les éléments d'un événement et son contexte spatial. Par ailleurs, elle regroupe deux des trois composantes retrouvées chez l'humain, à savoir le « quoi » et le « où » d'un événement. Seule la conscience du moment (le « quand ») auquel fait référence le souvenir ne peut être étudiée chez le rongeur. De ce fait, on ne parle pas de mémoire épisodique, mais de mémoire de type épisodique.

L'avantage de la mémoire spatiale est qu'elle peut être étudiée chez le rongeur (contrairement à la mémoire épisodique à proprement parler puisqu'elle est verbalisable). En 1979, Olton a même distingué deux types de mémoire spatiale. La première est la mémoire spatiale de travail qui ne nécessite pas de consolidation systémique et appartient au système de mémoire à court terme. Elle concerne le stockage d'informations spécifiques à une situation donnée et dont la pertinence n'est valable que pour une durée limitée, généralement le temps d'un essai (dans un labyrinthe radial) ou de deux essais successifs (par exemple, alternance dans un labyrinthe en T). La seconde est la mémoire spatiale de

référence qui a besoin d'être consolidée et fait donc partie du système de mémoire à long terme. Elle concerne les informations qui restent constantes dans le temps et dont l'utilisation reste pertinente à chaque fois que l'animal rencontre la situation à laquelle ces informations sont associées (Olton, 1979).

### **3 – La consolidation mnésique**

La consolidation des souvenirs est l'un des trois processus de la mémorisation. Elle permet à une trace mnésique encodée initialement sous la forme d'une représentation labile d'être progressivement renforcée pour finalement persister sous une forme stable. Le processus de consolidation est sous-divisé en deux mécanismes : la consolidation synaptique, qui a lieu au niveau des synapses, et la consolidation systémique, qui est une réorganisation du souvenir à l'échelle des systèmes.

#### **3.1 – La consolidation synaptique**

La consolidation synaptique peut être définie comme l'ensemble des mécanismes cellulaires modulant l'activité d'une synapse pour augmenter ou bien diminuer les échanges de neurotransmetteurs. Les synapses, lieux d'interaction entre deux neurones, sont en effet plastiques, tant au niveau morphologique que fonctionnel.

##### **3.1.1 – Les différents types de plasticité synaptique**

Il existe au moins quatre types de plasticité synaptique selon la durée de modification de l'activité de la synapse : la potentialisation à court terme, la potentialisation à long terme précoce, la potentialisation à long terme tardive et la dépression à long terme.

La **potentialisation à court terme** prend place dans les minutes qui suivent la création d'un potentiel post-synaptique excitateur déclenché par la libération de neurotransmetteurs par le neurone pré-synaptique. Le neurotransmetteur est du glutamate qui se fixe sur les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazol acide propionique (AMPA), permettant l'entrée de calcium dans la dendrite. Lorsque cette entrée calcique devient suffisante pour atteindre une dépolarisation atteignant le seuil d'activation des récepteurs *N*-méthyl-*D*-aspartate (NMDA), l'ion magnésium qui les maintenait dans un état « fermé » est expulsé, favorisant l'entrée massive de calcium par ce canal. L'activité de l'élément post-synaptique

est alors augmentée. Le calcium intracellulaire va également se fixer à la calmoduline (une abréviation pour **calcium-modulated protein**) ce qui va contribuer à l'activation de différentes kinases, notamment la calmoduline-dependent kinase II (CaMKII). Du fait de sa période transitoire, la plasticité synaptique à court terme serait associée aux processus liés à la mémoire de travail.

La **potentialisation à long terme (PLT) précoce** débute de la même façon que la potentialisation à court terme, c'est-à-dire par l'entrée de calcium dans le neurone et l'activation de kinases dont la CaMKII. Mais elle dure plusieurs heures et permet un renforcement des connexions synaptiques entre deux neurones activés (principe de Hebb). En effet, il y a une augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la synapse, ce qui augmente la taille des épines dendritiques et la transmission du signal par ces récepteurs (Herring and Nicoll, 2016; Lisman, 2017). Deux mécanismes sont avancés pour expliquer ce phénomène, tous deux dépendants de la CaMKII : le premier serait lié au recrutement à la synapse des récepteurs AMPA extra-synaptiques grâce la phosphorylation par la CaMKII (mais également par les protéines kinases A et C) de la sérine 831 présente à l'extrémité C-terminale de la sous-unité GluA1 (Barria et al., 1997a, 1997b) ; le second consisterait en un adressage à la synapse de vésicules membranaires contenant des récepteurs AMPA, suite à l'activation de la cascade des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) par la CaMKII (Makino and Malinow, 2009; Zhu et al., 2002).

La **PLT tardive** repose sur des mécanismes différents. Elle est à l'origine d'un élargissement de la synapse, aussi bien au niveau de l'élément pré-synaptique que de l'élément post-synaptique (Bosch et al., 2014; Meyer et al., 2014), ce qui augmente durablement (au moins 10h) et de façon stable la transmission entre les deux neurones. L'élargissement de la synapse repose donc sur la synthèse de nouvelles protéines (Frey et al., 1993). La PLT tardive nécessiterait également l'intervention d'un troisième facteur (Frémaux and Gerstner, 2015). Dans l'hippocampe il s'agit de la dopamine qui promeut la synthèse protéique dans les dendrites, la production de sous-unités des récepteurs AMPA et leur incorporation à la membrane synaptique (Smith et al., 2005; Lisman et al., 2011). Le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) peut également agir de façon synergique avec la dopamine. En effet, l'activation du récepteur dopaminergique D1 et de la voie du BDNF conduisent à l'activation de la voie des MAPK qui résulte en l'activation de ERK (extracellular-signal regulated kinase)

qui stimule notamment la transcription de gènes impliqués dans la réponse aux stimuli et la plasticité structurale (voir 3.2.3 – Le rôle des MAPK dans la plasticité synaptique et la mémoire) (Alonso et al., 2004; Valjent et al., 2005).

La **dépression à long terme (DLT)** s'oppose à la PLT au niveau fonctionnel par le fait qu'elle induit un affaiblissement durable des synapses. La présence d'un stimulus répété et constant sur l'élément pré-synaptique entraîne une baisse de la réponse de l'élément post-synaptique. La DLT peut s'opérer *via* les récepteurs NMDA ou les récepteurs métabotropiques (mGluR) (Oliet et al., 1997). Le calcium entre par les récepteurs NMDA et se lie à la calmoduline pour activer la protéine phosphatase 2B (PP2B, aussi nommée calcineurine) qui, en déphosphorylant la protéine inhibitrice 1, conduit à l'activation de la protéine phosphatase 1 (PP1) (Mulkey et al., 1993). Celle-ci déphosphoryle la sérine 845 des sous-unités GluA1 des récepteurs AMPA et induit leur internalisation, d'où l'affaiblissement de la transmission synaptique (Collingridge et al., 2004; Hu et al., 2007). Lorsque les mGluR sont impliqués, ils conduisent à l'hydrolyse du phosphatidyl inositol pour générer de l'inositol triphosphate et du diacylglycérol, qui, à leur tour, activent la protéine kinase C (PKC). La PKC, en phosphorylant les récepteurs AMPA, entraînent leur internalisation (Gladding et al., 2009). Ce processus est dépendant de la synthèse de nouvelles protéines (Manahan-Vaughan et al., 2000; Ramiro-Cortés and Israely, 2013). La DLT est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Zeng et al., 2001; Brigman et al., 2010; Dietz and Manahan-Vaughan, 2017).

### 3.1.2 – Plasticité synaptique et mémoire

Depuis la découverte de la PLT, le monde des neurosciences se demande si cette plasticité synaptique ne serait pas le support de la formation des souvenirs. Pour tenter de répondre à cette question, différentes études ont été menées. Par exemple, l'équipe du Dr Tonegawa a développé un modèle de souris transgéniques mutées pour le gène codant pour la CaMKII, inhibant son expression dans le cerveau. Ces souris possèdent des densités post-synaptiques intactes, cependant elles présentent un déficit d'induction de la PLT au niveau de l'hippocampe (synapses entre les aires CA3-CA1) et de l'amygdale. Cette équipe a ensuite testé ces souris transgéniques dans une tâche d'apprentissage spatial en piscine de Morris. Les résultats montrent que les souris mutées présentent un déficit de mémoire spatiale. En



effet, la durée mise pour atteindre la plate-forme au cours des essais est supérieure chez les souris transgéniques comparée à celle des souris contrôles. Qui plus est, les souris transgéniques ne parviennent pas à se remémorer l'emplacement de la plate-forme au cours du test de rappel. Les auteurs en concluent que l'absence de PLT serait à l'origine d'un défaut d'apprentissage et de mémoire spatiale (Silva et al., 1992a, 1992b).

En 2006, Whitlock et collaborateurs ont comparé les effets induits par une PLT à ceux induits par un test d'évitement passif. Ce test consiste à placer un rongeur dans une boîte présentant un côté sombre attractif, et un côté lumineux aversif. Lors de la phase d'acquisition, le rat est placé dans le côté lumineux de la boîte. Lorsqu'il passe du côté sombre, il reçoit un choc électrique au niveau des pattes. Si le souvenir du choc est correctement associé au contexte, lors du test de rappel le rat passe logiquement moins de temps du côté sombre de la boîte. Les auteurs ont mis en évidence que ce test provoquait une augmentation de la phosphorylation de la sérine 831 de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA, qui est caractéristique, voire une véritable signature de la mise en place d'une PLT. Ils ont également observé une augmentation du nombre de ces récepteurs au niveau synaptique en lien avec une augmentation du potentiel de champ excitateur des neurones de CA1. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus après une stimulation à haute fréquence des fibres collatérales de Schaeffer à l'origine d'une PLT (Whitlock et al., 2006). Néanmoins ces deux études ne montrent qu'indirectement le lien entre PLT et mémoire.

Avec les progrès techniques de ces dernières années, des avancées dans l'établissement d'un lien de cause à effet direct entre plasticité synaptique et mémoire ont pu être réalisées. Nabavi et collaborateurs ont utilisé l'optogénétique pour mimer une PLT ou une DLT au cours d'un apprentissage. L'optogénétique est une technique permettant de moduler l'activité des neurones grâce à l'incorporation de canaux ioniques (appelés channelrhodopsines) dont l'ouverture et la fermeture sont contrôlées par l'application d'une stimulation lumineuse à une longueur d'onde donnée. Les auteurs ont d'abord soumis des rats à un conditionnement de peur au son, tâche au cours de laquelle un choc électrique délivré dans les pattes de l'animal est associé à un son particulier. Au cours du rappel, qui consiste à réexposer l'animal au son, les auteurs ont mimé les mécanismes responsables de la PLT (cinq applications de stimulations à 100Hz) ou de la DLT (une stimulation continue de 1Hz pendant 15min) qui s'opèrent dans l'amygdale. Ils ont ainsi observé que la mise en place

d'une DLT, responsable d'une désensibilisation des connexions neuronales, entraînait une absence de peur, donc une « perte » du souvenir. A l'inverse, lorsqu'une PLT est ensuite appliquée sur ces mêmes connexions, les rats présentent de nouveau la peur au son (Nabavi et al., 2014). Cette étude montre que la plasticité synaptique, au travers des mécanismes de PLT et de DLT, est le support de la formation des souvenirs, puisqu'en les modulant il est possible de contrôler l'état du souvenir.

### 3.2 – Bases moléculaires de la plasticité synaptique et de la mémoire

Comme décrit précédemment, les différents types de plasticité synaptique débutent tous par une stimulation des récepteurs membranaires permettant l'entrée de calcium dans le neurone, et ainsi l'activation d'enzymes modulant l'activité de différentes protéines. Parmi ces protéines modulées se trouvent des facteurs de transcription (FT) qui régulent des gènes dont l'expression est très rapide après la stimulation neuronale. Ils se nomment les gènes immédiats précoces, ou « *immediate early genes* » (IEG) en anglais. Ce terme est issu de la virologie où l'infection d'une cellule par un virus conduit à la transcription de plusieurs gènes viraux à partir de FT préexistants. Dans les neurones, l'expression des gènes immédiats précoces reflète l'activité récente de ces neurones et permet de savoir où et quand des neurones ont été activés, suite à un apprentissage par exemple (Lonergan et al., 2010; Cholvin et al., 2014; Barry et al., 2015).

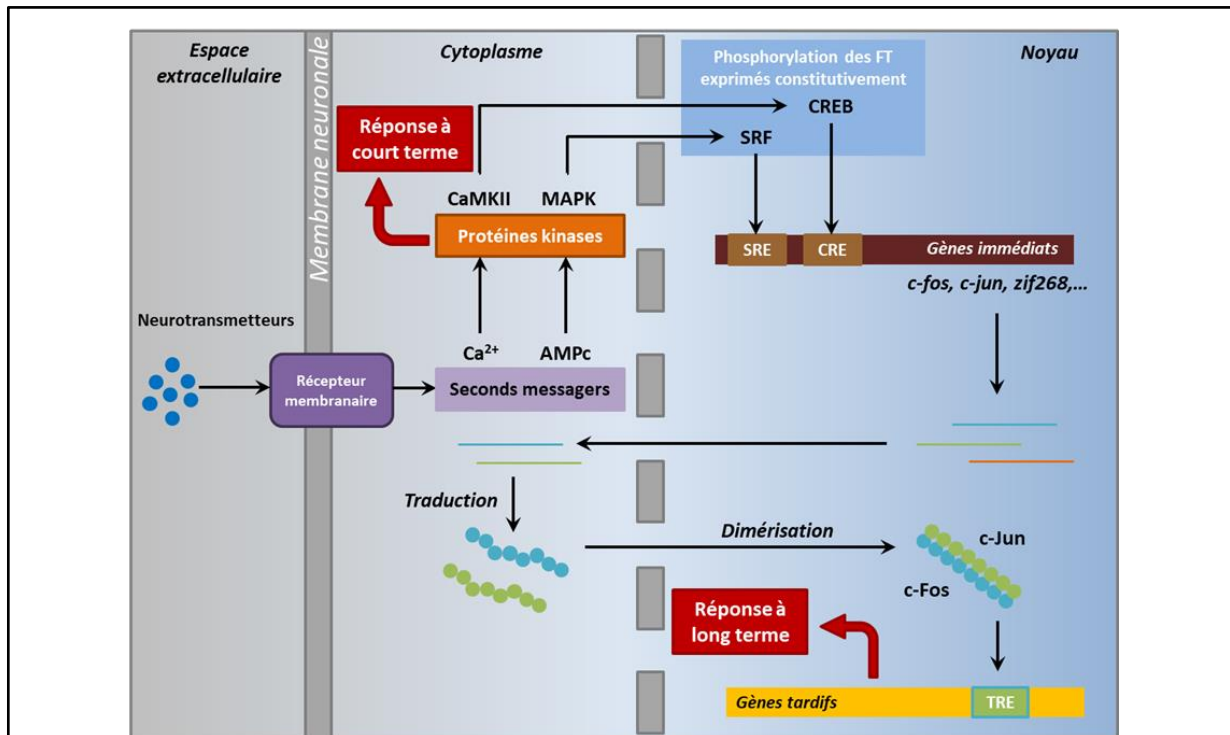
#### 3.2.1- Les gènes immédiats précoces

Parmi les différents gènes immédiats précoces identifiés au cours des années, les plus étudiés sont les gènes *c-fos*, *zif268* (aussi nommé *egr1* pour *early growth factor 1*) et *arc* (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*). Les gènes *c-fos* et *zif268* sont des FT qui régulent des gènes dits « tardifs » alors que *arc* code pour une protéine effectrice.

De façon simplifiée, suite à l'activation la CaMKIV par l'entrée de calcium dans le noyau (Bading, 2013), cette enzyme phosphoryle notamment le FT CREB (cAMP response element binding protein) et l'active. CREB se fixe alors sur le site CRE (cAMP responsive element) présent sur le promoteur du gène *c-fos* et favorise sa transcription. Le gène est également sous la régulation du FT SRF (serum-response element) (Treisman, 1986; Sheng et al., 1988), présent sous forme de dimère, associé à une protéine de la famille des Ternary Complex

Factor (TCF) comme Elk-1 (E twenty-six-like transcription factor). La phosphorylation de ce dernier par ERK contrôle la transcription du gène *c-fos* (Vanhoutte et al., 1999; Lavour et al., 2007; Besnard et al., 2011). Une fois la protéine c-Fos synthétisée, elle se lie avec une protéine de la famille Jun (v-Jun, c-Jun, JunD ou JunB) ou Fos (Fra ou FosB), pour former le complexe AP-1 (activator protein 1, également formé par un homodimère de Jun ou par un hétérodimère Jun-ATF (activating transcription factor)) (Karin et al., 1997). Ce complexe est un FT qui favorise la transcription des gènes dits « tardifs » dont le promoteur possède le domaine TRE (tetradecanoyl phorbol acetate response element) (Benito et al., 2011). Ces gènes tardifs peuvent, par exemple, coder pour des récepteurs membranaires ou des protéines de structure permettant d'élargir la synapse et de moduler durablement l'excitabilité synaptique (Lyons and West, 2011).

La transcription du gène *zif268* dépend de l'activation de ERK, par la voie des MAPK/ERK, qui active par phosphorylation le FT Elk-1. Celui-ci entre ensuite dans le noyau pour s'associer à un dimère de SRF, sur le site SRE, afin de recruter des co-activateurs de la transcription comme CBP (CREB binding protein) p300 ou encore le médiateur Srb (Davis et al., 2000; Lavour et al., 2007; Besnard et al., 2011). Le promoteur possède également un site de fixation pour CREB qui régule positivement sa transcription (Cui et al., 2006; Tyan et al., 2008). Une fois la protéine synthétisée, elle joue son rôle de FT et va moduler l'expression de différents types de gènes, permettant notamment l'établissement et le maintien d'une PLT tardive (Davis et al., 2000; Penke et al., 2014). Ses gènes cibles en lien avec la plasticité synaptique ne sont néanmoins pas très bien connus. Une étude suggère que Zif268 pourrait moduler les gènes du protéasome afin de favoriser un remodelage de la synapse favorable au maintien des échanges synaptiques (James et al., 2005).



**Figure 2 : Schéma simplifié des événements intracellulaires conduisant à l'expression des gènes immédiats tel que *c-fos*.** La fixation des neurotransmetteurs sur leurs récepteurs conduit à la production de seconds messagers qui activent des protéines kinases, comme la calmoduline kinase II, ou les MAPK. Cela constitue la réponse à court terme. Les protéines kinases rentrent dans le noyau pour phosphoryler des facteurs de transcription tels que CREB ou SRF qui vont alors se fixer de façon spécifique sur le promoteur des gènes immédiats. Une fois les protéines produites dans le cytoplasme, elles retournent dans le noyau pour activer la transcription de gènes-cibles dits « tardifs », qui moduleront alors la réponse à long terme. AMPc = adénosyl monophosphate cyclique ; CaMKII = calcium-calmoduline kinase II ; SRE = serum responsive element ; SRF = serum responsive factor ; CREB = cAMP response element binding protein ; CRE = cAMP response element ; AP-1 = activator protein 1 ; MAPK = mitogen-associated protein kinases. Adapté de Buritova et Besson, 1999.

Le gène *arc* est différent des deux précédents, car il code pour une protéine qui n'est pas un FT, mais une protéine effectrice. De plus, suite à un stimulus synaptique, l'ARNm du gène *arc* peut être adressé au niveau des dendrites où il subit une traduction locale, ce qui n'est pas le cas des deux autres gènes (Lyford et al., 1995; Kawashima et al., 2009; Peebles et al., 2010). Son promoteur possède un domaine SARE (*synaptic-activity responsive element*) constitué de trois sites de fixation : CRE, SRE et MRE (*myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding site*) (Kawashima et al., 2009; Okuno, 2011). La transcription du gène *arc* pourrait donc être régulée par les FT CREB, Elk-1 et MEF2. Par ailleurs, l'activation de la cascade des MAPK/ERK est une voie qui est impliquée dans le contrôle de la transcription de ce gène (Ying et al., 2002; Besnard et al., 2014; Hunter et al., 2017). La protéine Arc est une protéine enrichie au niveau de la densité post-synaptique qui interagit avec deux autres protéines,

l'endophiline et la dynéine, pour favoriser l'endocytose des récepteurs, notamment des récepteurs AMPA (Chowdhury et al., 2006). Arc serait donc principalement associé à la DLT. A l'heure actuelle, les mécanismes d'adressage aux dendrites de l'ARNm du gène *arc* restent peu connus. Néanmoins, Okuno et collaborateurs (2012) ont montré que la protéine se lierait à la CaMKII inactive afin d'endocyter les récepteurs AMPA sélectivement dans au niveau des synapses inactives. Cela aurait pour but d'augmenter la force de contraste entre les synapses actives et inactives (Okuno et al., 2012).

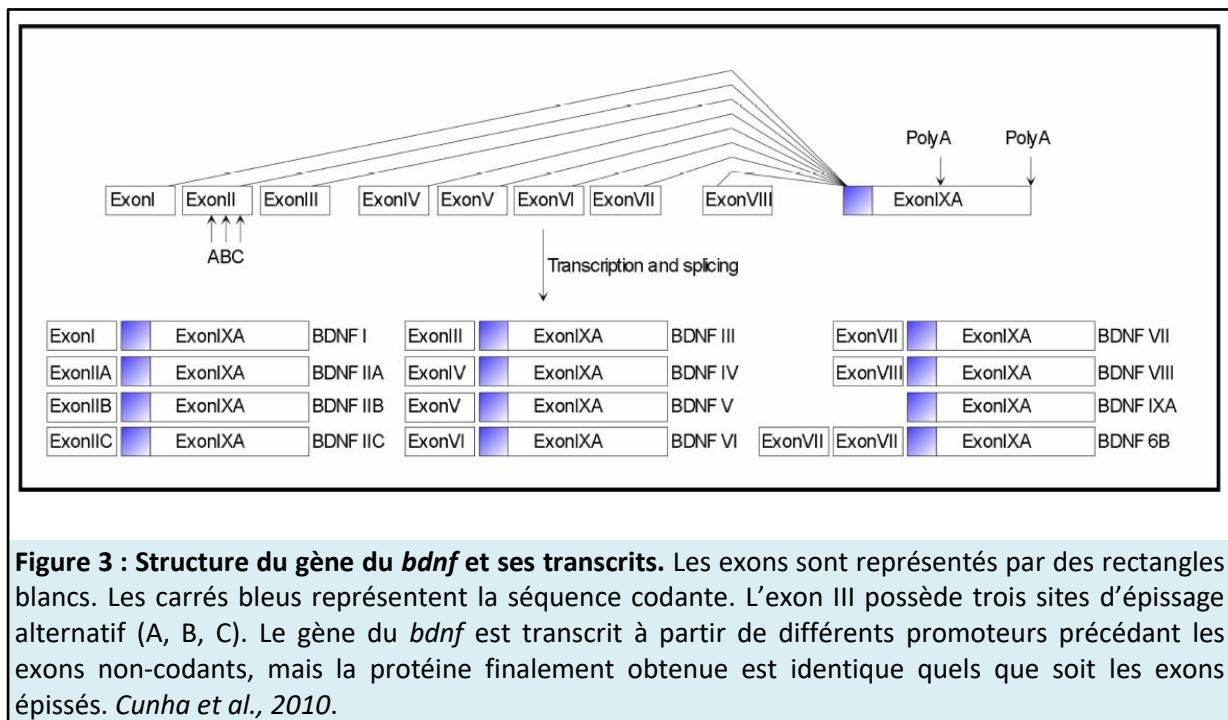
Plusieurs études, menées notamment avec des souris transgéniques knock-out (KO) pour un des gènes immédiats, ont montré l'importance de ces gènes dans la plasticité synaptique et la mémoire à long terme. Fleischmann et collaborateurs (2003) ont, par exemple, mis en évidence un déficit de mémoire spatiale à long terme chez des souris KO pour le gène *c-fos* dans le système nerveux central. Selon cette étude, ce déficit serait lié à un défaut d'induction de la PLT dépendante de la sous-unité NR2A du récepteur NMDA (Fleischmann et al., 2003). De la même façon, des souris KO pour le gène *zif268* (Jones et al., 2001) ou *arc* (Guzowski et al., 2000; Plath et al., 2006) présentent un défaut de PLT tardive qui induit entre autres un déficit de mémoire spatiale à long terme. Ces études soulignent la dépendance de la mémoire à long terme vis-à-vis de la plasticité synaptique sous le contrôle des gènes immédiats.

### 3.2.2 – Le BDNF

Le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) fait partie de la famille des facteurs neurotrophiques qui, avec lui, compte trois autres membres : le NGF (Nerve Growth Factor), NT-3 (Neurotrophine 3) et NT-4/5 (Neurotrophine 4/5). Les neurotrophines promeuvent le développement, la différenciation et la survie cellulaire (Huang and Reichardt, 2001).

Le gène du *bdnf* est relativement complexe car il comporte, chez le rat et la souris, huit exons non-codants (notés I à VIII) au niveau de l'extrémité 5' et un exon codant en 3' (IXA), le tout sous contrôle de neuf promoteurs (Aid et al., 2007) (Figure 3). L'activation des promoteurs serait dépendante de la région cérébrale, mais également du stimulus (Bishop et al., 1994; Timmusk et al., 1993, 1995). Chacun des transcrits obtenus code pour une seule et même protéine, le pré-proBDNF, qui est immédiatement clivé en proBDNF. Ce précurseur du BDNF mature n'est pas inactif. Il se fixe sur son récepteur p75 et serait préférentiellement

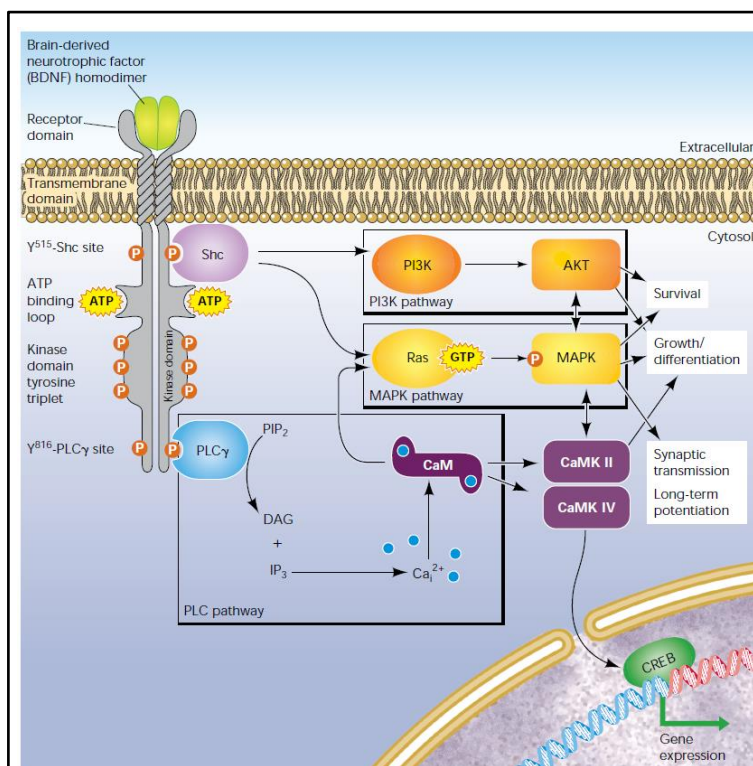
impliqué dans la DLT (Rösch et al., 2005; Woo et al., 2005). Le proBDNF est clivé pour donner la forme mature du BDNF, soit dans les vésicules trans-golgiennes (Mowla et al., 2001), soit au cours de sa sécrétion (Nagappan et al., 2009).



Il existe deux voies de sécrétion du BDNF : la voie constitutive et la voie régulée. La voie constitutive de sécrétion permettrait principalement une libération du proBDNF dans le milieu extracellulaire indépendamment des niveaux intracellulaires de calcium (Mowla et al., 2001; Harter and Reinhard, 2002). La voie de sécrétion régulée permet la libération du BDNF mature sous contrôle de l'activité neuronale, c'est-à-dire dépendamment des niveaux intracellulaires de calcium (Matsuda et al., 2009). Le BDNF est sujet à un transport antérograde (du corps cellulaire à la terminaison axonale) où il sera libéré, et rétrograde (de la terminaison axonale vers le corps cellulaire) où il est capturé avant de pouvoir agir dans le neurone (Lessmann et al., 2003; Matsuda et al., 2009).

Le BDNF sécrété agit par l'intermédiaire de son récepteur TrkB (Tropomyosin-related kinase B), un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase retrouvé au niveau axonale, dendritique et somatique, fortement exprimé au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe notamment (Fryer et al., 1996). La fixation du BDNF sur son récepteur conduit à l'activation de trois voies de signalisation intracellulaires : la voie PI3K/Akt, la voie des MAPK et la voie PLCγ (phospholipase C gamma) (Figure 4). La voie PI3K-Akt serait

principalement impliquée dans la survie cellulaire, la croissance et la différenciation neuronale. La voie des MAPK/ERK joue un rôle privilégié dans la transmission synaptique (PLT) et l'expression des gènes, via la régulation des FT comme CREB. La PLC $\gamma$  produit du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol-triphosphate (IP $_3$ ). Ce dernier, en se fixant sur ses récepteurs présents au niveau du réticulum endoplasmique, induit une libération intracellulaire de calcium qui va se lier à la calmoduline et activer différentes kinases. Le calcium et le DAG activent également la PKC (protéine kinase C) qui, avec les kinases dépendantes du calcium (CaMKII notamment), vont permettre l'activation de FT, donc la régulation de l'activité transcriptionnelle (Blum and Konnerth, 2005; Schlessinger, 2000).



**Figure 4 : Voies de signalisation intracellulaires déclenchées par l'activation du récepteur TrkB par le BDNF.** La fixation d'un homodimère de BDNF dimérise le récepteur TrkB et déclenche son autophosphorylation. Cela crée des sites de fixations pour la protéine Shc, qui active la PI3K et Ras, et pour la PLC $\gamma$  qui produit du DAG et de l'IP $_3$ . Ce dernier libère le calcium intracellulaire qui se lie à la calmoduline, et active ensuite les kinases dépendantes de la calmoduline. Les différentes voies promeuvent la survie, la croissance et la différenciation cellulaire, mais également la plasticité synaptique, la potentialisation à long terme et l'expression génique.

P = phosphorylation ; Shc = Src homology 2/ $\alpha$ -collagen-related

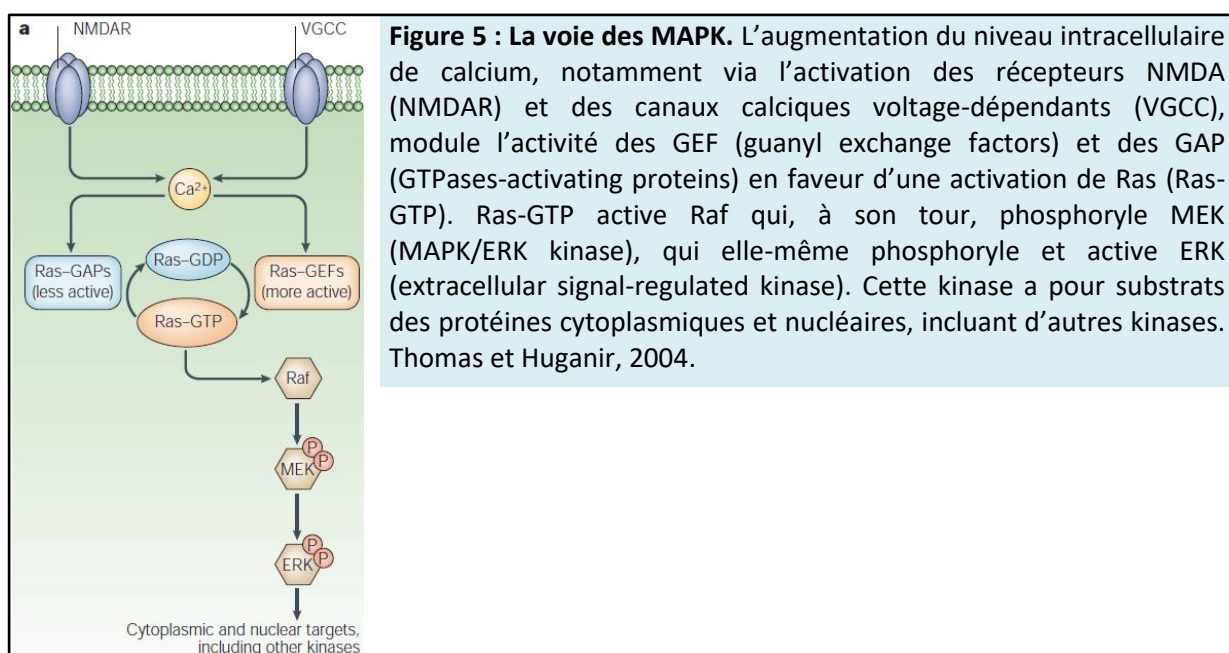
protein ; PI3K = phosphatidylinositol 3-kinase ; AKT = Akt kinase ; MAPK = mitogen-associated protein kinase ; PLC $\gamma$  = phospholipase C $\gamma$  ; CaM = calmoduline ; CaMK = calcium-calmoduline-dépendante kinase ; PIP $_2$  = phosphatidyl-inositol-bisphosphate ; DAG = diacylglycérol ; IP $_3$  = inositol-triphosphate ; CREB = cAMP response element-binding protein. (Blum and Konnerth, 2005).

Le BDNF est fortement impliqué dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Des études ont mis en évidence une augmentation de la transcription du *bdnf* dans l'hippocampe de rats au cours d'un apprentissage spatial (Kesslak et al., 1998; Mizuno et al., 2000). De plus, l'administration intra-hippocampique du BDNF améliore les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris, tandis que son blocage provoque des déficits (Linnarsson et al., 1997; Mu et al., 1999; Cirulli et al., 2004). L'action du BDNF sur les

processus qui supportent l'apprentissage et la mémoire semblerait reposer sur le remodelage dendritique. En effet, les ARNm du *bdnf* peuvent être transportés de façon rétrograde jusque dans les dendrites où ils sont traduits et la protéine ainsi produite régule le nombre et la taille des dendrites (Matsuda et al., 2009; Baj et al., 2011).

### 3.3.3 – Le rôle des MAPK dans la plasticité synaptique et la mémoire

Il existe plusieurs cascades de signalisation impliquant les MAPK mais la plus étudiée d'entre elles est celle conduisant à l'activation des kinases ERK1 et 2 (*extracellular signal-regulated kinases*). La protéine en amont de cette cascade est Ras, dont l'activation repose sur une balance entre les activités de deux classes de protéines : les guanyl nucleotide exchange factors (GEF), qui catalysent l'échange du GDP en GTP, et les GTPases-activating proteins (GAP), qui désactivent Ras en stimulant l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP qui lui est associée. Dans les neurones, l'activation de Ras peut être déclenchée par la fixation de neurotrophines sur leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (Ying et al., 2002; Alonso et al., 2004), par une dépolarisation membranaire (Wu et al., 2001), ou encore par la signalisation glutamatergique (Xia et al., 1996; Vanhoutte et al., 1999). Ces deux dernières voies sont activées par le calcium, qui régule les GEF et les GAP (Walker et al., 2003). Il en résulte une activation de Ras qui active alors la protéine kinase Raf. A son tour, Raf active MEK (MAPK/ERK kinase) par phosphorylation, qui phosphoryle et active ensuite les kinases ERK1 et 2 (Figure 5) (Thomas and Huganir, 2004).





Les MAPK/ERK, et plus particulièrement ERK, jouent un rôle-clé dans la mise en place de la plasticité synaptique. La première démonstration de l'importance de ERK dans l'induction de la PLT a été faite par English et Sweatt en 1997. Ces auteurs ont appliqué, sur des coupes hippocampiques de rats, un inhibiteur de la kinase MEK, dont l'unique substrat connu est ERK, et ont constaté une forte atténuation de l'induction de la PLT (English and Sweatt, 1997). Dès lors, les études montrant l'implication des MAPK/ERK dans la plasticité synaptique n'ont cessé de croître, aussi bien dans la mise en place de la PLT (Ying et al., 2002; Selcher et al., 2003; Kelleher et al., 2004), que de la DLT (Kawasaki et al., 1999; Thiels et al., 2002; Lindecke et al., 2006). En 2000, Davis et collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence la phosphorylation de ERK suite à une PLT induite *in vivo* au sein du GD de rats (Davis et al., 2000). Par ailleurs, l'activation de la voie des MAPK/ERK serait en lien étroit avec la signalisation glutamatergique, notamment *via* l'activation des récepteurs NMDA, qui conduirait à une modulation de la transmission synaptique grâce au contrôle exercé par ERK sur le trafic des récepteurs AMPA au niveau de la membrane post-synaptique (Zhu et al., 2002; Patterson et al., 2010). En effet, Zhu et collaborateurs ont, dans un premier temps, montré qu'une expression constitutive neuronale de Ras induisait une augmentation de 80% de la transmission assurée par les récepteurs AMPA. Dans un second temps, ces auteurs ont mis en évidence que l'activation de Ras, par l'activation des récepteurs NMDA, conduisait à une incorporation des récepteurs AMPA à la membrane, ce qui expliquerait l'augmentation de la transmission *via* ces récepteurs. Enfin, leur étude suggère que ces mécanismes seraient dépendants de l'activation de ERK puisque l'application d'un inhibiteur de MEK abolit ces effets (Zhu et al., 2002).

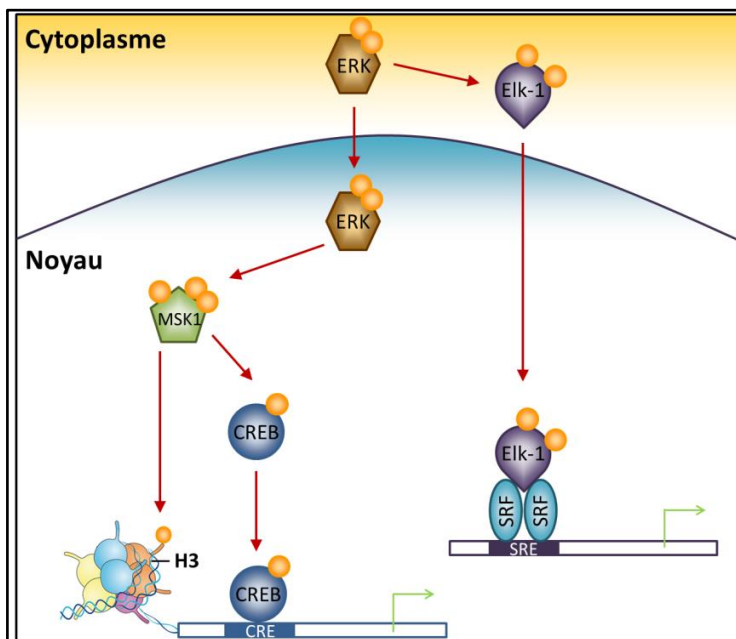
De part leur forte implication dans les processus de plasticité, la cascade des MAPK/ERK joue un rôle dans les mécanismes moléculaires liés à l'apprentissage et la mémoire (Atkins et al., 1998; Selcher et al., 1999; Sweatt, 2004). Par exemple, Blum et collaborateurs (1999) ont mis en avant qu'un apprentissage spatial en piscine de Morris induisait la phosphorylation transitoire de ERK dans les neurones pyramidaux de la couche CA1/CA2 de l'hippocampe dorsal. Leur étude montre également que l'inhibition de l'activation de ERK avant l'apprentissage affecte spécifiquement le rappel du souvenir après 48h, donc la mémoire à long terme (l'acquisition et la mémoire à court terme ne sont pas affectées) (Blum et al., 1999). L'implication de ERK dans les mécanismes conduisant à la formation d'une mémoire à

long terme a été démontrée à plusieurs reprises, aussi bien dans une tâche de mémoire spatiale (Hebert and Dash, 2002; Kelleher et al., 2004) que de mémoire de peur au contexte (Schafe et al., 2000; Shalin et al., 2004; Trifilieff et al., 2007). Les effets de la phosphorylation de ERK sur la plasticité synaptique et la mémoire semblent la conséquence de l'activation de la transcription par au moins deux de ses substrats : MSK1 (mitogen- and stress-activated kinase 1) et Elk-1 (E twenty-six-like transcription factor 1) (Thomas and Huganir, 2004; Cargnello and Roux, 2011).

MSK1 est une protéine kinase exprimée de manière constitutive, retrouvée majoritairement dans le noyau des cellules, où elle active par phosphorylation ses substrats, dont les plus connus sont le FT CREB et l'histone H3 (Arthur, 2008; Brami-Cherrier et al., 2009) (Figure 6). Par exemple, sur des cultures cellulaires de neurones striataux, Brami-Cherrier et collaborateurs (2007) ont mis en évidence qu'une inhibition de ERK ou de MSK1 était responsable d'une baisse de la phosphorylation de l'histone H3 et de la transcription des gènes immédiats *c-fos* et *c-jun*, et ce malgré la stimulation des neurones par le glutamate (Brami-Cherrier et al., 2007). La voie ERK-MSK1 semble, de ce fait, impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Arthur et al., 2004; Kelleher et al., 2004; Chwang et al., 2007; Karelina et al., 2012; Besnard et al., 2014). Il a notamment été montré qu'une augmentation transitoire de ERK phosphorylée, dans les toutes premières minutes qui suivent un conditionnement de peur au contexte, était corrélée à une phosphorylation de MSK1 ainsi qu'à une augmentation de la phosphorylation de l'histone H3 et de la production des FT Arc, c-Fos et Zif268 dans les minutes suivantes ; ces modifications concernent le GD de souris (Besnard et al., 2014). A l'inverse, des souris KO pour le gène de MSK1 présentent des déficits de mémoire spatiale et de peur à long terme, associés à une baisse de la phosphorylation de CREB et de l'histone H3 (Chwang et al., 2007).

Elk-1 est un FT qui se trouve dans le cytoplasme dans une cellule au repos et qui migre dans le noyau suite à sa phosphorylation par ERK sur les sérine 383 et 389 (Lavaur et al., 2007) (Figure 6). Elle appartient à une famille de protéines nommée Ternary Complex Factor (TCF) qui régule la transcription des gènes *via* le site SRE sur leur promoteur, suite à son association avec un dimère de SRF. La phosphorylation de Elk-1 apparaît essentielle à la transcription de ces gènes, notamment de par sa capacité à stimuler le remodelage de la chromatine *via* la phosphorylation et l'acétylation des histones, mais également du fait du

recrutement de co-activateurs de la transcription comme CBP (CREB Binding Protein), p300 ou le complexe médiateur Srb (Besnard et al., 2011). Ainsi, l'activation de Elk-1 serait requise pour les processus d'apprentissage (Camarota et al., 2000; Sananbenesi et al., 2002; Berman, 2003). Par exemple, l'activation des récepteurs NMDA, au cours de la phase de conditionnement d'une tâche d'inhibition passive, conduit à l'activation de ERK, Elk-1 et CREB en lien avec l'augmentation de la transcription du gène immédiat *c-fos*. Ce gène est d'ailleurs la cible la mieux caractérisée de Elk-1 (Xia et al., 1996; Vanhoutte et al., 1999; Besnard et al., 2011).



**Figure 6 : L'activation d'ERK induit la transcription de gènes en lien avec la plasticité synaptique et structurale.**

ERK activé phosphoryle Elk-1 (E twenty-six-like transcription factor 1), ce qui lui permet de rentrer dans le noyau, où il se fixe à un dimère de SRF (serum-response factor) au niveau du site consensus SRE (serum-response element) afin de favoriser la transcription de gènes tels que *c-fos* ou *zif268*. La phosphorylation de ERK

lui permet également de rentrer dans le noyau, par un processus d'endocytose (Trifilieff et al., 2009), pour phosphoryler et activer MSK1 (mitogen- and stress-activated kinase 1). Deux des principaux substrats de MSK1 sont l'histone H3 et le facteur de transcription CREB (cAMP response binding protein). Leur phosphorylation stimule la transcription, notamment des gènes immédiats *c-fos*, *zif268* et *arc*. Globalement, les conséquences de l'activation de MSK1 et Elk-1 portent sur la régulation de la transcription des gènes, la modulation de la plasticité synaptique (potentialisation et dépression à long terme) et la plasticité structurale (remodelage des épines dendritiques). Figure du nucléosome modifiée d'après Gräff et Tsai, 2013.

Les protéines kinases MSK1 et Elk-1 pourraient également agir sur la plasticité structurale des neurones (Thomas et Huganir, 2004). La stimulation répétée de neurones hippocampiques conduit à l'augmentation de la phosphorylation de ERK et à la formation de nouveaux filopodes (Wu et al., 2001), tandis que son inhibition empêche tout remodelage

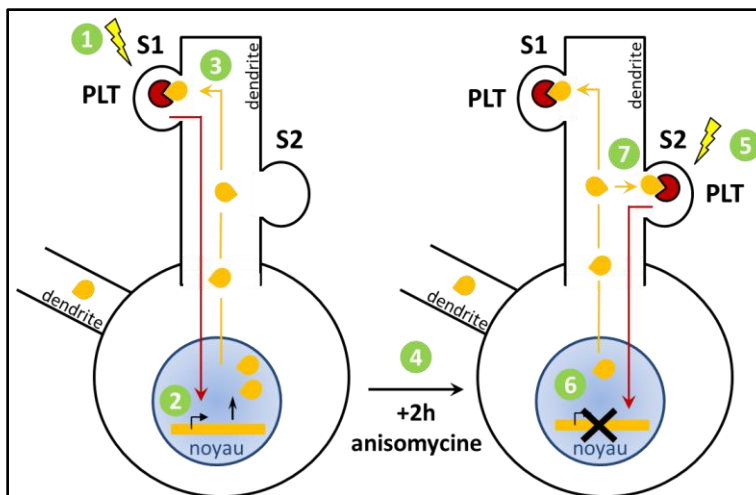
(Wu et al., 2001; (Goldin and Segal, 2003). En réponse au BDNF, ERK est phosphorylé et permet la mise en place de la PLT, ainsi que la transcription nucléaire du gène *arc* et la production de sa protéine au niveau des dendrites (Ying et al., 2002), ce qui permettrait l'augmentation de la densité des épines (Alonso et al., 2004). Cet effet impliquerait spécifiquement une médiation par la phosphorylation de l'histone H3 sur le promoteur du gène *arc* par MSK1 (Hunter et al., 2017). Karelina et collaborateurs (2012) ont également montré que des souris KO pour le gène codant MSK1 présentaient une baisse de la spinogénèse et de la complexité des branchements dendritiques entre les neurones de l'hippocampe, le tout résultant en des déficits mnésiques (Karelina et al., 2012). Elk-1 serait également impliqué dans l'élongation des dendrites, en association avec la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine, puisqu'une inhibition de l'interaction de Elk-1 avec ERK (par l'utilisation d'un peptide synthétique qui bloque le site de fixation spécifique de ERK phosphorylé sur Elk-1) cause une sous-expression de SRF et de l'actine (Lavour et al., 2007).

De récents résultats suggèrent néanmoins que le rôle de MSK1 dans la formation de la mémoire ne reposerait pas uniquement sur l'activité kinase de cette protéine (Daumas et al., 2017), tout comme d'autres études ont pu mettre en évidence qu'une inhibition constitutive de l'expression du gène codant ERK1 (Selcher et al., 2001) ou ERK2 (Vithayathil et al., 2017) n'induisait pas de déficit de mémoire. Cela montre la complexité des processus qui sous-tendent la plasticité synaptique et la mémoire et justifie les efforts constants de la recherche pour les mettre à jour.

### 3.2 – La théorie du « tagging » synaptique et de la capture

La découverte de la plasticité synaptique à long terme a soulevé la question des mécanismes permettant l'adressage spécifique des protéines de plasticité aux synapses actives suite aux activités transcriptionnelles déclenchées par un stimulus neuronal. En effet, comment les protéines synthétisées dans le corps cellulaires sont-elles ensuite dirigées dans les épines dendritiques actives plutôt que dans n'importe quelle autre épine ? En 1997, Frey et Morris ont apporté une réponse à cette question. Selon eux, le déclenchement d'une PLT précoce, qu'elle soit ou non convertie en une PLT tardive, induit la mise en place d'un « tag » au niveau de la synapse. Ce « tag » serait l'élément qui séquestrerait ensuite les protéines de plasticité dont la synthèse aura été initiée par la stimulation de cette synapse, ou bien de

toute autre synapse du même neurone dans une fenêtre de temps limitée. Leur expérience a été menée sur des tranches de la région CA1 hippocampique de la façon suivante : une première synapse S1 est stimulée jusqu'à induire une PLT tardive qui entraîne la mise en place d'un « tag » au niveau de S1 et la synthèse de protéines au niveau du corps cellulaire. Le « tag » synaptique serait un changement moléculaire local qui signifierait qu'une plasticité synaptique a eu lieu. De l'anisomycine est ensuite appliquée sur les tranches pour inhiber toute nouvelle synthèse protéique. Une seconde synapse S2 du même neurone est ensuite stimulée et malgré la présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique, une PLT tardive est obtenue. Les auteurs en concluent que les protéines produites par la stimulation de S1 ont pu être séquestrées par S2 grâce à la présence du « tag » mis en place par la PLT précoce, et qu'ainsi S2 a pu développer une PLT tardive (Figure 7). Selon ces auteurs, le tag aurait une durée de vie de 2 à 3h et ne serait pas dépendant de la synthèse protéique. Aussi, toute synapse stimulée 2h avant ou après l'induction d'une PLT tardive sur une synapse du même neurone pourra potentiellement être renforcée (Frey and Morris, 1997). Le devenir d'une synapse ne dépendrait donc pas uniquement de l'activité locale, mais également de l'activité temporellement proche des autres synapses du même neurone.



**Figure 7 : Théorie du « tagging » synaptique et de la capture.** 1. Une stimulation à haute fréquence est appliquée sur la synapse S1. Elle entraîne la mise en place d'un « tag » local. 2. Le signal de dépolarisation induit par la stimulation de S1 atteint le noyau et active la transcription qui se poursuit en traduction. 3. Les protéines produites sont alors distribuées dans l'ensemble des dendrites mais seulement capturées par le « tag » mis en place au niveau

de la synapse stimulée (S1), et permet la mise en place d'une PLT. 4. Deux heures après la stimulation de S1, de l'anisomycine (un inhibiteur de la synthèse protéique) est appliquée sur la cellule. 5. Une stimulation à haute fréquence est appliquée sur la synapse S2 et entraîne la mise en place d'un « tag » local. 6. Le signal de dépolarisation se propage jusqu'au noyau où il active la transcription. Mais la synthèse protéique étant inhibée, aucune protéine n'est produite. 7. Néanmoins, le « tag » dans la synapse S2 recrute les protéines produites lors de la stimulation de S1 deux heures plus tôt. Cela permet la mise en place d'une PLT dans S2.

Dans les années qui ont suivi cette découverte, les chercheurs ont tenté de savoir quelle était la nature du « tag » et comment celui-ci pouvait interagir avec les protéines produites

dans le corps cellulaire. Les candidats doivent répondre à trois critères. Ils doivent être 1) localisés, autrement dit restreints à une synapse, 2) transitoires, et 3) capables d'interagir avec les protéines, mais également les ARNm adressés à la synapse. Plusieurs propositions sont avancées ; parmi elles, l'activation des protéines kinases telles que la CaMKII et la protéine kinase A (PKA). Ces kinases sont spatialement restreintes car ancrées à la membrane, elles ont une demi-vie de phosphorylation comparable à la durée de présence du « tag » (entre 1h et 2h), et elles peuvent interagir avec une variété de substrats. De plus, des études ont montré que selon le type de stimulation induite (hautes fréquences pour la PLT et basses fréquences pour la DLT), les kinases activées sont différentes (CaMKII pour la PLT et calcineurine pour la DLT). Néanmoins, d'autres études suggèrent un rôle des neurotrophines, comme le BDNF, dans le « tagging » de la synapse au travers de son récepteur TrkB, ou encore le changement dans la composition des synapses en récepteurs glutamatergiques et même un changement structurel de la synapse par un remodelage du réseau d'actine qui permettrait un élargissement de l'épine dendritique, facilitant ainsi la capture des protéines circulant dans la dendrite (Barco et al., 2008). Redondo et Morris proposent que plutôt qu'une molécule unique, le « tag » serait un état de la synapse, comprenant un remodelage à la fois structurel et fonctionnel qui serait stabilisé par l'arrivée des protéines de plasticité (Redondo and Morris, 2011).

Le fait qu'une synapse faiblement potentialisée puisse voir son activité renforcée grâce à une potentialisation plus forte d'une synapse voisine a laissé supposer qu'un mécanisme similaire pourrait exister au niveau comportemental. En effet, ne vous souvenez-vous pas de ce que vous étiez en train de faire ni d'où vous vous trouviez lorsque vous avez appris la survenue des attentats du 11 septembre 2001 ? Pourtant, dans d'autres circonstances plus banales, il est fort probable que vous auriez oublié ce que vous avez fait cette journée. Néanmoins, à la lumière des découvertes récentes, ce phénomène peut être expliqué par ce qui est appelé le « **tagging comportemental** ». L'hypothèse est qu'un événement insignifiant, banal, qui n'entraînerait qu'un souvenir à court terme, pourrait être retenu à long terme s'il se retrouve temporellement couplé à un événement indépendant plus important (par exemple nouveau, motivé ou bien chargé émotionnellement). Pour tester cette hypothèse, Ballarini et collaborateurs ont utilisé un protocole de reconnaissance spatiale d'objets n'entraînant pas la formation d'un souvenir spatial à long terme. Ce

protocole consiste à laisser le rat explorer pendant 4 minutes deux objets identiques placés à deux endroits différents d'un champ ouvert familier. Un temps d'exploration de 4 minutes est insuffisant pour permettre au rat de se souvenir durablement de l'emplacement des deux objets 24h après la session d'entraînement. Cependant, lorsque le rat est placé 15 minutes après dans un nouveau champ ouvert qu'il est libre d'explorer durant 5 minutes, le rat présente une mémoire à long terme de l'emplacement des objets lorsqu'il est testé 24h après l'entraînement. Cela est également valable lorsque l'exploration du nouveau champ ouvert se fait en amont de l'entraînement (Ballarini et al., 2009).

La plasticité synaptique est donc la base des réorganisations locales structurelles et moléculaires qui sous-tendent la mémoire. Mais pour que nos souvenirs soient durablement conservés, une plasticité systémique doit se mettre en place parallèlement à la plasticité synaptique.

### **3.3 – La consolidation systémique**

Alors que la consolidation synaptique se met en place en quelques heures et implique la stabilisation des changements de connectivité synaptique au sein d'une structure, la consolidation systémique prend plus de temps pour s'établir, car elle nécessite une réorganisation graduelle des différentes régions où s'établit durablement le souvenir.

Les premières observations suggérant une réorganisation graduelle des souvenirs viennent du philosophe français Théodule Ribot qui, en 1882, constate qu'un évènement traumatique (comme un accident) peut être à l'origine d'une perte des souvenirs remontant à quelques heures sans affecter les souvenirs plus anciens. On parle d'amnésie rétrograde temporellement graduée. En effet, Ribot décrit que l'amnésie est liée à l'âge des souvenirs, c'est-à-dire qu'un souvenir récent est affecté plus sévèrement qu'un souvenir ancien. Il existe donc bel et bien un gradient temporel au sein de l'amnésie (loi de Ribot).

Il faudra attendre le milieu du XXème siècle pour que des études menées chez l'Homme précisent la relation entre la localisation de la lésion cérébrale et les caractéristiques de l'amnésie. Ces études mettent en avant un rôle prépondérant du lobe temporal médian, et plus précisément de l'hippocampe. L'exemple du cas d'Henry Molaison (H.M.) illustre parfaitement l'existence du gradient temporel. Souffrant de crises épileptiques sévères, il

s'est vu retiré les lobes hippocampiques dans un but thérapeutique. Malheureusement, cela a conduit à une perte des souvenirs datant des 11 années les plus récentes, ainsi qu'à l'incapacité de former de nouveaux souvenirs épisodiques et sémantiques. Néanmoins, il était capable de rappeler des souvenirs de son enfance (Scoville and Milner, 1957). D'autres études ont par la suite confirmé l'existence d'une amnésie temporellement graduée suite à des dommages hippocampiques (Kapur and Brooks, 1999; Squire et al., 1975).

L'hippocampe serait donc le socle sur lequel repose la formation des souvenirs, mais il ne jouerait qu'un rôle transitoire dans leur établissement. A l'heure actuelle il existe plusieurs théories pour tenter d'expliquer les mécanismes de la consolidation systémique ; parmi elles, on compte le modèle standard de la consolidation systémique et la théorie des traces multiples.

### 3.3.1 – Le modèle standard de la consolidation systémique

Marr en 1971 fut le premier à proposer un modèle de consolidation dans lequel l'hippocampe encoderait rapidement et transitoirement les événements quotidiens avant que l'information ne soit transmise à d'autres modules corticaux pour y être conservée durablement. Il proposa également que le transfert de l'information de l'hippocampe au cortex repose sur une répétition, durant le sommeil, de l'activité des réseaux neuronaux engagés au cours de l'acquisition de l'évènement (Marr, 1971).

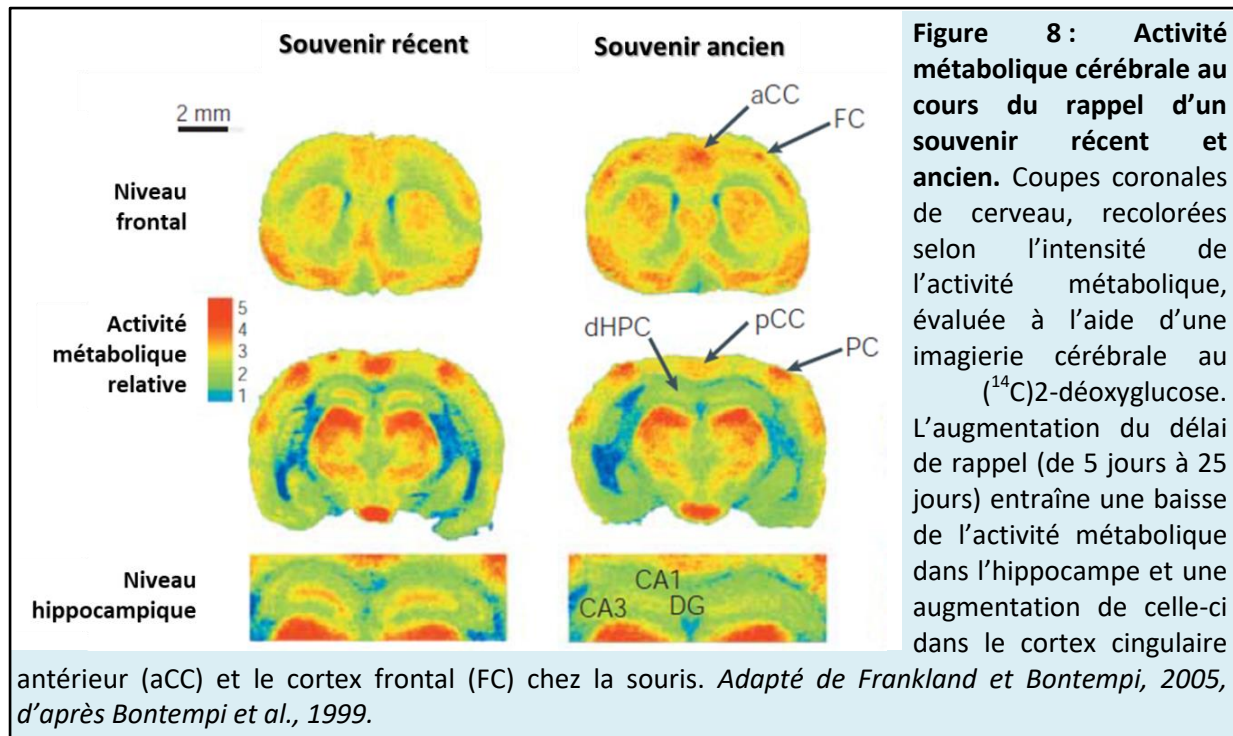
Aujourd'hui, le modèle standard de la consolidation systémique ayant légèrement évolué, il suggère que l'hippocampe et le néocortex encoderaient simultanément l'évènement vécu. L'hippocampe intégrerait l'information depuis les diverses régions corticales qui sous-tendent les différentes caractéristiques du souvenir (sensorielles et cognitives) pour les transformer en une trace mnésique cohérente. Une future réactivation du réseau hippocampique permettrait une réactivation des réseaux corticaux. Cette activité coordonnée du réseau hippocampo-cortical supporterait le renforcement des connexions cortico-corticales, qui finalement seraient à même de fonctionner indépendamment de l'hippocampe (Figure 6) (Frankland and Bontempi, 2005).

Zola-Morgan et Squire ont montré dès 1990 le rôle transitoire de l'hippocampe dans la mémoire chez le Primate non-humain. Ils ont entraîné des macaques à reconnaître des paires d'objets avant d'effectuer une lésion bilatérale de l'hippocampe. Deux semaines après



l'opération, les macaques doivent de nouveau reconnaître les paires d'objets présentées en sessions différant selon l'ancienneté de l'entraînement par rapport au moment de l'opération (16, 12, 8, 4 et deux semaines). Les résultats montrent que la lésion affecte la mémoire récente, car les singes lésés sont significativement moins bons lors du rappel d'objets présentés 2 et 4 semaines avant l'opération par rapport aux singes non lésés, tandis que leurs performances sont égales à celles des animaux contrôles pour les délais de 8, 12 et 16 semaines et significativement meilleures que les performances aux délais 2 et 4 semaines. Cela suggère que les souvenirs les plus anciens ont pu s'émanciper de l'hippocampe avant que celui-ci ne soit lésé et qu'ils ont pu intégrer une nouvelle structure (Zola-Morgan and Squire, 1990).

En 1999, Bontempi et collaborateurs ont eu l'idée de regarder la distribution de l'activité des régions cérébrales lors du rappel d'un souvenir récent et ancien grâce à une imagerie cérébrale au ( $^{14}\text{C}$ )2-déoxyglucose (Figure 8). Ce composé est un analogue radioactif du glucose non dégradable qui permet la visualisation des régions cérébrales activées. Pour ce test, des souris sont entraînées à discriminer trois branches récompensées d'un labyrinthe radial à huit branches. Cinq jours et 25 jours après l'entraînement un test de rappel est effectué. L'imagerie fonctionnelle montre une diminution de l'activité métabolique de l'hippocampe avec l'augmentation du délai de rétention. A l'inverse, un recrutement de certaines structures corticales est observé, notamment les cortex frontal, cingulaire antérieur et temporal (Bontempi et al., 1999). Ces résultats sont les premiers à montrer que des régions corticales précises sont plus engagées lors du rappel d'un souvenir ancien.

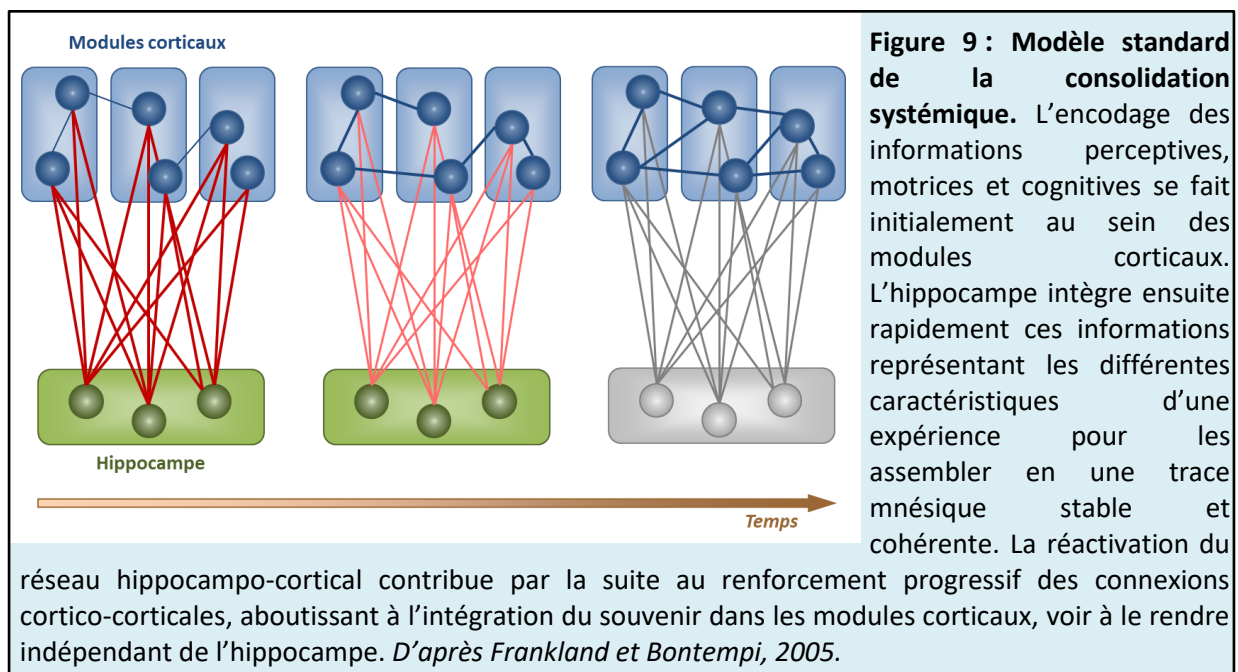


A partir des années 2000, de nombreuses études ont conforté l'idée d'un rôle transitoire de l'hippocampe avec un engagement inversement proportionnel du cortex, notamment du cortex cingulaire antérieur (CCA) (Frankland et al., 2001, 2004; Maviel et al., 2004; Takehara et al., 2003). Par exemple, Frankland et collaborateurs (2004) ont regardé l'expression des gènes immédiats *zif268* et *c-fos* dans le cortex préfrontal médian (CPFm) et dans la région CA1 de l'hippocampe après le rappel d'une mémoire de peur au contexte récente (1 jour) et ancienne (36 jours). Ils ont observé une augmentation de l'expression de ces deux gènes dans CA1 lors du rappel à 1 jour, mais pas dans le CPFm. A l'inverse, lors du rappel à 36 jours, l'augmentation est présente uniquement dans le CCA. Afin de montrer l'importance fonctionnelle de cette activation, les auteurs ont bloqué le CCA par injection de lidocaïne (un bloquant des canaux sodium provoquant une anesthésie réversible) avant le test de rappel. L'inhibition transitoire du CCA n'empêche pas le rappel d'un souvenir récent, mais bloque le rappel d'un souvenir ancien. Le CCA serait donc une structure-clé dans la consolidation à long terme des souvenirs.

L'équipe de Bontempi a montré à plusieurs reprises que l'augmentation de l'activité du CCA lors du rappel d'un souvenir ancien s'accompagnait d'une baisse de l'activité de l'hippocampe par rapport aux animaux contrôles (Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004). Dans leur revue de 2005, Frankland et Bontempi suggèrent que le rappel d'un souvenir ancien s'accompagnerait d'une inhibition de l'hippocampe exercée par

le CPFm afin que celui-ci ne ré-encode pas un souvenir déjà consolidé. Si le rappel s'effectue correctement, alors le CPFm inhibe l'hippocampe, mais si le rappel n'est pas optimal, alors l'hippocampe est réengagé (Frankland and Bontempi, 2005). Cette idée est soutenue par le fait que chez des souris hétérozygotes pour le gène codant pour la CamKII, et qui présentent un déficit lors du rappel d'un souvenir ancien, l'hippocampe n'est pas inhibé (Frankland et al., 2004).

L'ensemble de ces études montre que, selon la théorie standard de la consolidation à l'échelle des systèmes, la consolidation à long terme des souvenirs repose sur un dialogue hippocampo-cortical aboutissant à un désengagement progressif de l'hippocampe au profit d'une réorganisation du souvenir au sein du cortex (Figure 9).



### 3.3.2 - La théorie des traces multiples

En 1997, Nadel et Moscovitch proposèrent une théorie différente de celle de Marr (1971). Ces auteurs ont analysé des études qui avaient été menées chez différents patients souffrant de lésions du lobe temporal médian et se sont aperçu que dans la majorité des cas, une distinction entre les sous-types de mémoire pouvait être faite. Selon les études, les patients souffraient d'une amnésie rétrograde de 25 à 40 ans, voir de toute leur vie, en ce qui concernait leurs souvenirs épisodiques. Pour Nadel et Moscovitch, « il est difficile de concevoir une base d'adaptation pour un processus de consolidation qui est presque aussi long que la durée de vie humaine moyenne pendant une grande partie de l'Histoire. Selon

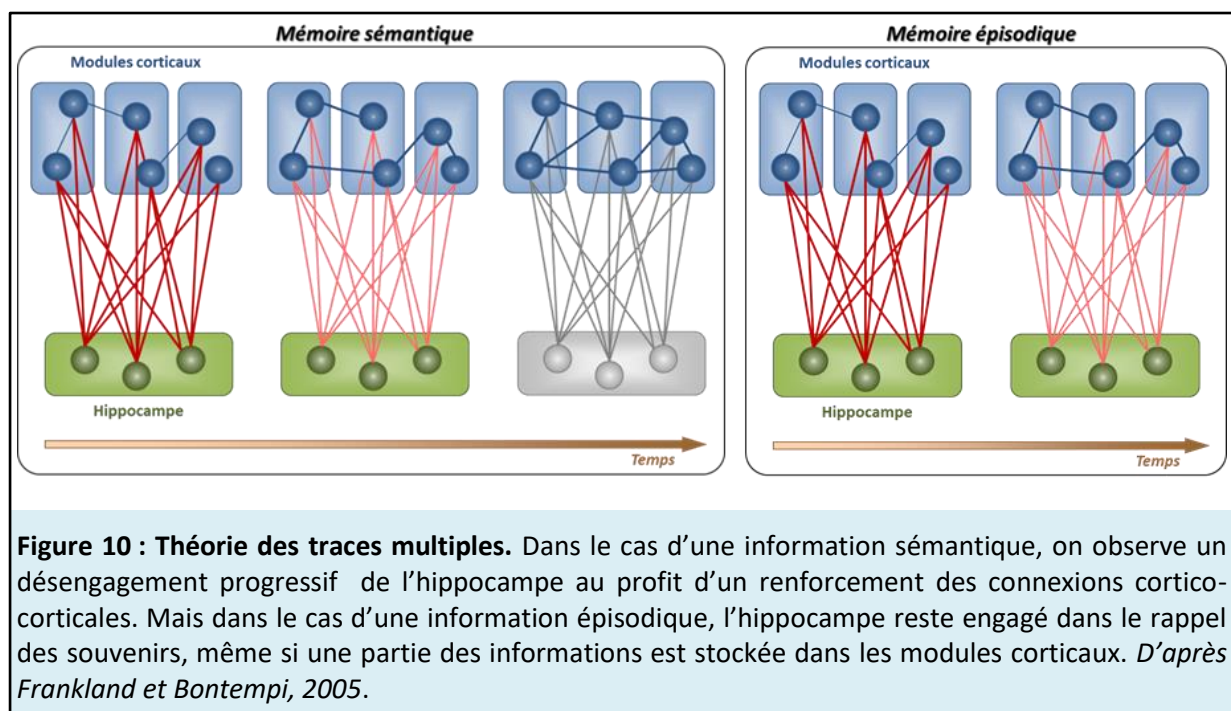
cette idée, la plupart des gens n'aurait consolidé aucun souvenir autobiographique avant de mourir ». Selon eux, l'amnésie rétrograde des souvenirs autobiographiques n'est pas graduée contrairement à celle des souvenirs sémantiques. Les souvenirs épisodiques resteraient dépendants de l'intégrité de l'hippocampe tandis que les souvenirs sémantiques pourraient être consolidés définitivement dans les régions corticales. C'est pourquoi, sur la base de ces constatations, ils ont proposé la théorie des traces multiples. Certains aspects de cette théorie sont en accord avec celle de Marr, comme le fait que l'hippocampe encode rapidement et de manière distribuée toutes les informations acquises consciemment, que les neurones de l'hippocampe mis en jeu sont en relation avec les neurones corticaux à l'origine du traitement de l'information, et que l'ensemble hippocampo-cortical constitue la trace mnésique du souvenir lié par le contexte spatio-temporel dans lequel il s'est déroulé. Les caractéristiques de la théorie qui divergent de celle de Marr sont les suivantes :

- chaque réactivation de la trace mnésique intervient dans un contexte neuronal et contextuel différent de celui de l'encodage,
- chaque réactivation de la trace mnésique résulte en la création d'une nouvelle trace distribuée dans la région hippocampique,
- toute nouvelle trace formée partage tout ou partie de l'information du souvenir initialement encodé,
- la création de traces multiples permet d'extraire les informations sémantiques du souvenir épisodique et leur intégration au sein d'un schéma cortical préexistant. Aussi les informations sémantiques sont indépendantes de l'hippocampe,
- Le rappel d'un souvenir épisodique fait appel à l'hippocampe pour le contexte spatial et au cortex frontal pour le contexte temporel.

Les souvenirs autobiographiques seraient donc nécessairement sous le contrôle de l'hippocampe. Avec le temps, soit ils sont oubliés, soit les nombreuses traces formées avec le cortex leur permettent de perdurer. Aussi, plus le souvenir est ancien, plus il est associé à un grand nombre de traces distribuées dans la région hippocampique, ce qui facilite leur rappel et leur permet d'être conservés malgré une lésion dans cette région (Nadel and Moscovitch, 1997) (Figure 10).

Dans les années qui suivirent cette proposition, plusieurs travaux ont été à l'origine de résultats allant dans le sens d'une participation de l'hippocampe dans le rappel des

souvenirs épisodiques, quel que soit l'âge du souvenir, aussi bien chez l'Homme (Addis et al., 2004; Maguire and Frith, 2003; Viskontas et al., 2000) que chez le rongeur (Clark et al., 2005; Martin et al., 2005; Winocur et al., 2005). Clark et collaborateurs ont entraîné des rats à mémoriser l'emplacement d'une plate-forme immergée dans une tâche de piscine de Morris. Les rats ont ensuite subi une lésion bilatérale de l'hippocampe 1 jour, 8 semaines ou 14 semaines après la phase d'acquisition. Deux semaines après la lésion, le souvenir de l'emplacement de la plate-forme est testé lors d'un test de rappel. Les résultats montrent que les rats présentent une amnésie rétrograde non graduée car leurs performances sont significativement moins bonnes que celles des rats contrôles.





## Chapitre 2 : La boucle

hippocampo-cortico-thalamique





## 1 – L’hippocampe

L’hippocampe, qui tire son nom de sa forme similaire à celle du poisson *Hippocampus leiria*, est une structure du télencéphale qui présente une architecture relativement conservée entre les espèces.

### 1.1 - Organisation anatomique

Chez l’Homme comme chez le Rongeur, l’hippocampe se situe dans le lobe temporal médian, dans le prolongement du fornix. Malgré une forte similarité entre les deux espèces, quelques différences cytoarchitecturales existent. Ainsi, l’hippocampe postérieur chez l’Homme correspond à l’hippocampe dorsal chez le Rongeur et l’hippocampe antérieur chez l’Homme correspond à l’hippocampe ventral chez le Rongeur.

Il faut distinguer la formation hippocampique de l’hippocampe à proprement parler. La formation hippocampique est constituée du cortex entorhinal, du cortex périrhinal, du présubiculum, du parasubiculum et de l’hippocampe. L’hippocampe à proprement parler est constitué des cornes d’Ammon 1 à 3. Certains placent le gyrus denté (GD) au sein de l’hippocampe malgré des différences cytoarchitecturales qui le caractérisent. En effet, les cornes d’Ammon sont constituées de 5 à 6 couches tandis que le gyrus denté n’en contient que 3. Dans les cornes d’Ammon, les six couches sont les suivantes, de la plus profonde à la plus superficielle : *stratum oriens* (couche polymorphe) contient les dendrites basales des cellules pyramidales et des interneurons inhibiteurs, *stratum pyramidale* (couche pyramidale) est la couche principale composée de neurones pyramidaux glutamatergiques et d’interneurones, *stratum lucidum* n’est présente que dans CA3 et reçoit les afférences des fibres moussues provenant du cortex entorhinal, *stratum radiatum* contient les dendrites apicales de cellules pyramidales et représente la zone d’échange entre les trois régions de la corne d’Ammon, et *stratum lacunosom moleculare* (couche moléculaire) reçoit les afférences du cortex entorhinal.

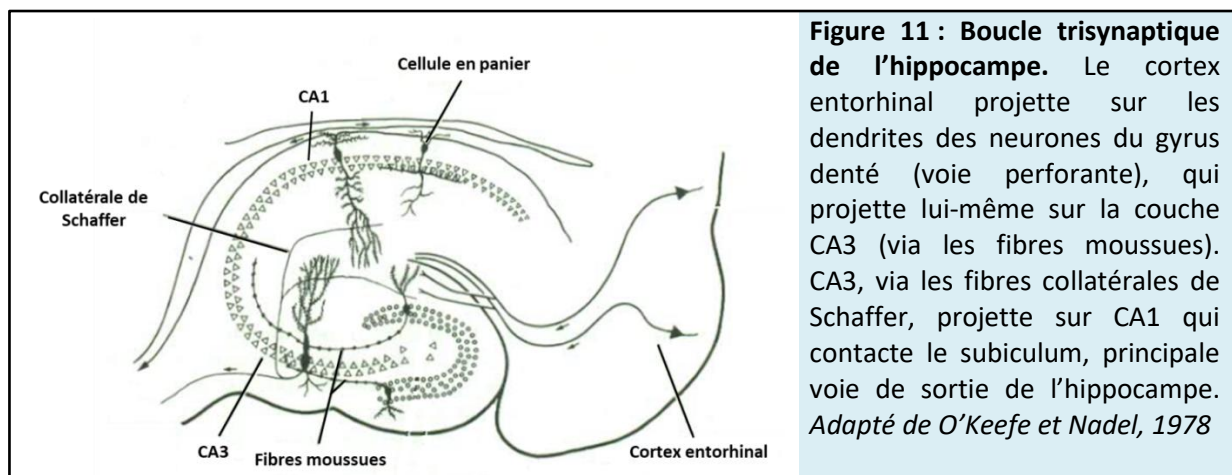
Dans le GD, on retrouve la couche polymorphe, aussi nommée le hile, qui représente la voie de sortie de la structure. Cette couche, la plus interne, regroupe les fibres moussues projetant vers la *stratum lucidum* de CA3. La couche principale est la couche granulaire (*stratum granulosum*). Elle est composée de neurones granulaires glutamatergiques et

d'interneurones. Enfin, la couche moléculaire, la plus externe, est formée par l'arborisation dendritique qui reçoit les afférences du cortex entorhinal par la voie perforante. Les couches granulaire et moléculaire ensemble sont également nommées *fascia dentata*.

## 1.2 - Connexions de la formation hippocampique

### 1.2.1 - Connexions intrinsèques

Les connexions intrinsèques de l'hippocampe forment une voie unidirectionnelle et sérielle connue sous le nom de boucle trisynaptique (Figure 11). Le cortex entorhinal constitue la principale voie d'entrée de cette boucle. La couche II du cortex entorhinal projette sur la couche moléculaire du GD et de CA3 (voie perforante), tandis que la couche III contacte CA1 et le subiculum. Les cellules granulaires du GD projettent via les fibres moussues sur les dendrites proximales de la *stratum lucidum* de CA3. Puis les cellules pyramidales de CA3, par les fibres collatérales de Schaffer, projettent sur les *strata radiatum* et *oriens* de CA1. Finalement, les cellules pyramidales de CA1 projettent majoritairement vers le subiculum, principale voie de sortie de l'hippocampe. Le subiculum envoie des projections vers le présubiculum et le parasubiculum et l'ensemble de ces trois régions projette vers le cortex entorhinal et ferme la boucle.



### 1.2.2 - Connexions extrinsèques

L'hippocampe est connecté de façon réciproque à l'ensemble des aires associatives néocorticales, soit directement, soit par les cortex périrhinal et parahippocampique via le cortex entorhinal. Ce dernier reçoit des projections directes depuis le gyrus temporal

supérieur, les cortex insulaire ventral, orbitofrontal supérieur, frontal dorsolatéral, frontal médian, cingulaire et rétrosplénial. En retour, il projette vers le cortex périrhinal, cingulaire et le gyrus parahippocampique. Ainsi, la région hippocampique exerce un contrôle sur les lobes temporaux, pariétaux et frontaux. Si la grande majorité des efférences de la région hippocampique passe par le cortex entorhinal, une partie est directement issue de CA1 et du subiculum, qui projettent notamment au cortex préfrontal médian.

La région hippocampique est également connectée aux aires sous-corticales. Par exemple, le cortex entorhinal projette vers l'amygdale et le noyau accumbens. Le septum médian et la bande diagonale de Broca constituent une entrée cholinergique vers l'ensemble de la formation hippocampique. Les noyaux supramammillaires contactent notamment le GD, CA2, CA3 et le cortex entorhinal, et le subiculum projette en retour sur ces noyaux hypothalamiques. Le thalamus est également une source de projections vers la région hippocampique en particulier via les noyaux antérieurs et les noyaux de la ligne médiane (principalement le noyau reuniens qui représente la majorité des entrées thalamiques). Le noyau reuniens projette directement et exclusivement sur la couche moléculaire de CA1, à la fois sur les dendrites des neurones pyramidaux mais également sur des interneurons. L'ensemble de cette région reçoit une innervation noradrénergique depuis le locus coeruleus, sérotoninergique depuis le noyau du raphé et dopaminergique depuis l'aire tegmentale ventrale (Schultz and Engelhardt, 2014).

### **1.3 - Les fonctions de l'hippocampe et de la formation hippocampique**

#### **1.3.1 - Le codage neuronal de l'environnement**

Il est admis depuis plusieurs années que l'hippocampe joue un rôle majeur dans la mémoire spatiale, aussi bien chez l'Homme (Maguire et al., 1997, 1998; Parslow et al., 2004; Travis et al., 2014), chez le Primate non-humain (Hampton et al., 2004; Lavenex et al., 2006), que chez le Rat (Broadbent et al., 2004; Li et al., 2012; Moser and Moser, 1998) .

Dans le but d'évaluer de façon spécifique la mémoire allocentrique, Parslow et collaborateurs ont testé des volontaires dans une arène virtuelle dans laquelle une localisation précise est indiquée par un objet. Les participants débutent la tâche avec cet objet dans leur champ visuel et doivent s'y rendre directement. Après une courte période de

latence, ils doivent retrouver, à partir d'un point de départ différent, la même localisation qui, cette fois, n'est plus indiquée. Les résultats montrent que l'encodage d'une information spatiale requiert l'activation de l'hippocampe (Parslow et al., 2004).

L'implication majeure de l'hippocampe dans la navigation et la mémoire spatiale s'explique notamment par l'existence de cellules spécialisées dans le codage neuronal de l'environnement présentes au sein de la formation hippocampique.

### ***Les cellules de lieu***

Découvertes par O'Keefe et Dostrovsky en 1971, les cellules de lieu sont les principales cellules de l'hippocampe et du GD (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Ces cellules ont la caractéristique de décharger de façon proéminente à un endroit donné d'un environnement particulier. Le profil spatial de décharge, incluant le potentiel de champ, peut être visualisé grâce à une carte des niveaux de décharge où la moyenne des niveaux de décharge pour une cellule à chaque endroit de l'environnement est représentée par un dégradé de couleurs. L'activité des cellules de lieu est indépendante de l'orientation de l'animal dans l'environnement et reste stable d'un essai à l'autre et au cours des jours, à partir du moment où tous les indices visuels principaux restent en place. Si l'un d'eux est déplacé ou retiré, on observe une réorganisation de la cartographie des champs d'activité des cellules (en anglais « *re-mapping* »). Une même cellule de lieu peut être active dans deux environnements différents ou plus, mais ne sera pas activée au même endroit. Il apparaît que le noyau reuniens possède des cellules de lieu (Jankowski et al., 2015).

### ***Les cellules de direction de la tête***

Découvertes par Rank et collaborateurs en 1990, ces cellules s'activent selon la direction dans laquelle est orientée la tête de l'animal, de façon indépendante de la position du corps dans l'espace (Taube et al., 1990). Ces cellules sont présentes dans le présubiculum dorsal, le cortex entorhinal, les noyaux dorsaux antérieurs du thalamus, le cortex rétrosplénial mais également dans le noyau reuniens (Jankowski et al., 2014). Chaque cellule de direction de la tête possède sa propre direction préférentielle et ne s'activera que lorsque l'animal orientera sa tête dans cette direction. L'activité de ces cellules dépend des indices visuels puisque le déplacement de ceux-ci entraîne une rotation de l'ensemble du système, mais également des champs d'activité des cellules de lieu. Le positionnement de ces dernières

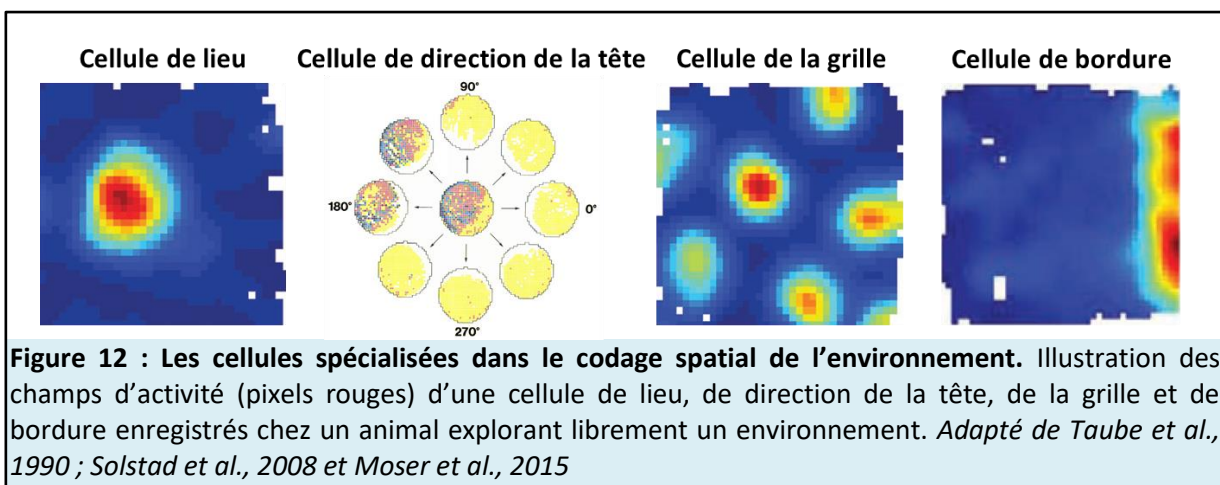
pourrait donc, au moins en partie, dépendre des informations envoyées par les cellules de direction de la tête.

### **Les cellules de la grille**

En 2005, l'équipe de May-Britt et Edvard Moser a mis en évidence l'existence des cellules de la grille (Hafting et al., 2005). Ces cellules déchargent à des endroits multiples d'un environnement donné de façon très géométrique. En effet, une cellule de la grille possède différents champs d'activité qui forment des triangles équilatéraux entre eux puisque séparés d'un angle d'environ 60°. Initialement découvertes dans le cortex entorhinal médian, elles sont également présentes dans le pré- et le parasubiculum et seraient impliquées dans l'intégration du trajet. Cela correspond à l'utilisation des signaux liés aux mouvements du corps afin d'estimer les distances effectuées et les directions prises qui peuvent en retour contribuer à affiner l'estimation de la position actuelle.

### **Les cellules de bordure**

Entre 2006 et 2009, l'équipe de John O'Keefe et des Moser a contribué à mettre en évidence les cellules de bordure dont l'existence était supposée depuis la découverte des autres catégories de cellules (Lever et al., 2009; Solstad et al., 2008). Ces cellules sont présentes dans le subiculum, le cortex entorhinal médian, le pré- et parasubiculum ainsi que dans le noyau reuniens (Jankowski et al., 2015). Leur champ d'activité se situe à proximité des bords physiques d'un environnement et permettrait la mise en place des cellules de lieu et de la grille.



### **1.3.2 - Un hippocampe, deux sous-régions**

Les études menées sur l'hippocampe tendent à montrer l'existence de deux régions différentes aux fonctions propres en son sein qui se distinguent sur la base d'un axe dorso-ventral. La partie dorsale de l'hippocampe est qualifiée d'hippocampe « froid » et serait impliquée dans le traitement des informations cognitives comme les souvenirs déclaratifs dénués de leur contexte émotionnel. A l'inverse, la partie ventrale est l'hippocampe dit « chaud » qui traite les réponses émotionnelles et liées au stress.

#### ***L'hippocampe dorsal***

Les études suggèrent que l'hippocampe dorsal (HD) serait impliqué dans la mémoire, notamment la mémoire spatiale (Moser et al., 1993, 1995; Pothuizen et al., 2004; Zhang et al., 2004). En 1993, Moser et collaborateurs ont montré qu'une lésion de 20% et plus de la partie dorsale de l'hippocampe provoquait un déficit d'encodage et de rappel d'un souvenir spatial chez des rats testés en piscine de Morris. De façon plus précise, ces auteurs ont montré qu'une lésion restreinte à la région CA1 de l'HD causait les mêmes déficits que ceux induits par la lésion de l'HD entier (Moser et al., 1993). A l'inverse, une lésion touchant 60% de l'hippocampe (incluant l'HV et la partie la plus ventrale de l'HD), mais épargnant la partie la plus dorsale de l'hippocampe, n'induit pas de déficit de mémoire spatiale (Moser et al., 1995).

De façon intéressante, il existerait une latéralisation hippocampique dans le traitement des informations mnésiques spatiales. En effet, il semblerait que l'HD droit soit préférentiellement activé lors d'une tâche spatiale à la différence de l'HD gauche. Cela est retrouvé aussi bien chez le Rat (Klur et al., 2009, mais voir (Shipton et al., 2014) que chez l'Homme (Maguire and Frith, 2003; Maguire et al., 1997, 1998; Nunn et al., 1998). Klur et collaborateurs ont montré qu'un entraînement en piscine de Morris conduisait à une expression différentielle de 623 gènes dans CA1 dorsal droit contre seulement 74 dans CA1 dorsal gauche comparés à des rats non-entraînés. Afin de voir si cette expression différentielle de gènes pouvait être mise en lien avec un effet comportemental, les auteurs ont réalisé des inactivations temporaires soit de l'HD droit ou gauche, ou bilatérales, par instillation de lidocaïne, un antagoniste des canaux sodiques voltage-dépendants. Les résultats montrent que les inactivations de l'HD droit et bilatérale, mais pas de l'HD gauche, causent des déficits de mémoire spatiale à long terme.

***L'hippocampe ventral***

Une lésion de l'HV chez des rats provoque une augmentation de la formation d'ulcères gastriques lorsque ces rats sont stabulés dans des conditions stressantes (Henke, 1990). Une autre étude menée chez le rat montre qu'une lésion de l'HV diminue leur niveau d'anxiété. En effet, lorsqu'ils sont testés dans un labyrinthe en croix surélevé, ces animaux lésés entrent beaucoup plus souvent dans les bras ouverts, aversifs, plutôt que dans les bras fermés, rassurants. L'abaissement de leur niveau de stress est corrélé à une moindre défécation et à une réduction de la production de corticostérone en réponse à un confinement dans une chambre très lumineuse (habituellement source d'anxiété). Les auteurs montrent également que la lésion de l'HV n'induit pas de déficit dans des tâches de conditionnement de peur au contexte ni dans celui de la piscine de Morris (Kjelstrup et al., 2002). De façon intéressante, Hunsaker et collaborateurs montrent que l'HV serait plus fortement impliqué lorsque la tâche requiert une discrimination olfactive plutôt que visuelle ou spatiale (à l'inverse de l'HD) (Hunsaker et al., 2008).

**2 – Le cortex préfrontal médian****2.1 - Description anatomique et connexions**

Chez le Rat, le CPFm est constitué de quatre sous-régions qui, selon un axe dorso-ventral, sont le cortex agrulaire médian (AGm), le cortex cingulaire antérieur (CCA), le cortex prélimbique (PL) et le cortex infralimbique (IL).

Bien que distinctes, les quatre sous-régions du CPFm reçoivent des afférences communes du cortex insulaire, du claustrum, du noyau basolatéral de l'amygdale, des noyaux ReRh, de l'aire tegmentale ventrale, des noyaux supramammillaires, et du tronc cérébral (noyaux du raphée, locus coeruleus, substance grise périaqueducale ; (Hoover and Vertes, 2007). Les quatre sous-régions sont également fortement interconnectées. Néanmoins, le CPFm peut être divisé en deux régions fonctionnelles sur la base des connexions anatomiques de ces dernières.

Tout d'abord le CPFm dorsal (cortex AGm et CCA) reçoit principalement des afférences sensorimotrices, notamment le cortex AGm fortement relié aux cortex somatosensoriels primaires et secondaires, fronto-polaire, occipital et rétrospécial, mais également du

thalamus (noyaux de la ligne médiane notamment ; (Hoover and Vertes, 2007). En retour, le CPFm dorsal distribue des efférences vers des régions sensorimotrices comme les cortex sensorimoteurs, le striatum dorsal, le thalamus et la formation réticulée. Le cortex AGm est considéré comme une région d'intégration multi-sensorielle qui utilise ces informations dans des situations d'attention immédiate afin de déclencher un comportement approprié. Le CPFm dorsal est plutôt relié aux comportements moteurs (Vertes, 2002, 2006).

Le CPFm ventral (cortex PL et IL), et particulièrement le cortex PL, reçoit essentiellement des afférences du système limbique, notamment de la formation hippocampique (CA1 ventral, subiculum, cortex périrhinal) et des noyaux de la ligne médiane du thalamus. Ces connexions sont réciproques. Le CPFm ventral est surtout associé aux processus émotionnels, cognitifs et mnésiques (Hoover and Vertes, 2007; Vertes, 2002, 2004, 2006).

### **2.3 - Fonctions**

Il est admis que le CPFm soutient le traitement des fonctions exécutives, c'est-à-dire « des processus cognitifs de niveau supérieur responsables de la plupart des fonctions et comportements complexes chez l'humain » (définition issue de l'Encyclopédie des Comportements Humains, 2012). Cela comprend les processus attentionnels, d'inhibition comportementale, de planification et d'organisation des comportements orientés vers un but (Dalley et al., 2004). Le CPFm est aussi impliqué dans la prise de décision (Paine et al., 2013) et la flexibilité comportementale (Ragozzino et al., 2003).

Le CPFm est aussi fortement impliqué dans la mémoire, telle que la mémoire de travail (Urban et al., 2014) et la mémoire à long terme récente (Cholvin et al., 2014; Corcoran and Quirk, 2007) et ancienne (Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; Teixeira et al., 2006).

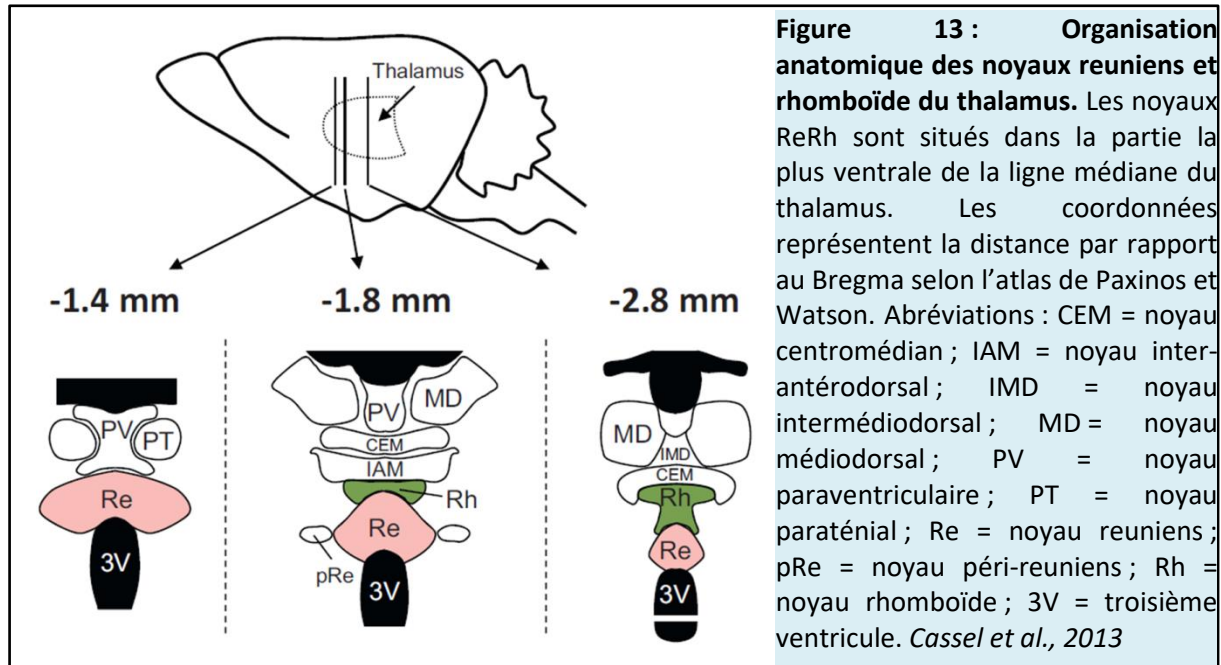
## **3 – Les noyaux reuniens et rhomboïde de la ligne médiane du thalamus**

### **3.1 - Organisation neuroanatomique**

Les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh), avec les noyaux paraventriculaire, paraténial et intermédiodorsal, font partie des noyaux de la ligne médiane du thalamus et reposent au-dessus du troisième ventricule. Dans la partie antérieure, seul le noyau reuniens est présent



et séparé en deux parties par le troisième ventricule. Au niveau médian, ces deux parties se rejoignent et le noyau rhomboïde apparaît, ainsi que les noyaux périreuniens, et l'ensemble de cette structure diminue progressivement dans la partie postérieure (Figure 13).



### 3.2 - Neurotransmission

Les neurones des noyaux ReRh semblent utiliser des acides aminés excitateurs comme neurotransmetteurs principaux. En effet, Bokor et al., (2002) ont injecté un traceur rétrograde (D-aspartate tritié) dans la couche moléculaire de la région CA1 hippocampique et ont observé un marquage dans le noyau Re, suggérant une projection glutamatergique/aspartatergique de ce noyau vers l'hippocampe (Bokor et al., 2002). Arai et collaborateurs ont, eux, mis en évidence la présence de calrétinine et de calbindine (protéines liant le calcium, généralement retrouvées dans les neurones à projections excitatrices, (Winsky et al., 1992) dans le noyaux Re, ainsi que de façon moins intense dans le noyau Rh (uniquement la calbindine). A l'inverse, peu de neurones expriment la parvalbumine, une protéine liant le calcium dans certains interneurons GABAergiques inhibiteurs (Arai et al., 1994). Il est donc considéré que les noyaux ReRh exercent une activité excitatrice sur les différentes régions vers lesquelles ils projettent.

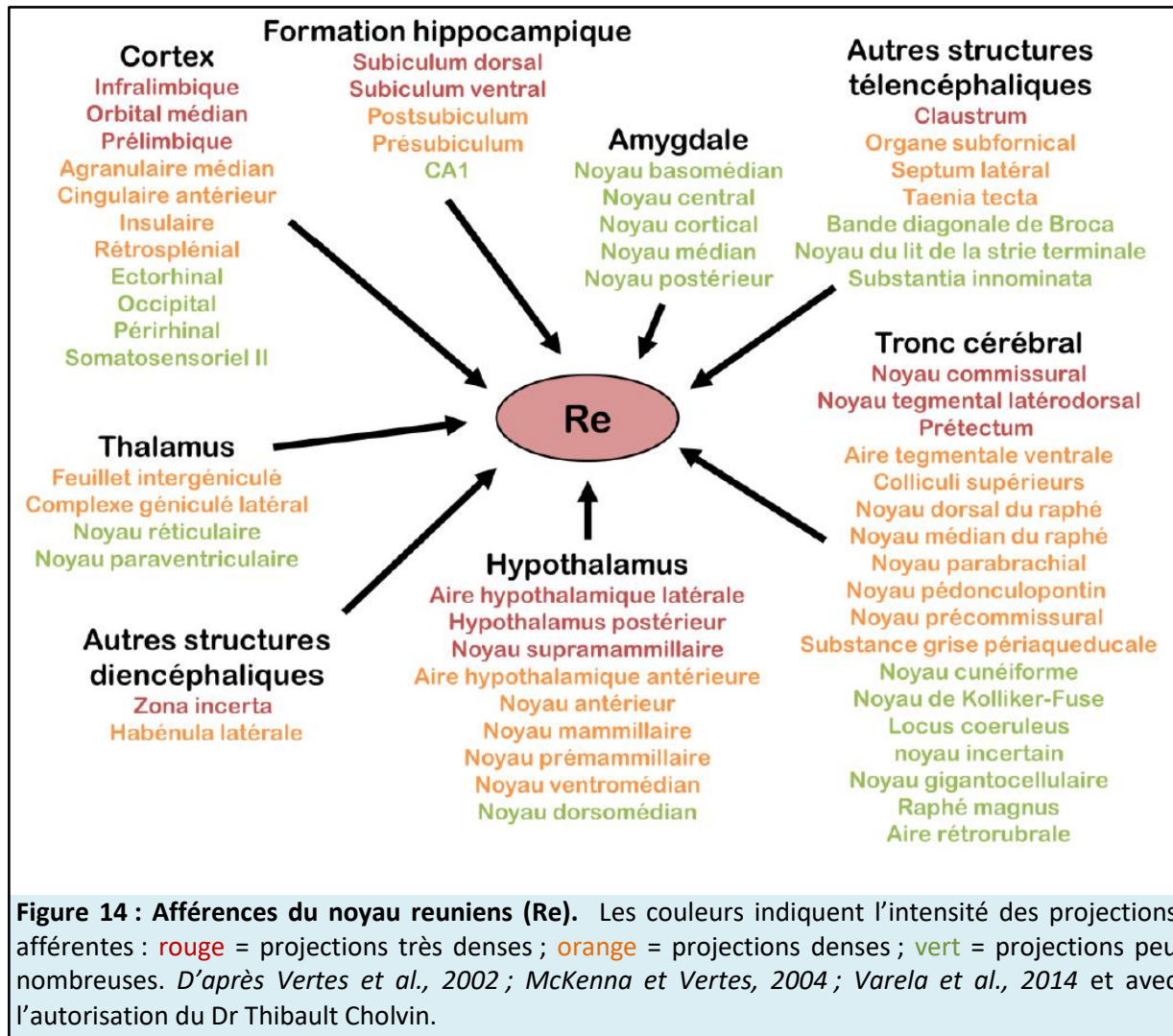
### **3.3 - Connexions**

#### **3.3.1 - Afférences du noyau reuniens**

Le noyau reuniens reçoit des projections denses depuis des régions corticales et sous-corticales. Parmi les régions corticales, les principales projections proviennent des quatre sous-régions du CPFm (cortex AGm, CCA, PL et IL). Les autres sources d'afférences corticales sont les cortex orbital médian, insulaire, ectorhinal, perirhinal et rétrosplénial (McKenna and Vertes, 2004; Vertes, 2002).

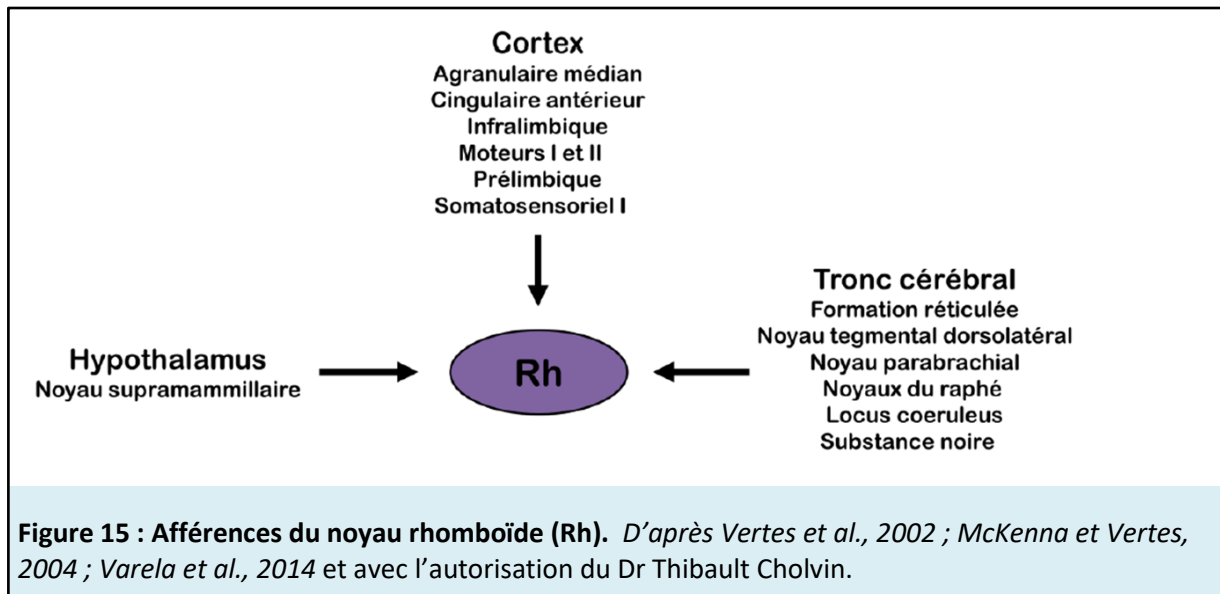
Le noyau Re reçoit également des projections de la formation hippocampique, dont les plus denses proviennent du subiculum, du présubiculum et du postsubiculum. La couche CA1 n'envoie que très peu d'axones vers le reuniens (Herkenham, 1978; McKenna and Vertes, 2004; Varela et al., 2014; Witter et al., 1990).

D'autres projections sont originaires des noyaux antérieurs et médians de l'amygdale, de la branche horizontale de la bande diagonale de Broca et du septum. Les projections diencephaliques proviennent notamment (liste non exhaustive) d'autres noyaux thalamiques (noyau réticulaire, noyau géniculé latéral), sous-thalamiques (zona incerta), hypothalamiques (hypothalamus médian et latéral). Les régions du tronc cérébral ayant des connexions avec le noyau Re sont, par exemple, l'aire tegmentale ventrale, la formation réticulée ou encore le locus coeruleus (Krout et al., 2002; McKenna and Vertes, 2004) (Figure 14).



### 3.3.2 - Afférences du noyau rhomboïde

Les afférences du noyau Rh sont moins bien décrites que celles du noyau Re. Ce noyau reçoit des projections de l'ensemble des quatre sous-régions du CPFm (Vertes, 2002, 2004). Les autres sources de projections corticales sont les cortex moteurs primaires et secondaires ainsi que le cortex somatosensoriel primaire (Vertes, 2004). Mais ses principales sources de projections proviennent du tronc cérébral, en particulier des afférences sérotoninergiques du noyau du raphé. La formation réticulée, le noyau tegmental dorso-latéral, la substance noire, les noyaux supramammillaires et le locus coeruleus projettent également au noyau Rh (Vertes et al., 2010) (Figure 15).



### 3.3.3 - Efférences du noyau reuniens

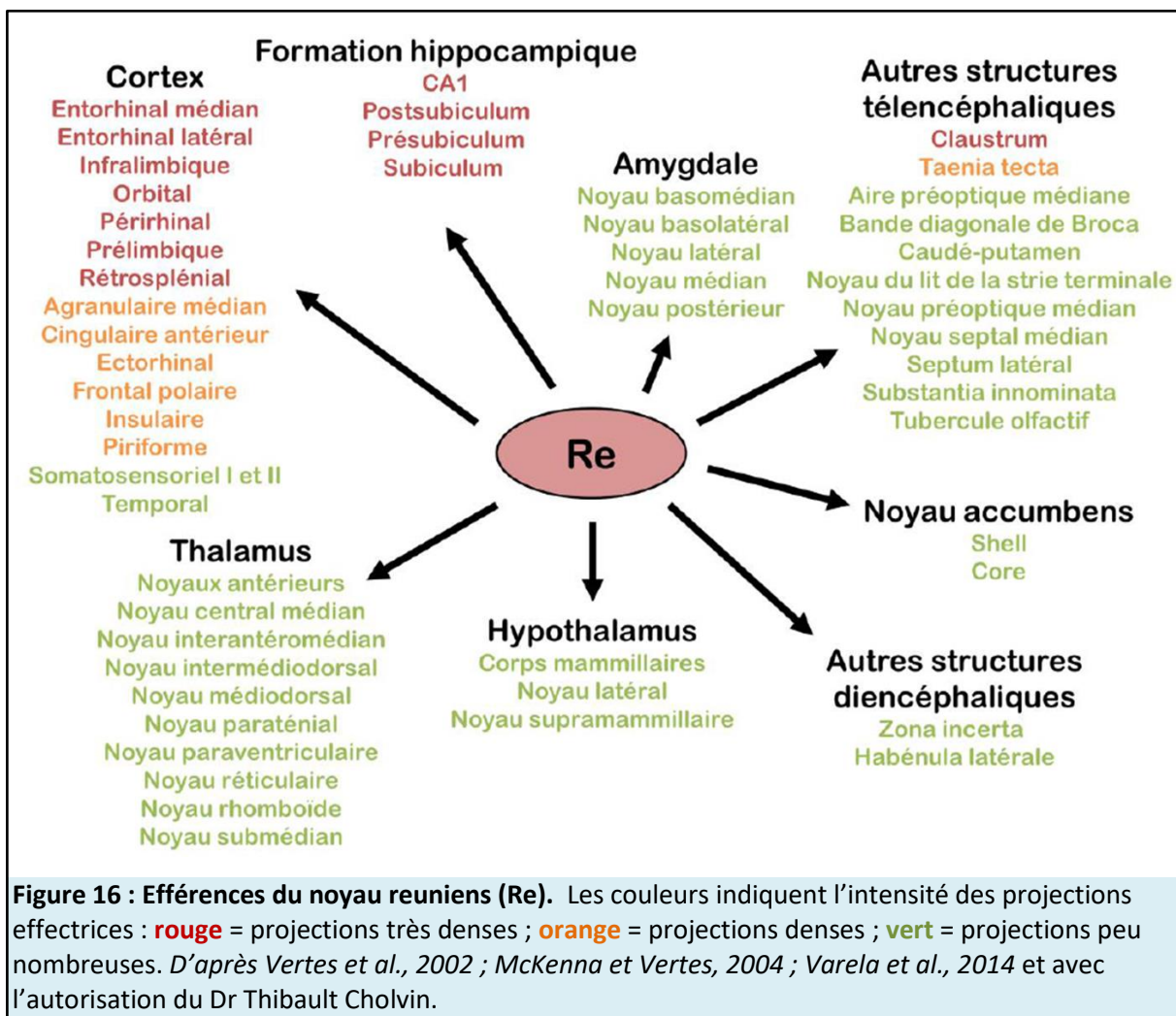
Le noyau reuniens projette essentiellement sur le cortex et la formation hippocampique.

Au niveau cortical, les cortex PL et IL sont des cibles majeures (notamment les couches 1, 5 et 6), ainsi que les cortex entorhinal latéral et médian, orbital, périrhinal et rétrosplénial (Hoover and Vertes, 2007; Van der Werf et al., 2002; Vertes et al., 2006).

Au niveau de la formation hippocampique, la couche moléculaire de la région CA1 de l'hippocampe reçoit des projections denses tout le long de l'axe dorso-latéral ; le noyau Re étant la principale source des projections thalamiques vers l'hippocampe (Van der Werf et al., 2002; Varela et al., 2014; Vertes et al., 2006). Ces projections vers l'hippocampe ne concernent que la région CA1, les régions CA2/CA3 et le GD étant dépourvues de toutes connexions directes avec le noyau Re. De plus, il existe une dissymétrie dans les projections vers CA1 puisque la densité des fibres connectant la partie ventrale est jusqu'à dix fois supérieure à celle connectant la partie dorsale, reflétant une connexion privilégiée entre le noyau Re et CA1 ventral (Hoover and Vertes, 2012). Le subiculum dorsal et ventral et le parasubiculum sont également des cibles, et les projections du noyau Re vers le subiculum ventral sont bien supérieures à celles vers CA1 ventral (Herkenham, 1978; Vertes et al., 2006; Wouterlood et al., 1990) (Figure 16).

Hoover et Vertes (2012), par à une technique de double marquage où un traceur est injecté dans le CPFm et le deuxième dans l'hippocampe ventral ou le subiculum, ont mis en évidence l'existence de neurones du Re doublement marqués (entre 3 et 6%), donc

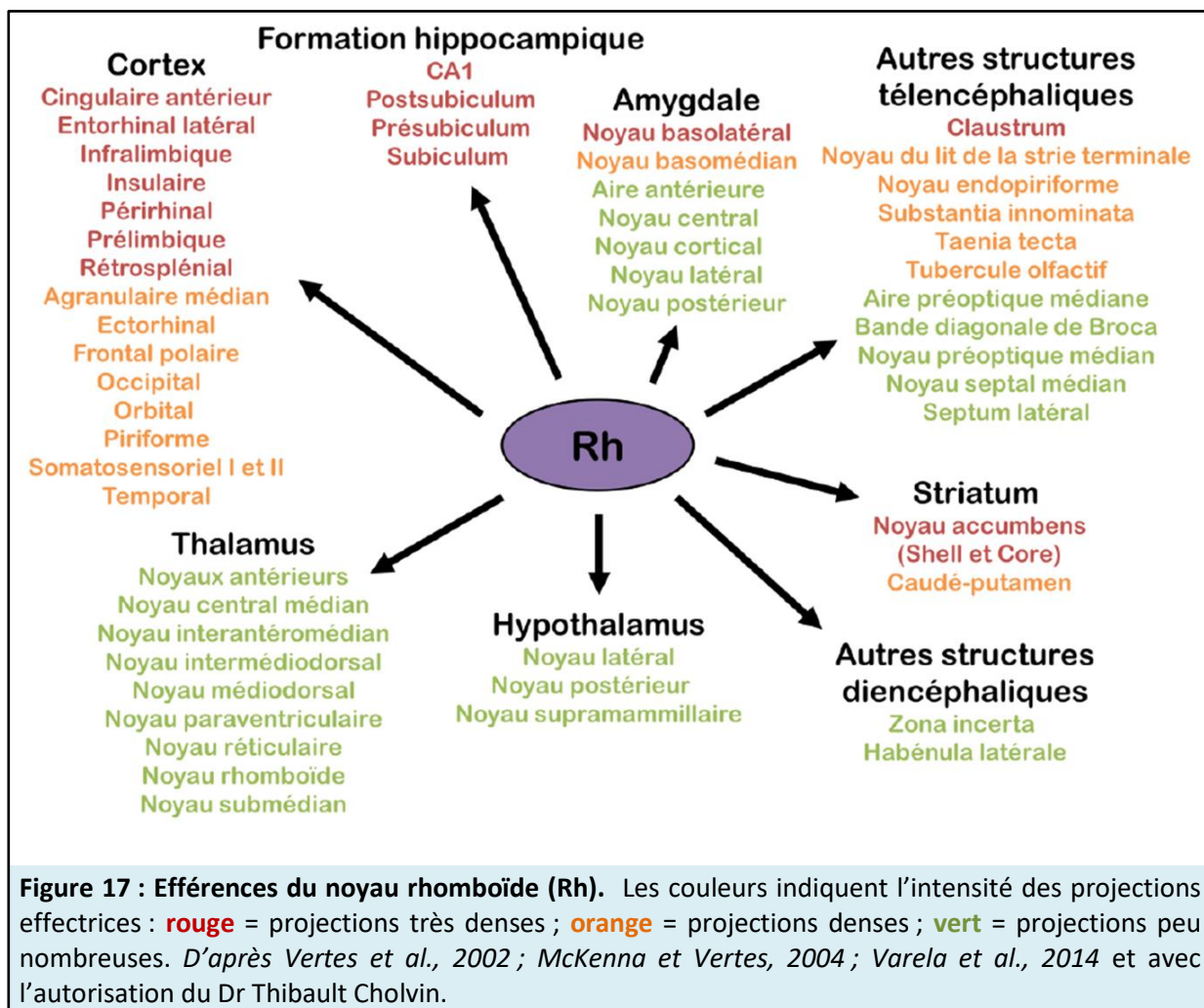
envoyant des fibres collatérales sur chacune de ces deux structures. Varela et al. (2014) ont, eux, rapporté environ 8% de neurones doublement marqués. Par ailleurs, il apparaît que les neurones du Re sont organisés selon les cibles vers lesquelles ils projettent. En effet, la partie antérieure du noyau contient majoritairement des neurones projetant vers le CPFm par rapport à l'hippocampe (60% contre 40%), tandis que ce profil est inversé dans la partie postérieure (Hoover and Vertes, 2012). De plus, il existe une ségrégation des neurones selon les structures avec lesquelles ils sont en relation. Par exemple, les neurones de la partie dorsolatérale du Re projettent principalement vers la région CA1 de l'hippocampe, ceux du Re latéral vers le subiculum, ceux du Re médian vers le cortex entorhinal médian, ceux du Re ventral vers le cortex entorhinal latéral et, enfin, les neurones du périrhinal cibleraient surtout le cortex périrhinal (Dolleman-Van Der Weel and Witter, 1996). Vertes et collaborateurs (2006) ont mis en évidence que le Re rostral projette surtout vers le cortex entorhinal médian tandis que le Re caudal connecte essentiellement le cortex entorhinal latéral.





### 3.3.4 - Efférences du noyau rhomboïde

Les efférences du noyau Rh sont similaires à celles du noyau Re, à la différence près que les premières sont plus diffuses, en terme de structures ciblées. En effet, si les efférences du noyau Re contactent principalement le cortex et la formation hippocampique, celles du noyau Rh ciblent également l'amygdale et le striatum. Par ailleurs, seule la partie dorsale de CA1 reçoit des projections du noyau Rh (Van der Werf et al., 2002; Vertes et al., 2006) (Figure 17).



## 3.4 - La boucle hippocampo-cortico-thalamique

### 3.4.1 - Modulation corticale

En 2006, Di Prisco et Vertes ont étudié l'effet des projections des noyaux de la ligne médiane du thalamus ventral (incluant donc les noyaux ReRh) sur l'activité du CPFm chez le rat. Pour cela, ils ont stimulé (entre autres) les noyaux ReRh et enregistré les réponses

électrophysiologiques au sein des quatre sous-régions du CPFm. Il en ressort que les noyaux ReRh exercent une action excitatrice importante sur l'ensemble du CPFm. La latence des réponses indique que les connexions entre ces structures sont monosynaptiques. Les potentiels évoqués ayant les plus larges amplitudes sont obtenus dans les cortex PL et IL suite à la stimulation des noyaux ReRh. De plus, une stimulation appariée des noyaux ReRh produit une facilitation importante dans ces deux mêmes sous-régions (également rapporté par (Eleore et al., 2011)). Ces caractéristiques sont retrouvées lorsque les stimulations sont effectuées sur d'autres sources d'afférences du CPFm, tels que l'hippocampe, le noyau médiodorsal du thalamus et le CPFm controlatéral (Di Prisco and Vertes, 2006). Ces résultats suggèrent que les noyaux ReRh représentent une source directe majeure d'afférences excitatrices vers le CPFm pouvant moduler de façon significative le fonctionnement du CPFm.

### 3.4.2 - Modulation de l'hippocampe

Dolleman-Van der Weel et collaborateurs (1997) ont été les premiers à s'intéresser à l'influence des connexions du noyau Re sur l'activité de l'hippocampe, chez le rat anesthésié. Pour cela, ils ont placé une électrode de stimulation au sein du noyau Re et enregistré les potentiels de champ évoqués et les activités unitaires dans la région CA1 de l'hippocampe, dans les couches moléculaire (où l'on retrouve les dendrites des cellules pyramidales), oriens/alveus et radiatum (où sont présents les interneurones). Ils ont constaté la présence d'une déflexion négative au sein de la couche moléculaire en réponse à la stimulation, reflet d'une dépolarisation des dendrites apicales des cellules pyramidales. A l'inverse, une déflexion positive a été enregistrée dans la *stratum radiatum*, illustrant une dépolarisation des interneurones de cette couche. Lors de stimulations appariées du noyau Re, la seconde réponse des cellules pyramidales est robuste et soutenue, mais néanmoins insuffisante pour activer les cellules pyramidales. A l'inverse, la dépolarisation induite par la stimulation appariée du noyau Re est suffisante pour activer les interneurones. Ainsi, ces résultats montrent que le noyau Re peut moduler positivement l'hippocampe via ses projections sur les dendrites apicales des cellules pyramidales (mais la dépolarisation reste insuffisante pour atteindre le seuil de décharge de ces cellules), et négativement via ses projections sur les interneurones qui peuvent ensuite inhiber les cellules pyramidales (Dolleman-Van der Weel et al., 1997).

En 1999, Bertram et Zhang ont testé le rôle physiologique des efférences du noyau Re sur la région CA1. Ils ont comparé les effets d'une stimulation de la connexion Re-CA1 avec celle sur la connexion CA3 controlatéral-CA1. Les résultats montrent que le noyau Re exerce une excitation directe et puissante sur CA1, similaire à celle induite par CA3 controlatéral. Néanmoins, si les réponses induites par les deux sources sont qualitativement similaires, les effets physiologiques diffèrent. En effet, la stimulation du noyau Re entraîne une réponse plus brève de CA1, une facilitation en cas de stimulation appariée, et une PLT après une des stimulations répétées de haute fréquence, ce que n'induit pas la stimulation de CA3. L'excitation induite par le noyau Re serait donc plus importante que celle induite par CA3 controlatéral, tout du moins avec des conséquences physiologiques différentes (Bertram and Zhang, 1999).

### **3.4.3 - Modulation cortico-hippocampique**

Les études précédentes, basées sur des données anatomiques, montrent que les noyaux ReRh sont à même de moduler le CPFm et l'hippocampe. Néanmoins, elles ne disent pas si cette modulation se fait de façon séparée ou bien simultanée. Autrement dit, les noyaux ReRh modulent-ils l'hippocampe et le CPFm indépendamment l'un de l'autre ou bien dans des situations où les deux structures sont requises ? Une donnée anatomique laisse à penser que les noyaux ReRh pourraient agir simultanément sur ces deux structures. En effet, il s'avère qu'une population de neurones du noyau Re reçoit à la fois des efférences du CPFm et projettent vers CA1 (Vertes et al., 2007). Au début des années 2010, plusieurs équipes ont voulu savoir dans quelles mesures les noyaux ReRh intervenaient en lien avec le CPFm et l'hippocampe.

#### ***Modulation cortico-hippocampique dans la mémoire de travail***

Plusieurs études suggèrent que les noyaux ReRh coordonneraient le transfert des informations circulant entre l'hippocampe et le CPFm dans la mémoire de travail (Hembrook et al., 2012; Layfield et al., 2015).

En 2013, Hallock et collaborateurs ont entraîné des rats dans deux tâches au cours desquelles le rat doit suivre une texture présente au sol pour obtenir une récompense. La première est une tâche de discrimination indépendante de la mémoire de travail. Le rat doit suivre la texture présente du début du labyrinthe jusqu'au bras récompensé. La deuxième



tâche est une tâche de discrimination dépendante de la mémoire de travail. Elle se présente de la même façon que la première, à la différence près que la texture recouvrant la surface du labyrinthe n'est présentée que sur sa première partie. Le rat doit donc mémoriser la texture rencontrée jusqu'au point d'intersection entre les deux bras pour faire son choix et espérer la récompense. Les auteurs montrent qu'une inhibition des noyaux ReRh (par injection de muscimol, agoniste des récepteurs GABA) altère uniquement la tâche de mémoire de travail (Hallock et al., 2013). En 2016, ces mêmes auteurs montrent que la tâche de discrimination dépendante de la mémoire de travail nécessite une synchronisation des potentiels de champs de l'hippocampe et du CPFm et que l'inhibition des noyaux ReRh altère cette synchronisation, ce qui expliquerait les faibles performances de mémoire de travail (Hallock et al., 2016).

***Modulation cortico-hippocampique dans la mémoire à long terme***

En 2013, les prix Nobel Xu et Südhof ont entraînés des souris dans une tâche de conditionnement de peur au contexte. Le test de rappel effectué 24h après l'acquisition montre qu'une inhibition du noyau Re engendre une généralisation du souvenir contextuel, associée à une diminution du nombre de cellules activées (c-Fos positives, par rapport aux souris contrôles) dans la région CA1 et le cortex CA. A l'inverse, une activation du noyau Re est à l'origine d'un souvenir du contexte plus précis et d'une augmentation de cellules activées dans CA1 et le cortex CA. Enfin, par modulation optogénétique, les auteurs montrent qu'une stimulation tonique du noyau Re permet l'obtention d'un souvenir de peur au contexte spécifique, tandis qu'une stimulation phasique le généralise. Ainsi, le noyau Re contrôlerait la spécificité des souvenirs d'un contexte particulier en traitant l'information circulant entre le CPFm et l'hippocampe (Xu and Südhof, 2013).

Au sein du laboratoire, Cholvin et collaborateurs (2013) ont également montré que l'inactivation des noyaux ReRh induisait un déficit de flexibilité comportementale dans une tâche requérant à la fois l'hippocampe et le CPFm (Cholvin et al., 2013).



Chapitre 3 : Du gène à la  
protéine



## **1 – Généralités**

Ce chapitre rappellera brièvement les grandes étapes des processus permettant l'obtention d'une protéine fonctionnelle à partir de son gène, sur la base des revues suivantes : (Jackson et al., 2010, 2012; Dever and Green, 2012; Shandilya and Roberts, 2012; Matera and Wang, 2014)

L'ADN (acide désoxyribonucléique) contient toute l'information génétique, appelée génome, permettant le développement, le fonctionnement et la reproduction des êtres vivants. L'ADN est une macromolécule présente dans le noyau de toutes les cellules de l'organisme. Cet ADN est identique au sein de toutes les cellules d'un même individu, mais tous les individus ne portent pas le même ADN, d'où la diversité des espèces vivantes. Toutes les cellules d'un individu ne sont pas identiques. Dans le noyau, la molécule d'ADN se présente sous forme repliée appelée chromosome. Ce repliement est nécessaire car si l'ADN de toutes les cellules de l'Homme était déroulé et mis bout à bout, sa longueur totale atteindrait 400 000 km, soit un peu plus que la distance moyenne Terre-Lune.

Cette molécule a pour la première fois été identifiée et isolée à partir d'un noyau de globule blanc par le suisse Friedrich Miescher en 1869. Puis en 1953, sa structure en double hélice est découverte par le britannique Francis Crick et l'américain Richard Watson, à partir des données expérimentales obtenues par Rosalind Franklin.

Cette molécule est un polymère formé par la répétition de monomères appelés bases nucléiques ou nucléotides. Ces nucléotides sont au nombre de quatre et nommés adénine, thymine, cytosine et guanine. Il existe deux types de nucléotides suivant leur composition chimique : les purines (adénine et guanine) et les pyrimidines (thymine et cytosine). Une purine est systématiquement associée à une pyrimidine et, plus précisément, une adénine est toujours associée à une thymine tandis qu'une cytosine est toujours associée à une guanine. Grâce à cette complémentarité des bases nucléiques, toute l'information génétique portée par un brin d'ADN est portée à l'identique par l'autre brin. Le génome humain comporte environ 2,9 milliards de paires de bases (pb) distribuées dans 46 chromosomes (2,75 milliards de pb pour le rat réparties dans 42 chromosomes).

L'information contenue dans le génome est portée par les gènes. Un gène est une séquence de nucléotides précise sur l'ADN qui code pour une protéine ayant une fonction particulière dans l'organisme. C'est également le support de l'hérédité. L'ensemble des gènes est appelé génotype. Toutes les cellules de l'organisme ne sont pas identiques. Bien qu'ayant le même génotype, chaque cellule va exprimer spécifiquement les gènes nécessaires à son fonctionnement. Le contrôle de la transcription des gènes dans les cellules est assuré par des facteurs de transcription (FT) et des complexes protéiques, dont les régulations sont également contrôlées par les modifications épigénétiques (littéralement « sur les gènes »). Les régulations épigénétiques peuvent donc participer au contrôle de la transcription des gènes suivant des stimuli, par exemple durant un apprentissage.

La transcription d'un gène donne un ARN (acide ribonucléique) qui, à la différence de l'ADN, est simple brin et où la base thymine est remplacée par une base uracile. Il existe divers types d'ARN, du plus connu ARN messager (ARNm) aux plus récemment découverts micro ARN ou siARN (small interfering ARN). Seuls les ARNm sont ensuite traduits en protéines, tandis que les autres ont un rôle fonctionnel dans la cellule. Sur l'ensemble du génome humain, seuls 3% des gènes sont dits « codants » (soit environ 20 000 gènes), c'est-à-dire qu'ils permettent la production d'une protéine. Les 97% restants sont des gènes « non-codants » dont les fonctions sont encore mal connues.

## **2 – La transcription**

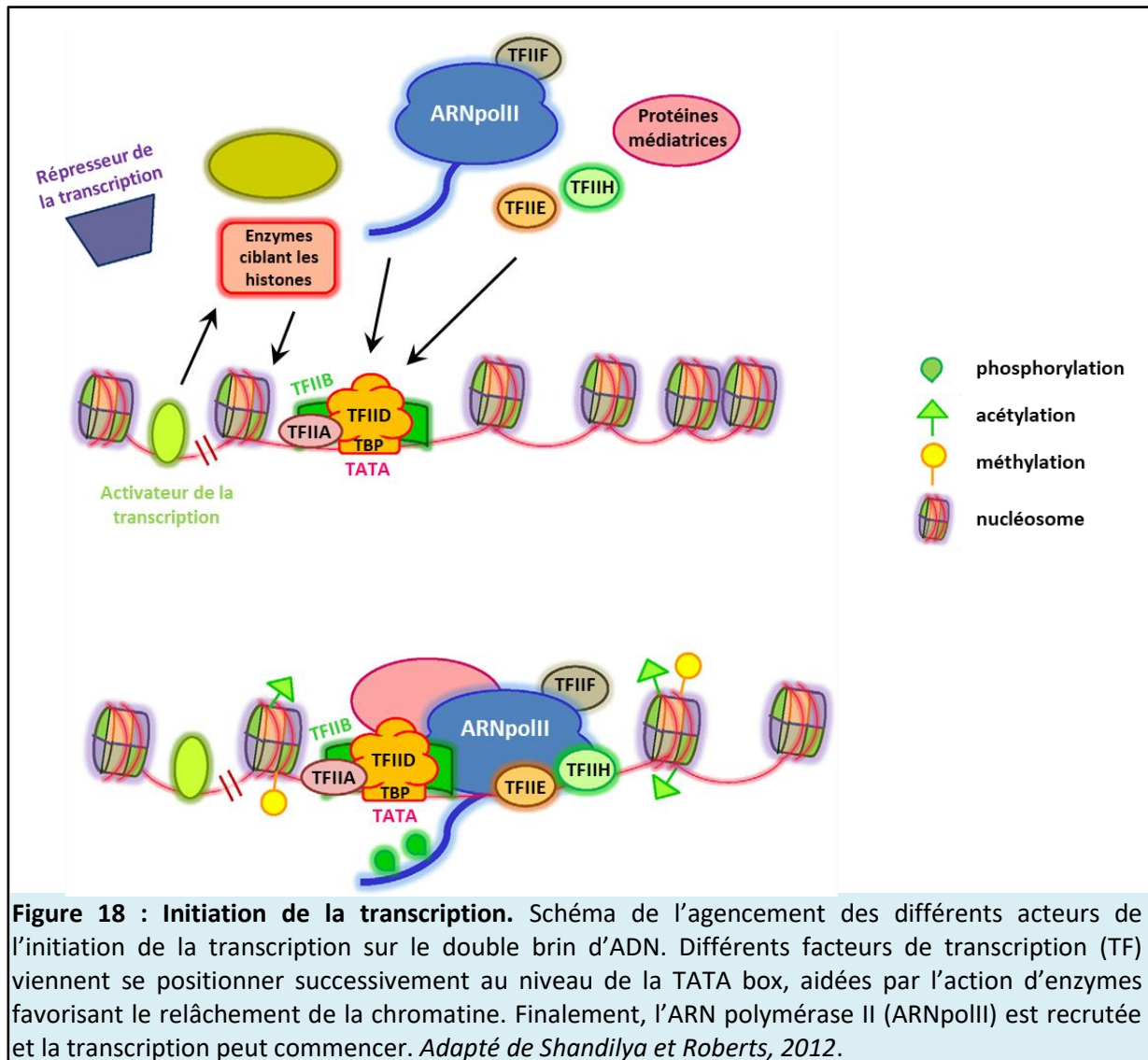
La transcription est la première étape qui mène à la production des protéines. Ce mécanisme permet de copier l'information génétique contenue dans le double brin d'ADN en un simple brin complémentaire au brin codant, l'ARNm. Chez les eucaryotes, la transcription prend place dans le noyau et se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La molécule assurant la copie du gène est l'ARN polymérase II (ARNpolII).

### **2.1 – L'initiation**

L'initiation de la transcription est un processus complexe consistant à placer l'ARNpolII sur le promoteur proximal du gène cible et à ouvrir la double hélice d'ADN afin de commencer la synthèse de l'ARNm (Figure 18). Un promoteur est une région longue de 100 à 1000pb située en amont et à proximité du site initiateur de la transcription. L'initiation de la

transcription est un mécanisme séquentiel qui débute par la fixation sur la séquence TATA (région riche en nucléotides adénine et thymine) de la TATA binding protein (TBP). La fixation de cette protéine dépend de la présence d'activateurs (en anglais « enhancers ») liés sur leur séquence cible qui peut se trouver à plusieurs à centaines ou milliers de paires de bases de distance du promoteur. Leur interaction avec TBP suppose donc que l'ADN se replie.

TBP favorise ensuite l'assemblage des facteurs de transcription généraux nommés TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH. TFIID vient se fixer sur TBP, puis TFIIA s'associe à TBP pour stabiliser l'interaction entre TBP et l'ADN au niveau de la séquence TATA. Cette séquence est flanquée d'éléments reconnus par TFIIB, qui s'y fixe. L'ensemble de ces protéines forme le complexe de pré-initiation (CPI). Finalement l'ARNpolIII, associée à TFIIF, se fixe au CPI et le stabilise. Par la suite, TFIIB aide l'ARNpolIII à séparer les deux brins d'ADN et à repérer le site d'initiation de la transcription. TFIIH est ensuite recrutée et par hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate) permet l'ouverture du CPI et déclenche l'avancée de l'ARNpolIII le long de l'ADN. C'est alors que l'ARNpolIII commence à former l'ARNm. Néanmoins, cela ne signifie pas pour autant que tout est réussi. En effet, selon le nombre de nucléotides formant l'ARNm naissant, la transcription est plus ou moins stable. Un transcrit de moins de 5 nucléotides est peu stable et mène régulièrement à une transcription avortée. Un transcrit de 10 nucléotides favorise la délocalisation du PIC mais reste peu stable. Enfin, lorsque 25 nucléotides forment l'ARNm, l'initiation est dite productive et s'achève pour laisser place à l'étape d'élongation (Shandilya and Roberts, 2012).



## 2.2 – L'élongation

L'élongation est réalisée grâce à l'hydrolyse de l'ATP, assurée par TFIIH, qui permet au complexe d'initiation d'avancer le long de l'ADN, et d'ouvrir le double brin afin que l'ARNpolIII incorpore la bonne base complémentaire de l'ADN à l'ARN en cours de formation. Cette étape est cruciale car toute erreur d'incorporation d'une base pourra être à l'origine d'une protéine non fonctionnelle. Heureusement, en cas d'erreur l'ARNpolIII possède des mécanismes permettant de revenir en arrière et de remplacer la mauvaise base par la bonne et ainsi assurer la fidélité de la transcription. L'élongation n'est pas une douce promenade le long de l'ADN. A l'inverse, c'est plutôt un processus saccadé, fait d'avancées et de pauses dont la durée peut varier afin que l'ARNpolIII s'assure de la fidélité de lecture et d'incorporation des bases. Lors de l'élongation, la plupart des facteurs d'initiation de la transcription sont remplacés par des facteurs d'élongation, assurant des fonctions telles



qu'aider l'ARNpolIII durant ses pauses, recevoir le signal lui indiquant de reprendre son élongation ou encore augmenter le niveau général de transcription en limitant la durée des pauses (Dever and Green, 2012).

### 2.3 – La terminaison

La terminaison est le processus permettant le relargage de l'ARNm du complexe d'élongation et le détachement de l'ARNpolIII de l'ADN. Des trois mécanismes de la transcription, c'est le moins connu. La fin d'un gène est constituée par une série d'adénines que l'ARNpolIII transcrit et qui lui signale de s'arrêter. Le complexe subit plusieurs phosphorylations qui signalent à la machinerie de la terminaison de cliver l'ARNm et de le polyadényler. Cette étape consiste en l'ajout d'une série de 200 adénines à l'extrémité de l'ARNm par la poly-A polymérase (Dever and Green, 2012).

Lorsqu'une première transcription a été réalisée, l'initiation de la suivante peut être simplifiée et plus rapide. En effet, les facteurs de transcription généraux peuvent rester en place sur le promoteur, TFIIB peut interagir avec l'extrémité opposée du gène et permettre ainsi à l'ARNpolIII de se fixer directement sur le promoteur (Dever and Green, 2012).

L'ARNm ainsi formé n'est en fait qu'un ARN pré-messager. Des modifications post-transcriptionnelles vont ensuite avoir lieu afin de rendre l'ARNm mature, c'est-à-dire compétant pour la traduction.

### 2.4 – Les modifications post-transcriptionnelles

Les modifications post-transcriptionnelles ont lieu au niveau des extrémités 5' et 3' mais également au sein même de l'ARN pré-messager. La modification mise en place à l'extrémité 3' correspond à l'ajout d'une queue polyA lors de la terminaison de la transcription.

#### 2.4.1 – Modification de l'extrémité 5' : ajout d'une coiffe

Cette modification n'attend pas la fin de la transcription pour se faire, mais débute dès que l'ARN pré-messager en cours de formation atteint une trentaine de nucléotides. Il s'agit donc d'une modification co-transcriptionnelle. Elle consiste en l'ajout d'une coiffe au niveau de l'extrémité 5'. Cette coiffe est la résultante d'un clivage de l'extrémité 5'triphosphate, de l'ajout d'un GTP (guanosine triphosphate) et de méthylations sur la guanosine de ce GTP.

La coiffe a trois fonctions importantes : protéger l'ARNm contre les ribonucléases qui le dégradent, permettre son exportation vers le cytoplasme et permettre l'initiation de la traduction.

#### **2.4.2 – L'épissage**

L'ARN pré-messager est composé d'une alternance de séquences codantes, les exons, et de séquences non-codantes, les introns. L'épissage est le mécanisme qui permet de retirer les introns afin d'accoler tous les exons et reconstituer ainsi ce que l'on appelle le « cadre de lecture » de l'ARNm. Ce cadre de lecture contient le code permettant aux ribosomes de synthétiser les protéines (Matera and Wang, 2014).

### **3 – La traduction**

La traduction est la seconde et dernière étape permettant la synthèse des protéines. Elle a lieu une fois les ARNm exportés du noyau vers le cytoplasme. Comme la transcription, elle se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Le complexe à l'origine de la traduction est le ribosome.

La traduction est un processus basé sur la lecture de l'ARNm permettant d'assembler de façon précise des acides aminés afin de former une chaîne polypeptidique. L'ARNm transcrit est lu sous forme de codons correspondant à une séquence de trois nucléotides successifs spécifiant l'un des 20 acides aminés entrant dans la composition des protéines. Les nucléotides étant au nombre de quatre, il existe donc  $4^3 = 64$  codons différents codant pour les 20 acides aminés ainsi que 3 codons impliqués dans la terminaison de la traduction. Cela sous-entend donc qu'un acide aminé peut être codé par plusieurs codons. C'est le cas de l'acide aminé Leucine qui est associé à 6 codons différents, tandis que la Méthionine n'est spécifiée que par un seul (Figure 19).

		Seconde position												Troisième position
		U			C			A			G			
Première position	U	U U U	Phe	U C U	Ser	U A U	Tyr	U G U	Cys	U				
		U U C		U C C			U A C		U G C		C			
		U U A	Leu	U C A			U A A	STOP	U G A	STOP	A			
		U U G		U C G			U A G	STOP	U G G	Trp	G			
	C	C U U	Leu	C C U	Pro	C A U	His	C G U	Arg	U				
		C U C		C C C		C A C	C G C	C						
		C U A		C C A		C A A	C G A	A						
		C U G		C C G		C A G	C G G	G						
	A	A U U	Ile	A C U	Thr	A A U	Asn	A G U	Ser	U				
		A U C		A C C		A A C	A G C	C						
		A U A		A C A		A A A	A G A	A						
		A U G		Met		A C G	A A G	Lys		A G G	Arg	G		
G	G U U	Val	G C U	Ala	G A U	Asp	G G U	Gly	U					
	G U C		G C C		G A C	G G C	C							
	G U A		G C A		G A A	G G A	A							
	G U G		G C G		G A G	G G G	G							

**Figure 19 : Le tableau du code génétique.** Ce tableau est utilisé pour lire le code génétique afin d'associer chaque triplet de nucléotides (aussi nommé codon) à l'acide aminé correspondant. Ce tableau met en évidence la redondance du code génétique puisque plusieurs codons peuvent coder pour un même acide aminé. Le codon AUG est le codon initiateur de la traduction tandis que les codons UAA, UAG et UGA sont les codons dits « stop » qui déclenchent la terminaison de la traduction.

### 3.1 – L'initiation

L'initiation de la traduction est le processus d'assemblage du ribosome sur l'ARNm au niveau du codon d'initiation. Cette première étape est limitante dans la synthèse des protéines. En effet, les régulations de la traduction se font dans la grande majorité des cas au cours de l'assemblage du ribosome. Ce processus est d'ailleurs divisé en plusieurs étapes successives (Figure 20).

#### **Étape 1 : formation du complexe de pré-initiation 43S**

Tout d'abord, un complexe ternaire se forme. Il est constitué du facteur eIF2 (eukaryotic initiation factor 2) associé à une molécule de GTP et de l'ARN de transfert (ARNt) reconnaissant le codon d'initiation (toujours le même, AUG, codant pour l'acide aminé Methionine). La reconnaissance du codon par l'ARNt se fait grâce à la présence d'une

séquence inverse présente sur l'ARNt appelée « anticodon ». Le complexe ternaire composé de eIF2 du GTP et de l'ARNt-Met forme le complexe de pré-initiation (CPI) 43S.

#### **Etape 2 : fixation du complexe 43S sur l'ARNm**

Cela est réalisé grâce au complexe eIF4 qui se fixe au niveau de la coiffe de l'ARNm et recrute ensuite le CPI. Cela forme alors le complexe d'initiation (CI) 48S.

#### **Etape 3 : lecture de l'ARNm**

Le CI 48S avance le long de l'ARNm sur la séquence 5' non traduite jusqu'à trouver le codon d'initiation AUG qui code pour l'acide aminé méthionine.

#### **Etape 4 : reconnaissance du codon d'initiation**

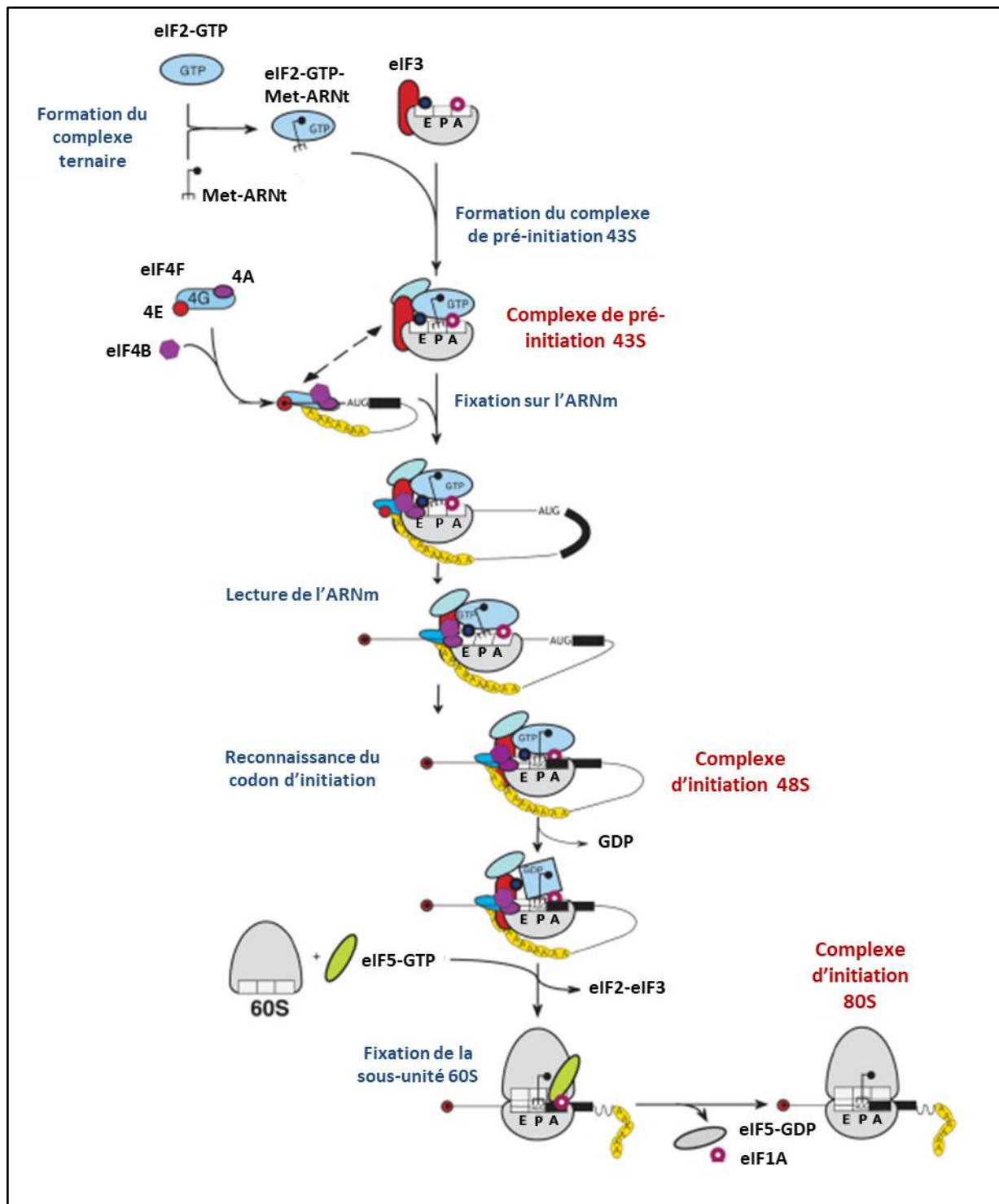
Normalement, le codon d'initiation est le premier codon AUG rencontré. Cependant, pour ne pas risquer une mauvaise reconnaissance et une traduction qui débiterait au mauvais endroit, ce codon doit se trouver au sein d'une séquence particulière comme suit : **XXXA/GXXAUGG** (où X correspond à n'importe lequel des quatre nucléotides) (Kozak, 1981). La base A du codon **AUG** est nommée +1. En position -3 doit donc se trouver une purine (**A/G**) et en position +4 une guanine (**G**). Si le CI rencontre un codon AUG au sein d'une séquence ne comprenant pas ces éléments, ou dans les huit premiers nucléotides suivant la coiffe, le complexe se dissocie et la traduction est avortée.

#### **Etape 5 : formation du complexe d'initiation 80S**

Le ribosome n'est complet que lorsque la sous-unité ribosomique 60S vient se positionner sur la sous-unité 40S. Cela est réalisé grâce à eIF5 qui déclenche l'hydrolyse du GTP de eIF2 et permet ainsi aux différentes eIF de partir afin de rendre possible la fixation de la sous-unité 60S. A la fin de l'initiation, le ribosome est donc constitué des sous-unités 40S et 60S formant le complexe d'initiation 80S qui renferme l'ARNt positionné au niveau du codon d'initiation.

Le ribosome ainsi formé possède trois sites distincts : le site **A** (pour aminoacyl-ARNt) contient un ARNt associé à un acide aminé en attente d'être lié à la chaîne polypeptidique, le site **P** (pour peptidyl-ARNt) contient l'ARNt associé à la chaîne polypeptidique en cours de

formation, et le site E (pour « exit ») contient l'ARNt libéré de son acide aminé et sur le point de sortir du ribosome (Jackson et al., 2010).



**Figure 20 : Initiation de la traduction.** Illustration des différentes étapes de l'initiation de la traduction. L'initiation de la traduction a pour but d'assembler les deux sous-unités du ribosome au niveau du codon d'initiation sur lequel est positionné l'ARNt associé à l'acide aminé Methionine (complexe d'initiation 80S). Adapté de Jackson et al., 2010.

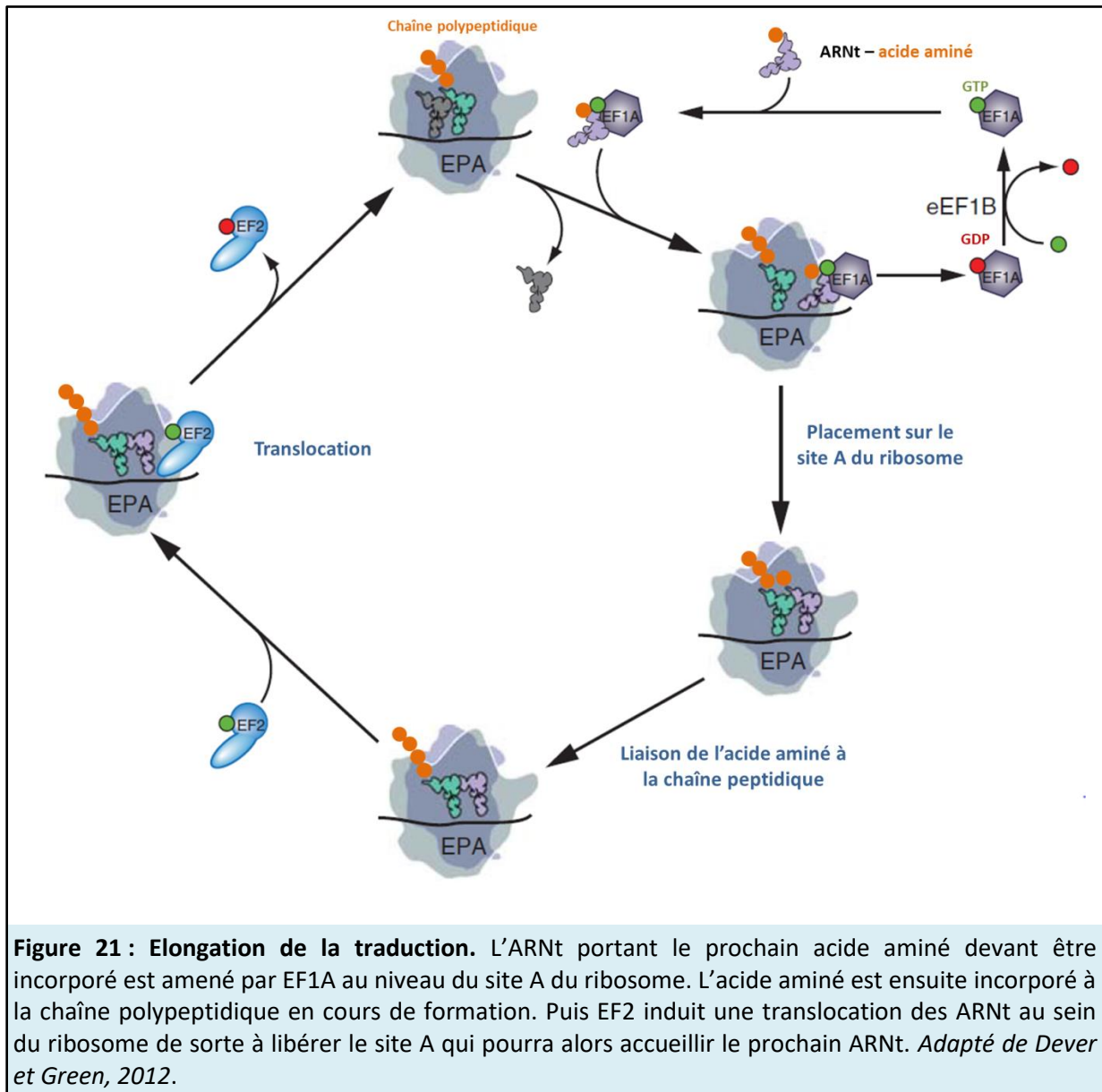
### 3.2 – L'élongation

L'élongation a pour but de former une chaîne polypeptidique correspondant exactement à la séquence des codons présente sur l'ARNm. Elle est assurée par des facteurs d'élongation nommés eEF (eukaryotic elongation factor).

Le facteur eEF1A est lié à une molécule de GTP. Il se fixe à l'ARNt associé à un acide aminé et possédant l'anticodon correspondant au codon présent au niveau du site A du ribosome. eEF1A vient placer l'ARNt de telle sorte que l'anticodon soit au contact du codon (on parle d'appariement), ce qui déclenche l'hydrolyse du GTP et la libération de eEF1A.

Ensuite, la sous-unité 60S du ribosome catalyse la fixation de l'acide aminé présent sur le site P sur l'acide aminé présent sur le site A. La chaîne polypeptidique se retrouve donc portée par l'ARNt présent au niveau du site A.

Enfin, le facteur eEF2, par hydrolyse de la molécule de GTP qu'il porte, permet le déplacement des ARNt le long de l'ARNm. Ainsi, l'ARNt initialement présent au niveau du site P et maintenant dépossédé de son acide aminé se retrouve au niveau du site E, tandis que l'ARNt initialement présent au niveau du site A et portant à présent la chaîne polypeptidique se retrouve finalement au niveau du site P. Le site A étant de nouveau libre, il est prêt à accueillir le prochain ARNt (Dever and Green, 2012) (Figure 21).



**Figure 21 : Elongation de la traduction.** L'ARNt portant le prochain acide aminé devant être incorporé est amené par EF1A au niveau du site A du ribosome. L'acide aminé est ensuite incorporé à la chaîne polypeptidique en cours de formation. Puis EF2 induit une translocation des ARNt au sein du ribosome de sorte à libérer le site A qui pourra alors accueillir le prochain ARNt. *Adapté de Dever et Green, 2012.*

### 3.3 – La terminaison

Le processus de terminaison de la traduction a lieu lorsque le ribosome atteint la fin de la séquence codante signalée par l'un des trois codons STOP. Ces codons ne codent aucun acide aminé et correspondent aux séquences suivantes : UAA, UAG, UGA. La terminaison est assurée par des facteurs nommés eRF (eukaryotic release factor).

Lorsqu'un codon STOP est présent au niveau du site A du ribosome, le complexe eRF1-eRF3-GTP vient se positionner sur le site A. eRF3 stimule l'hydrolyse du GTP et permet à eRF1, qui reconnaît exactement les trois codons STOP, de se fixer au site A. eRF1 induit ensuite le relargage de la chaîne polypeptidique et la dissociation des sous-unités du ribosome qui pourront ainsi être recyclées pour une nouvelle traduction (Jackson et al., 2012).

## **4 – Les modifications épigénétiques**

Le terme « épigénétique » a été utilisé pour la première fois en 1942 par le zoologiste Conrad H. Waddington, ceci en cherchant à expliquer comment l'interaction entre l'expression des gènes et l'environnement conduit à l'établissement d'un phénotype. De nos jours, l'épigénétique peut être définie comme l'ensemble des mécanismes modifiant la structure de la chromatine, sans altérer la séquence génomique. C'est par exemple grâce à ces mécanismes que des cellules totipotentes vont progressivement se transformer en des cellules spléniques, cardiaques ou musculaires.

L'ADN, qui porte l'information génétique de toute espèce vivante, est associé à des protéines qui contribuent à son repliement sous forme de chromosomes. Cet ensemble nucléo-protéique est appelé chromatine. La chromatine est constituée d'une unité de base, le nucléosome, lui-même formé de protéines appelées histones. Il existe cinq types d'histone : H1, H2A, H2B, H3 et H4. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 s'associent par paires homologues, et quatre paires forment un octamère. Cet octamère et les 146pb d'ADN qui l'entourent constituent le nucléosome. H1 fait la jonction entre deux nucléosomes et les stabilise (Gräff et al., 2011).

La chromatine existe sous deux états différents : un état condensé (hétérochromatine), où les nucléosomes sont fortement compactés, ce qui réprime la transcription des gènes, et un état décondensé (euchromatine) où, cette fois, les nucléosomes sont plus espacés, ce qui favorise la transcription des gènes en permettant à l'ensemble de la machinerie transcriptionnelle de se fixer sur leur promoteur. L'alternance de ces deux états de chromatine est régulée par des mécanismes épigénétiques prenant place sur les histones.

Les histones sont de petites protéines composées d'un corps globulaire et d'une extrémité N-terminale qui sort du nucléosome. Ces protéines sont chargées positivement, ce qui leur permet d'interagir fortement avec l'ADN chargé négativement. C'est au niveau de leur extrémité N-terminale que des modifications post-traductionnelles prennent place et modulent l'état de compaction de la chromatine.



Les modifications épigénétiques peuvent porter sur trois niveaux : directement sur les cytosines par méthylation, sur les histones ou encore via les ARN interférants. Le paragraphe qui suit sera consacré uniquement aux modifications portant sur les histones.

## **4.1 - Les modifications post-traductionnelles des histones**

Il existe différentes modifications apportées sur l'extrémité N-terminale des histones : la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation sont les plus connues, mais on trouve aussi l'ubiquitination ou encore la SUMOylation. Ci-après seront brièvement décrites la méthylation, l'acétylation et la phosphorylation des histones (Gräff et al., 2011)

### **4.1.1 - La méthylation des histones**

La méthylation des histones se fait sur les résidus lysine et arginine de l'extrémité N-terminale de la protéine. Cette réaction est effectuée par des lysines méthyltransférases et des arginine méthyltransférases respectivement, qui ajoutent le groupement méthyle à partir du donneur de méthyle. A l'inverse, les histones déméthylases le retirent. Une même lysine peut être méthylée jusqu'à 3 fois et une arginine jusqu'à deux fois, complexifiant ainsi l'information. Chacune de ces marques a une conséquence qui lui est propre. Par exemple, la diméthylation et la monométhylation de la lysine 9 de l'histone H3 favorisent la transcription. A l'inverse, la triméthylation de la lysine 9 réprime la transcription des gènes.

### **4.1.2 – La phosphorylation des histones**

La phosphorylation des histones a lieu sur les résidus serine, thréonine et tyrosine. Elle est régulée par deux types d'enzymes : les protéines kinases responsable de l'ajout du groupement phosphate, et les protéines phosphatases qui assurent son retrait. La phosphorylation des histones est principalement associée à une activation de la transcription. En effet, la charge négative apportée par le groupe phosphate crée une force de répulsion entre l'histone et l'ADN, lui-même chargé négativement, à l'origine d'un état décondensé de la chromatine favorable au placement de la machinerie transcriptionnelle.

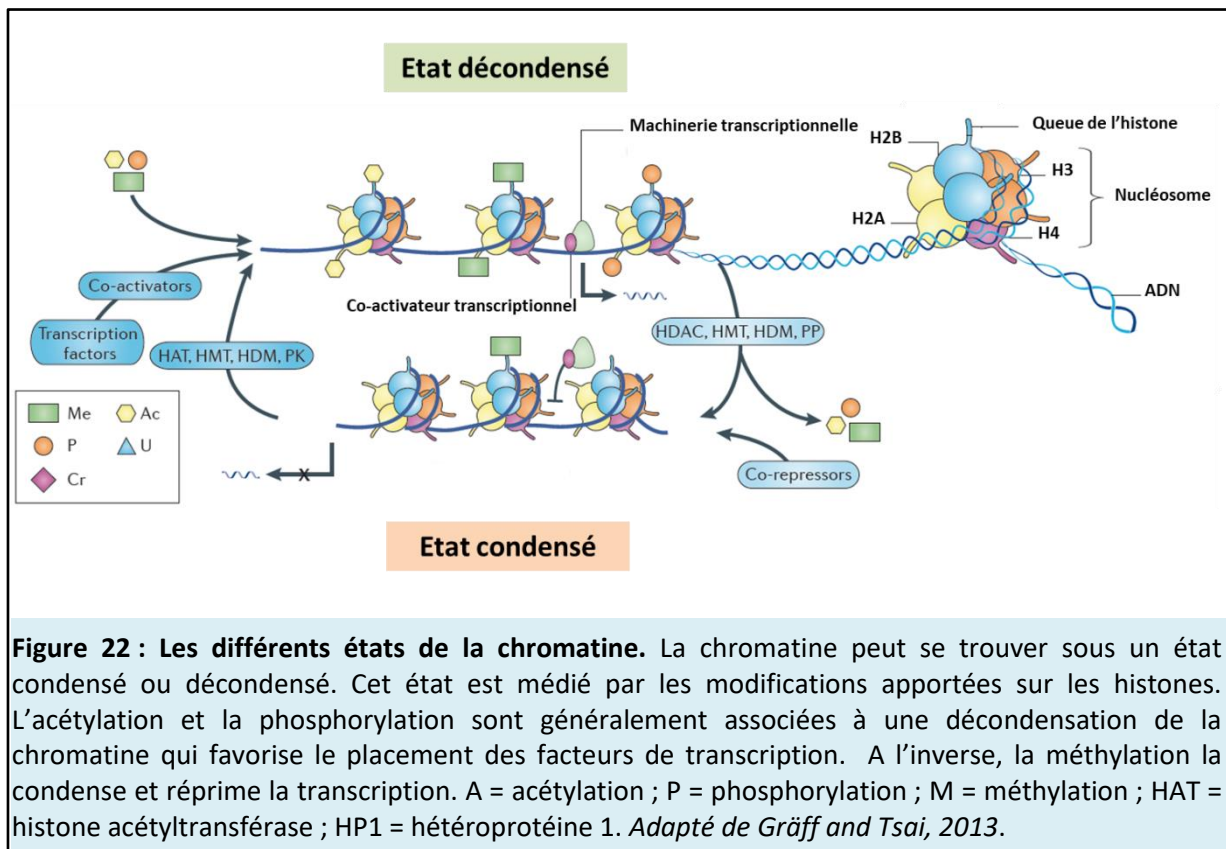
### **4.1.3 – L'acétylation des histones**

L'acétylation des histones se fait sur les résidus lysine. Elle est catalysée par une famille d'enzymes appelées histone acétyltransférases qui apportent le groupement acétyl à partir

de l'acétyl Coenzyme A, tandis que les histones déacétylases hydrolysent ce groupement. L'acétylation des histones favorisent la transcription des gènes par deux mécanismes complémentaires (Figure 22).

Le premier mécanisme est basé sur la neutralisation de la charge positive portée par l'histone. En effet, les lysines portent un groupement ammonium, chargé positivement, responsable de l'attraction exercée par l'histone sur l'ADN. L'apport de l'acétyl, chargé positivement, rend la charge de l'histone neutre et diminue ainsi la force attractive entre l'histone et l'ADN. Cela est alors favorable au positionnement de la machinerie transcriptionnelle sur l'ADN.

Le second mécanisme est directement dépendant de la présence des groupements acétyl. En effet, il existe des protéines qui possèdent un domaine de liaison spécifique aux lysines acétylées, nommé bromodomaine. Ces protéines, suivant leur fonction, vont pouvoir augmenter le niveau d'acétylation des histones, comme c'est le cas pour la protéine CBP, ou encore participer au recrutement des facteurs de transcription ou des protéines impliquées dans la machinerie transcriptionnelle, l'ensemble de ces processus conduisant, *in fine*, à augmenter la probabilité de transcription des gènes (Filippakopoulos and Knapp, 2014; McClung and Nestler, 2008).



## 4.2 – Régulations épigénétiques et processus mnésiques

Les modifications post-traductionnelles des histones sont un mécanisme fondamental de la régulation de l'expression des gènes. La consolidation d'un souvenir dépendant de la synthèse de nouvelles protéines, la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la mémoire est donc au cœur des processus mnésiques.

En 2004, Levenson et collaborateurs ont été les premiers à montrer que l'apprentissage et la mémoire dépendaient de l'acétylation des histones. Ils ont observé qu'après un conditionnement de peur au contexte, l'acétylation de la lysine 14 (K14) de l'histone 3 (H3) était significativement augmentée dans la région CA1 hippocampique (Levenson et al., 2004). Depuis, de nombreuses études ont montré que les régulations post-traductionnelles des histones étaient essentielles aux processus mnésiques, notamment dans l'hippocampe et le cortex (Bousiges et al., 2010, 2013; Gräff et al., 2012; Gräff and Tsai, 2013; Carter et al., 2015).

Gräff et collaborateurs (2012) ont, par exemple, montré l'existence d'une dynamique spatio-temporelle dans la mise en place des modifications épigénétiques entre l'hippocampe et le CPF au cours d'une consolidation mnésique. Ils ont testés des souris dans une tâche de

reconnaissance d'objets à différents délais. Ils ont observé qu'un rappel à court terme (10min) était associé à une augmentation de la phosphorylation de H3S10 ainsi que de l'acétylation de H3K14 dans l'hippocampe. Ces mêmes marques sont significativement augmentées après 1 jour mais retournent à leur niveau basal après 7 jours. De façon intéressante, ces modifications épigénétiques ne sont pas induites par un rappel à court terme dans le CPF, mais sont présentes après 1 jour et persistent jusqu'à 7 jours. Ils ont ensuite voulu savoir si ces régulations épigénétiques étaient associées à la régulation de gènes, notamment le gène précoce *zif268*. Par une approche de chromatine immunoprécipitation, ils ont observé que la phosphorylation de H3S10 tout comme l'acétylation de H3K14 étaient augmentée au niveau du promoteur du gène *zif268* dans l'hippocampe après 1 jour, et que ce gène était significativement induit à ce délai. Au bout de 7 jours, ces modifications retournent à leur niveau basal, tout comme l'expression du gène précoce. Dans le CPF, la dynamique est inversée. En effet, ce n'est qu'au rappel à 7 jours que les mêmes régulations prennent place alors que rien n'est observé après 1 jour (Gräff et al., 2012). Cette dynamique spatio-temporelle serait le reflet du transfert progressif du souvenir de l'hippocampe vers le cortex.





# **Partie 2 : Matériels et** **Méthodes**





## **1 - Animaux**

L'ensemble des expériences réalisées au cours de cette thèse a été effectué sur des rats mâles de souche Long-Evans, provenant du centre d'élevage R. Janvier, France, âgés d'environ 3 mois à leur arrivée et pesant autour de 320g. Ces rats ont été choisis en raison de leur bonne aptitude à réaliser des tâches de mémoire spatiale (D'Hooge and De Deyn, 2001). Dès leur arrivée, les rats sont placés dans des cages individuelles transparentes en Makrolon, de dimensions 42 x 26 x 15cm. La semaine suivante, les rats sont manipulés 1 à 2 minutes par jours pendant 5 jours afin de les habituer à l'expérimentateur ainsi qu'à la manipulation. De la nourriture et de l'eau leur sont fournis *ad libitum*. La pièce de stabulation était différente de la pièce d'expérimentation et les paramètres d'éclairage (cycle lumière/obscurité de 12:12h et 7h à 19h en hiver et 8h à 20h en été), de température ( $22.6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), d'humidité ( $50 \pm 10\%$ ), et d'ambiance sonore (assurée par une radio en phase diurne) étaient réglés automatiquement. L'ensemble des tests a été réalisé durant la phase diurne. Cette étude est autorisée par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche, référencée sous le numéro APAFIS#3651-2016011910398831.

## **2 - Chirurgie stéréotaxique**

### **2.1 - Principe**

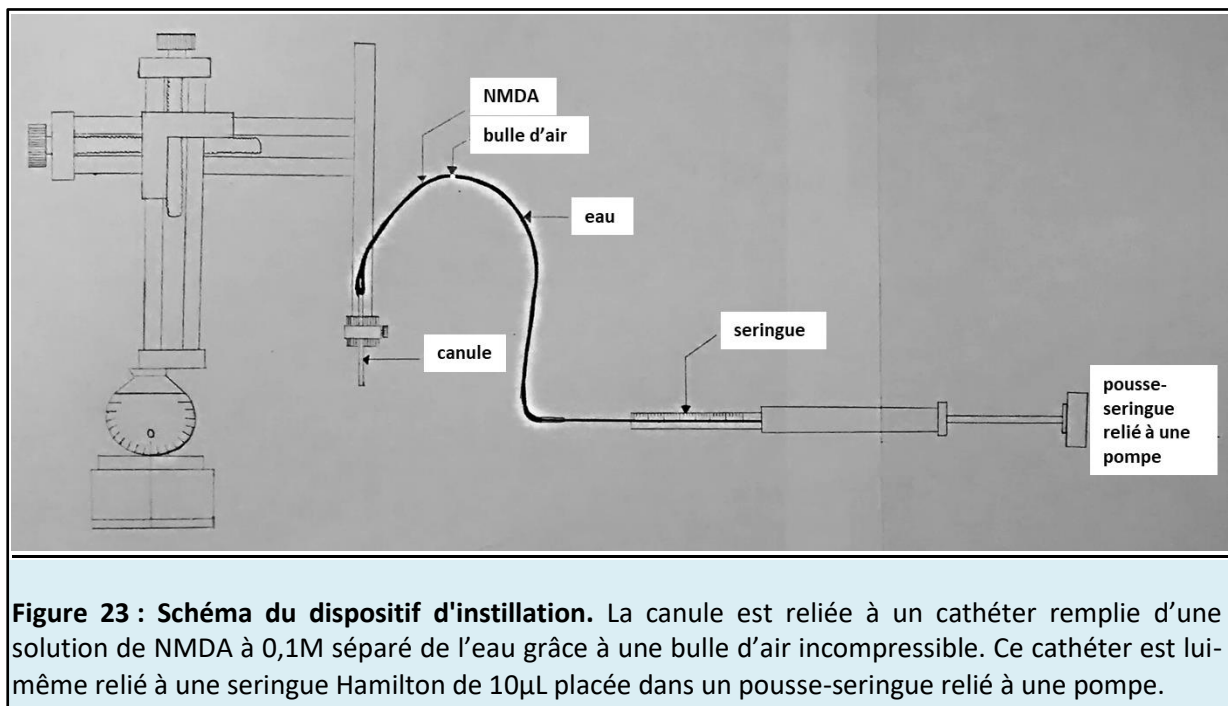
La chirurgie stéréotaxique visait la lésion des noyaux ReRh par instillation de NMDA (*N*-méthyl-*D*-aspartate). Concrètement, le NMDA est instillé au niveau des noyaux ReRh grâce aux coordonnées stéréotaxiques obtenues à partir d'un atlas stéréotaxique (Paxinos and Watson, 2007). Cette molécule, un analogue du glutamate, est un agoniste des récepteurs NMDA, récepteurs canaux cationiques. La dose instillée est très supérieure à ce que l'on peut retrouver dans des conditions physiologiques. La liaison du NMDA sur ses récepteurs présents sur les neurones provoque une entrée massive de cations, surtout de calcium, qui active de nombreuses enzymes (phospholipases, endonucléases, protéases) et conduit à la destruction du neurone. C'est le processus d'apoptose, induit par excitotoxicité. L'étendue de la lésion dépend du volume injecté et de la concentration du NMDA.

### **2.2 - Protocole expérimental**

Les rats sont anesthésiés avec du pentobarbital sodique (67mg/kg, Centravet) par voie intrapéritonéale. Après une dizaine de minutes, la profondeur de l'anesthésie est vérifiée par l'observation d'une respiration lente et par pincement de la queue. En l'absence de réaction, le rat est rasé au niveau du scalp, enroulé dans une couverture chauffante et placé dans un cadre stéréotaxique. Les rats reçoivent une injection d'un antibiotique à large spectre (Duphamox, 0,1mL/100g) par voie intramusculaire pour prévenir d'éventuelles infections post-opératoires. Du gel ophtalmique (Lacrigel) est appliqué sur leurs yeux pour éviter le dessèchement de la cornée. Les rats reçoivent également une injection sous-cutanée de xylocaïne (Xylovet, 0,1mL) au niveau du scalp pour anesthésier localement la future zone opératoire. A l'aide d'un scalpel, le scalp est incisé et la peau maintenue écartée grâce à des écarteurs placés de part et d'autre de l'ouverture. La boîte crânienne ainsi dégagée, une crâniotomie est effectuée à l'aide d'une fraise dentaire, sur une surface de 2mm<sup>2</sup>, au niveau des coordonnées stéréotaxiques des noyaux ReRh définies comme suit par rapport au Bregma : AP (antéro-postérieur) 1 = -1,5 mm ; AP2 = -2,1 mm ; AP3 = -2,7 mm ; ML (médio-latéral) 1 = -1,9 mm ; ML2 = -1,9 mm ; ML3 = -1,9 mm ; DV (dorso-ventral) 1 = -7,0 mm ; DV2 = -7,1 mm ; DV3 = -7,2 mm. Trois instillations sont réalisées afin de toucher toute l'étendue antéro-postérieure des noyaux ReRh. Une fois la craniotomie réalisée, une canule d'instillation (d'un diamètre externe de 0,28 mm et interne de 0,18 mm) est descendue avec précaution dans le tissu avec un angle de 15° afin d'éviter le sinus longitudinal supérieur dont la perforation pourrait entraîner une hémorragie. L'instillation de NMDA (0,1μL d'une solution dissoute à 0,1M dans du tampon phosphate salin (PBS) à 0,1M) est rendue possible grâce à une micro-pompe motorisée reliée à une seringue Hamilton de 10μL (Hamilton SYR 10μL 1801N), elle-même reliée à la canule par un cathéter. La micro-pompe est réglée sur un volume de 0,1μL à délivrer à la vitesse de 0,1μL/min (soit une instillation sur une période de 1 minute). La procédure pour les rats pseudo-opérés est identique à la différence que seul 0,1μL de PBS (0,1M) est instillé. Suite à l'instillation, la canule est laissée à demeure durant 5 min afin que le NMDA puisse diffuser librement, mais également dans le but de limiter sa remontée le long de la canule lors du retrait de celle-ci. A l'issue des 5 min, la canule est retirée doucement. Lorsque les 3 instillations sont faites, la zone d'opération est nettoyée avec du chlorure de sodium puis le scalp est suturé par des points « en cadre » qui assurent

## Matériel et Méthodes

une bonne cicatrisation et limitent le risque d'être arrachés par le rat. Pour finir, les rats reçoivent une injection d'un antibiotique (Métacam, 0,1 $\mu$ L/100g) en sous-cutanée au niveau du cou, puis sont retirés du cadre et placés dans leur cage sous une lumière chauffante jusqu'à leur réveil. Une fois réveillés, ils sont replacés dans leur pièce de stabulation et laissés au repos une semaine durant laquelle ils sont manipulés et attentivement surveillés afin de détecter d'éventuels soucis post-opératoires (points de suture défaits, infection, inflammation, etc.).



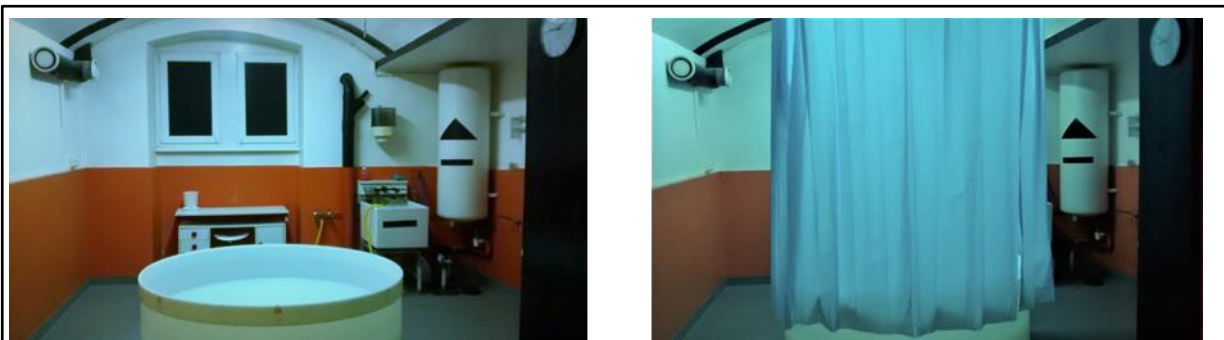
## 3 - La piscine de Morris

### 3.1 - Description du dispositif

La piscine de Morris est un bassin circulaire en PVC blanc, de 160 cm de diamètre et 60 cm de hauteur. Le bassin est rempli jusqu'à mi-hauteur d'eau (soit environ 660 litres) et 600g de lait en poudre y sont ajoutés dans le but d'opacifier l'eau. Le bassin est virtuellement divisé en 4 quadrants égaux et une plateforme est placée au centre de l'un d'eux. La plateforme est en PVC transparent, percée de trous, d'un diamètre de 11 cm et d'une hauteur de 31 cm, immergée à 2 cm sous la surface de l'eau. Du fait de la couleur blanche de l'eau ainsi que de la transparence de la plateforme, celle-ci devient invisible pour le rat nageant en surface. La température de l'eau est de 20°C ( $\pm 1^\circ$ C). A cette température, l'eau constitue un milieu suffisamment aversif pour motiver le rat à effectuer la tâche qui consiste à retrouver la

## Matériel et Méthodes

plateforme et se hisser dessus pour de sortir de l'eau. Une caméra, placée au-dessus de la piscine et reliée à un ordinateur (système Smart, SD Instruments, Etats-Unis), permet de mesurer et d'enregistrer divers paramètres, tels que le temps mis pour rejoindre la plateforme, la distance parcourue par l'animal et le temps passé à nager à proximité des parois (thigmotaxie). La salle d'expérimentation, entièrement dédiée à cette tâche, possède de nombreux indices spatiaux, qu'ils soient matériels (chaise, plomberie) ou figuratifs (formes géométriques dessinées sur les murs) (Figure 24). Ceux-ci permettent l'instauration chez l'animal d'une mémoire allocentrique l'aidant à se repérer et localiser la plateforme.



**Figure 24 : Illustration de pièce d'expérimentation.** La pièce dispose d'un grand nombre d'indices visuels (tuyaux, objets accrochés aux murs, formes géométriques) qui doivent permettre aux rats de s'orienter dans la piscine afin de localiser une plate-forme immergée dans l'eau opacifiée (photo de gauche). A l'inverse, les rats contrôles, nageant vers une plate-forme visible, n'ont pas accès à ces indices en raison de la présence d'un rideau entourant la piscine (photo de droite).

### 3.2 - Protocole expérimental

Le test débute toujours par une journée dite d' « habitude ». La plateforme utilisée lors de cette phase est différente car elle est surmontée d'un petit ballon (Figure 25) qui dépasse de l'eau d'environ 5 cm, la rendant bien visible aux yeux des rats. L'objectif de cette phase d'habitude est de confronter le rat à l'eau pour la première fois, et de faire en sorte qu'il comprenne qu'une plateforme est présente et que c'est en se hissant dessus qu'il peut échapper à ce milieu aversif. La phase consiste en une session de 4 essais consécutifs où la position de la plateforme reste inchangée, à la différence des points de lâcher qui varient entre les quatre essais. L'essai se termine lorsque le rat grimpe sur la plateforme ou bien à l'issue de 60s. Si au cours du temps imparti le rat ne parvient pas à grimper sur la plateforme, l'expérimentateur le guide jusqu'à elle et attend 10s avant de le récupérer dans une serviette pour le sécher et le réchauffer.

## **Matériel et Méthodes**

La phase d'acquisition débute le lendemain et dure de 3 à 10 jours selon le protocole expérimental. Lors de cette phase, la plateforme est immergée et le rat doit s'aider des indices visuels spatiaux pour la retrouver et mémoriser durablement son emplacement. La position de la plateforme diffère de celle de la phase d' « habitude ». La plate-forme est immergée et reste fixe durant toute la phase de test. Les rats sont lâchés face contre la paroi de la piscine, à des points différents et semi-aléatoires entre chaque essai. La distance parcourue ainsi que la latence d'accès à la plate-forme, la vitesse de nage et la thigmotaxie sont systématiquement enregistrées. Une bonne acquisition de la tâche est représentée par une baisse de la distance et de la latence pour atteindre la plateforme ainsi que de la thigmotaxie au fur et à mesure des essais/jours.

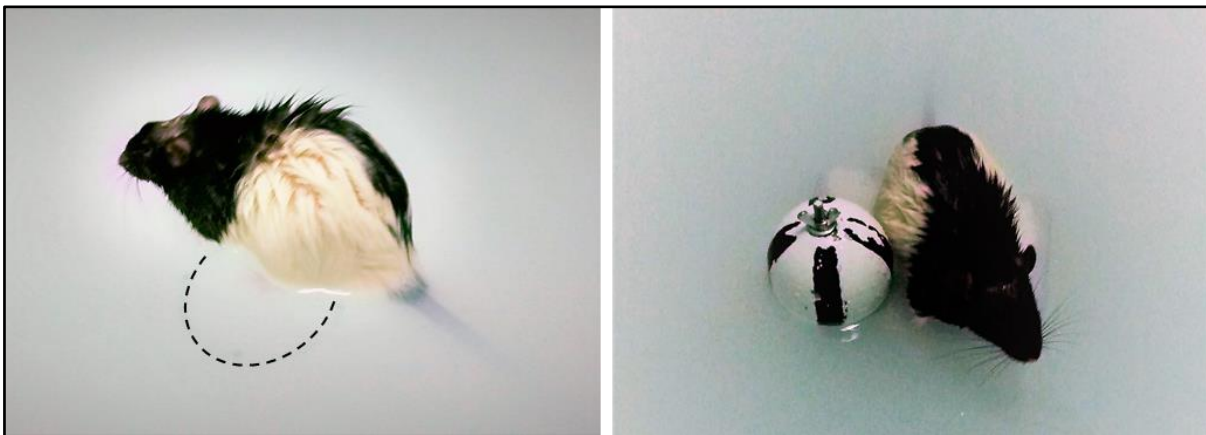


Figure 25 : Illustration d'un rat sur une plate-forme cachée et sur une plate-forme visible.

## **4 - Histologie et Immunohistochimie**

Les techniques d'histologie et d'immunohistochimie servent à vérifier et caractériser l'étendue de la lésion des noyaux ReRh, mais également à effectuer une quantification stéréologique.

### **4.1 - Mise à mort des rats**

#### ***Procédure pour la biologie moléculaire***

Les rats sont mis à mort par décapitation une heure après la fin du test comportemental et leur cerveau est rapidement prélevé. Lors de la dissection, différentes structures sont récupérées : le CPFm, l'hippocampe qui est sous-disséqué selon ses trois sous-régions (CA1, CA3, GD) mais également selon un axe dorso-ventral, et un bloc de 3 mm  $\pm$  1 mm

## **Matériel et Méthodes**

d'épaisseur dans le plan antéro-postérieur contenant les noyaux ReRh. Suite à leur dissection, les structures sont refroidies dans l'azote liquide à  $-190^{\circ}\text{C}$ , puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Procédure pour l'immunohistochimie**

Le bloc contenant les noyaux ReRh récupéré sur les animaux mis à mort par décapitation est conservé pendant  $3\text{h} \pm 30\text{ min}$  dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,4 ;  $4^{\circ}\text{C}$ ), puis transféré dans une solution de saccharose (20% dans du tampon phosphate à 0,1M, pH 7,4 ;  $4^{\circ}\text{C}$ ), où il reste pendant 24h. Finalement, ces blocs sont congelés dans de l'isopentane (2-méthylbutane ; ROTH), refroidis à  $-40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  avec de la carboglace, puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Pour les animaux ne servant qu'à fait de l'immunohistochimie, une heure après la fin du test comportemental, les rats reçoivent une injection létale de pentobarbital sodique (200mg/kg, i.p.). Après élimination du sang par perfusion d'une solution de chlorure de sodium, une perfusion intracardiaque lente de 60mL de paraformaldéhyde (4%) dissous dans du tampon phosphate (0,1M, pH7,4) à  $4^{\circ}\text{C}$  permet de fixer les tissus cérébraux. Les cerveaux sont ensuite récupérés et placés dans cette même solution pendant deux heures avant d'être transférés dans une solution de saccharose (20%,  $4^{\circ}\text{C}$ ) pendant 48h. Les cerveaux sont finalement congelés dans de l'isopentane refroidi à  $-40^{\circ}\text{C}$  puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2 - Préparation des coupes**

Des sections coronales flottantes de  $40\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées à partir du cerveau entier ou bien du bloc contenant les noyaux ReRh à l'aide d'un microtome placé dans un cryostat (HM560), dont l'enceinte est maintenue à une température de  $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Chaque coupe est récupérée puis conservée dans des puits contenant une solution de cryoprotection placée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3 - Immunohistochimie de la protéine NeuN**

Le choix du marquage de la protéine NeuN (neuronal nucleus) pour visualiser la présence de la lésion des noyaux ReRh par instillation de NMDA s'explique par le fait que cette protéine est retrouvée uniquement dans les neurones. Or, la lésion des noyaux ReRh est basée sur une destruction ciblée des neurones, laissant intacte toute autre cellule ne possédant par les

## ***Matériel et Méthodes***

récepteurs NMDA. De ce fait, dans le cas d'une lésion correctement établie, aucune coloration ne doit apparaître, reflet de l'absence de la protéine NeuN, donc de neurones.

L'ensemble des étapes suivantes est réalisé à température ambiante et sous agitation lente. Les coupes sont d'abord rincées trois fois dans du tampon PBS afin d'enlever la solution cryoprotectrice dans laquelle elles étaient conservées. Elles sont ensuite incubées 10 min dans une solution de peroxyde d'hydrogène (1,5mL pour 100mL de tampon phosphate 0,1M) dans le but d'éliminer les peroxydases endogènes qui pourraient biaiser le résultat final. Après avoir été rincées trois fois dans un tampon PBS, elles sont incubées pendant une heure dans une solution de PBS contenant 5% de sérum de cheval (Biowest) et 0,5% de Triton X-100 (PBST). Cela permet de bloquer les sites antigéniques non-spécifiques. Les coupes sont ensuite transférées dans une solution d'anticorps primaire polyclonal de souris dirigé contre le NeuN (dilution 1/4000 dans du PBST ; MAB377, Millipore), et incubées à température ambiante toute la nuit. Le lendemain, ces coupes sont rincées trois fois dans du tampon PBS, puis incubées pendant une heure dans une solution d'anticorps biotinylés de cheval dirigés contre la souris (dilution 1/500 dans du PBST ; Vector Laboratories International, Burlingame, CA, USA). Les coupes sont ensuite incubées pendant 45 min à l'obscurité avec le complexe avidine-biotine-péroxydase (dilution 1/500 dans du PBST ; kit ABC Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Après deux lavages dans du tampon PBS et un lavage dans une solution de Tris, le marquage est révélé à l'aide de la DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Kit DAB, SK 4100, Vector Laboratories). La réaction est arrêtée par retrait de la solution et ajout de tampon PBS deux à trois minutes plus tard. Après trois rinçages au PBS, les coupes sont montées sur des lames gélatinées et laissées à sécher à température ambiante durant une nuit. Afin de les protéger, un milieu de montage doit être ajouté. Pour cela, les lames contenant les coupes sont rincées trois fois dans de l'eau ultra-pure, puis déshydratées une minute dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 95% deux fois et 100% deux fois). Enfin, après 5min dans du solvant (Clearify, Houston, USA), les coupes sont finalement montées entre lame et lamelle dans un milieu d'inclusion (Diamount).

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

Le marquage de la protéine c-Fos est couramment utilisé pour mettre en évidence une activité neuronale. En effet, cette protéine appartient à la famille des gènes immédiats et sa production à partir des ARNm est rapide après une stimulation neuronale. Celle-ci déclenche une cascade d'évènements intracellulaires impliquant des seconds messagers comme le calcium, des kinases phosphorylant notamment CREB et favorisant l'activation de la transcription des gènes immédiats tels que *c-fos* et finalement leur traduction en protéine. L'ensemble de ces processus, bien que rapide, n'est pas non plus instantané. La détection de la protéine se fait avec un pic aux alentours de 60 à 90 minutes après la stimulation. C'est pourquoi la mise à mort des rats se fait une heure après la fin du dernier essai lors du test de la piscine de Morris. L'avantage de *c-fos* en comparaison d'autres gènes immédiats tels que *zif268* ou *arc* réside dans le fait que son niveau basal d'expression (en l'absence de stimulations particulières) est très faible. Ainsi il est plus facile de détecter de faibles variations car le bruit de fond est presque inexistant. Néanmoins cette protéine n'est pas produite de façon spécifique en réponse à une tâche mnésique. En effet, la manipulation, la nage, le stress sont autant de facteurs déclenchant sa synthèse, d'où l'importance des groupes contrôles adéquats (contrôle nage, contrôle cage par exemple).

Le protocole de marquage de c-Fos ne diffère que très peu de celui utilisé pour la protéine NeuN. Les changements concernent simplement les anticorps utilisés : un anticorps de lapin dirigé contre la protéine c-Fos (dilution 1/8000 dans du PBST ; 226003/3, Synaptic System) et un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre le lapin (dilution 1/500 dans du PBST ; BA-1000, Jackson ImmunoResearch, West Grove PA).

## **5 – Stéréologie**

La stéréologie est un outil basé sur un ensemble de méthodes mathématiques et statistiques permettant d'extraire des informations quantitatives (volumes, surfaces, longueurs, nombres) au sujet d'éléments présents dans un volume délimité. Cette méthode est basée sur une approche non-biaisée : aucun postulat initial n'est formulé sur la taille, la forme, l'orientation ou la distribution spatiale des objets à compter. La stéréologie s'appuie sur des



## **Matériel et Méthodes**

échantillons systématiques et randomisés, de manière à ce que chaque objet au sein du volume d'intérêt ait la même probabilité d'être compté.

Dans cette thèse, l'approche stéréologique a permis d'estimer quantitativement le nombre de neurones exprimant la protéine c-Fos au sein d'une région donnée (la sous-région CA1 de l'HD ou bien le CCA) grâce à la prise en considération du volume de celle-ci. Ainsi, le comptage stéréologique est réalisé d'une part à partir d'un échantillon de coupes issues de l'ensemble de la région anatomique qui a été entièrement sectionnée, et d'autre part dans l'épaisseur de chaque coupe. Le principe de l'approche stéréologique est donc de réaliser le comptage sur un échantillon représentatif du nombre total d'éléments présents dans l'ensemble du volume considéré. Pour estimer le nombre total de neurones exprimant c-Fos dans une région donnée sur la base d'un échantillon représentatif, la mise en place d'un échantillonnage non-biaisé est primordiale. Cet échantillonnage a lieu à deux niveaux : le premier concerne les coupes prises en considération, le second la proportion du volume de chaque coupe au sein de laquelle le comptage sera effectué (dissecteur optique).

L'échantillonnage des coupes permet de prendre en considération l'intégralité de la structure d'intérêt sans pour autant évaluer le nombre de neurones immunomarqués sur toutes les sections de celle-ci : un échantillonnage de coupes de 1/6 (une coupe considérée toutes les six sections effectuées au cryostat) a été utilisé pour le CCA et 1/3 (soit 2 puits sur 6) pour CA1d. Les échantillons proviennent d'un ou de deux puits de coupes sélectionnés de manière aléatoire parmi un ensemble de six puits contenant un ensemble de coupes représentatives de la région anatomique.

Les dissecteurs optiques sont des cubes virtuels qui permettent, à l'aide d'un ensemble de sections optiques dans le plan Z, le comptage en 3D. Ces dissecteurs sont répartis de manière aléatoire et homogène par le logiciel au sein de la région d'intérêt. Le comptage est effectué uniquement au sein de ces dissecteurs, qui définissent les limites des zones à considérer pour le comptage, à la fois dans les plans X et Y, mais aussi dans l'épaisseur du tissu (plan Z).

Pour le comptage effectué dans la sous-région CA1 de l'HD, les dissecteurs optiques utilisés avaient une longueur et une hauteur de 40µm et étaient espacés de 20µm les uns des autres. Pour le CCA, la longueur et la hauteur étaient de 40µm également, et les dissecteurs

## **Matériel et Méthodes**

espacés de 80µm. Après avoir manuellement délimité la région d'intérêt, le comptage s'effectue à l'objectif x100 à immersion dans l'huile. Toute cellule dont la coloration est au moins deux fois supérieure au bruit de fond est considérée comme immunopositive et est marquée manuellement par l'expérimentateur.

Pour calculer le nombre de neurones c-Fos positifs, le logiciel de comptage prend en considération les paramètres d'échantillonnage pour calculer le nombre de cellules immunopositives présentes au sein de l'ensemble de la région d'intérêt. La méthode utilisée a été celle du fractionnateur optique, qui utilise la méthode du dissecteur optique combinée à un échantillonnage systématique et randomisé (dans notre cas, 1 coupe/6 ou 1/3), et qui permet d'obtenir une estimation quantitative du nombre total de neurones exprimant la protéine d'intérêt dans la structure considérée.

## **6 - Biologie moléculaire : analyses protéiques et génomiques**

### **6.1 - Extraction des protéines totales**

Les échantillons de la sous-région CA1 dorsale et du CPFm sont lysés sur glace à l'aide d'une lame de scalpel et homogénéisés dans du tampon Laemmli 1X (Bio-Rad) à l'aide d'un homogénéiseur en plastique puis par des allers-retours effectués avec une micropipette. Après 10s de vortex, les tubes sont alors laissés sur glace pendant 30 min afin que le tampon Laemmli puisse agir sur les membranes des cellules. Les échantillons sont ensuite vortexés puis soniqués deux fois 15s à 30% (Bioblock Scientific Vibra Cell 75041) et vortexés. Puis les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 min cela dans le but de faciliter la lyse des cellules. Enfin, après une centrifugation de 5 min à 13 000 rpm, le surnageant contenant les protéines est récupéré. Les concentrations protéiques sont finalement mesurées avec le kit RC-DC Protein Assay (Bio-Rad). La densité optique est lue à 750 nm par un spectrophotomètre (Jenway 6305), puis comparée à celle d'une gamme standard réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (Euromedex). Cela nous donne une mesure relative de la concentration des protéines. Les solutions stock obtenues de protéines sont conservées à -20°C.

### **6.2 - Western blot**

Les gels utilisés sont des gels de poly-acrylamide à gradient (4-20% Critérium 500 ; Bio-Rad) pré-coulés, contenant 26 puits. Les gels se trouvent entre deux plaques de plastique les maintenant à la verticale. Ces cassettes sont disposées dans une cuve adaptée (Criterion Cell ; Bio-Rad) dans laquelle est versé le tampon de migration 1X (TG-SDS 10X, Euromedex). Une fois les échantillons déposés dans les puits, la migration par électrophorèse est lancée à 250V durant 30 min (durée au bout de laquelle le front de migration tend à sortir du gel). Puis les protéines sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose (Midi-size Nitrocellulose, TransBlot Turbo ; Bio-Rad) à l'aide d'un appareil à transfert semi-sec (TransBlot Turbo ; Bio-Rad). Les gels sont disposés dans une cassette comme suit, du bas de la cassette vers le haut : une couche de papier Whatman, la membrane de nitrocellulose, le gel de poly-acrylamide, puis une nouvelle couche de papier Whatman. Les deux couches de papier Whatman sont imbibées de tampon de transfert 1X (Trans-Blot Turbo Buffer, Bio-Rad). Le transfert des protéines s'effectuant du pôle négatif (haut de la cassette) vers le pôle positif (bas de la cassette), les protéines vont être transférées du gel de poly-acrylamide vers la membrane de nitrocellulose. Une fois le transfert fini, la membrane est laissée pendant 1h sous agitation lente dans un tampon de lavage (50mL de Tris pH 7,4, 30mL de NaCl 5M, 500µL de Tween 20%, 900mL d'eau distillée pour 1L) additionné de lait en poudre (Régilait, solution à 5%) afin de saturer les sites antigéniques non-spécifiques. La membrane est ensuite incubée toute la nuit sous agitation lente et à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène voulu, dans une solution de lait à 3%. Le lendemain, les membranes sont rincées trois fois 5 min dans le tampon de lavage, puis incubées pendant 1h dans une solution de lait à 3% contenant l'anticorps secondaire adapté à l'anticorps primaire (anticorps d'âne dirigé contre la souris dilué au 1/4000 ou anticorps d'âne dirigé contre le lapin dilué au 1/10 000 ; Jackson). Après, 3 lavages de 10 min, les membranes sont révélées par une solution d'« enhanced chemoluminescence » (Clarity Western ECL Substrate ; Bio-Rad). Pour s'assurer que les résultats obtenus sont semi-quantitatifs, 3 dépôts d'un mélange des échantillons ont été faits pour chaque anticorps au préalable de toute expérience. Le premier est un dépôt de la même quantité de protéines que pour les dépôts des échantillons seuls (par exemple 2µg), le second correspond au double de la quantité (4µg) et le dernier est un dépôt de la moitié de la quantité des échantillons seuls (1µg). Si la valeur de la

## **Matériel et Méthodes**

quantification reflète bien les écarts de quantités de protéines déposés dans le gel, alors nous pouvons considérer les résultats pour les échantillons seuls comme étant semi-quantitatifs. La quantification de l'expression des différentes protéines est réalisée par lecture de la densité optique grâce au logiciel ImageLab (Bio-Rad).

### **6.3 - Extraction des ARN totaux**

Les échantillons de HD et de CPFm sont lysés sur glace avec une lame de scalpel et homogénéisés dans du TRIzol (TRIzol Reagent, Ambion) à l'aide d'un homogénéiseur en plastique, puis en effectuant des allers-retours avec une micropipette. Les tubes sont ensuite vortexés et laissés 5 min à température ambiante. Ils sont ensuite placés à -80°C pendant 20 min puis décongelés, dans le but de favoriser l'éclatement des noyaux des cellules. Une centrifugation de 4min à 14000g à 4°C permet ensuite de précipiter les débris cellulaires, aussi on ne récupère sur glace que le surnageant auquel sont ajoutés 75µL d'une solution de chlorophorme-isoamyl (24/1, Sigma). Après vortex, les tubes sont laissés 3 min à température ambiante puis centrifugés 15 min à 12000g à 4°C. La phase aqueuse est de nouveau prélevée (environ 150µL), et 150µL de chlorophorme-isoamyl sont de nouveau ajoutés. Après une centrifugation de 5 min à 12000g à 4°C, le surnageant est récupéré. Les ARN sont précipités une première fois avec 200µL d'isopropanol (VWR Chemicals) et du glycogène (5mg/mL, Calbiochem) qui nous permet de voir le précipité. Les tubes sont vortexés et laissés 20 min à température ambiante. Après 10 min d'une centrifugation à 12000g (4°C), le surnageant est jeté et le culot est lavé à l'éthanol (70%, à température ambiante). Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 7500g (4°C), le surnageant est de nouveau jeté et le culot est repris dans 200µL d'eau ultra-pure sur glace. Enfin, une deuxième précipitation des ARN est effectuée par ajout de 500µL d'éthanol absolu (-20°C, VWR Chemicals), 20µL d'acétate de sodium 3M (pH 5,2) et 1µL de glycogène. Les tubes sont placés à -20°C pour la nuit.

Le lendemain, les tubes sont centrifugés 20 min à 12000g à 4°C et le surnageant est jeté. Le culot est lavé à l'éthanol (70%) puis centrifugé 10 min à 7500g à 4°C. Le lavage et la centrifugation sont répétés et le culot d'ARN est séché à température ambiante. Après addition de 30µL d'eau ultra-pure, les tubes sont laissés 10-15 min sur glace. Les échantillons sont homogénéisés en effectuant des allers-retours avec une micropipette et placés 6 min à

## **Matériel et Méthodes**

50°C afin d'améliorer la dissolution du culot. Pour finir, les échantillons sont dosés (Nanovue).

### **6.4 - Rétro-transcription et PCR quantitative**

Le protocole d'extraction des ARNm ne comporte pas d'étape d'élimination de l'ADN. Or l'ADN peut être gênant lors de la PCR quantitative. En effet, les amorces utilisées pour cibler les gènes cibles sur l'ADN complémentaire (issu de la rétro-transcription de l'ARNm) peuvent également reconnaître la séquence sur l'ADN génomique. A l'issue de l'amplification, il peut donc y avoir potentiellement le produit de l'amplification de l'ADN complémentaire, mais également celui de l'ADN génomique, ce qui fausserait les résultats. L'élimination de l'ADN génomique est réalisée en amont de la rétro-transcription avec une enzyme de dégradation de l'ADN (iScript gDNA Clear cDNA, Synthesis kit, Bio-Rad). Puis la rétro-transcription est effectuée.

Afin d'être sûr de ne pas amplifier de l'ADN génomique qui ne serait pas totalement dégradé, les amorces utilisées pour les différents gènes testés se situent sur deux exons différents de l'ADN complémentaire. Ainsi, le produit de l'amplification issue de l'ADN génomique sera plus grand, car il contiendra l'intron séparant les deux exons. De façon générale, les introns sont des séquences beaucoup plus grandes que les exons (de plusieurs centaines de paires de bases). L'amplification à partir de l'ADN génomique va demander plus de temps que celui qui correspond à l'étape d'amplification (5 secondes) et ne sera donc pas possible.

## **7 – Analyses statistiques**

Pour l'analyse des performances au cours de la tâche de piscine de Morris, une ANOVA à mesures répétées (Jours) à un facteur (chirurgie) ou à deux facteurs (chirurgie et comportement) a été effectuée. Lorsque celle-ci était significative ( $p < 0,05$ ), un test post-hoc de Newman-Keuls a été appliqué.

Pour l'analyse des résultats biochimiques (Western blots, RT-qPCR), une ANOVA à deux facteurs (chirurgie, comportement) a été réalisée suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls lorsque l'ANOVA était significative.

## ***Matériel et Méthodes***

L'ensemble des résultats est exprimé sous forme d'une moyenne + erreur-type. Le groupe contrôle HC est placé arbitrairement à 100% et les autres groupes sont exprimés en fonction de ce contrôle.







# **Partie 3 : Contributions** **expérimentales**



# *Partie 1 : Lésions et test comportemental*

## *Partie 1 : Lésions et test comportemental*

---

Dans cette première partie, je rappelle brièvement le contexte scientifique général qui a justifié la réalisation des différentes expériences que j'ai menées, avant de rapidement décrire ces expériences et leurs objectifs. Je présente ensuite les résultats, pour chacune des expériences, de la chirurgie stéréotaxique dont le but était de léser les noyaux ReRh, avant d'aborder les performances de ces mêmes rats au test de la piscine de Morris.

## 1 – Contexte

Plusieurs études menées au laboratoire ont permis de montrer que la lésion des noyaux ReRh ne modifiait pas les capacités de rappel d'un souvenir spatial à long terme lorsque ce souvenir était récent (5 jours). Par contre, une telle lésion affecte le rappel d'un souvenir à long terme ancien (25 jours) (Cholvin et al., 2013; Loureiro et al., 2012). Une étude menée par Lesburguères et collaborateurs (2011) a suggéré qu'un phénomène de « tagging » pourrait se mettre en place au cours de l'encodage du souvenir au sein du cortex préfrontal afin de marquer les neurones qui participeront par la suite au dialogue hippocampo-cortical (Lesburguères et al., 2011). Cela suggère que le cortex préfrontal interviendrait rapidement dans les processus d'encodage et de consolidation.

Ma thèse a pour objectif l'étude des régulations génétiques et protéiques qui prennent place au sein de l'hippocampe et du CPFm au cours de la formation d'un souvenir spatial chez le rat, et l'impact des noyaux ReRh sur ces régulations qui pourrait expliquer le déficit de rappel d'un souvenir à long terme ancien.

Afin de choisir un délai adéquat pour cette étude, nous nous sommes basés sur des travaux réalisés au sein du laboratoire qui montrent que 3 jours d'acquisition en piscine de Morris constituent un délai approprié pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'encodage et aux premières de la mémorisation d'une expérience. En effet, chez des rats non-lésés, on observe au sein de l'HD une induction de l'expression des gènes immédiats *c-fos* et *zif268* chez des rats entraînés à trouver la plate-forme cachée comparativement à des rats nageant vers une plate-forme visible. Ce résultat est par ailleurs associé à une augmentation de l'acétylation des histones et d'une induction de certaines HAT dans l'HD (Bousiges et al., 2010). Nous avons donc choisi d'étudier l'impact de la lésion des noyaux ReRh sur les régulations transcriptionnelles et protéiques prenant place dans l'hippocampe et le CPFm après 3 jours d'apprentissage spatial en piscine de Morris (voir aussi Annexe 1).

Pour mener à bien cette étude, trois expériences temporellement indépendantes ont été réalisées. Ces trois expériences ont une base commune : la lésion des noyaux ReRh et la tâche de piscine de Morris. Seules les analyses effectuées ensuite diffèrent.

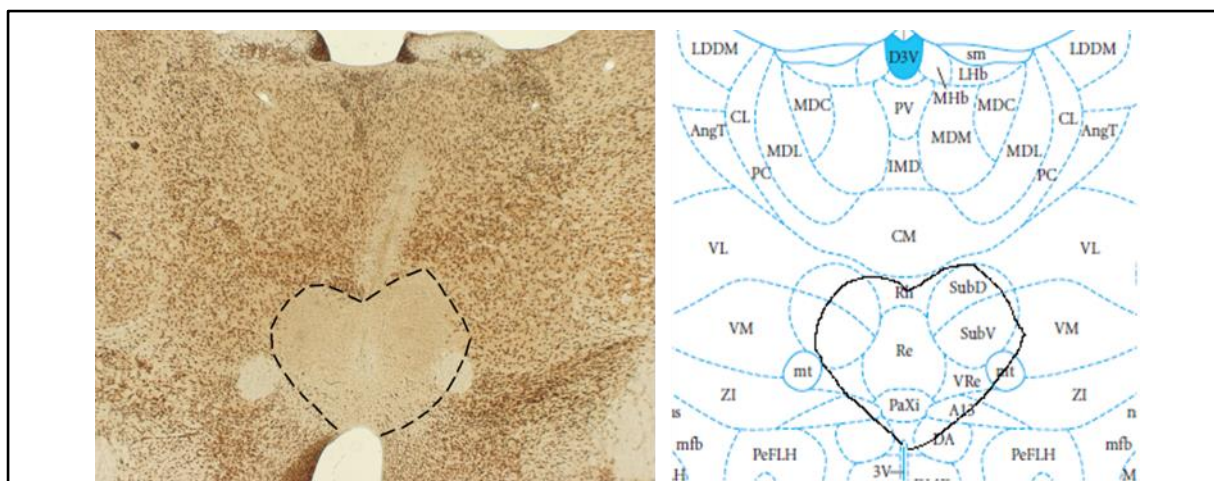
La première expérience a servi à effectuer un séquençage des ARNm des sous-régions CA1 de l'HD et de l'HV. Ces séquençages ont permis de mettre en avant l'ensemble des gènes modulés par la lésion, mais également par l'apprentissage. Le but était d'avoir une vue large des régulations génétiques mises en œuvre et non pas limitée à quelques gènes, comme cela est le cas avec la technique des PCR quantitatives.

La seconde expérience a permis une étude à deux niveaux ; tout d'abord une analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR dans le CPFm, à mettre en regard des résultats des séquençages hippocampiques, et une analyse protéique de CA1 dorsal et du CPFm par Western blot afin d'étudier l'activité traductionnelle de ces deux régions.

Enfin, la troisième expérience avait pour objectif la réalisation d'un comptage stéréologique de la protéine c-Fos dans CA1 dorsal et le CCA (cortex cingulaire antérieur), afin de compléter les résultats obtenus par Western blot concernant l'activation de ces régions cérébrales au cours de la formation d'un souvenir spatial.

## **2 – La lésion des noyaux ReRh**

La lésion des noyaux ReRh a été réalisée par une instillation stéréotaxique d'une solution de NMDA localisée au niveau de ces noyaux, afin de détruire les corps cellulaires des neurones tout en épargnant les fibres passant les traversant. Une quantification de l'étendue de la lésion a été faite *post-mortem* pour chacun des animaux opérés grâce à un marquage immunohistochimique de la protéine NeuN (Figure 26). Les animaux dont la lésion du noyau reuniens était inférieure à 50% et/ou dont la lésion du noyau rhomboïde était inférieure à 25% ont été écartés (Figures 26 à 29). De façon générale, la zone lésée est grande et touche également une partie des noyaux adjacents, tels que les noyaux thalamiques submédians, le noyau thalamique centromédian ou encore les noyaux thalamiques antéromédians. Nous ne pouvons donc pas exclure une influence de la lésion de ces noyaux limitrophes sur les régulations génétiques et protéiques que nous avons observées par la suite chez les rats lésés.



**Figure 26 : Exemple d'une lésion des noyaux ReRh.** A gauche est présentée une photographie d'une coupe après immunomarquage de la protéine NeuN. On observe une disparition des corps cellulaires au-dessus du troisième ventricule. A droite se trouve une représentation de l'étendue de la lésion sur une planche de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (6<sup>ème</sup> édition). On observe que la lésion englobe la totalité du noyau reuniens (Re) et la quasi-totalité des noyaux rhomboïde (Rh) et péri-reuniens (VRe). Bien que localisée, la lésion touche également les noyaux adjacents suivants : les noyaux thalamiques submédians dorsaux et ventraux (SubD et SubV), le noyau thalamique ventromédian (VM), le noyau paraxiphoïde du thalamus (PaXi), les cellules dopaminergiques A13 (A13) et l'aire hypothalamique dorsale (DA). Le tractus mamillo-thalamique, bien que partiellement inclus dans la zone lésée, n'est pas affecté puisqu'il ne contient que des fibres de passages ne possédant pas de récepteurs au NMDA.

### Expérience 1 : séquençage

	Régions	Lésion minimale (%)	Lésion maximale (%)	Moyenne sur l'ensemble des rats conservés (%)
<b>HCL</b> n=4	Reuniens	73	94	<b>84</b>
	Rhomboïde	23	77	<b>43</b>
	péri-reuniens	41	54	<b>47</b>
	Région entière	56	66	<b>60</b>
<b>PTCL</b> n=4	Reuniens	93	100	<b>97</b>
	Rhomboïde	93	100	<b>98</b>
	péri-reuniens	55	80	<b>71</b>
	Région entière	75	90	<b>65</b>
<b>PTVL</b> n=4	Reuniens	93	100	<b>98</b>
	Rhomboïde	94	100	<b>98</b>
	péri-reuniens	60	96	<b>67</b>
	Région entière	75	97	<b>92</b>

**Figure 27 : Récapitulatif de l'étendue des lésions des rats de l'expérience 1.** Pour chaque noyau, la lésion minimale et maximale est donnée. La lésion minimale du noyau reuniens peut être obtenue chez un rat et la lésion minimale du noyau rhomboïde chez un autre rat. La région entière correspond à la moyenne des pourcentages des lésions des noyaux reuniens, rhomboïde et péri-reuniens. HCL = home cage lésés ; PTCL = plate-forme cachée lésés ; PTVL = plate-forme visible lésés.

<b>Expérience 2 : Western blots</b>				
	Régions	Lésion minimale (%)	Lésion maximale (%)	Moyenne sur l'ensemble des rats conservés (%)
<b>HCL</b> n=7	Reuniens	97	100	98
	Rhomboïde	84	100	98
	péri-reuniens	77	99	88
	Région entière	88	99	92
<b>PTCL</b> n=7	Reuniens	76	100	94
	Rhomboïde	80	100	96
	péri-reuniens	36	100	68
	Région entière	69	100	80

**Figure 28 : Récapitulatif de l'étendue des lésions des rats de l'expérience 2.** Pour chaque noyau, la lésion minimale et maximale est donnée. La lésion minimale du noyau reuniens peut être obtenue chez un rat et la lésion minimale du noyau rhomboïde chez un autre rat. La région entière correspond à la moyenne des pourcentages des lésions des noyaux reuniens, rhomboïde et péri-reuniens. HCL = home cage lésés ; PTCL = plate-forme cachée lésés ; PTVL = plate-forme visible lésés.

<b>Expérience 3 : comptage c-Fos</b>				
	Régions	Lésion minimale (%)	Lésion maximale (%)	Moyenne sur l'ensemble des rats conservés (%)
<b>HCL</b> n=4	Reuniens	46	100	82
	Rhomboïde	52	100	73
	péri-reuniens	36	65	51
	Région entière	37	78	62
<b>PTCL</b> n=4	Reuniens	57	86	79
	Rhomboïde	37	90	64
	péri-reuniens	41	60	50
	Région entière	44	72	59
<b>PTVL</b> n=4	Reuniens	58	100	85
	Rhomboïde	16	73	49
	péri-reuniens	32	60	50
	Région entière	40	74	60

**Figure 29 : Récapitulatif de l'étendue des lésions des rats de l'expérience 3.** Pour chaque noyau, la lésion minimale et maximale est donnée. La lésion minimale du noyau reuniens peut être obtenue chez un rat et la lésion minimale du noyau rhomboïde chez un autre rat. La région entière correspond à la moyenne des pourcentages des lésions des noyaux reuniens, rhomboïde et péri-reuniens. HCL = home cage lésés ; PTCL = plate-forme cachée lésés ; PTVL = plate-forme visible lésés.



### 3 – Tâche comportementale : la piscine de Morris

Une dizaine de jours après la chirurgie, les rats « Sham » et « Lésés » ont été entraînés dans une tâche de mémoire spatiale identique dans les trois expériences, la piscine de Morris. Pour les expériences 1 et 3, trois groupes ont été définis : un groupe de rats contrôles n'effectuant pas la tâche (home cage = HC), un groupe de rats effectuant la tâche, c'est-à-dire nageant vers la plate-forme cachée (= PTC), et un groupe de rats nageant vers une plate-forme visible (= PTV). L'expérience 2 comprenait uniquement les groupes HC et PTC.

Pour le groupe PTC, la tâche consiste à trouver et mémoriser l'emplacement d'une plate-forme immergée dans un dispositif circulaire rempli d'eau opacifiée. Pour cela, les rats doivent s'aider des indices visuels distaux présents dans la pièce d'expérimentation. Le test dure trois jours et chaque rat dispose de quatre essais par jour pour mémoriser l'emplacement de la plate-forme. Les rats du groupe PTV doivent, eux, nager vers une plate-forme visible dans le même dispositif, mais entouré d'un rideau qui soustrait les indices visuels à leur regard, interdisant tout encodage spatial. Le groupe HC, quant à lui, est simplement manipulé rapidement chaque jour de test, dans sa pièce de stabulation.

Ci-après la composition des groupes pour chaque expérience :

Expérience 1			Expérience 2			Expérience 3		
	Groupes	Nombre de rats		Groupes	Nombre de rats		Groupes	Nombre de rats
Sham	HC	6	Sham	HC	6	Sham	HC	4
	PTC	6		PTC	6		PTC	4
	PTV	6					PTV	3
Lésés	HC	12	Lésés	HC	10	Lésés	HC	6
	PTC	12		PTC	10		PTC	6
	PTV	10					PTV	5
Total =		52	Total =		32	Total =		28

Les trois expériences ont pour but d'analyser les régulations génétiques et protéiques prenant place au sein de l'hippocampe et du CPFm suite à un apprentissage spatial en présence et en l'absence de lésion des noyaux ReRh. Il est connu que les régulations génétiques et protéiques varient fortement au cours de la journée. C'est pourquoi, dans un souci d'homogénéité des échantillons, nous avons choisi de mettre à mort les animaux uniquement le matin, entre 9h et 13h afin de limiter ces variations. Ce choix nous a

contraints à diviser les animaux en trois sous-groupes pour l'expérience 1 et deux sous-groupes pour l'expérience 2, afin de respecter ce créneau horaire. En effet, il nous était impossible de disséquer 52 et 32 animaux en 4h. Chaque sous-groupe au sein d'une expérience est composé d'un nombre équivalent de rats « Sham » et « Lésés », ainsi que de rats HC, PTC et PTV.

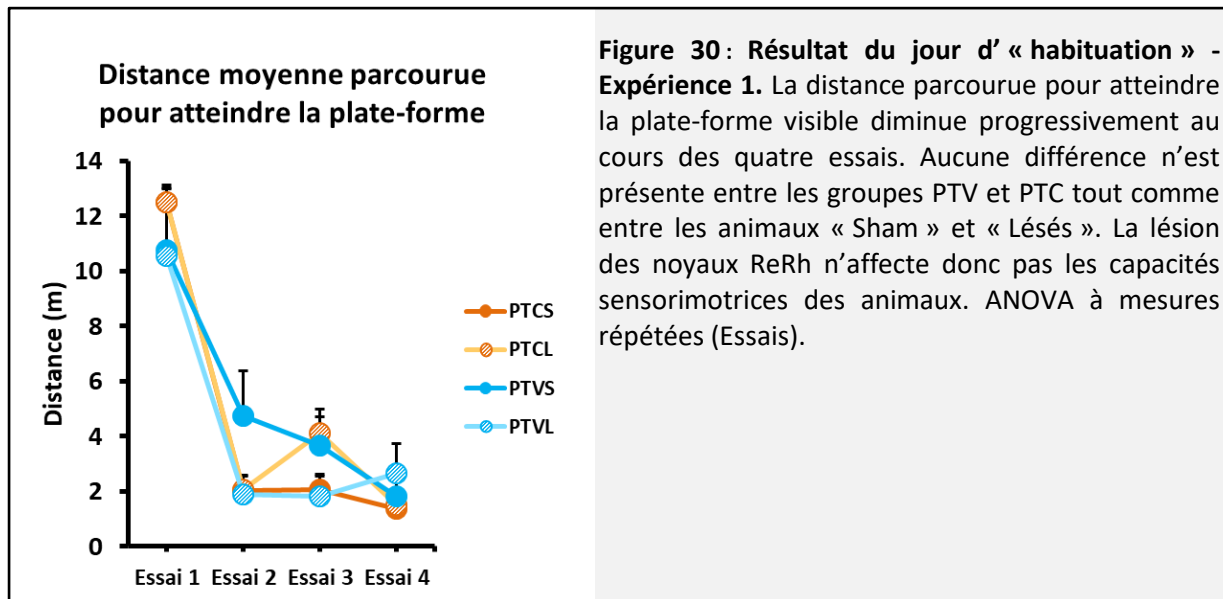
Pour chacune des trois expériences qui suivent, la tâche comportementale a consisté en trois jours d'acquisition à raison de quatre essais par jour. Les variables analysées sont la distance et la latence mises pour atteindre la plate-forme, la thigmotaxie (le fait de nager à proximité des parois du dispositif) et la vitesse de nage. Les analyses qui suivent ont été réalisées sur des groupes après retrait des rats présentant une lésion insuffisante ou mal placée des noyaux ReRh.

### **3.1 – Expérience 1**

Les 52 animaux de cette expérience étaient divisés en trois sous-groupes pour la tâche comportementale. Le deuxième sous-groupe a commencé la tâche deux jours après le premier sous-groupe et le troisième sous-groupe sept jours après. Une fois la tâche effectuée par tous les animaux, nous nous sommes assurés que les résultats entre les trois sous-groupes ne différaient pas statistiquement. Une analyse de la variance à mesure répétée sur la distance parcourue pour atteindre la plate-forme ne montre pas de différence significative globale entre les trois sous-groupes ( $F_{(2,15)} = 0,62 ; p = 0,55$ ). Nous les avons donc réunis pour les analyses suivantes. La composition du groupe complet est la suivante : HCS = 6, PTVS = 4, PTCS = 5, HCL = 6, PTVL = 5, PTCL = 7.

Les trois jours de test sont précédés d'un jour dit d'« habitude », où les groupes PTC et PTV nagent vers une plate-forme visible dans le dispositif entouré d'un rideau. La distance parcourue pour atteindre la plate-forme visible diminue progressivement au cours des quatre essais ( $F_{(3,51)} = 58,93 ; p < 0,0001$ ). Il n'y a pas d'effet de la chirurgie (Sham, Lésés) ( $F_{(1,17)} = 0,39 ; p = 0,54$ ), ni de l'interaction Essais x Chirurgie ( $F_{(3,51)} = 0,47 ; p = 0,70$ ). Il n'y a également pas d'effet du groupe (PTV, PTC) ( $F_{(1,17)} = 0,007 ; p = 0,93$ ), ni de l'interaction Essais x Groupe ( $F_{(3,51)} = 1,34 ; p = 0,27$ ), ni de l'interaction Essais x Chirurgie x Groupe ( $F_{(3,51)} = 0,83 ; p = 0,48$ ) (Figure 30). Ces résultats confirment les études précédentes montrant que

la lésion des noyaux ReRh n'affecte pas les capacités sensorimotrices ou visuelles des animaux (Dolleman-Van der Weel et al., 1997; Loureiro et al., 2012; Cholvin et al., 2013).



Au cours des trois jours d'acquisition, la distance parcourue pour atteindre la plate-forme cachée diminue progressivement ( $F_{(2,46)} = 3,25$  ;  $p = 0,048$ ) attestant un apprentissage progressif de la localisation de la plate-forme. L'analyse statistique de la distance parcourue ne révèle aucun effet de la chirurgie ( $F_{(1,23)} = 0,52$  ;  $p = 0,48$ ) ni de l'interaction Jour x Chirurgie ( $F_{(2,46)} = 0,05$  ;  $p = 0,95$ ). On observe un effet du groupe ( $F_{(1,23)} = 115,1$  ;  $p < 0,001$ ), les groupes PTV parcourant une distance réduite comparé aux groupes PTC. Il n'y a pas d'effet de l'interaction Groupe x Chirurgie ( $F_{(1,23)} = 0,37$  ;  $p = 0,55$ ) ni de l'interaction Groupe x Jour ( $F_{(2,46)} = 2,60$  ;  $p = 0,085$ ). Il n'y a également pas d'interaction Jour x Chirurgie x Groupe ( $F_{(2,46)} = 0,26$  ;  $p = 0,77$ ) (Figure 31A).

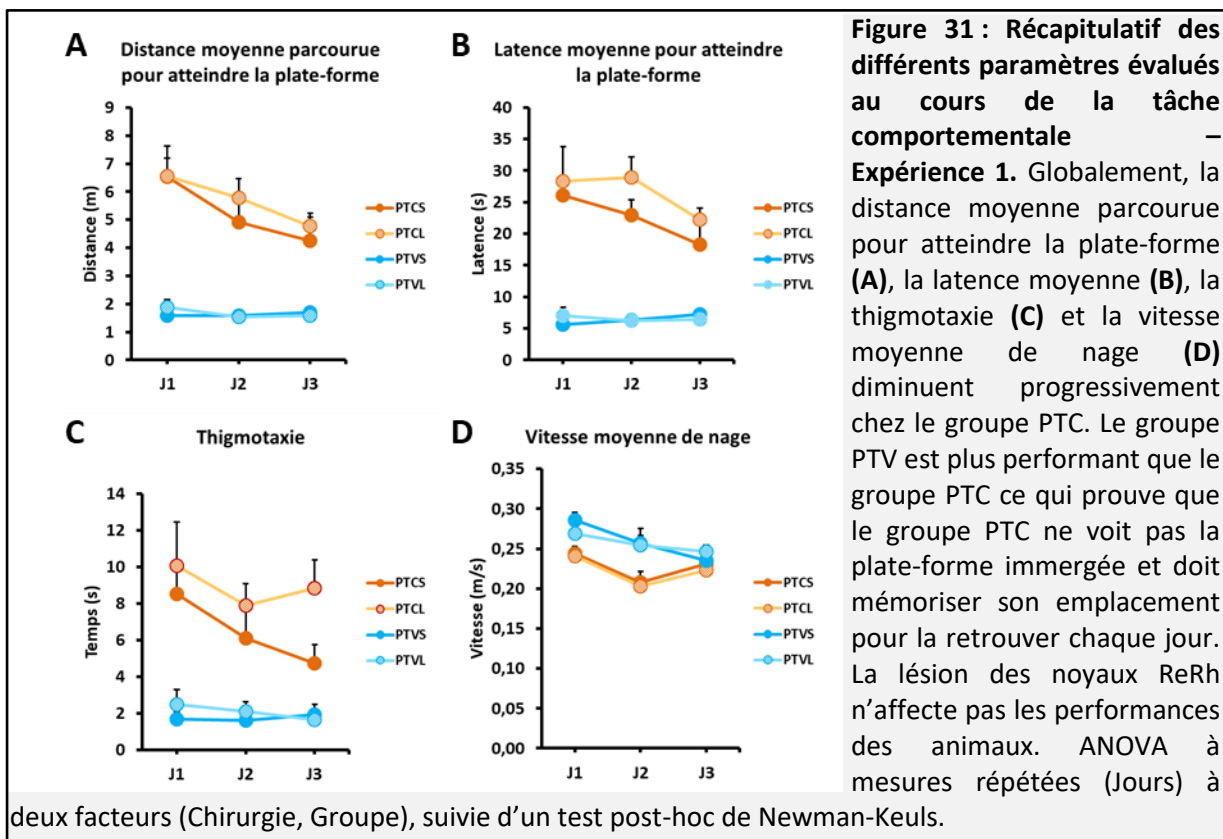
L'analyse statistique de la latence mise pour atteindre la plate-forme ne montre pas un effet des jours ( $F_{(2,46)} = 1,64$  ;  $p = 0,21$ ). Il n'y a également pas d'effet de la chirurgie ( $F_{(1,23)} = 1,66$  ;  $p = 0,21$ ), ni de l'interaction Jour x Chirurgie ( $F_{(2,46)} = 0,07$  ;  $p = 0,93$ ). Un effet du groupe est présent ( $F_{(1,23)} = 121,4$  ;  $p < 0,001$ ), mais pas des interactions Groupe x Chirurgie ( $F_{(1,23)} = 1,41$  ;  $p = 0,25$ ), Groupe x Jour ( $F_{(2,46)} = 2,17$  ;  $p = 0,13$ ), et Jour x Chirurgie x Groupe ( $F_{(2,46)} = 0,26$  ;  $p = 0,77$ ) (Figure 31B).

Concernant la thigmotaxie, aucun effet du jour n'est montré ( $F_{(2,46)} = 1,75$  ;  $p = 0,18$ ), ni de la chirurgie ( $F_{(1,23)} = 2,22$  ;  $p = 0,15$ ), ni de l'interaction Jour x Chirurgie ( $F_{(2,46)} = 0,14$  ;  $p = 0,87$ ). Un effet est présent pour le groupe ( $F_{(1,23)} = 37$  ;  $p < 0,001$ ), mais pas pour l'interaction

Groupe x Chirurgie ( $F_{(1,23)} = 1,26$  ;  $p = 0,27$ ), ni pour l'interaction Groupe x Jour ( $F_{(2,46)} = 1,14$  ;  $p = 0,33$ ), ni pour l'interaction Jour x Chirurgie x Groupe ( $F_{(2,46)} = 0,72$  ;  $p = 0,49$ ) (Figure 31C).

Enfin, la vitesse de nage diffère significativement entre les jours ( $F_{(2,46)} = 12,95$  ;  $p < 0,001$ ). Il n'y a pas d'effet de la chirurgie ( $F_{(1,23)} = 0,25$  ;  $p = 0,62$ ), ni de l'interaction Jour x Chirurgie ( $F_{(2,46)} = 0,40$  ;  $p = 0,67$ ). Il y a cependant un effet du groupe ( $F_{(1,23)} = 15,43$  ;  $p < 0,001$ ) et de l'interaction Groupe x Jour ( $F_{(2,46)} = 4,19$  ;  $p = 0,02$ ) avec les PTV nageant globalement plus vite que les PTC. Il n'y a pas de différence significative concernant l'interaction Groupe x Chirurgie ( $F_{(1,23)} = 0,03$  ;  $p = 0,87$ ). Enfin, il n'y a pas d'effet de l'interaction Jour x Chirurgie x Groupe ( $F_{(2,46)} = 0,85$  ;  $p = 0,43$ ) (Figure 31D).

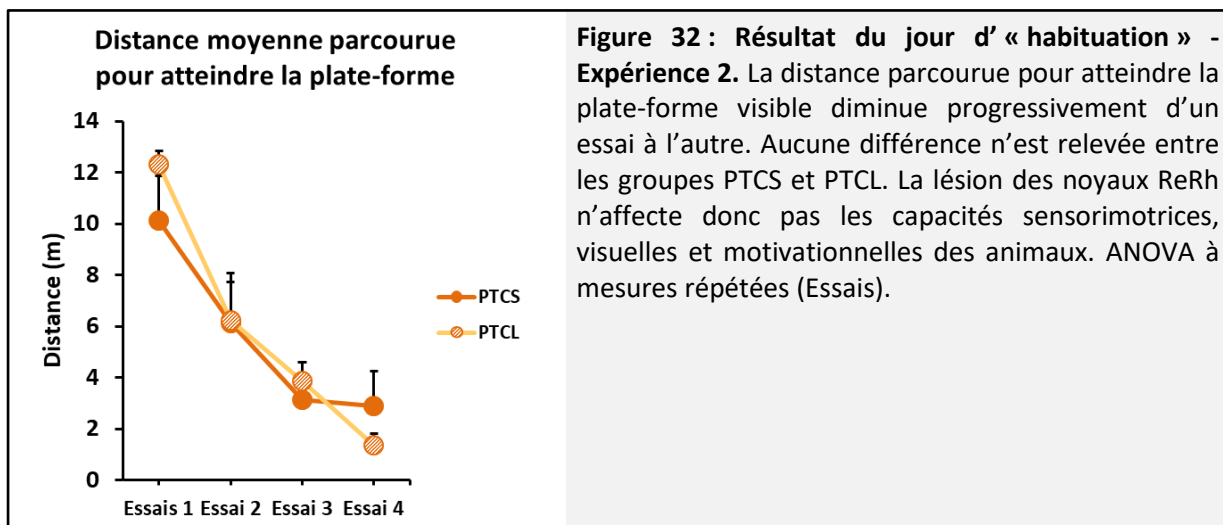
Ainsi, la lésion des noyaux ReRh n'affecte pas l'acquisition de la localisation d'une plateforme cachée dans une tâche de piscine de Morris (Loureiro et al., 2012; Cholvin et al., 2013; Ali et al., 2017).



### 3.2 – Expérience 2

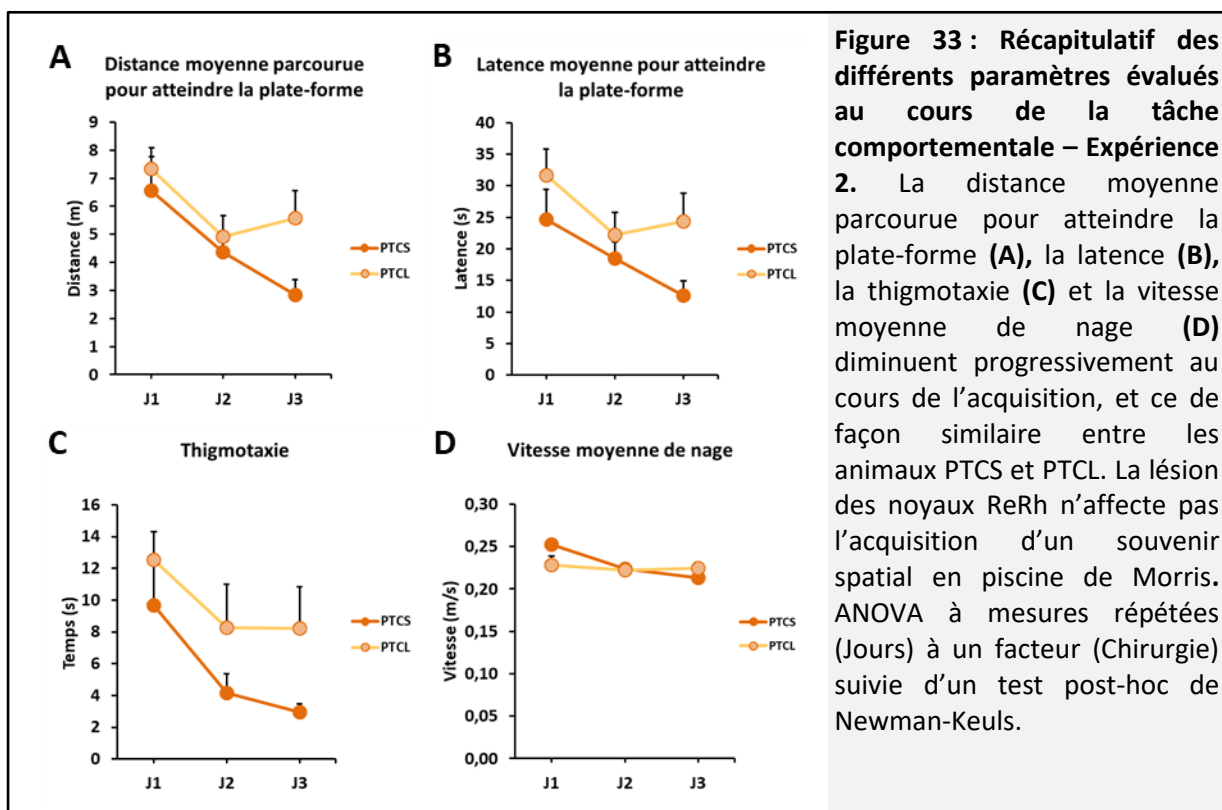
Les 32 animaux de cette expérience ont été divisés en deux sous-groupes qui ont effectué la tâche comportementale avec un jour d'intervalle. Tout comme pour l'expérience 1, nous sommes assurés que les performances des deux sous-groupes n'étaient pas statistiquement différentes. Une analyse de la variance à mesure répétée sur la distance parcourue pour atteindre la plate-forme cachée ne montre pas de différence significative globale entre les sous-groupes ( $F_{(1,8)} = 1,30$  ;  $p = 0,29$ ), ce qui nous permet de les regrouper. La composition du groupe complet, après retrait des animaux mal lésés, est la suivante : HCS = 6, HCL = 6, PTCS = 6 et PTCL = 6.

Pendant l'« habitude », la distance parcourue pour atteindre la plate-forme visible diminue progressivement au cours des quatre essais ( $F_{(1,10)} = 342$  ;  $p < 0,001$ ), ce qui atteste que les animaux comprennent la tâche et ont de bonnes capacités sensorimotrices (Figure 32).



Au cours de l'acquisition, la distance parcourue pour atteindre la plate-forme diminue progressivement au cours des jours ( $F_{(2,20)} = 5,57$  ;  $p = 0,01$ ), sans qu'il n'y ait de différence liée à la chirurgie ( $F_{(1,10)} = 4,26$  ;  $p = 0,07$ ). L'interaction Jour x Chirurgie n'est pas significativement différente ( $F_{(2,20)} = 0,96$  ;  $p = 0,40$ ) (Figure 33A). La latence pour atteindre la plate-forme diminue, elle aussi, au cours des jours ( $F_{(2,20)} = 3,94$  ;  $p = 0,04$ ). Pour ce paramètre, on constate une différence significative liée à la chirurgie ( $F_{(1,10)} = 5,81$  ;  $p = 0,04$ ) : la latence des animaux « Sham » au troisième jour est plus courte que la latence des

animaux « Lésés » au premier jour. Cependant, il n'y a pas de différence significative entre les animaux « Sham » et « Lésés » pour un même jour car l'interaction Jour x Chirurgie n'est pas significative ( $F_{(2,20)} = 0,59$  ;  $p = 0,56$ ) (Figure 33B). La thigmotaxie diminue au cours des jours d'acquisition ( $F_{(2,20)} = 6,51$  ;  $p = 0,007$ ) et n'est pas affectée par la chirurgie ( $F_{(1,10)} = 3,23$  ;  $p = 0,10$ ), ni par l'interaction Jour x Chirurgie ( $F_{(2,20)} = 0,25$  ;  $p = 0,78$ ) (Figure 33C). Enfin, la vitesse de nage diminue globalement au cours des jours ( $F_{(2,20)} = 5,30$  ;  $p = 0,01$ ) mais ne diffère pas entre les animaux « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,10)} = 0,78$  ;  $p = 0,40$ ). L'interaction Jour x Chirurgie tend cependant à être significative ( $F_{(2,20)} = 3,46$  ;  $p = 0,051$ ) (Figure 33D).

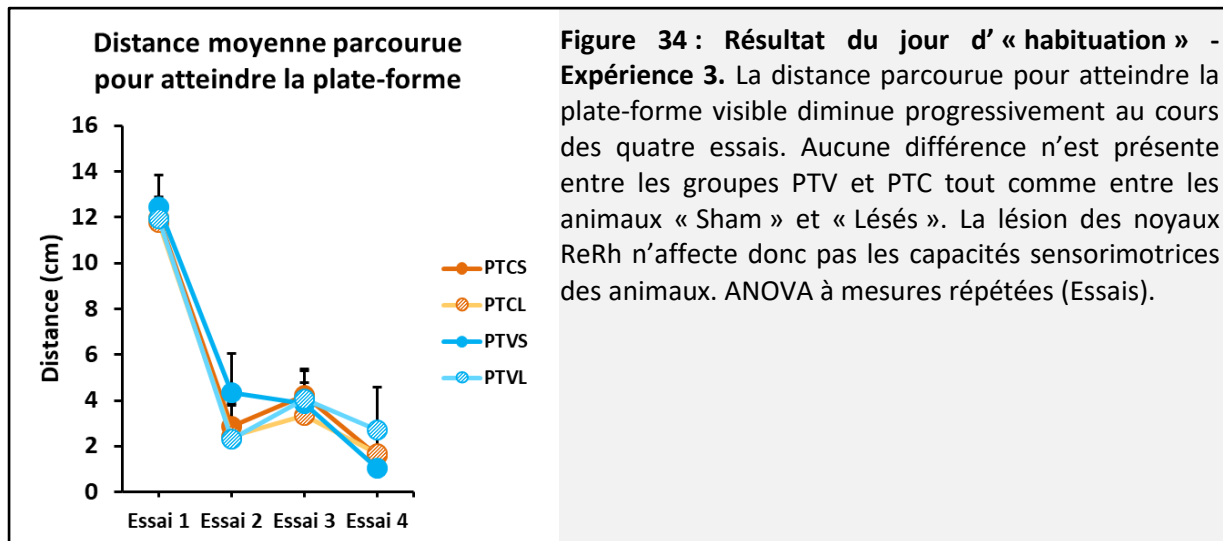


### 3.3 – Expérience 3

Cette troisième expérience comprenait les trois groupes HC, PTV et PTC. La composition de chaque groupe est la suivante : HCS = 4, PTVS = 3, PTCS = 4, HCL = 4, PTVL = 4 et PTCL = 5.

Au cours de l'« habitude », la distance parcourue pour atteindre la plate-forme diminue progressivement au fil des quatre Essais ( $F_{(3,42)} = 60,5$  ;  $p < 0,001$ ). Il n'y a toujours pas d'effet du Groupe ( $F_{(1,14)} = 0,92$  ;  $p = 0,35$ ) ni de l'interaction Essais x Groupe ( $F_{(3,42)} = 0,43$  ;  $p = 0,73$ ).

Les animaux de cette expérience, comme ceux des deux précédentes, n'ont pas de déficit sensorimoteur, visuel ou motivationnel (Figure 34).



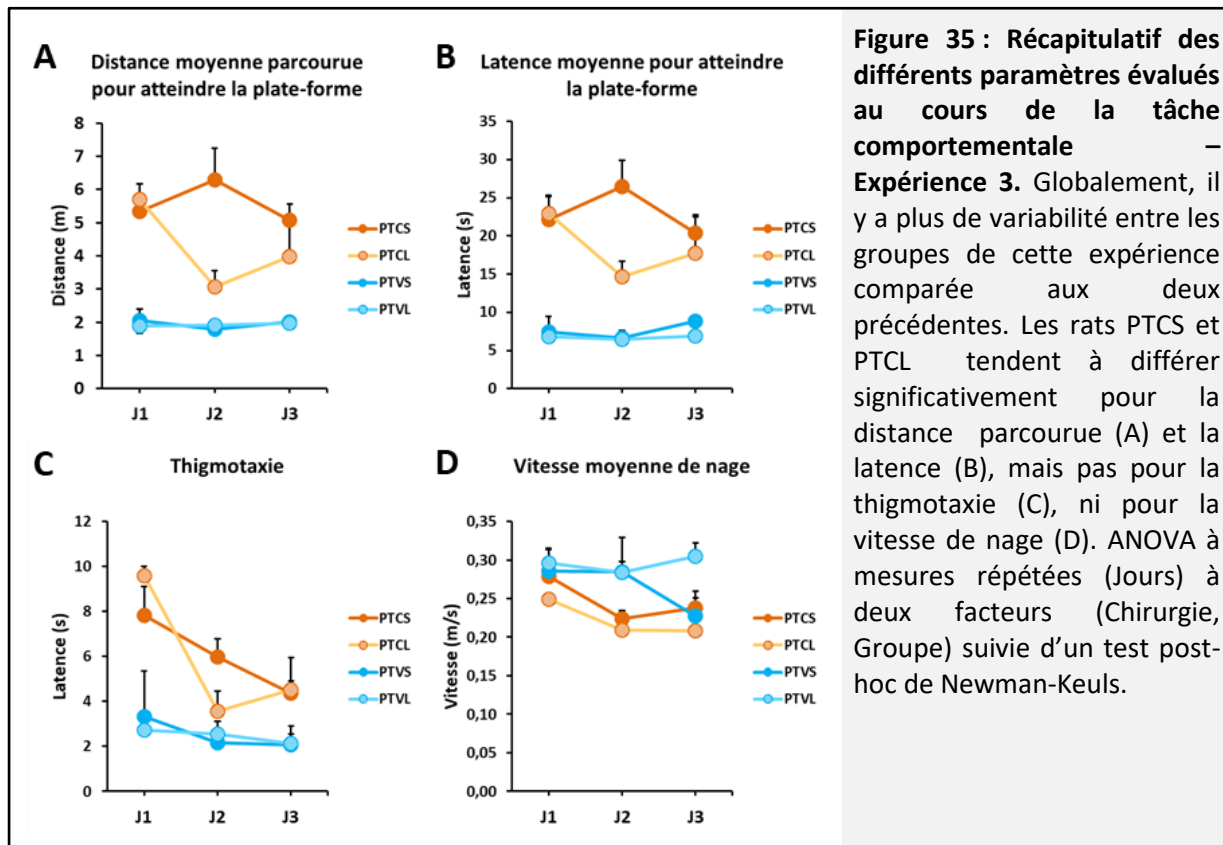
Au cours de l'acquisition, du fait d'une grande variabilité des résultats, notamment chez les groupes PTC, et d'un faible nombre de rats par groupe, la distance moyenne parcourue pour atteindre la plate-forme ne diminue pas significativement au cours des jours ( $F_{(2,24)} = 0,90$  ;  $p = 0,42$ ). Il n'y a globalement pas de différence significative entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,12)} = 3,41$  ;  $p = 0,09$ ). L'interaction Groupe x Chirurgie n'est pas significative ( $F_{(1,12)} = 3,14$  ;  $p = 0,10$ ). Il y a une différence de distance parcourue entre les groupes ( $F_{(1,12)} = 66,78$  ;  $p < 0,001$ ) mais pas pour l'interaction Groupe x Chirurgie ( $F_{(1,12)} = 3,14$  ;  $p = 0,10$ ) (Figure 35A).

La latence ne diminue pas significativement au cours des Jours ( $F_{(2,24)} = 0,28$  ;  $p = 0,76$ ) et, globalement, les performances tendent à différer significativement en fonction de la chirurgie ( $F_{(1,12)} = 4,04$  ;  $p = 0,07$ ). L'interaction Jours x Chirurgie n'est cependant pas significative ( $F_{(2,24)} = 1,15$  ;  $p = 0,33$ ). Les groupes PTV mettent significativement moins de temps pour atteindre la plate-forme ( $F_{(1,12)} = 100,1$  ;  $p < 0,001$ ), sans distinction entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,12)} = 1,82$  ;  $p = 0,20$ ) (Figure 35B).

La thigmotaxie diminue, elle, progressivement au cours des jours ( $F_{(2,24)} = 9,70$  ;  $p < 0,001$ ). Il n'y a globalement pas de différence significative entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,12)} = 0,04$  ;  $p = 0,85$ ), et il n'y a pas d'effet significatif de l'interaction Jour x Chirurgie ( $F_{(2,24)} = 0,81$  ;  $p = 0,46$ ). Les groupes PTC font plus de thigmotaxie que les groupes PTV ( $F_{(1,12)} =$

48,05 ;  $p < 0,001$ ), différence qui persiste au cours des jours ( $F_{(2,24)} = 4,35$  ;  $p = 0,02$ ) (Figure 35C).

Enfin, la vitesse moyenne de nage diffère entre les jours ( $F_{(2,24)} = 11,41$  ;  $p < 0,001$ ). Il n'y a globalement pas de différence liée à la chirurgie ( $F_{(1,12)} = 0,02$  ;  $p = 0,90$ ), pas plus qu'il n'y a d'effet de l'interaction Jour x Chirurgie ( $F_{(2,24)} = 3,26$  ;  $p = 0,06$ ). Globalement, les groupes PTV nagent moins vite que les groupes PTC ( $F_{(1,12)} = 8,52$  ;  $p = 0,01$ ) (Figure 35D).





## *Partie 2 : Analyse de l'expression des gènes*

*Partie 2: Analyse de l'expression des gènes en réponse à l'apprentissage et/ou à la lésion des noyaux reuniens et rhomboïde.*

---

Cette deuxième partie est consacrée à l'étude de l'expression des gènes dans l'hippocampe et le CPFm, au cours de la formation d'un souvenir spatial, chez des rats avec et sans noyaux ReRh. Dans un premier temps, je présente les résultats obtenus grâce au séquençage des ARNm de la sous-région hippocampique CA1 dorsale, puis ceux du séquençage de CA1 ventrale. Je termine par l'analyse de l'expression génique par RT-qPCR effectuée sur les ARNm du CPFm. Ces analyses permettent de mettre en évidence les régulations transcriptionnelles qui prennent place dès trois jours d'apprentissage au sein de la boucle hippocampo-corticale et les conséquences de la lésion des noyaux ReRh sur ces régulations.

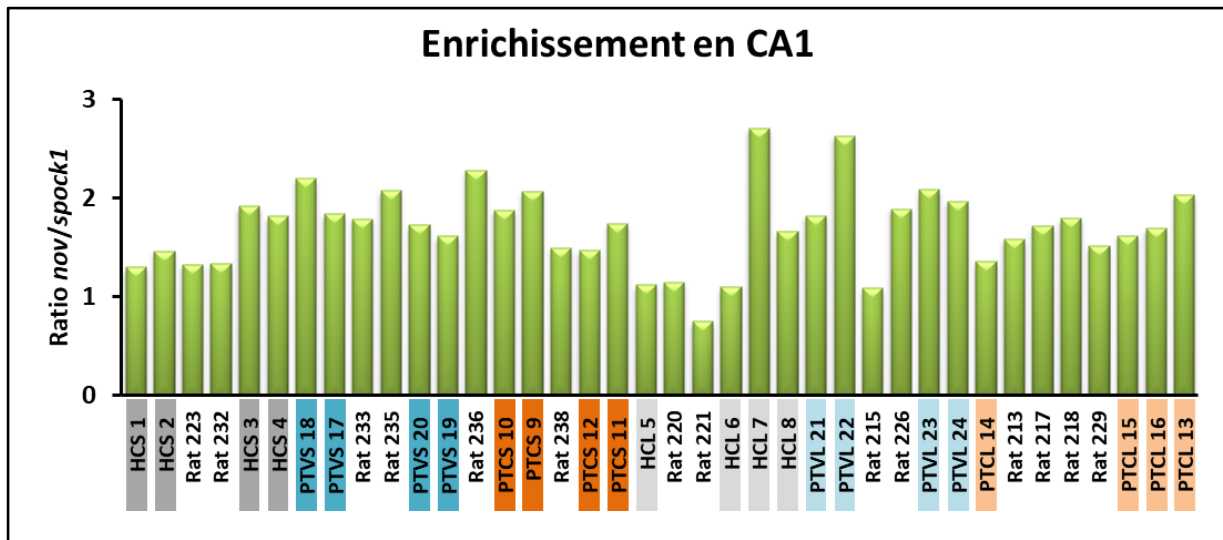
## **1 - Le séquençage de CA1 dorsal**

Le séquençage des ARN messagers de la sous-région CA1 de l'hippocampe dorsal a été réalisé sur des quadruplicats (n = 4 par groupe) de chacun des groupes suivants : home-cage sham (HCS1 à 4) et lésés (HCL5 à 8), plate-forme cachée sham (PTCS9 à 12) et lésés (PTCL13 à 16), et plate-forme visible sham (PTVS17 à 20) et lésés (PTVL21 à 24). Cela représente donc un total de 24 échantillons séquencés.

### **1.1 – Sélection des échantillons à séquencer**

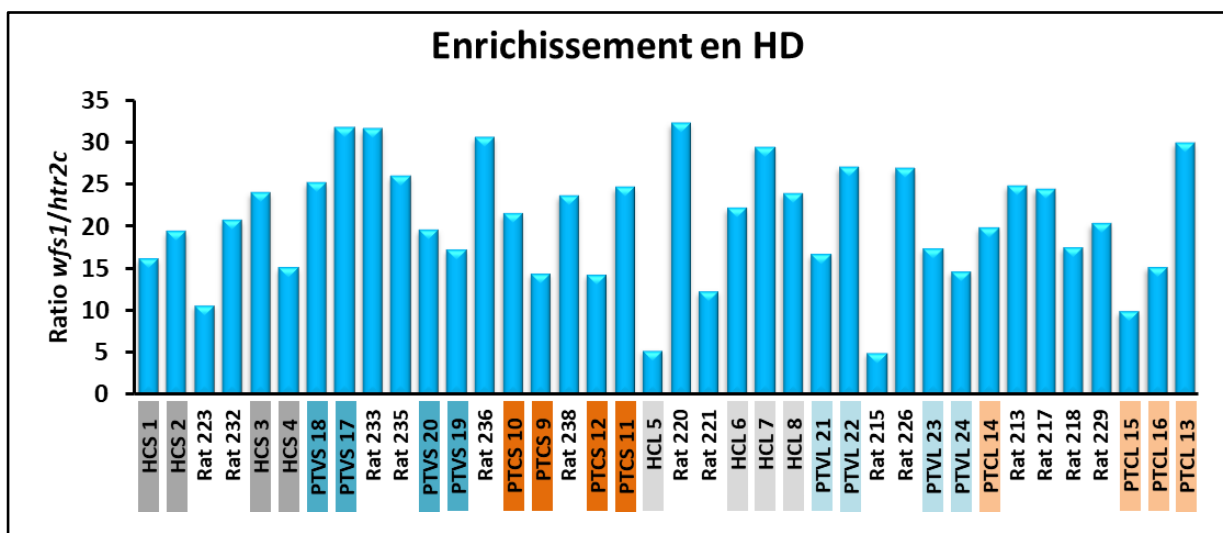
La sélection des échantillons à séquencer parmi les 54 rats opérés s'est initialement faite sur la qualité de la lésion et sur l'homogénéité du comportement. Cela a permis de restreindre le nombre de rats à 38, (HCS = 6 ; PTVS = 6 ; PTCS ; HCL = 6 ; PTVL = 6 ; PTCL = 8). Nous devons choisir quatre échantillons à séquencer pour chaque groupe. Nous avons ensuite affiné notre sélection en nous basant sur la qualité de la sous-dissection de CA1 dorsal. Autrement dit, les échantillons sélectionnés devaient, dans la mesure du possible, ne pas être contaminés par du tissu provenant de CA3, du GD et de l'HV.

Pour tester l'enrichissement des échantillons en CA1, j'ai dans un premier temps analysé par RT-qPCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) l'expression de gènes spécifiques de chacune des aires hippocampiques (*nov* pour CA1, *spock1* pour CA3 et *dsp* pour le GD) (Lein et al., 2004; Zhao et al., 2001); Allen Brain Atlas : <http://www.brain-map.org>). Idéalement, il aurait fallu réaliser l'extraction dans chacune des trois sous-régions afin de calculer l'expression des trois gènes dans chacune des trois sous-régions. Comme cela n'a pas été fait, j'ai simplement effectué un ratio des quantités obtenues entre *nov* et *spock1* (l'expression du gène *dsp* était négligeable) (Figure 36) et j'ai comparé les échantillons entre eux.



**Figure 36 : Evaluation de l'enrichissement en CA1 par RT-qPCR.** L'expression des gènes *nov*, *spock1* et *dsp* est obtenue à partir de RT-PCR effectuées sur des extraits d'ARNm de la sous-dissection de CA1 dorsale. Les échantillons utilisés pour le séquençage sont identifiés par leur nom de groupe suivi d'un numéro de 1 à 24. Les autres échantillons sont identifiés par le numéro du rat lors de l'expérience. HCS/L = home-cage sham/lésés ; PTVS/L = plate-forme visible sham/lésés ; PTCS/L = plate-forme cachée sham/lésés.

Le même procédé a été utilisé pour évaluer l'enrichissement en HD (Figure 37). J'ai pour cela ciblé par RT-qPCR le gène *wfs1* spécifique de la région dorsale, et le gène *htr2c* spécifique de la région ventrale (Strange et al., 2014).



**Figure 37 : Evaluation de l'enrichissement en HD par RT-qPCR.** L'expression des gènes *htr2c*, et *wfs1* est obtenue à partir de RT-qPCR effectuées sur des extraits d'ARNm de la sous-dissection de CA1 dorsale. Les échantillons utilisés pour le séquençage sont identifiés par leur nom de groupe suivi d'un numéro de 1 à 24. Les autres échantillons sont identifiés par le numéro du rat lors de l'expérience.

Les quatre échantillons par groupe choisis pour le séquençage sont ceux présentant une combinaison du meilleur enrichissement en CA1 et en HD, mais également de la meilleure lésion (ce qui explique par exemple que l'échantillon HCL5 ait été préféré au Rat 220).

## 1.2 – Premiers résultats et ajustements

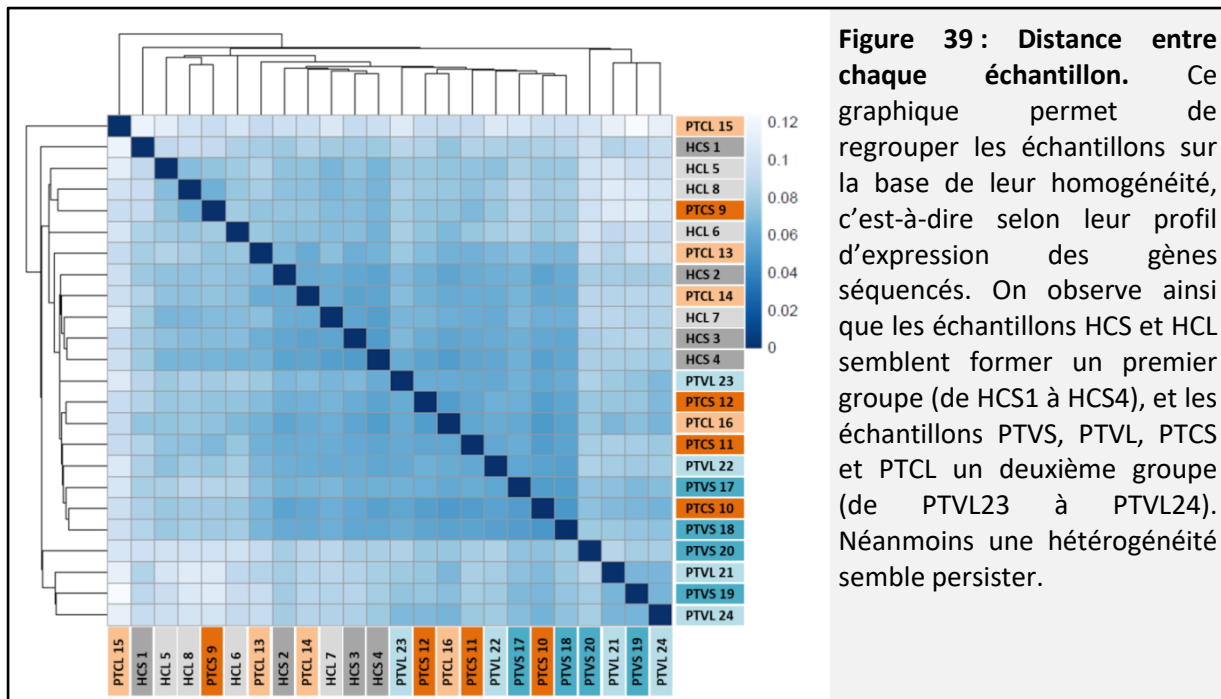
### 1.2.1 – Premiers résultats

Le résultat du séquençage des 24 échantillons met en évidence une analyse différentielle hétérogène ( $\text{Log}_2(\text{FC}) > 0$ ,  $p \leq 0,05$  et  $\text{Log}_2(\text{FC}) < 0$ ,  $p \leq 0,05$ ). En effet, le nombre de gènes est très différent suivant les comparaisons (Figure 38). Ce résultat suggère une possible hétérogénéité des tissus au sein d'un même groupe.

	Comparaisons	Nombre de gènes significativement modulés	Nombre de gènes surexprimés	Nombre de gènes sous-exprimés
Lésés vs Sham	HCL vs HCS	1	0	1
	PTCL vs PTCS	0	0	0
	PTVL vs PTVS	0	0	0
Sham	PTCS vs HCS	27	18	9
	PTVS vs HCS	343	135	208
	PTCS vs PTVS	39	19	20
Lésés	PTCL vs HCL	762	365	397
	PTVL vs HCL	2736	1376	1360
	PTCL vs PTVL	1732	650	1082

**Figure 38 : Tableau du nombre de gènes significativement modulés avec les 24 échantillons.** Les critères de significativité sont un  $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 0$  pour les gènes surexprimés et un  $\text{Log}_2(\text{FC}) \leq 0$  pour les gènes sous-exprimés, avec une  $p$ -valeur  $\leq 0,05$  dans les deux cas. On observe une forte hétérogénéité du nombre de gènes modulés suivant les comparaisons. Ce résultat laisse à penser qu'une hétérogénéité au sein des tissus d'un même groupe est présente.

Une analyse de la distance entre chaque échantillon, basée sur les niveaux d'expression de l'ensemble des gènes, confirme une certaine hétérogénéité des échantillons au sein d'un même groupe (Figure 39).



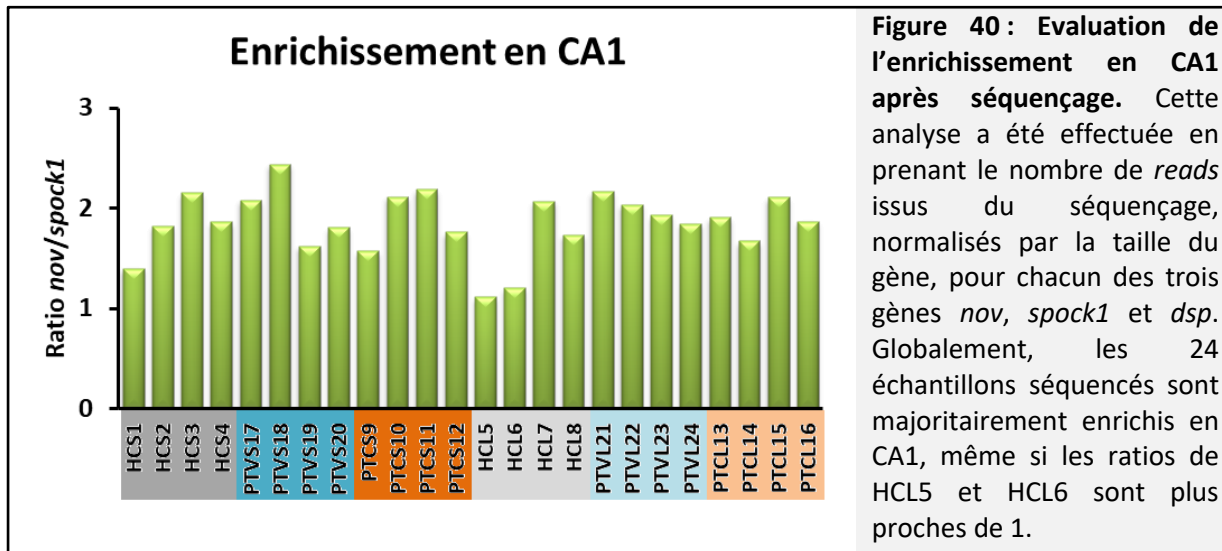
**Figure 39 : Distance entre chaque échantillon.** Ce graphique permet de regrouper les échantillons sur la base de leur homogénéité, c'est-à-dire selon leur profil d'expression des gènes séquencés. On observe ainsi que les échantillons HCS et HCL semblent former un premier groupe (de HCS1 à HCS4), et les échantillons PTVS, PTVL, PTCS et PTCL un deuxième groupe (de PTVL23 à PTVL24). Néanmoins une hétérogénéité semble persister.

Malgré tout, on observe un regroupement des rats HC, qu'ils soient « Sham » ou « Lésés », et des groupes PTV et PTC, « Sham » et « Lésés ». Ce regroupement semble cohérent avec le vécu de chaque groupe dans les conditions expérimentales, c'est-à-dire soit non testé (HC), soit testé en piscine (PTV ou PTC).

### 1.2.2 - Ajustements

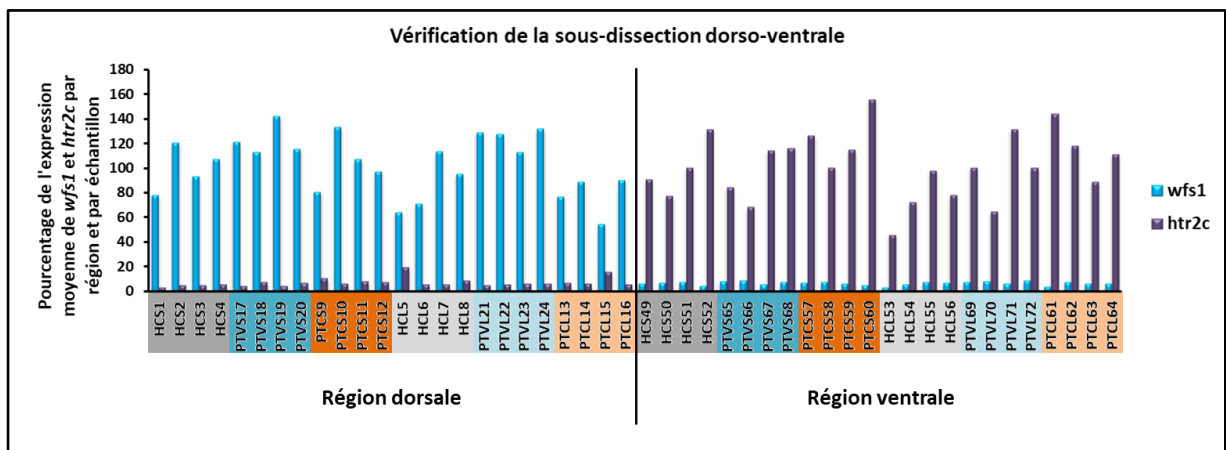
Au regard des résultats précédents, nous avons de nouveau vérifié la qualité de la sous-dissection, mais en utilisant cette fois les données du séquençage.

Pour chaque échantillon, un nombre de *reads* est obtenu à l'issue de séquençage. Les *reads* sont de petites séquences de nucléotides issues des ARNm précédemment fractionnés. Ces *reads* sont alignés sur le génome du rat de telle sorte que leur séquence corresponde parfaitement (ou presque) à une fraction de la séquence génomique. Ainsi, pour chaque gène, nous avons un nombre de *reads* alignés. Ce nombre est ensuite normalisé par rapport à la taille du gène (en nombre de bases nucléiques), ce qui donne une quantification de l'expression de chaque gène. Plus le nombre de *reads* alignés sur un gène est grand, plus le gène est exprimé. J'ai donc repris ces valeurs normalisées obtenues pour chaque échantillon pour les gènes *nov* et *spock1* afin de calculer l'enrichissement en CA1 des échantillons (Figure 40).



Les résultats montrent que, globalement, les échantillons sélectionnés sont enrichis en CA1. Cependant, certains échantillons sont plus contaminés par CA3, comme HCL5 et HCL6. Une contamination par CA3 reste présente du fait de la difficulté technique qu'il existe à séparer les deux sous-régions, tandis qu'il est plus facile de sous-disséquer proprement le GD qui est de plus isolé de CA1 par CA3.

La même analyse a été réalisée pour tester l'enrichissement en HD, en prenant le nombre de *reads* normalisés par la taille du gène, pour les gènes *wfs1* et *htr2c* issus du séquençage de CA1 dorsal mais également de CA1 ventral. J'ai ainsi obtenu un niveau d'expression de chacun de ces deux gènes, chez l'ensemble des échantillons dorsaux et ventraux (Figure 41).



**Figure 41 : Evaluation de la sous-dissection dorso-ventrale après séquençage, par région et par échantillon.** Le nombre de *reads* normalisé par la taille du gène a été pris pour chaque gène (*wfs1* et *htr2c*) et pour chaque région (dorsale et ventrale) afin de calculer leur pourcentage d'expression dans chacun des six groupes expérimentaux au sein des deux régions hippocampiques. Globalement, la sous-dissection dorso-ventrale a été correctement effectuée puisque chaque groupe expérimental surexprime le gène spécifique de chaque région hippocampique qui lui est propre.

Cette analyse nous a permis de voir que certains échantillons semblaient moins spécifiques de CA1d mais également de l'HD (ratio *wfs1/htr2c* plus faible ; PTCS9, HCL5, PTCL15). Ces échantillons ont donc été retirés de l'analyse. On peut remarquer que les échantillons PTCS9 et PTCL15 présentaient également un profil global d'expression plus éloigné des échantillons PTC et PTV (Figure 39), suggérant un problème potentiel avec ces échantillons. De la même façon, au regard de la figure 39, nous constatons que quatre échantillons du groupe PTV semblent avoir un profil d'expression plus éloigné des autres. Ces échantillons, PTVS19, PTVS20, PTVL21 et PTVL24, ont également été retirés de l'analyse, afin de conserver des groupes homogènes.

Ainsi, seuls 17 échantillons sur les 24 séquencés ont servis à l'analyse de l'expression des gènes. La composition de chaque groupe est la suivante : HCS n=4 ; PTVS n=2 ; PTCS n=3 ; HCL n=3 ; PTVL n=2 ; PTCL n=3.

### 1.3 – Analyse des résultats

L'analyse statistique pour chaque gène et pour chaque comparaison a été effectuée par un bio-informaticien de la plate-forme de séquençage de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire. Les résultats montrent qu'il y a beaucoup moins d'hétérogénéité entre les différentes comparaisons que précédemment (Figure 38 vs Figure 42).

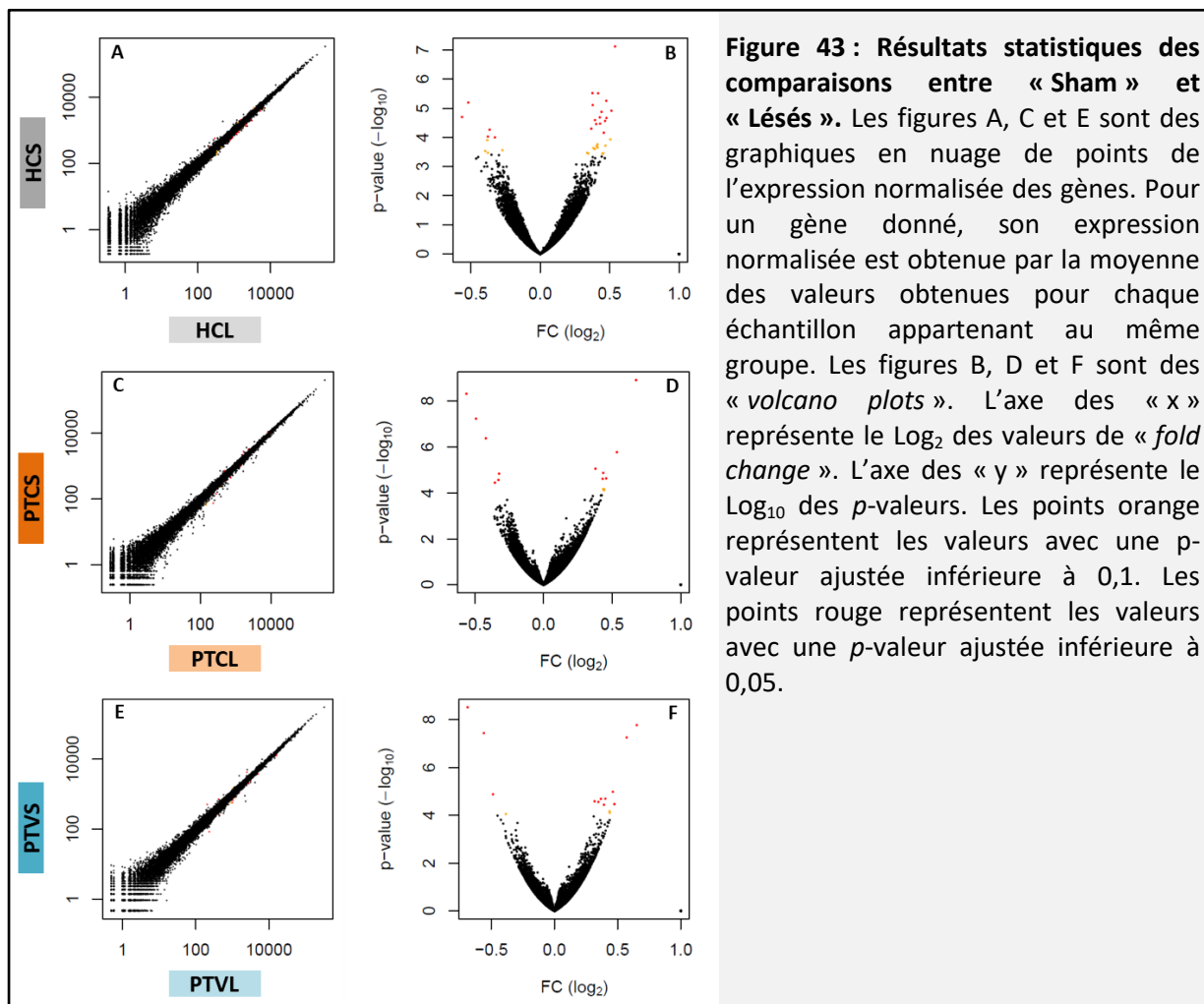
	Comparaisons	Nombre de gènes significativement modulés	Nombre de gènes surexprimés	Nombre de gènes sous-exprimés
Lésés vs Sham	HCL vs HCS	20	15	5
	PTCL vs PTCS	12	6	6
	PTVL vs PTVS	12	9	3
Sham	PTCS vs HCS	239	104	135
	PTVS vs HCS	259	86	173
	PTCS vs PTVS	62	43	19
Lésés	PTCL vs HCL	122	45	77
	PTVL vs HCL	715	360	355
	PTCL vs PTVL	129	36	93

**Figure 42 : Tableau du nombre de gènes significativement modulés avec 17 échantillons.** Les critères de significativité sont un  $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 0$  pour les gènes surexprimés et un  $\text{Log}_2(\text{FC}) \leq 0$  pour les gènes sous-exprimés, avec une  $p$ -valeur  $\leq 0,05$  dans les deux cas. La suppression des sept échantillons a permis d'homogénéiser le nombre de gènes entre les groupes.



## 1.3.1 – Effets de la lésion

L'analyse statistique ne révèle que peu de gènes significativement modulés en réponse à la lésion des noyaux ReRh (44 au total, Figure 44 :  $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 0$  et  $p \leq 0,05$  : Figure 45 :  $\text{Log}_2(\text{FC}) \leq 0$  et  $p \leq 0,05$ ). Ce résultat n'est pas forcément surprenant. En effet, le fond génétique des animaux est identique, au sein de chaque groupe (HC, PTC, PTV) les animaux ont été exposés aux mêmes conditions et la tâche de piscine de Morris n'a pas révélé de différence de performance au cours de l'acquisition entre les rats « Sham » et « Lésés ».



Gènes surexprimés			Log <sub>2</sub> (FC)	p-valeur ajustée
HCL vs HCS	Trank1	tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1	0,54	7,5E-04
	Rbm33	RNA binding motif protein 33	0,51	1,6E-02
	Pnizr	PNN-interacting serine/arginine-rich protein	0,48	1,9E-02
	Nktr	natural killer cell triggering receptor	0,48	1,3E-02
	Carns1	carosine synthase 1	0,47	2,1E-02
	Wsb1	WD repeat and SOCS box-containing 1	0,46	3,8E-02
	Pnn	pinin, desmosome associated protein	0,44	1,6E-02
	Zc3h11a	zinc finger CCCH-type containing 11A	0,43	2,3E-02
	<td>fibronectin 1</td> <td>0,43</td> <td>1,9E-02</td>	fibronectin 1	0,43	1,9E-02
	Celsr3	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	0,42	1,0E-02
	Plekkg3	pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G3	0,40	2,3E-02
	Akap8l	A-kinase anchoring protein 8 like	0,39	2,1E-02
	Leng8	leukocyte receptor cluster (LRC) member 8	0,38	1,3E-02
	Ddx17	DEAD-box helicase 17	0,38	1,0E-02
Fcho1	FCH domain only 1	0,37	3,1E-02	
PTVL vs PTVS	Cxcr1	C-X-C motif chemokine receptor 1	0,65	1,4E-04
	Ids	iduronate 2-sulfatase	0,57	2,2E-04
	Cacna2d1	calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta	0,47	4,9E-02
	Nrxn1	neurexin 1	0,46	3,4E-02
	Dock4	dedicator of cytokinesis 4	0,40	4,2E-02
	Dync1h1	dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1	0,39	4,9E-02
	Rph3a	rabphilin 3A	0,37	4,2E-02
	Srcin1	SRC kinase signaling inhibitor 1	0,35	4,5E-02
	Kif1a	kinesin family member 1A	0,32	4,5E-02
PTCL vs PTCS	Pdilt	protein disulfide isomerase-like, testis expressed	0,67	2,0E-05
	Fmod	fibromodulin	0,53	5,6E-03
	Dnah9	dynein, axonemal, heavy chain 9	0,46	4,0E-02
	Col6a2	collagen, type VI, alpha 2	0,44	3,0E-02
	Col1a1	collagen, type I, alpha 1	0,43	4,0E-02
Igf2	insulin-like growth factor 2	0,38	2,4E-02	

Figure 44 : Tableau des gènes surexprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh. Les comparaisons effectuées entre les rats « Sham » et « Lésés » suivant les groupes (HC, PTV, PTC) montrent que peu de gènes sont modulés en réponse à la lésion.  $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 0$ ,  $p\text{-valeur} \leq 0,05$ . FC = fold change.

Gènes sous-exprimés			Log <sub>2</sub> (FC)	p-valeur ajustée
HCL vs HCS	Apoc1	apolipoprotein C1	-0,56	1,9E-02
	RGD1306739	similar to RIKEN cDNA 1700040L02	-0,52	1,3E-02
	Rps15a	ribosomal protein S15a	-0,38	4,9E-02
	Rpl31	ribosomal protein L31-like 3	-0,36	3,1E-02
	Rpl28	ribosomal protein L28	-0,33	4,9E-02
PTVL vs PTVS	Ghdc	GH3 domain containing	-0,69	4,9E-05
	Ino80e	INO80 complex subunit E	-0,56	2,0E-04
	Tspan18	tetraspanin 18	-0,49	3,6E-02
PTCL vs PTCS	Polr3k	polymerase (RNA) III subunit K	-0,56	4,0E-05
	Crabp1	cellular retinoic acid binding protein 1	-0,49	3,2E-04
	Scn4b	sodium voltage-gated channel beta subunit 4	-0,42	1,7E-03
	Olig2	oligodendrocyte lineage transcription factor 2	-0,35	4,9E-02
	Parm1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1	-0,33	4,1E-02
	Olig1	oligodendrocyte transcription factor 1	-0,32	3,0E-02

Figure 45 : Tableau des gènes sous-exprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh. Tout comme pour les gènes surexprimés, peu de gènes sont sous-exprimés en réponse à la lésion au regard des comparaisons effectuées entre les rats « Sham » et « Lésés ».  $\text{Log}_2(\text{FC}) \leq 0$ ,  $p\text{-valeur} \leq 0,05$ . FC = fold change.

Les gènes surexprimés et sous-exprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh ont fait l'objet d'une analyse fonctionnelle grâce à deux logiciels : DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery ; <https://david.ncifcrf.gov/>) et STRING (Protein-Protein Interaction Networks, © STRING Consortium 2017 ; <https://string-db.org>). Ces deux logiciels sont utilisés pour mettre en avant des groupes fonctionnels (ou clusters) à partir d'une liste de gènes donnés. Ils se basent sur des associations directes (physiques) ou indirectes (fonctionnelles) de protéines pour mettre en évidence ces clusters fonctionnels à partir de leurs bases de données (Huang et al., 2007; Szklarczyk et al., 2017).

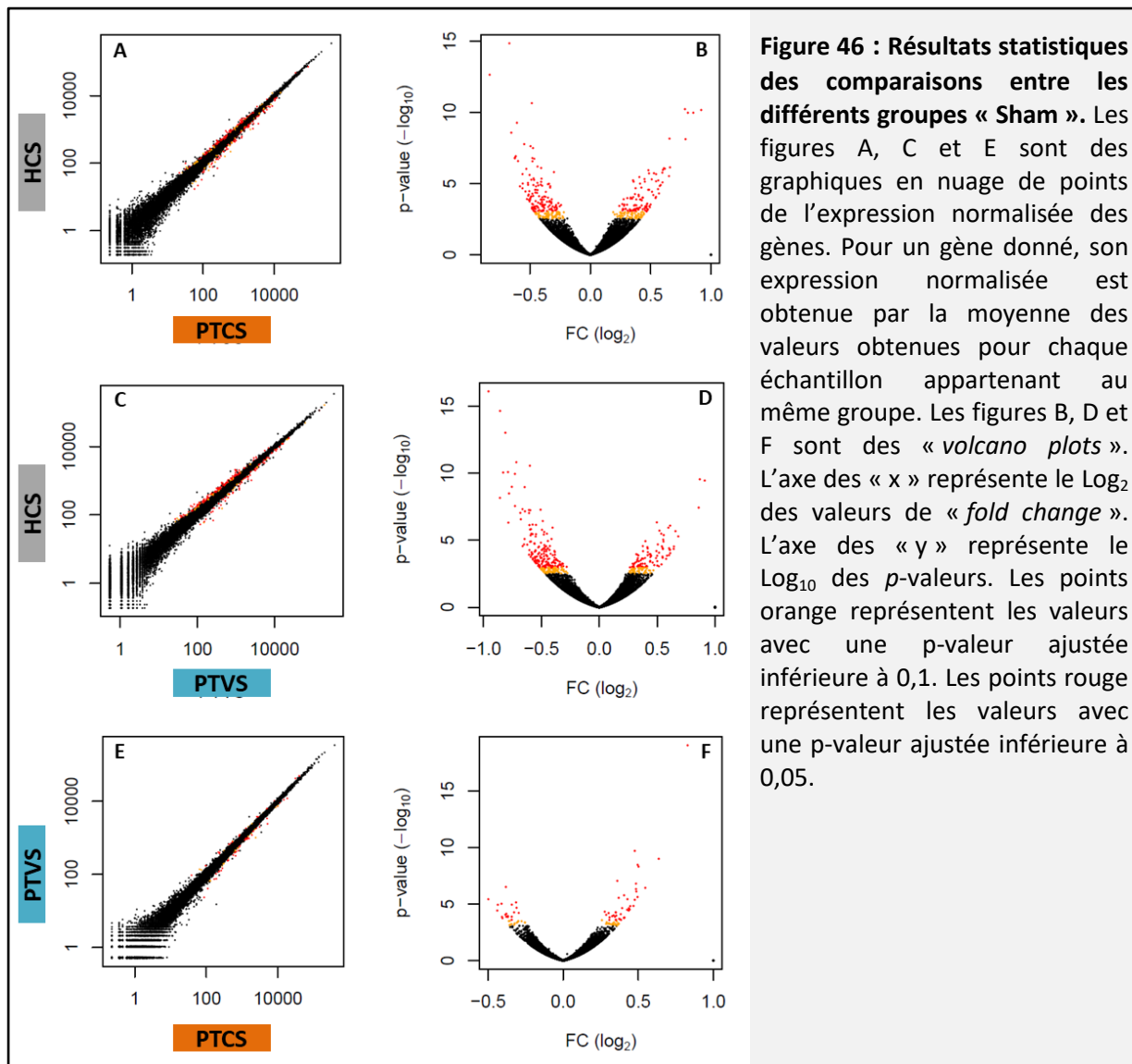
L'analyse de ces différentes listes de gènes avec les deux logiciels n'a pas permis de faire ressortir de clusters fonctionnels particuliers. Néanmoins, on notera que des gènes codant pour des sous-unités ribosomiques ainsi que pour une sous-unité de l'ARN polymérase III (ARNpolIII) sont sous-exprimés chez les animaux « Lésés » comparés aux animaux « Sham » (Figure 45). L'ARNpolIII permet la transcription de gènes non-codants, tels que les ARN ribosomiques (ARNr) ou des ARNt (Nikitina et al., 2011). Ces données peuvent être mises en relation avec les analyses effectuées ci-après (voir 1.3.2.1 – Analyse des gènes surexprimés Groupe « Lésés »).

### **1.3.2 – Effets de l'apprentissage**

#### 1.3.2.1 – Analyse des gènes surexprimés

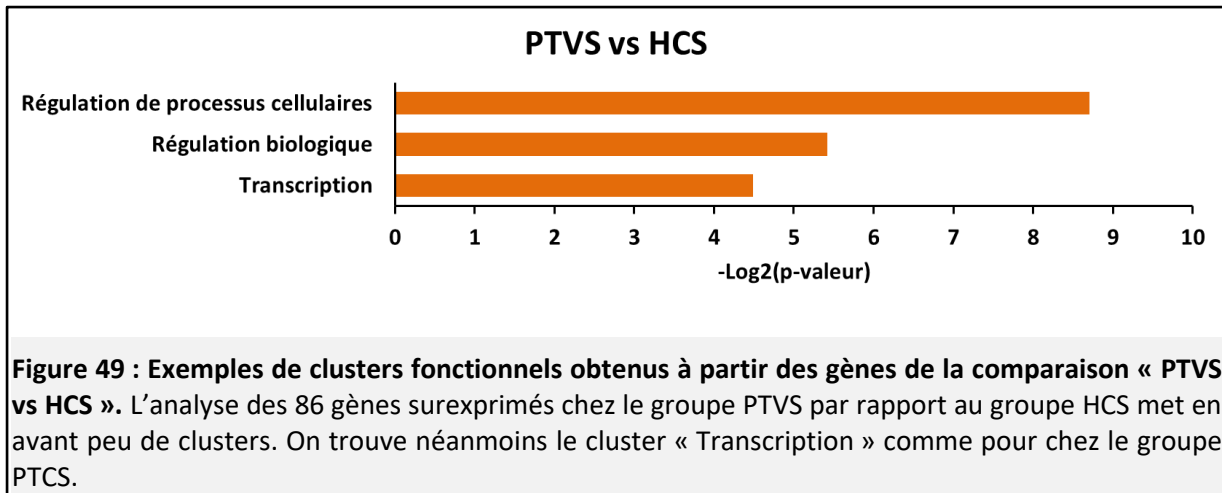
##### ***Groupe « Sham »***

L'analyse statistique montre qu'il y a 104 gènes significativement surexprimés chez les animaux PTCS par rapport aux animaux HCS (Figure 42).

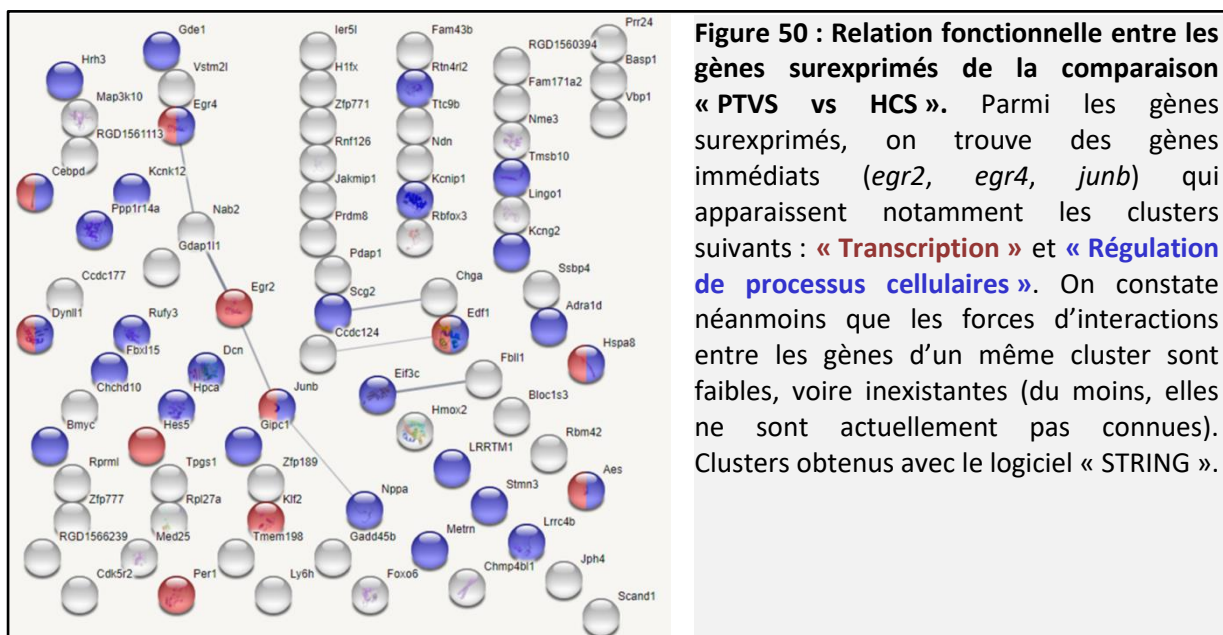


Nous nous sommes intéressés à la comparaison « PTCS vs HCS » afin de voir quels étaient les gènes induits en réponse à l'apprentissage spatial. L'analyse de ces 104 gènes grâce au logiciel « STRING » fait ressortir de nombreux clusters, dont « **Réponse à l'AMPC** », « **Transcription** » ou encore « **Apprentissage et mémoire** » (Figure 47). Ces clusters sont également retrouvés lors de l'analyse avec le logiciel « DAVID ».



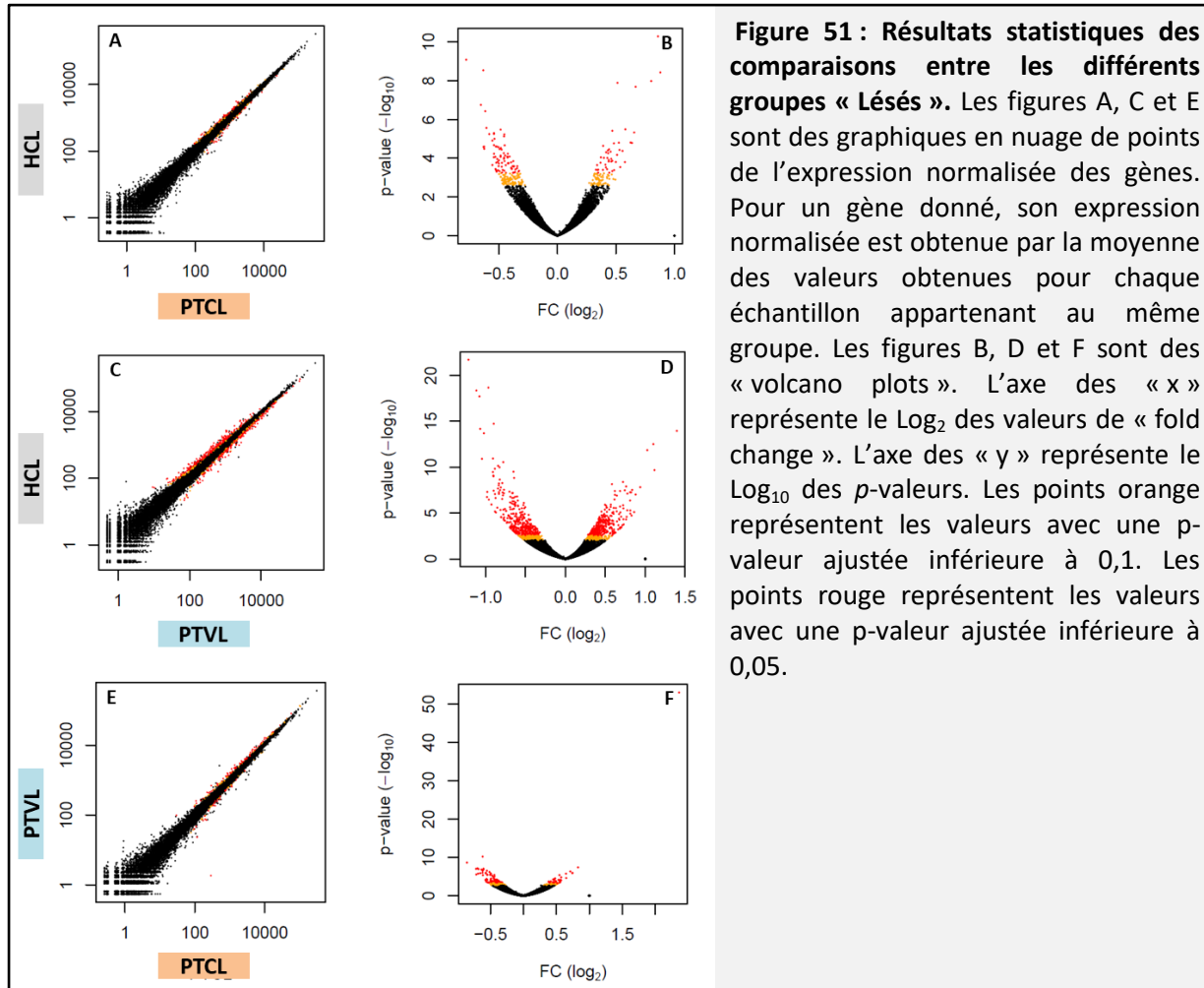


Le cluster « Transcription » contient les gènes immédiats *egr2*, *egr4* et *junb* que l'on retrouve également dans le cluster « **Régulation positive de la transcription à partir du promoteur de l'ARNpollII** » de la comparaison « PTCS vs HCS ». Cependant, il y a moins de gènes immédiats exprimés chez les PTVS et les gènes du cluster « **Transcription** » ont une force d'interaction plus faible que ceux du groupe PTCS (Figure 50 vs Figure 48).



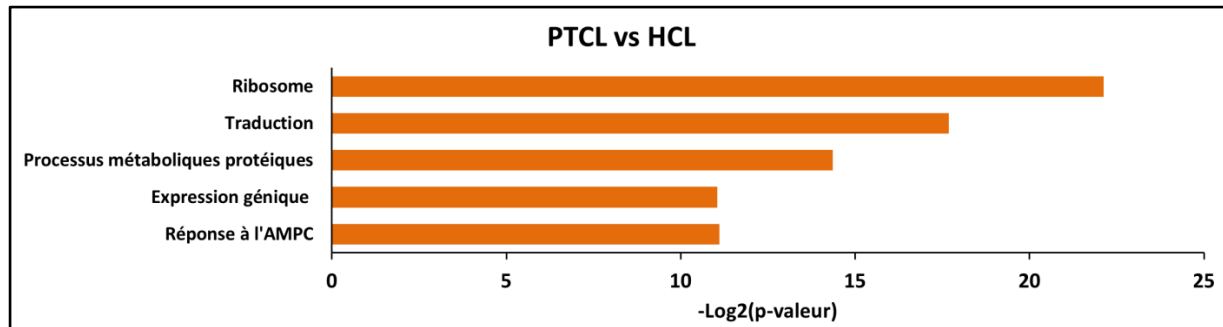
## Groupe « Lésés »

L'analyse statistique montre qu'il y a 45 gènes surexprimés chez le groupe PTCL par rapport au groupe HCL (Figure 42).



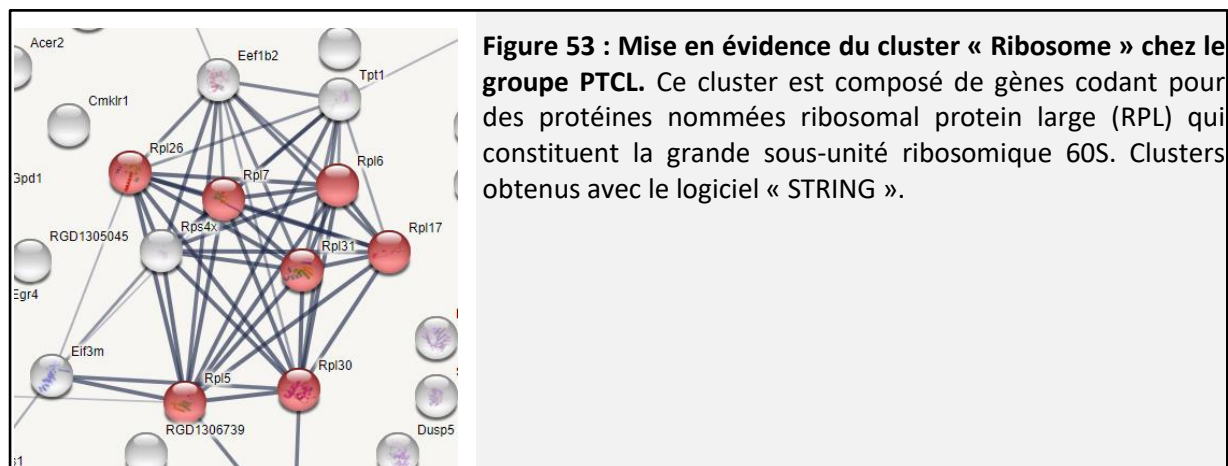
L'analyse fonctionnelle met majoritairement en avant des clusters différents de ceux trouvés chez le groupe « Sham ». Néanmoins, nous retrouvons le cluster « **Réponse à l'AMPC** » (Figure 52). Ce cluster est généralement présent lorsque des gènes immédiats sont trouvés. Ici, ce cluster est formé par les gènes *egr2*, *egr4*, *junb*, *gpd1* et *per1*.





**Figure 52 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes surexprimés de la comparaison « PTCL vs HCL ».** L'analyse des 45 gènes de cette comparaison met en avant un cluster principal « Ribosome » associé à un cluster « Traduction ». Le cluster « Réponse à l'AMPC » est également présent comme chez les rats « Sham » du fait notamment de la présence d'un reliquat de gènes immédiats (*egr2*, *egr4*, *junb*).

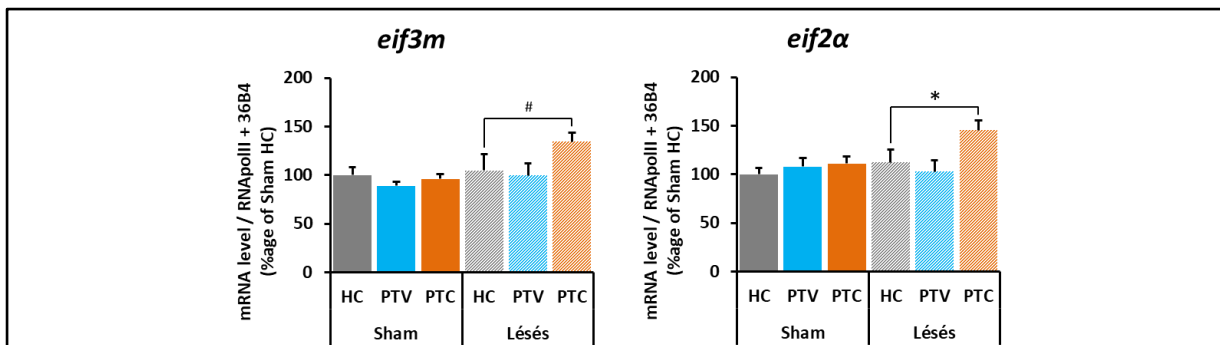
Le cluster « **Ribosome** » comprend huit gènes nommés *rpl* (ribosomal protein large) (Figure 53). Les protéines codées par ces gènes font partie de la grande sous-unité 60S du ribosome.



**Figure 53 : Mise en évidence du cluster « Ribosome » chez le groupe PTCL.** Ce cluster est composé de gènes codant pour des protéines nommées ribosomal protein large (RPL) qui constituent la grande sous-unité ribosomique 60S. Clusters obtenus avec le logiciel « STRING ».

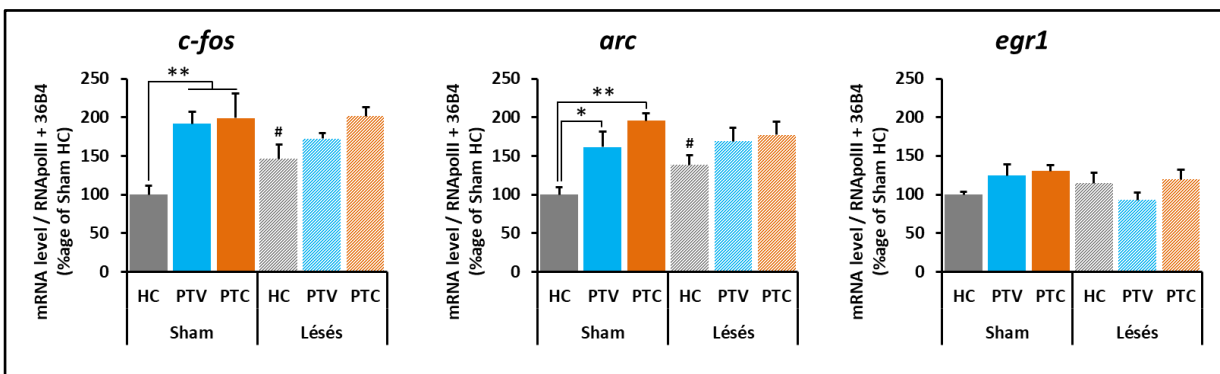
Nous avons noté la présence du gène *eif3m* (*eukaryotic initiation factor 3m*,  $\text{Log}_2(\text{FC}) = 0,41$   $p = 0,03$ ), un facteur d'initiation de la traduction, qui, au regard de l'analyse fonctionnelle effectuée avec le logiciel « STRING », est lié au cluster « Ribosome » (Figure 52). Nous avons testé par RT-qPCR l'expression de ce gène, mais également d'un autre initiateur de la traduction, *eif2a* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 0,18$   $p = 0,54$ ), qui, d'après la littérature, semble jouer un rôle dans l'apprentissage et la mémoire (Costa-Mattioli et al., 2005, 2007). Nous avons retrouvé une tendance à l'augmentation de l'expression du gène *eif3m* et une augmentation significative par l'apprentissage du gène *eif2a* chez le groupe PTCL (Figure 54).





**Figure 54 : Résultats de la quantification des gènes *eif3m* et *eif2a* par RT-qPCR.** Les RT-qPCR ont été réalisées à partir d'un groupe d'échantillons comprenant les échantillons séquencés additionnés d'autres dont la sous-dissection était correcte (Figure X1). Le nombre d'échantillons par groupe est le suivant : HCS = 6 ; PTVS = 4 ; PTCS = 5 ; HCL = 6 ; PTVL = 5 ; PTCL = 7. Le gène *eif3m* tend à être significativement induit par l'apprentissage chez le groupe « Lésés » tandis que le gène *eif2a* l'est effectivement. ANOVA à deux facteurs (Lésion ; Comportement) suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \* =  $p < 0,05$  ; # = tendance ( $0,05 < p < 0,1$ ).

Parmi les 45 gènes surexprimés, nous ne retrouvons pas l'induction des gènes immédiats qui étaient présents dans la comparaison PTC vs HC chez le groupe « Sham ». Ce résultat a par ailleurs été reproduit par RT-qPCR pour les gènes *c-fos*, *arc*, et *egr1*, bien que pour ce dernier nous n'avons pas observé d'augmentation chez les groupes « Sham ». (Figure 55).



**Figure 55 : Résultats de la quantification des gènes immédiats *c-fos*, *arc* et *egr1* par RT-qPCR.** Les RT-qPCR ont été réalisées à partir d'un groupe d'échantillons comprenant les échantillons séquencés additionnés d'autres dont la sous-dissection était correcte (Figure X1). Le nombre d'échantillons par groupe est le suivant : HCS = 6 ; PTVS = 4 ; PTCS = 5 ; HCL = 6 ; PTVL = 5 ; PTCL = 7. On constate que les gènes immédiats *c-fos* et *arc* sont significativement induits par l'apprentissage chez le groupe « Sham » tandis qu'ils ne le sont pas chez le groupe « Lésés ». Ce résultat confirme celui obtenu par le séquençage. Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'augmentation significative du gène *egr1* chez le groupe « Sham ». ANOVA à deux facteurs (Lésion ; Comportement) suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \* =  $p < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,01$  ; # = tendance par rapport à HCS ( $0,05 < p < 0,1$ ).

Nous nous sommes également intéressés à la comparaison « PTVL vs HCL ». L'analyse statistique montre que 360 gènes sont significativement surexprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh chez le groupe PTVL, soit huit fois plus que chez les PTCL. L'analyse

fonctionnelle effectuée avec le logiciel « STRING » met en avant les clusters « **Ribosome** » et « **Traduction** », mais également d'autres tel que « **Mitochondrie** » (Figures 56 et 57).

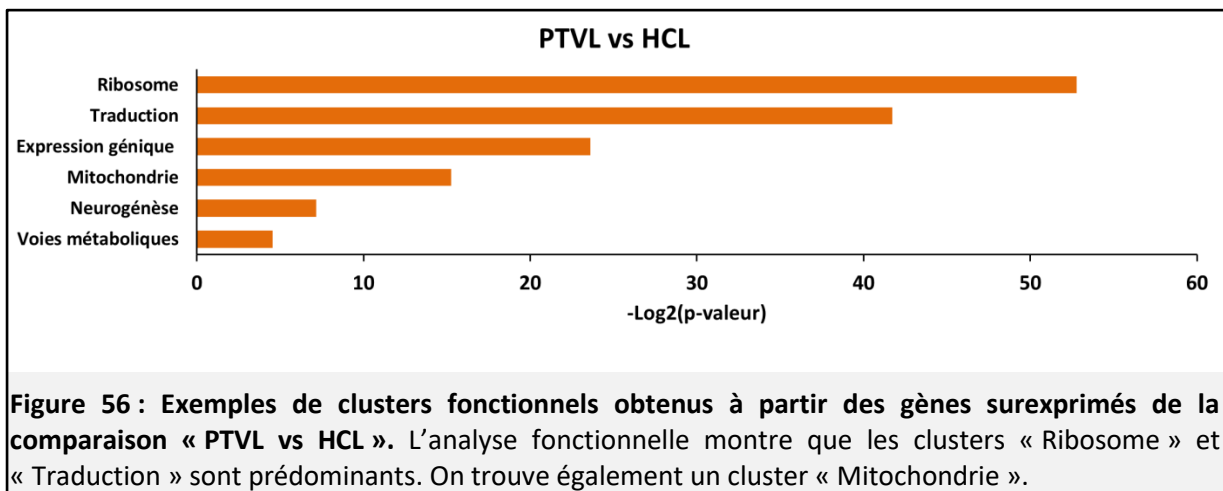


Figure 56 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes surexprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ». L'analyse fonctionnelle montre que les clusters « Ribosome » et « Traduction » sont prédominants. On trouve également un cluster « Mitochondrie ».

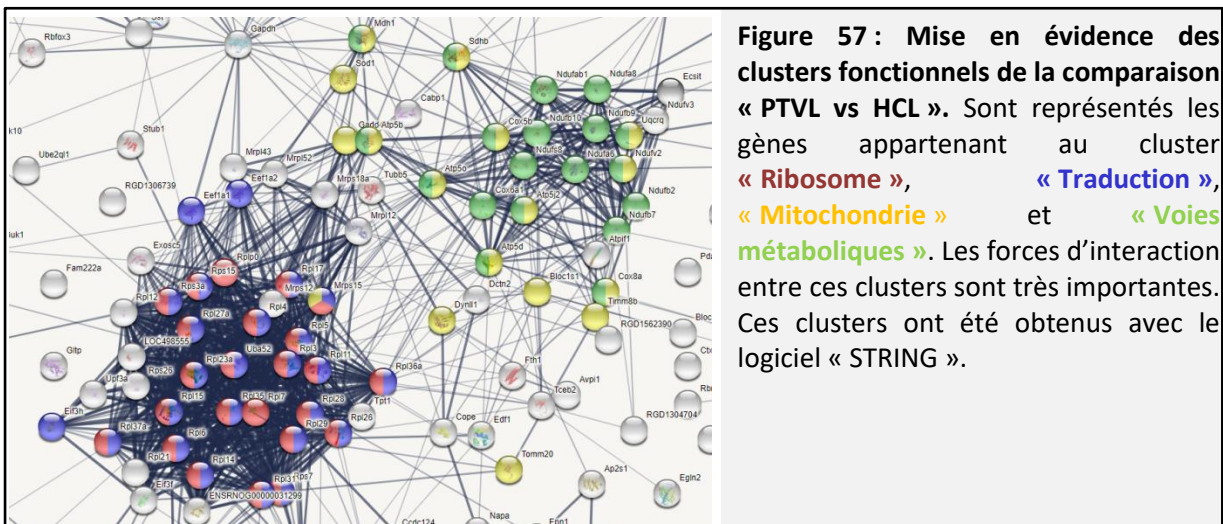
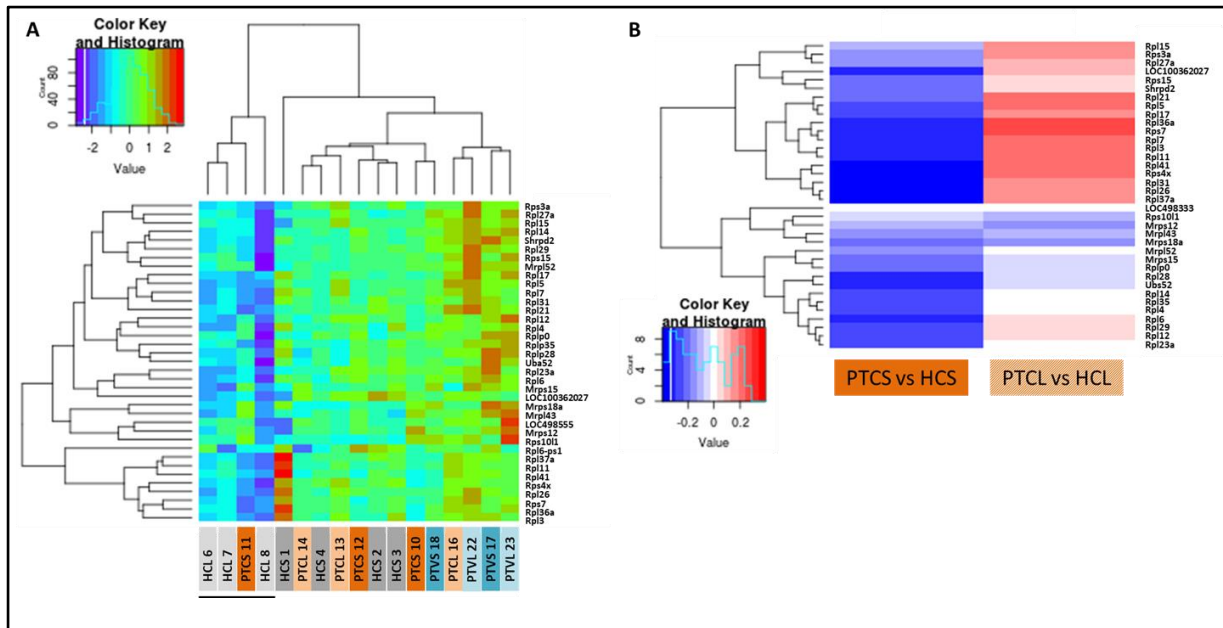


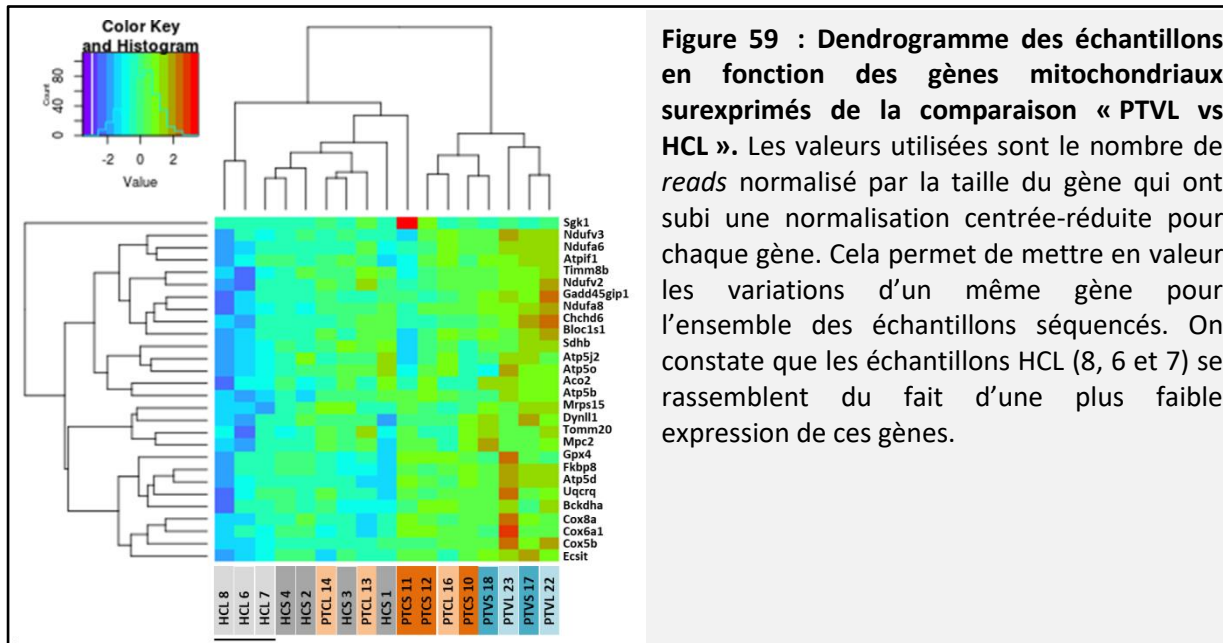
Figure 57 : Mise en évidence des clusters fonctionnels de la comparaison « PTVL vs HCL ». Sont représentés les gènes appartenant au cluster « Ribosome », « Traduction », « Mitochondrie » et « Voies métaboliques ». Les forces d'interaction entre ces clusters sont très importantes. Ces clusters ont été obtenus avec le logiciel « STRING ».

Ces groupes fonctionnels sont également retrouvés lorsque les listes de gènes sont analysées avec le logiciel DAVID, ce qui suggère leur fiabilité.

Nous avons ensuite sélectionné les gènes des clusters « **Ribosome** » et « **Mitochondrie** » afin de voir quelle était l'expression des gènes correspondant pour chacun des 17 échantillons séquencés. Pour cela nous avons fait des dendrogrammes des échantillons en fonction des gènes ribosomiques ou mitochondriaux (Figures 58 et 59). Cette représentation permet de voir la distribution des échantillons en fonction de l'expression des gènes sélectionnés.



**Figure 58 : Dendrogrammes des gènes ribosomiques surexprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».** Les valeurs utilisées sont le nombre de *reads* normalisé par la taille du gène qui ont subi une normalisation centrée-réduite pour chaque gène. Cela permet de mettre en valeur les variations d'un même gène pour l'ensemble des échantillons séquencés. **A.** Regroupement par échantillons. On observe que les échantillons HCL (6, 7 et 8) tendent à se regrouper du fait d'une plus faible expression des gènes ribosomiques sélectionnés. **B.** Expression de chaque gène ribosomique par comparaison. Le groupe PTCS sous-exprime (de façon non-significative) les différents gènes par rapport au groupe HCS tandis qu'à l'inverse, le groupe PTCL surexprime la moitié de ces gènes comparativement au groupe HCL. On remarque que l'autre moitié est plutôt peu exprimée.



**Figure 59 : Dendrogramme des échantillons en fonction des gènes mitochondriaux surexprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».** Les valeurs utilisées sont le nombre de *reads* normalisé par la taille du gène qui ont subi une normalisation centrée-réduite pour chaque gène. Cela permet de mettre en valeur les variations d'un même gène pour l'ensemble des échantillons séquencés. On constate que les échantillons HCL (8, 6 et 7) se rassemblent du fait d'une plus faible expression de ces gènes.

Les Figures 58 et 59 montrent globalement un regroupement des échantillons HCL, qui expriment moins les gènes ribosomiques et mitochondriaux que les autres échantillons. Ce résultat est également visible, de façon très amoindrie, dans la comparaison « HCL vs HCS »,

où l'on observe quelques gènes ribosomiques sous-exprimés avec la lésion des noyaux ReRh (Figure 45). Cela suggère que la lésion provoque une régulation différentielle des gènes ribosomiques et mitochondriaux.

### **Analyse des gènes surexprimés : conclusion**

Ces analyses nous amènent à deux conclusions :

Tout d'abord concernant les gènes immédiats, chez le groupe « Sham », l'apprentissage est à l'origine d'une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la transcription, l'apprentissage et la mémoire, tels que les gènes *c-fos*, *egr1* ou *arc*. Ce résultat est cohérent avec la littérature (Cavallaro et al., 2002; Bousiges et al., 2010; Carter et al., 2015; Barry and Commins, 2017). Ceci pourrait avoir un impact direct sur les mécanismes de consolidation de la mémoire spatiale. Chez le groupe « Lésés », la dynamique d'expression des gènes immédiats n'est pas retrouvée avec l'apprentissage (pas de surexpression de ces gènes dans la comparaison PTCL vs HCL).

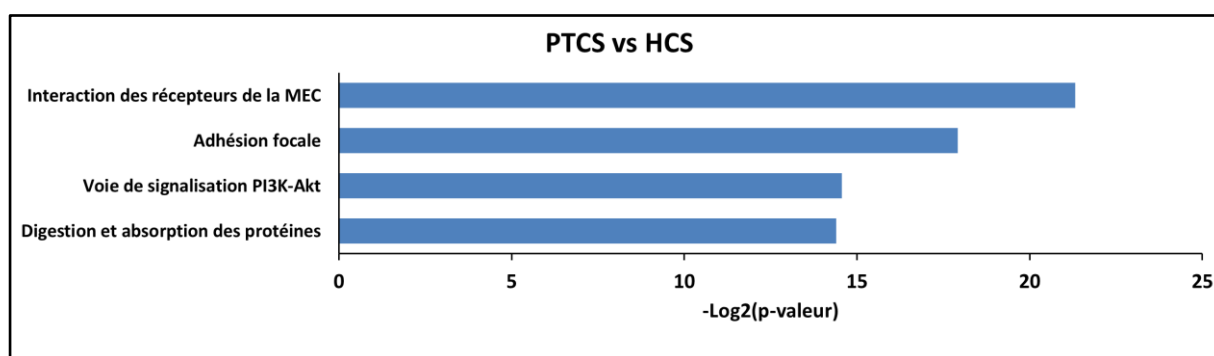
Ensuite, la transcription de gènes impliqués dans la traduction (gènes ribosomiques) et dans les processus métaboliques (gènes mitochondriaux notamment) semblent dérégulés chez le groupe HCL. La lésion des noyaux ReRh provoquerait un déficit de fonctionnement des processus métaboliques à l'état basal. De plus, nous observons que dans un contexte où l'animal est appelé à effectuer un apprentissage (qu'il s'agisse de retrouver une plate-forme visible ou cachée), ces gènes sont surexprimés par rapport au niveau de base. Ainsi, l'activité énergétique dépensée par la cellule, et nécessaire pour obtenir les mêmes performances qu'un animal non-lésé, pourrait être plus importante. L'élévation de cette dépense métabolique semble suffisante pour une mémorisation à long terme récente, mais pourrait se révéler insuffisante pour une mémoire à long terme ancienne stable (Loureiro et al., 2012; Ali et al., 2017).

## 1.3.2.2 – Analyse des gènes sous-exprimés

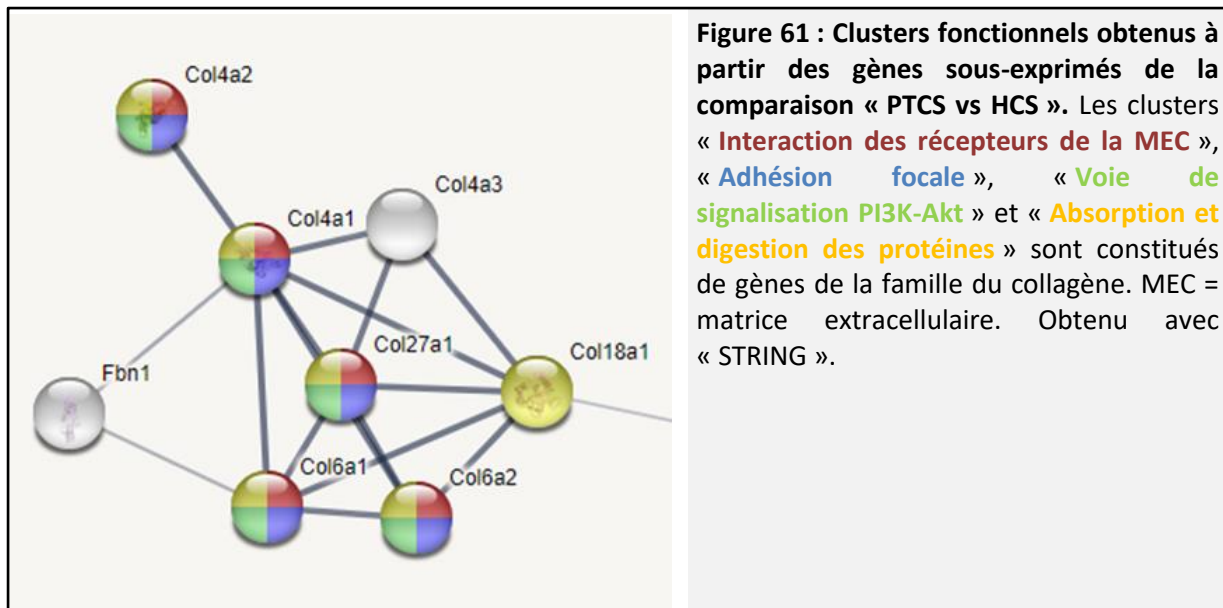
## Groupe « Sham »

	Comparaisons	Nombre de gènes significativement modulés	Nombre de gènes surexprimés	Nombre de gènes sous-exprimés
Lésés vs Sham	HCL vs HCS	20	15	5
	PTCL vs PTCS	12	6	6
	PTVL vs PTVS	12	9	3
Sham	PTCS vs HCS	239	104	135
	PTVS vs HCS	259	86	173
	PTCS vs PTVS	62	43	19
Lésés	PTCL vs HCL	122	45	77
	PTVL vs HCL	715	360	355
	PTCL vs PTVL	129	36	93

L'analyse fonctionnelle des 135 gènes significativement sous-exprimés chez les animaux PTCS par rapport aux animaux HCS met en avant quatre clusters : « **Interaction des récepteurs de la matrice extracellulaire** », « **Adhésion focale** », « **Voie de signalisation PI3K-Akt** » et « **Digestion et absorption des protéines** » (Figures 60 et 61). PI3K (phosphoinositide-3-kinase) et Akt (ou protéine kinase B, une sérine-thréonine kinase) appartiennent à une voie qui régule positivement la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation et qui inhibe l'apoptose (Cantley, 2002; Wymann et al., 2003).



**Figure 60 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes sous-exprimés de la comparaison « PTCS vs HCS ».** L'apprentissage spatial diminue l'expression des gènes impliqués dans des processus en lien avec la MEC, l'adhésion focale, la croissance cellulaire la prolifération ou encore la digestion et l'absorption des protéines. MEC = matrice extracellulaire.

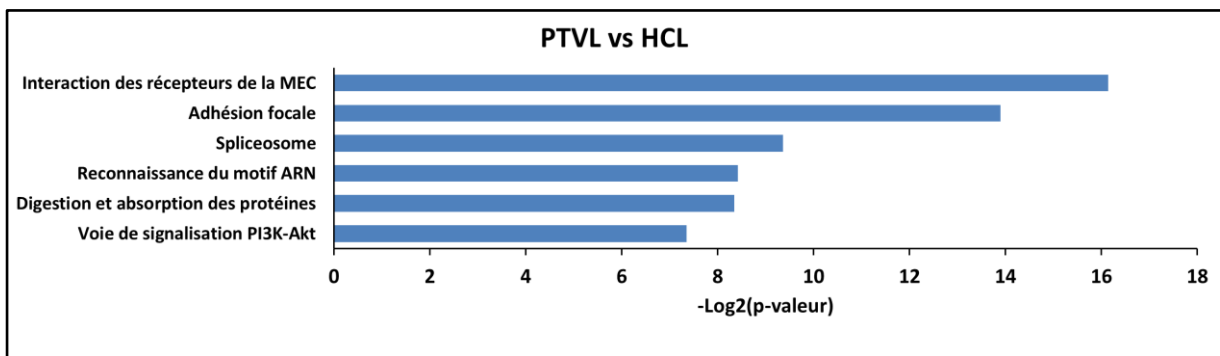


Les protéines de collagène sont les principales protéines de structure de la matrice extracellulaire (MEC). Elles sont classées en deux catégories : forme fibrillaire (types I à III, V et XI) et non-fibrillaire (dont les types IV, VI). Il existe deux principales formes de MEC : la matrice interstitielle, principalement composée de collagène de type I et de fibronectine, qui entoure les cellules pour leur conférer un point d'ancrage, et la membrane basale, riche en collagène de type IV, une forme spécialisée de la MEC qui sépare l'épithélium du stroma environnant (Bonnans et al., 2014). La MEC joue un rôle primordial dans l'adhésion focale grâce aux nombreux récepteurs transmembranaires qu'elle possède (notamment les intégrines). Les protéines de collagène sont dégradées par des enzymes dont les métalloprotéinases (Fields, 2013). A ma connaissance, aucun lien entre une diminution de l'expression du collagène et la mémoire spatiale n'a été montré. Ces clusters sont également trouvés parmi les 173 gènes de la comparaison « PTVS vs HCS ». Ces régulations pourraient ne pas être spécifiquement liées à la mémoire spatiale, mais plutôt à l'environnement tel que la nage.

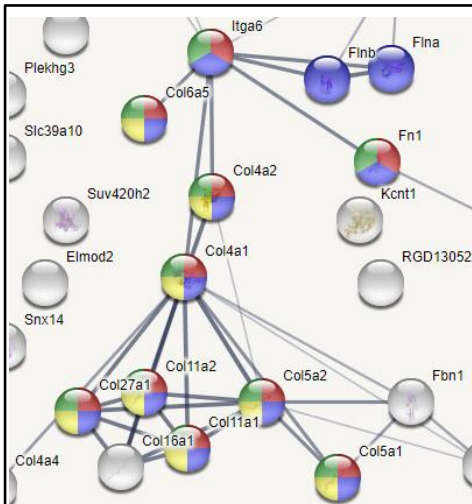


### Groupe « Lésés »

L'analyse fonctionnelle des 77 gènes sous-exprimés chez les PTCL par rapport aux HCL ne montre pas de regroupement fonctionnel, que ce soit avec le logiciel « STRING » ou « DAVID ». Nous avons néanmoins analysé les 355 gènes de la comparaison « PTVL vs HCL ». Nous avons retrouvé les quatre mêmes clusters que ceux du groupe « Sham », à savoir « Interaction des récepteurs de la matrice extracellulaire », « Adhésion focale », « Voie de signalisation PI3K-Akt » et « Digestion et absorption des protéines » (Figures 62 et 63).

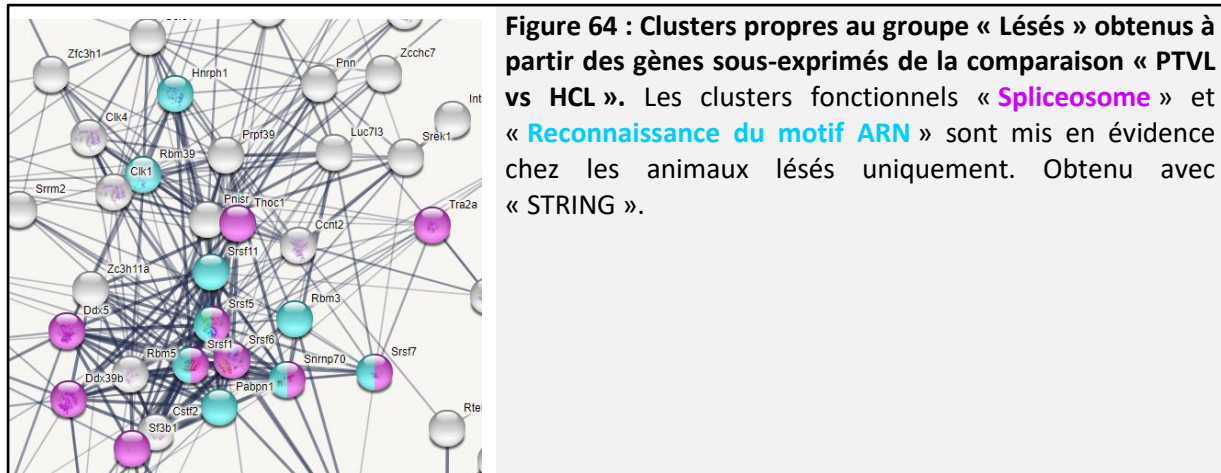


**Figure 62 : Exemples de clusters obtenus avec les gènes sous-exprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».** On retrouve les mêmes clusters que chez le groupe « Sham » additionné du cluster « Spliceosome ». MEC = matrice extracellulaire.



**Figure 63 : Clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes sous-exprimés de la comparaison « PTVL vs HCL ».** Les clusters sont les suivants : « Interaction des récepteurs de la MEC », « Adhésion focale », « Digestion et absorption des protéines » et « Voie de signalisation PI3K-Akt ». Ces clusters sont de nouveau formés par des gènes codant pour des protéines de collagène. Obtenu avec « STRING ».

En plus des quatre clusters précédents sont également présents deux autres clusters propres au groupe « Lésés » : « Spliceosome » associé à « Reconnaissance du motif ARN » (Figure 64).



Le spliceosome est le complexe protéique assurant l'épissage des ARN pré-messagers (Matera and Wang, 2014). Ce complexe reconnaît des sites spécifiques présents sur l'ARN pré-messager, au niveau des jonctions intron-exon, s'y fixe et procède à l'excision de l'intron et à l'accolement des deux exons. Le spliceosome peut également effectuer un épissage dit « alternatif » et n'accoler que certains exons parmi tous ceux présents sur l'ARN pré-messager. Ainsi, pour un même gène, des ARNm matures peuvent être différents suivant leur composition en exons et donner lieu à des protéines aux fonctions différentes ou déterminer leur localisation (Aoto et al., 2013; Kelemen et al., 2013).

De façon intéressante, la protéine DDX5 (ou p68 ; nos données :  $\text{Log}_2(\text{FC}) = -0,35$ ,  $p = 0,02$ ) est étroitement associée à l'expression du gène *c-fos*. DDX5 est une ARN hélicase, c'est-à-dire une protéine qui utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP ou du GTP pour catalyser l'ouverture des acides nucléiques de l'ADN ou de l'ARN double brin (Linder, 2006). DDX5 agit comme un co-régulateur transcriptionnel de plusieurs FT. Lorsque la protéine est recrutée par des FT au niveau de ses promoteurs cibles, elle peut recruter des HAT tels que CBP ainsi que l'ARNpolII (Rossow and Janknecht, 2003). DDX5 est également un composant du spliceosome (Lin et al., 2005) et pourrait jouer un rôle dans l'export des ARNm matures. Une étude montre que la présence de DDX5 est nécessaire pour l'activation complète de la transcription du gène *c-fos*, l'épissage et l'exportation de son ARN pré-messager vers le cytoplasme où il sera traduit (Zonta et al., 2013). Dans une autre étude, Poplawski et collaborateurs (2016) ont montré que le gène *rbm3* (*RNA binding motif protein 3* ; Nos données :  $\text{Log}_2(\text{FC}) = -0,42$ ,  $p = 0,01$ ) était régulé au cours de la consolidation d'un souvenir de peur au contexte. De façon plus précise, suivant le contexte dans lequel est placé l'animal



(contexte seul ou association contexte-choc), l'épissage de l'ARN pré-messager du gène *rbm3* diffère. Une forme est surexprimée en réponse à l'activité hippocampique non-spécifique de la consolidation (en réponse au contexte seul), et une autre est sous-exprimée en réponse à l'apprentissage (association contexte-choc) (Poplawski et al., 2016). Dans notre cas, le gène *rbm3* est sous-exprimé uniquement chez le groupe PTVL comparé au groupe HCL. Il pourrait être intéressant de regarder quelle est la forme qui est ici sous-exprimée.

Aucune étude n'a montré de lien précis entre une dérégulation du spliceosome, ou de l'un de ses composants, avec la mémoire spatiale. Néanmoins, les deux études citées précédemment montrent que l'épissage joue un rôle important dans les processus mnésiques.

### **Analyse des gènes sous-exprimés : conclusion**

Chez le groupe « Sham », l'exposition à un nouvel environnement est associée à une sous-expression de gènes codant pour des protéines de collagène, une des principales composantes de la MEC.

Chez le groupe « Lésés », l'expression de certains gènes codant pour des protéines de collagène est également sous-exprimée lorsque l'animal est exposé à un nouvel environnement (« PTVL vs HCL »), mais pas au cours de l'apprentissage (« PTCL vs HCL »). Cependant, la lésion des noyaux ReRh entraîne une sous-expression de gènes codant pour des composants du spliceosome dont la fonction est d'épisser les ARNm afin de les rendre matures pour la traduction.

## **1.4 – Conclusion générale sur le séquençage des ARNm de CA1 dorsal**

Au cours d'une tâche de mémoire spatiale, en l'absence de lésion, des gènes immédiats sont positivement régulés afin de permettre une transcription des gènes tardifs, support de la consolidation mnésique (Guzowski et al., 2001; Lonergan et al., 2010; Bero et al., 2014).

En l'absence des noyaux ReRh, plusieurs fonctions cellulaires semblent perturbées. Tout d'abord, les gènes immédiats ne sont plus significativement induits avec l'apprentissage ce qui traduit une dérégulation de la dynamique liée à la mémorisation. De plus, les résultats montrent une dérégulation du système de traduction et de maturation des ARNm, puisque

des gènes codant pour des sous-unités ribosomales sont surexprimés et des composants du complexe d'épissage des ARN pré-messagers sont sous-exprimés en réponse au test comportemental chez les rats « Lésés ». Ces dérégulations peuvent être liées à celle des processus métaboliques, comme des mitochondries, dont les gènes codant leurs sous-unités sont surexprimés chez les animaux lésés entraînés en piscine. Cela pourrait traduire un effort supplémentaire de la part des cellules pour maintenir une activité optimale pour l'encodage du souvenir. Néanmoins, bien que cet effort permette de consolider un souvenir récent, il serait insuffisant pour consolider un souvenir ancien.

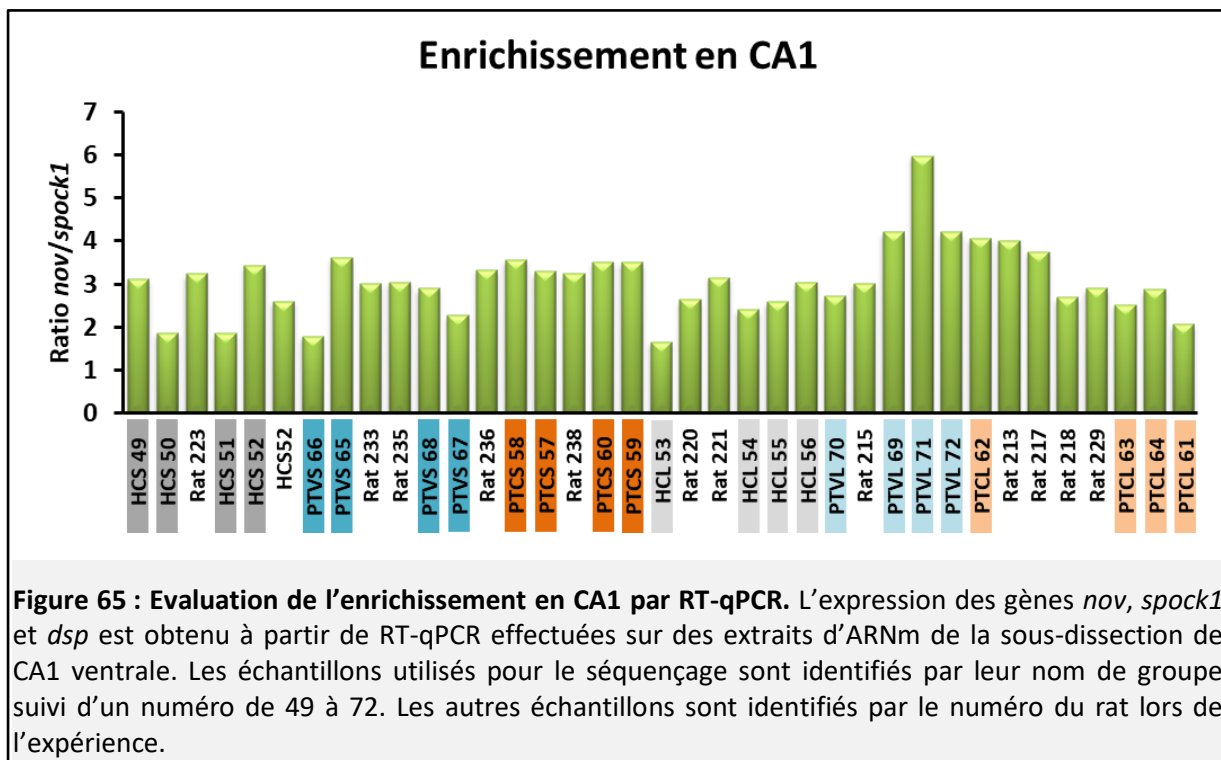
Ces résultats, bien que très intéressants, ne concernent que l'expression des gènes. Pour savoir si les dérégulations de la transcription se répercutent au niveau fonctionnel, il faudrait dans un premier temps également estimer l'état des protéines correspondantes, par Western blot par exemple. De plus, nous n'avons pas pu valider par RT-qPCR l'expression de certains gènes tels que les gènes ribosomiques et mitochondriaux. L'idéal serait de le faire sur un groupe de rats indépendants (la validation de l'expression des gènes immédiats a été faite sur des groupes d'échantillons comprenant ceux séquencés additionnés de quelques autres de la même expérience). Malgré tout, ces résultats sont un premier pas vers la compréhension de l'impact de la lésion des noyaux ReRh sur l'absence de rappel d'un souvenir spatial ancien.

## 2 – Le séquençage de CA1 ventral

Le séquençage des ARNm de la sous-région CA1 de l'hippocampe ventral a été réalisé sur des échantillons provenant des rats ayant servi à récupérer l'hippocampe dorsal à l'exception d'un (qui a été remplacé par un échantillon de qualité équivalente). Les groupes sont donc identiques à ceux analysés pour CA1 dorsal, à savoir HCS (49 à 52), HCL (53 à 56), PTCS (57 à 60), PTCL (61 à 64), PTVS (65 à 68) et PTVL (69 à 72).

### 2.1 – Evaluation de la qualité de la sous-dissection

De la même façon que pour le séquençage de CA1 dorsal, j'ai analysé la qualité de la sous-dissection des 37 échantillons de CA1 ventral. Après extraction, j'ai effectué des RT-qPCR afin de quantifier l'expression des gènes caractéristiques de chaque sous-région hippocampiques (*nov*, *spock1* et *dsp*). Idéalement, il aurait fallu réaliser l'extraction dans chacune des trois sous-régions afin de calculer l'expression des trois gènes dans chacune de ces trois sous-régions. Comme cela n'a pas été fait, j'ai simplement effectué un ratio des quantités obtenues entre *nov* et *spock1* (l'expression du gène *dsp* était négligeable) (Figure 65) et j'ai comparé les échantillons entre eux.

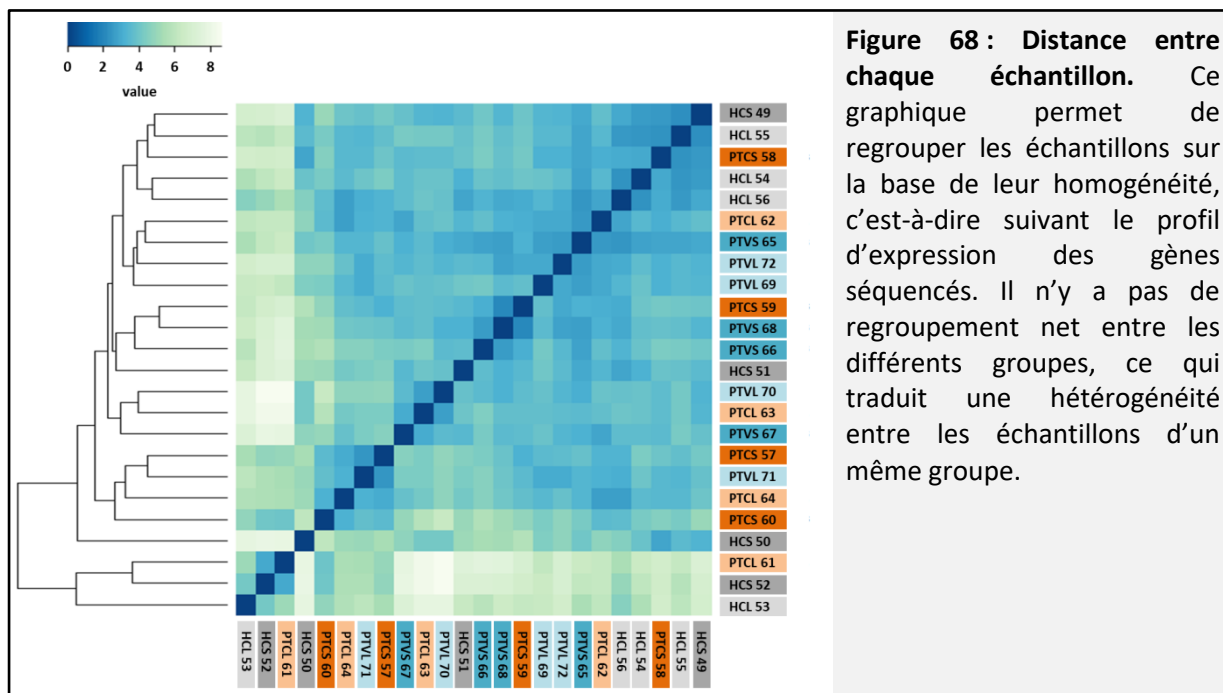




	Comparaisons	Nombre de gènes significativement modulés	Nombre de gènes surexprimés	Nombre de gènes sous-exprimés
Lésés vs Sham	HCL vs HCS	0	0	0
	PTCL vs PTCS	0	0	0
	PTVL vs PTVS	57	22	35
Sham	PTCS vs HCS	13	11	2
	PTVS vs HCS	11	7	4
	PTCS vs PTVS	55	19	36
Lésés	PTCL vs HCL	35	19	16
	PTVL vs HCL	360	131	229
	PTCL vs PTVL	5	5	0

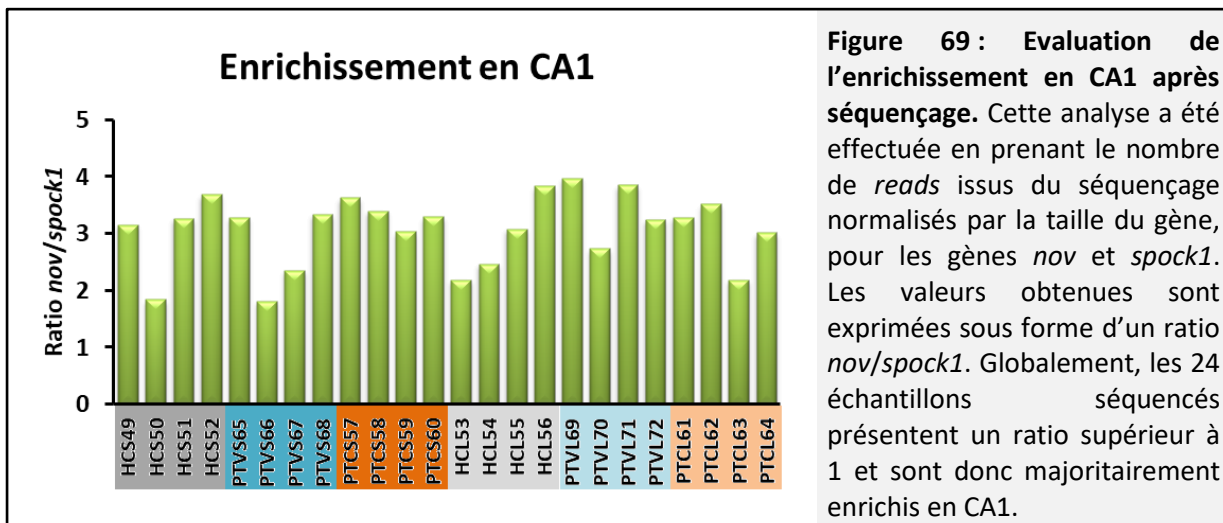
Figure 67 : Tableau du nombre de gènes significativement modulés pour les différentes comparaisons. Les critères de significativité sont un  $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 0$  pour les gènes surexprimés et un  $\text{Log}_2(\text{FC}) \leq 0$  pour les gènes sous-exprimés, avec une  $p$ -valeur  $\leq 0,05$  dans les deux cas.

Une analyse de la distance entre chaque échantillon, basée sur les niveaux d'expression de l'ensemble des gènes, met en évidence une hétérogénéité des échantillons au sein d'un même groupe (Figure 68).

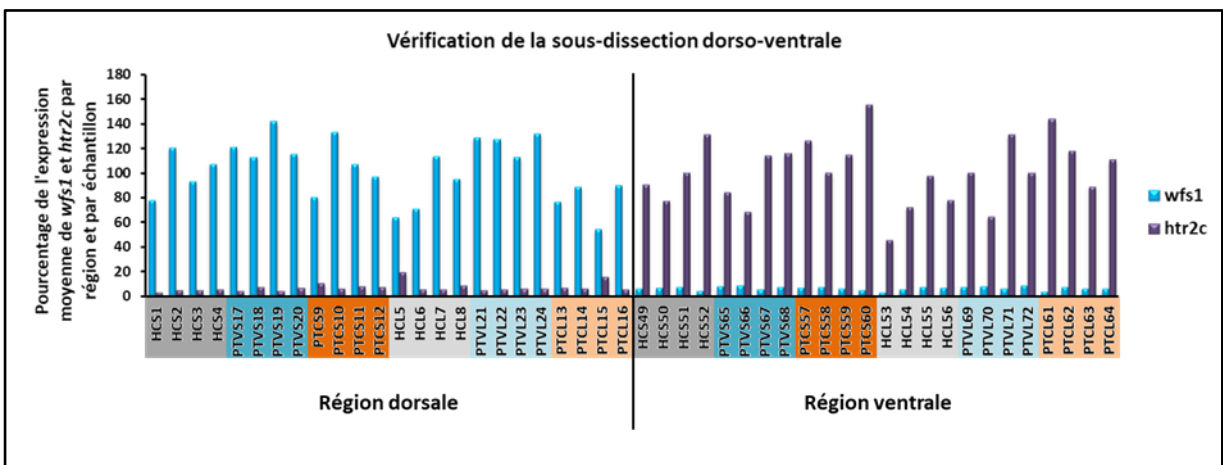


En effet, les échantillons d'un même groupe ne sont pas regroupés entre eux. De plus, l'analyse ne permet pas de ségréger les groupes HC d'une part et les groupes PTV et PTC d'autre part, comme c'était le cas pour les échantillons de CA1 dorsal. Nous avons donc

utilisé les données du séquençage pour, de nouveau, regarder l'enrichissement en CA1 (Figure 69) et HV (Figure 70) afin de s'assurer que l'hétérogénéité ne provienne pas de la présence d'échantillons mal sous-disséqués (comme pour CA1 dorsal).



Les valeurs du ratio *nov/spock1* sont plus élevées que celles obtenues pour CA1 dorsal ce qui suggère un bon enrichissement en CA1 (peut-être même un meilleur enrichissement que dans CA1 dorsal).

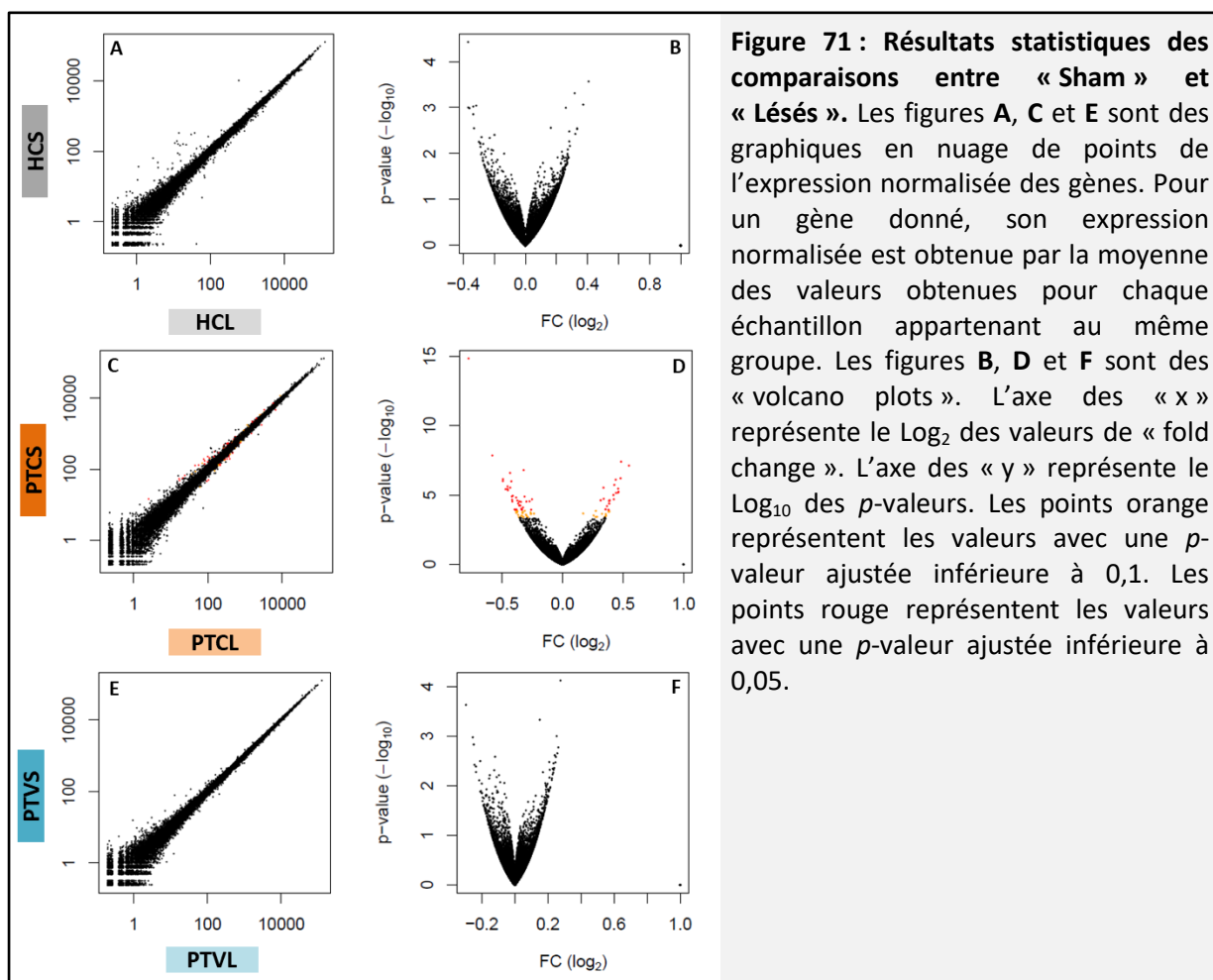


L'enrichissement en HV est également très bon (Figure 70). L'hétérogénéité des résultats obtenus (Figures 67 et 68) ne semblerait donc pas liée à la présence d'échantillons présentant une mauvaise sous-dissection. Quoi qu'il en soit, cette hétérogénéité pourrait simplement rendre compte du fait qu'il y a peu de gènes significativement modulés dans

cette structure, que ce soit en réponse à la lésion, ou à l'apprentissage. Ce dernier point serait en accord avec une plus forte implication de CA1 dorsal dans la formation d'une mémoire spatiale (Fanselow and Dong, 2010; Hunsaker et al., 2008; Klur et al., 2009; Moser et al., 1993, 1995).

### 2.2.1 – Effets de la lésion

L'analyse statistique révèle un total de 57 gènes significativement modulés en réponse à la lésion des noyaux ReRh, mais retrouvés seulement dans la comparaison « PTVL vs PTVS » (Figures 67, 71, 72 et 73).



Gènes surexprimés			Log2(FC)	p-valeur ajustée
PTVL vs PTVS	Myom3	myomesin 3	0,55	4,1E-04
	Nxph3	neurexophilin 3	0,48	2,9E-04
	XAF1	XIAP associated factor-1	0,48	1,9E-03
	Ctgf	connective tissue growth factor	0,46	6,3E-03
	Gpr88	G-protein coupled receptor 88	0,46	4,6E-03
	Bhmt	betaine-homocysteine S-methyltransferase	0,46	7,0E-03
	Ccdc180	coiled-coil domain containing 180	0,44	7,1E-03
	Mmp9	matrix metalloproteinase 9	0,44	1,9E-03
	Cplx3	complexin 3	0,43	3,4E-03
	Chrna5	cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit	0,42	1,5E-02
	Grm8	glutamate metabotropic receptor 8	0,42	9,5E-03
	Crabp1	cellular retinoic acid binding protein 1	0,39	1,6E-02
	Klhdc8a	kelch domain containing 8A	0,39	1,6E-02
	Cbln2	cerebellin 2 precursor	0,39	1,6E-02
	Oma1	OMA1 zinc metalloproteinase	0,39	2,1E-02
	Rab38	RAB38, member RAS oncogene family	0,38	5,0E-02
	Filip1l	filamin A interacting protein 1-like	0,38	4,5E-02
	Coro6	coronin 6	0,37	3,0E-02
	Rgs4	regulator of G-protein signaling 4	0,36	4,5E-02
	Hivep1	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	0,34	1,5E-02
Mapk11	mitogen-activated protein kinase 11	0,34	4,3E-03	
Pbx3	pre-B-cell leukemia homeobox 3	0,32	1,6E-02	

**Figure 72 : Tableau des gènes surexprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh.** La lésion induit une surexpression des gènes uniquement chez le groupe PTVL par rapport au groupe PTVS. L'analyse fonctionnelle de cette liste de gènes ne permet pas d'obtenir de clusters fonctionnels significatifs.  $\text{Log}_2(\text{FC}) \geq 0$ ,  $p$ -valeur  $\leq 0,05$ . FC = fold change.

Gènes sous-exprimés			Log2(FC)	p-valeur ajustée
PTVL vs PTVS	Ghdc	GH3 domain containing	-0,78	3,2E-11
	Epha8	Eph receptor A8	-0,58	1,6E-04
	Sema3c	semaphorin 3C	-0,49	2,1E-03
	Tnnt1	troponin T1, slow skeletal type	-0,49	1,9E-03
	Nhlh1	nescient helix loop helix 1	-0,47	4,7E-03
	Col11a1	collagen, type XI, alpha 1	-0,45	4,6E-03
	Tbc1d8b	TBC1 domain family member 8B	-0,45	4,0E-03
	Plekha2	pleckstrin homology domain containing A2	-0,45	5,2E-03
	Bhlhe22	basic helix-loop-helix family, member e22	-0,43	9,4E-04
	Chst9	carbohydrate sulfotransferase 9	-0,43	4,3E-03
	Pcdh20	protocadherin 20	-0,42	2,1E-03
	St18	suppression of tumorigenicity 18	-0,42	1,1E-02
	Rasgrf2	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2	-0,42	1,5E-02
	Svep1	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1	-0,41	1,6E-02
	Vwa5b1	von Willebrand factor A domain containing 5B1	-0,41	1,0E-02
	Foxo6	forkhead box O6	-0,40	4,5E-02
	Arg1	arginase 1	-0,39	4,5E-02
	AC142182.1		-0,38	1,2E-02
	Calml4	calmodulin-like 4	-0,38	4,5E-02
	Mex3b	mex-3 RNA binding family member B	-0,37	1,6E-02
	Cfap43	cilia and flagella associated protein 43	-0,37	2,1E-02
	Dnah1	dynein, axonemal, heavy chain 12	-0,36	2,8E-02
	Neurod1	neuronal differentiation 1	-0,36	1,6E-02
	Dock10	dedicator of cytokinesis 10	-0,35	2,8E-02
	Htr1a	5-hydroxytryptamine receptor 1A	-0,34	1,7E-02
	Plpp4	phospholipid phosphatase 4	-0,34	4,5E-02
	Rgs13	regulator of G-protein signaling 13	-0,34	4,5E-02
	Kctd4	potassium channel tetramerization domain containing 4	-0,34	4,5E-02
	Ak9	adenylate kinase 9	-0,33	3,7E-02
	Fam84a	family with sequence similarity 84, member A	-0,32	7,0E-04
	Dgkb	diacylglycerol kinase, beta	-0,31	1,1E-02
	Abhd17c	abhydrolase domain containing 17C	-0,30	1,6E-02
	Serp1	Serpine1 mRNA binding protein 1	-0,27	1,6E-02
Cdhr3	cadherin-related family member 3	-0,26	4,5E-02	
Hn1	hematological and neurological expressed 1	-0,25	1,5E-02	

**Figure 73 : Tableau des gènes sous-exprimés en réponse à la lésion des noyaux ReRh.** Tout comme pour les gènes surexprimés, seuls les animaux PTVL sous-expriment des gènes comparés aux animaux PTVS, mais ceux-ci ne sont pas regroupés en un cluster fonctionnel particulier.  $\text{Log}_2(\text{FC}) \leq 0$ ,  $p$ -valeur  $\leq 0,05$ . FC = fold change.



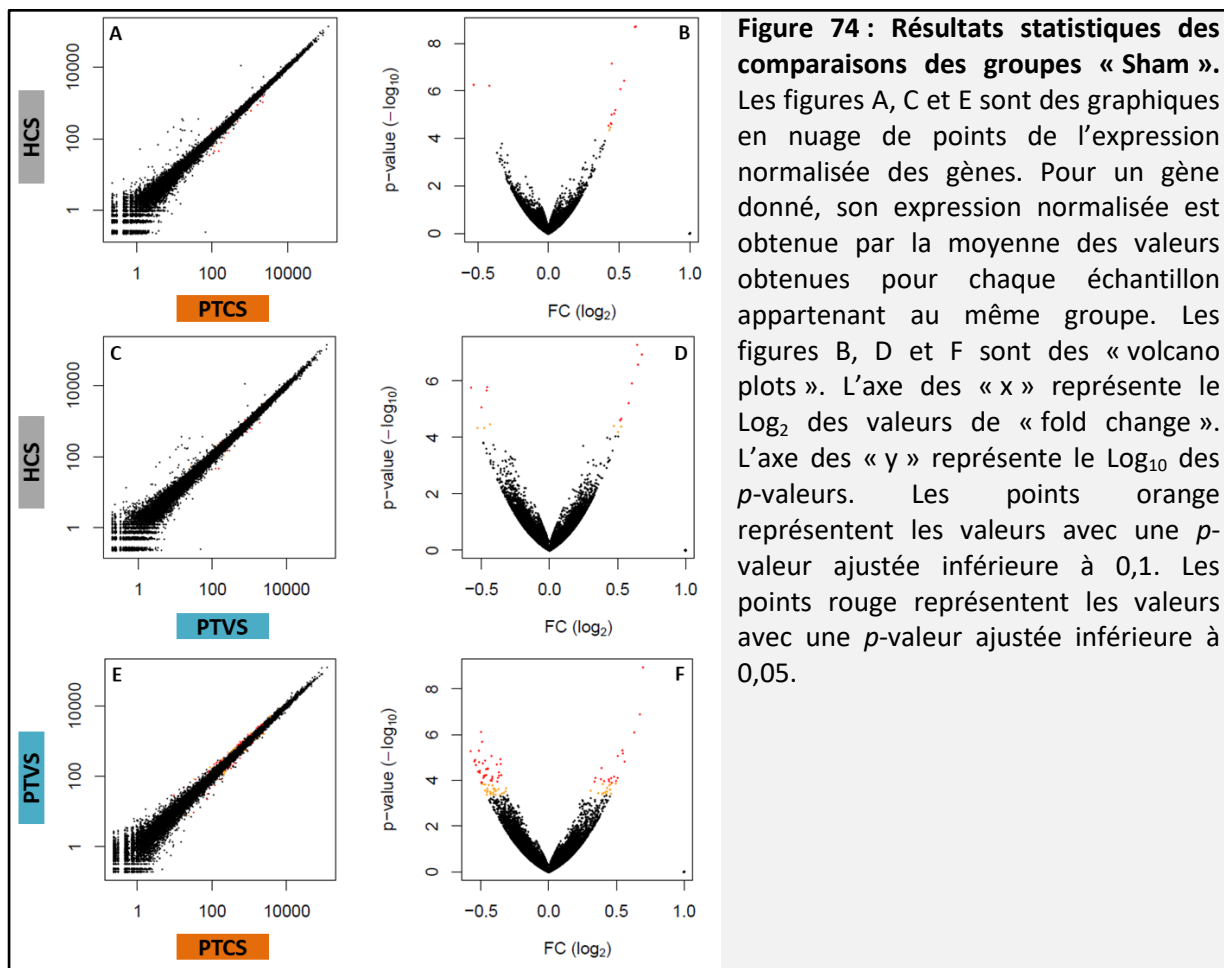
Que ce soit pour les gènes surexprimés ou sous-exprimés, l'analyse fonctionnelle avec les logiciels « STRING » et « DAVID » ne permet pas d'obtenir de clusters fonctionnels particuliers. Si un effet de la lésion des noyaux ReRh est présent au sein de CA1 ventral, il n'est pas rendu visible par une comparaison directe entre les animaux « Lésés » et « Sham » de chaque condition expérimentale.

## 2.2.2 – Effets de l'apprentissage

### 2.2.2.1 – Analyse des gènes surexprimés

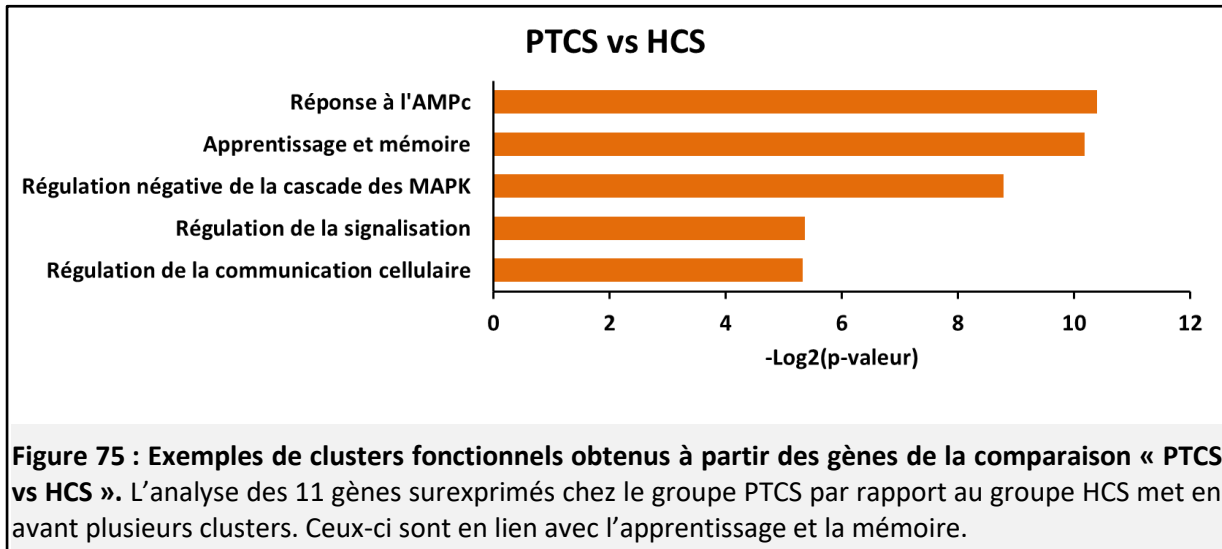
#### Groupe « Sham »

Peu de gènes sont significativement modulés chez les animaux « Sham », aussi bien chez le groupe PTCS (11) que PTVS (7) (Figures 67 et 74).

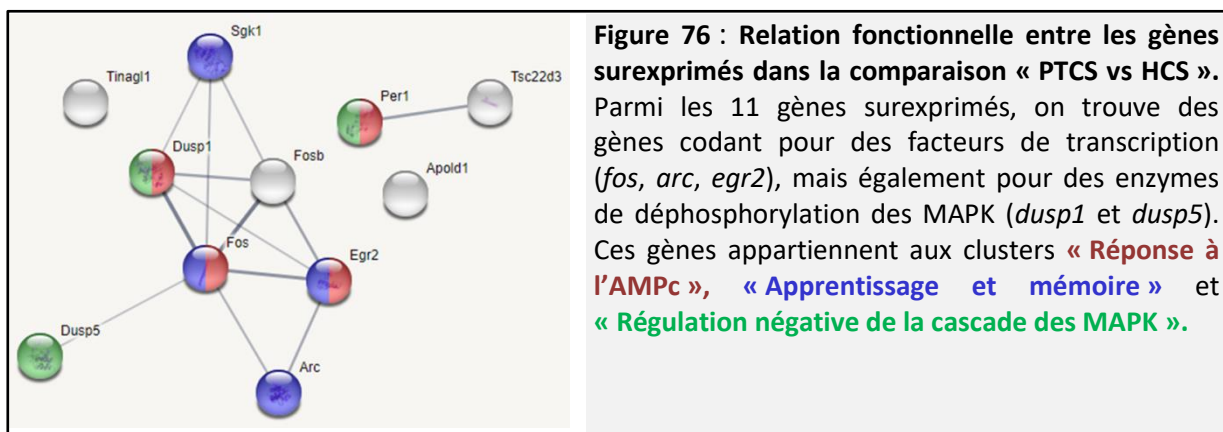


Le groupe PTCS surexprime 11 gènes comparé au groupe HCS. L'analyse fonctionnelle de ces 11 gènes met en avant différents clusters, dont « Réponse à l'AMPC », « Apprentissage et

mémoire » ou encore « **Régulation de la communication cellulaire** » (Figure 75). Les clusters « **Réponse à l'AMPC** » et « **Apprentissage et mémoire** » ressortent également lors de l'analyse des gènes surexprimés chez le groupe PTCS au sein de CA1 dorsal. Ces clusters semblent donc cohérents avec la tâche effectuée par les animaux, à savoir un apprentissage spatial.



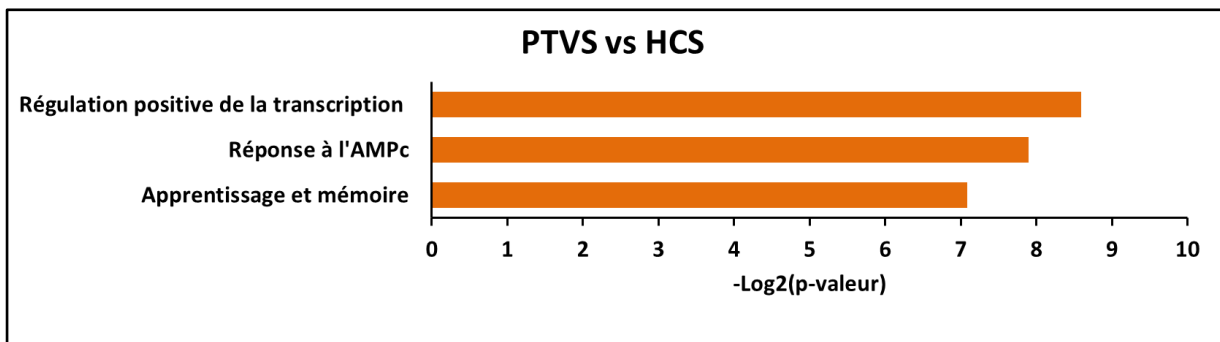
Il faut noter que les clusters « **Réponse à l'AMPC** », « **Apprentissage et mémoire** » sortent significativement par la présence des gènes codant les FT *c-fos* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 1,63$  ;  $p = 2,2 \cdot 10^{-5}$ ), *egr2* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 1,43$  ;  $p = 2,6 \cdot 10^{-3}$ ) et *arc* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 0,91$  ;  $p = 0,02$ ). Cependant, on retrouve également des gènes de la famille des *dusp* (*dual specificity protein phosphatase*) qui codent pour des enzymes qui déphosphorylent les MAPK (Figure 76).



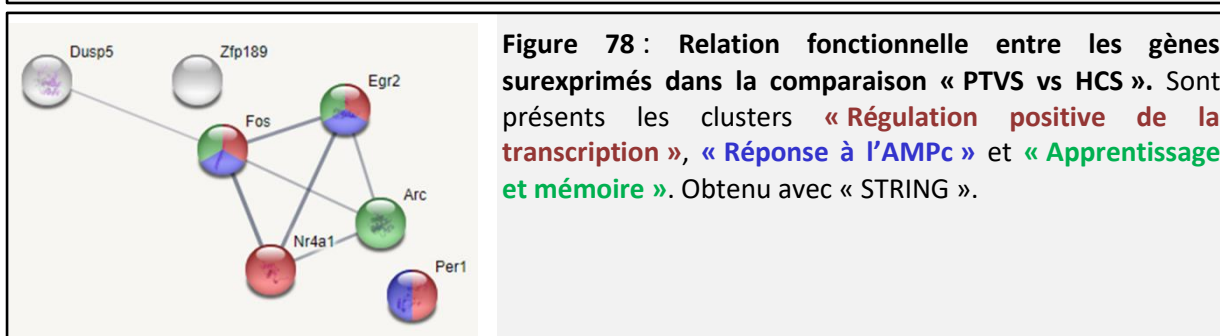
Les protéines DUSP, en déphosphorylant les MAPK, contrôlent la durée d'activation de ces enzymes. Les MAPK sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la réponse au stress ou encore l'apoptose (Sun et al., 2015). Un dérèglement des protéines DUSP peut augmenter ou diminuer la période d'activité des

MAPK, avec pour conséquence une perturbation des fonctions cellulaires (Owens and Keyse, 2007). C'est pourquoi ces dernières années les protéines DUSP, et plus particulièrement DUSP1, sont étudiées pour leur implication dans les cancers (Keyse, 2008; Shen et al., 2016). Les gènes *dusp* (notamment *dusp4* et *dusp6*) sont des cibles des facteurs de transcription CREB, c-Fos et Zif268 (Benito et al., 2011). Cependant, aucune étude n'a mis en évidence un lien direct entre l'activité des gènes *dusp* et la mémoire spatiale.

Les clusters « **Apprentissage et mémoire** » ainsi que « **Réponse à l'AMPc** » sont également trouvés lorsque l'analyse fonctionnelle est effectuée sur les 7 gènes surexprimés par le groupe PTVS comparé au groupe HCS (Figure 77). Cela est dû à la présence des 4 gènes communs *c-fos* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 1,6$  ;  $p = 1,3 \cdot 10^{-3}$ ), *arc* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 1,1$  ;  $p = 1,9 \cdot 10^{-3}$ ), *egr2* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 1,5$  ;  $p = 0,02$ ) et *per1* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 0,9$  ;  $p = 0,048$ ) (Figure 78).

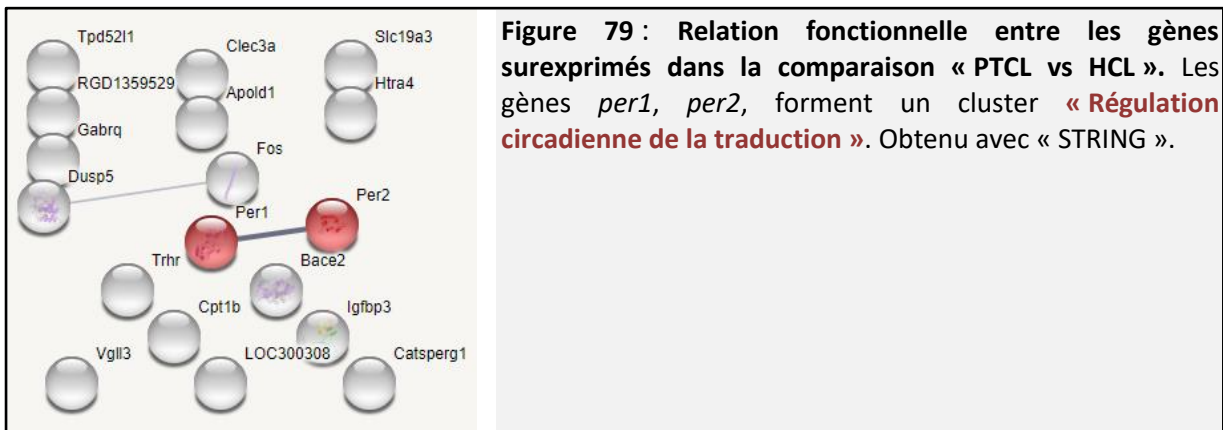


**Figure 77 : Exemples de clusters fonctionnels obtenus à partir des gènes de la comparaison « PTVS vs HCS ».** Les clusters obtenus sont en lien avec l'apprentissage et la mémoire, tout comme ceux du groupe PTCS.

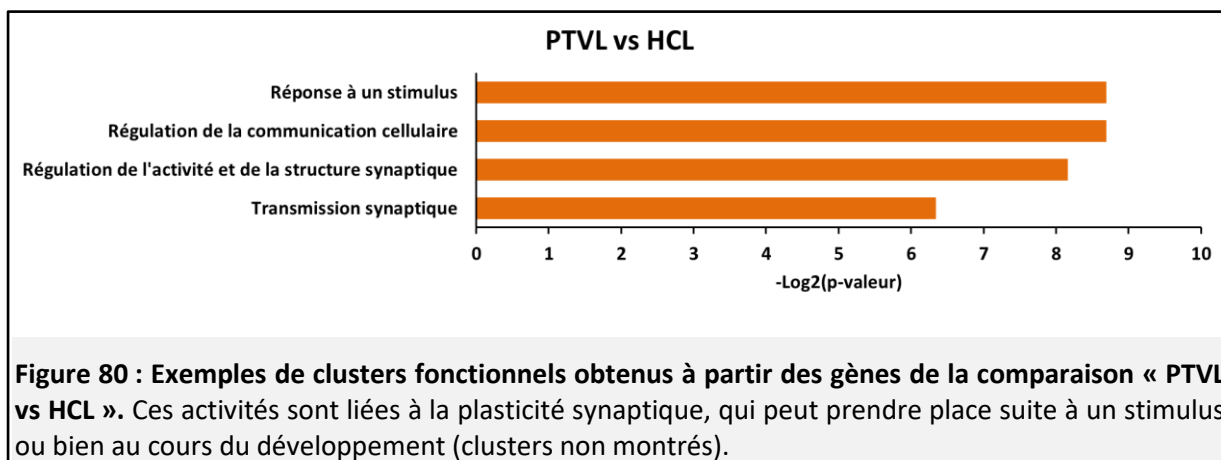


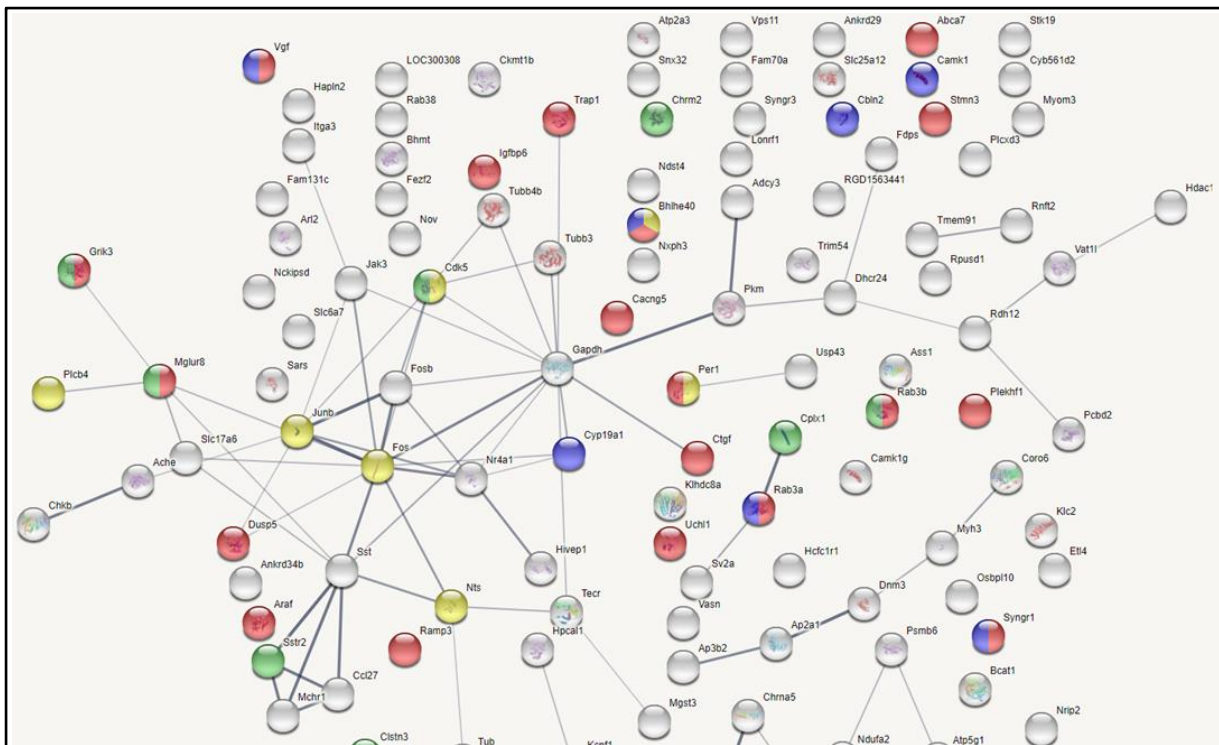
### Groupe « Lésés »

La comparaison « PTCL vs HCL » compte 19 gènes et seul un groupe fonctionnel sort significativement : « **Régulation circadienne de la traduction** ». Ce cluster n'est formé que par les deux gènes *per1* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 0,51$  ;  $p = 0,04$ ) et *per2* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 0,35$  ;  $p = 0,04$ ). (Figure 79).



La comparaison « PTVL vs HCL » contient plus de gènes, 131 au total (Figure 67). Dans l'ensemble, ces gènes appartiennent à des processus synaptiques, pouvant avoir lieu suite à un stimulus ou bien au cours du développement (des clusters en lien avec le développement nerveux, anatomique, et des systèmes ressortent de l'analyse ; données non montrées) (Figure 80). Néanmoins, la puissance statistique de ces clusters n'est pas aussi forte que celle des clusters trouvés chez les rats « Lésés » au sein de CA1 dorsal. De plus, les liens entre les gènes d'un même cluster sont plutôt faibles (Figure 81).





**Figure 81 : Relation fonctionnelle entre les gènes surexprimés dans la comparaison « PTVL vs HCL ».** Sont représentés les clusters « Réponse à un stimulus », « Régulation de la communication cellulaire », « Régulation de l'activité et de la structure synaptique » et « Transmission synaptique ». Les gènes appartenant à ces clusters présentent néanmoins de faibles interactions physiques et/ou fonctionnelles les uns avec les autres. Obtenu avec « STRING ».

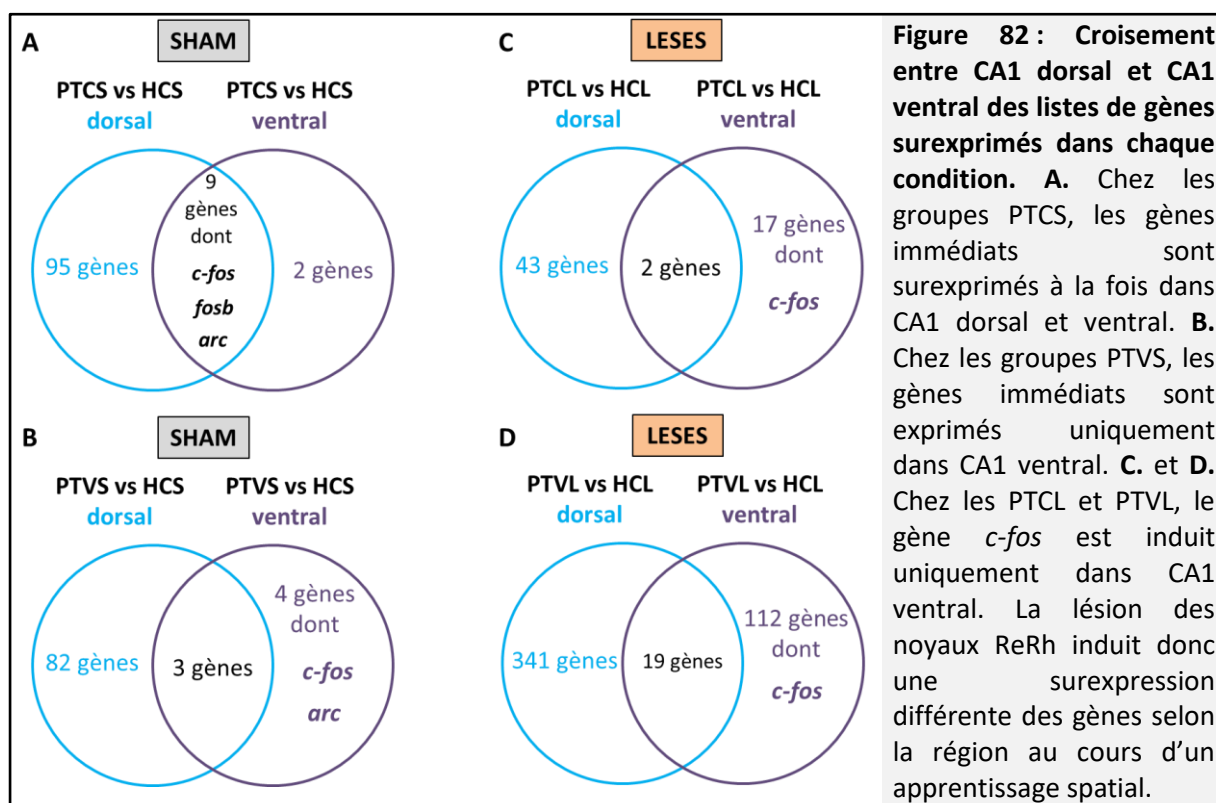
Ces clusters peuvent être mis en relation avec la plasticité synaptique et sont cohérents avec un apprentissage (Whitlock et al., 2006; Kennedy, 2013; Nabavi et al., 2014). Bien que ces groupes fonctionnels soient différents de ceux observés chez les groupes « Sham », nous retrouvons des gènes immédiats comme *c-fos* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 1,16$  ;  $p = 1.10^{-13}$ ), *fosb* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 0,41$  ;  $p = 0,049$ ), et *junb* ( $\text{Log}_2(\text{FC}) = 0,46$  ;  $p = 0,048$ ). Il semblerait donc que la lésion des noyaux ReRh n'ait pas eu de conséquences majeures sur le fonctionnement de CA1 ventral.

### 2.2.2.2 – Comparaison entre CA1 dorsal et ventral concernant les gènes surexprimés

Tout d'abord, il y a moins de gènes surexprimés dans la région ventrale en réponse à un stimulus par rapport à la région dorsale. Cela suggère que l'apprentissage (qui, dans notre cas, consiste à localiser une plate-forme, visible ou cachée, afin de se soustraire à un environnement aversif) sollicite CA1 dorsal de façon prépondérante à ce délai de trois jours.

Il existe une similitude entre les deux régions hippocampiques, que l'on trouve chez le groupe « Sham ». En effet, aussi bien dans la région dorsale que ventrale, des gènes immédiats sont induits en réponse à l'apprentissage ; c'est le cas pour *c-fos* et *arc* (Figure 82). La présence de ces gènes immédiats fait ressortir dans les deux cas des groupes fonctionnels en relation avec la transcription, l'apprentissage et la mémoire.

De façon intéressante, plusieurs différences sont présentes entre CA1 dorsal et CA1 ventral chez les groupes « Lésés ». Tout d'abord, au niveau de l'expression des gènes immédiats. En effet, au sein de CA1 dorsal, les gènes immédiats ne sont pas induits en réponse à l'apprentissage (PTCL vs HCL), alors que c'est le cas au sein de CA1 ventral chez les groupes PTCL et PTVL, où *c-fos*, *fosb* et *junb* sont significativement induits (Figure 82 C et D). L'intégrité des noyaux ReRh semble donc plus importante pour le bon fonctionnement de CA1 dorsal, qui est plus sollicité dans une tâche de mémoire spatiale que CA1 ventral (Klur et al., 2009; Fanselow and Dong, 2010). Ensuite, dans CA1 ventral, nous ne retrouvons pas les groupes fonctionnels « Ribosome » et « Mitochondrie » fortement présents chez les rats « Lésés » dans CA1 dorsal. Une analyse gène par gène révèle même qu'aucun gène codant pour une sous-unité du ribosome n'est dérégulé au sein de CA1 ventral. Le fait que le nombre de connexions entre les noyaux ReRh et CA1 ventral soit bien supérieur à celui des connexions avec CA1 dorsal (Hoover and Vertes, 2012), mais qu'aucune dérégulation des gènes ribosomiques et mitochondriaux ne soit trouvée dans l'HV, indique qu'à ce temps d'investigation (pendant l'encodage) les afférences des noyaux ReRh ne sont sans doute pas sollicitées dans CA1 ventral. Ceci renforce les résultats obtenus dans CA1 dorsal puisque l'on peut en conclure que la dérégulation des gènes ribosomiques et mitochondriaux est bien spécifique de CA1 dorsal à ce moment, et pas simplement une réponse au manque d'afférences venant des noyaux ReRh. Ainsi, les noyaux ReRh participeraient au bon fonctionnement de CA1 dorsal au cours d'un encodage, qui sous-tend une consolidation efficace du souvenir spatial (voir discussion générale).



## 2.2.2.3 – Analyse des gènes sous-exprimés

	Comparaisons	Nombre de gènes significativement modulés	Nombre de gènes surexprimés	Nombre de gènes sous-exprimés
Lésés vs Sham	HCL vs HCS	0	0	0
	PTCL vs PTCS	0	0	0
	PTVL vs PTVS	57	22	35
Sham	PTCS vs HCS	13	11	2
	PTVS vs HCS	11	7	4
	PTCS vs PTVS	55	19	36
Lésés	PTCL vs HCL	35	19	16
	PTVL vs HCL	360	131	229
	PTCL vs PTVL	5	5	0

## Groupe « Sham »

Gènes sous-exprimés			Log2(FC)	p-valeur ajustée
PTCS vs HCS	<i>Adamts1</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	-0,90	2,2E-03
	<i>Sox9</i>	SRY box 9	-0,52	2,2E-03
PTVS vs HCS	<i>Adamts1</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	-0,71	6,2E-03
	<i>Cd180</i>	CD180 molecule	-0,71	2,1E-02
	<i>Crot</i>	carnitine O-octanoyltransferase	-0,62	6,8E-03
	<i>Rasgrp3</i>	RAS guanyl releasing protein 3	-0,63	6,2E-03

**Figure 83 : Tableau des gènes sous-exprimés en réponse à l'apprentissage chez le groupe « Sham ».** Log2(FC) ≤ 0, p-valeur ≤ 0,05. FC = fold change.

Du fait du faible nombre de gènes sous-exprimés, les logiciels « DAVID » et « STRING » ne sont pas capables de faire ressortir des groupes fonctionnels particuliers. Seuls 2 gènes sont sous-exprimés de façon significative chez le groupe PTCS par rapport aux contrôles HCS, tandis que 4 gènes le sont chez le groupe PTVS (Figure 83). Le gène *adamts1* code pour une métalloprotéinase impliquée dans le remodelage de la MEC via la dégradation protéolytique de substrats tels que les protéoglycanes et le collagène (Kelwick et al., 2015). Le gène *sox9* code pour un FT qui régule la différenciation cellulaire à partir des cellules souches, notamment au niveau des testicules, du pancréas, mais également dans le système nerveux central (Stolt and Wegner, 2010). La protéine Sox9 permet, par exemple, d'initier la différenciation des cellules souches en cellules gliales dans la moelle épinière au cours de son développement (Stolt et al., 2003). Le gène *cd180* code pour la protéine RP105, un Toll-like receptor (TLR), exprimée à la membrane des cellules B du système immunitaire où il contribue notamment à son activation (Schultz and Blumenthal, 2016). Enfin, *rasgrp3* est un gène dont la protéine associée est un activateur de la famille des protéines Ras, qui est très présente dans les lymphocytes B (Stone, 2011). Au regard de la littérature, aucun de ces gènes ne semble lié à l'apprentissage ou à la mémoire de façon particulière.



## Groupe « Lésés »

Gènes sous-exprimés			Log2(FC)	p-valeur ajustée
PTCL vs HCL	Klk8	kallikrein related-peptidase 8	-0,70	2,9E-04
	LOC100362830		-0,60	2,4E-02
	Pgm5	phosphoglucomutase 5	-0,55	1,0E-02
	Hpca	hippocalcin-like 4	-0,54	2,8E-02
	Mex3b	mex-3 RNA binding family member B	-0,53	3,8E-02
	Strip2	striatin interacting protein 2	-0,52	3,8E-02
	Wipf3	WAS/WASL interacting protein family, member 3	-0,51	3,8E-02
	Sox2	SRY box 2	-0,49	4,6E-04
	Fkbp9	FK506 binding protein 9	-0,49	1,3E-02
	Snurf	SNRPN upstream reading frame	-0,48	3,8E-02
	LOC100910427		-0,42	1,6E-03
	Fth1	ferritin, heavy polypeptide 1	-0,39	1,6E-03
	Cryab	crystallin, alpha B	-0,38	1,0E-02
	Spry2	sprouty RTK signaling antagonist 2	-0,36	3,1E-02
	Bcas1	breast carcinoma amplified sequence 1	-0,33	3,8E-02
	Ankrd40	ankyrin repeat domain 40	-0,26	3,8E-02

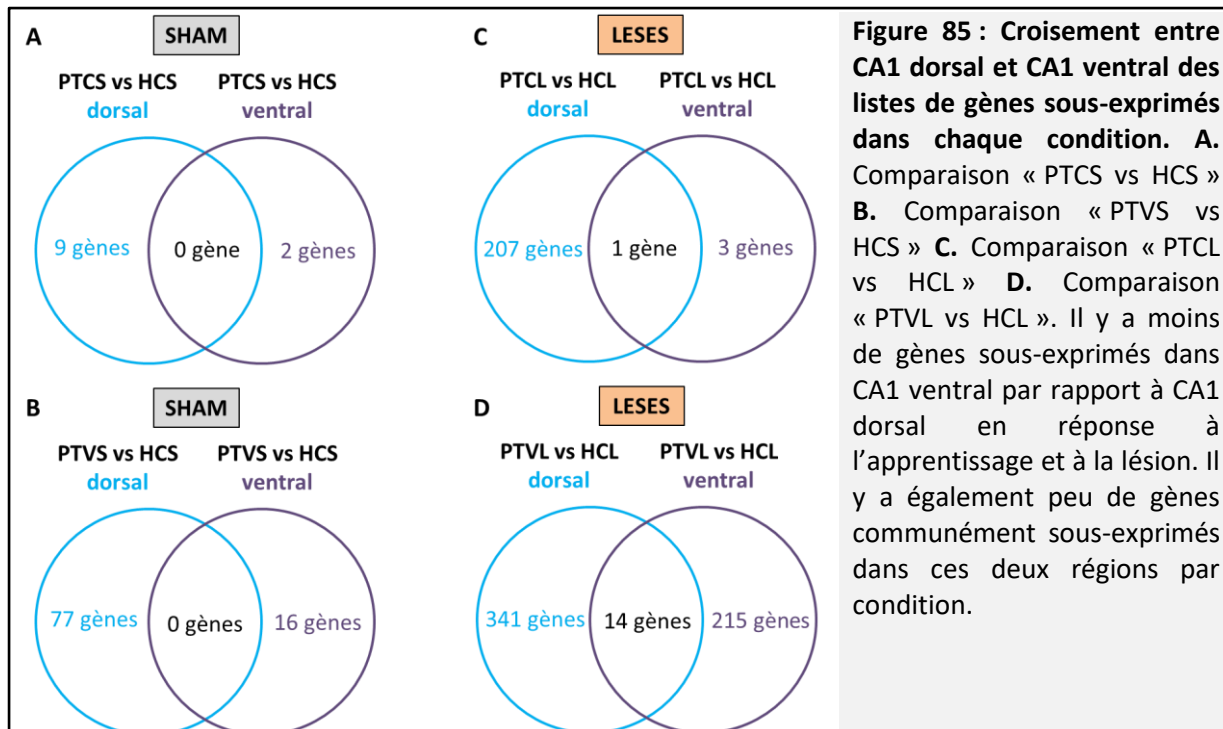
Figure 84 : Tableau des gènes sous-exprimés en réponse à l'apprentissage chez le groupe « Lésés ». Seuls les 16 gènes sous-exprimés de la comparaison « PTCL vs HCL) sont mentionnés.  $\text{Log}_2(\text{FC}) \leq 0$ ,  $p\text{-valeur} \leq 0,05$ . FC = fold change.

Que ce soit pour les 16 gènes de la comparaison « PTCL vs HCL » (Figure 84) ou les 229 de la comparaison « PTVL vs HCL », l'analyse fonctionnelle ne fait ressortir aucun cluster significatif.

#### 2.2.2.4 – Comparaison entre CA1 dorsal et ventral concernant les gènes sous-exprimés

Tout comme pour les gènes surexprimés, il y a beaucoup plus de gènes sous-exprimés dans CA1 dorsal que dans CA1 ventral (Figure 85). Là encore, cela suggère que l'apprentissage sollicite plus la région dorsale que ventrale. La lésion des noyaux ReRh semble avoir un impact limité sur la sous-expression des gènes, que ce soit dans CA1 dorsal ou ventral, puisque dans chacun des deux cas, l'analyse fonctionnelle donne des résultats similaires (clusters proches pour CA1d, absence de cluster pour CA1 ventral).

Comme énoncé pour CA1 dorsal, les résultats obtenus dans CA1 ventral nécessitent d'être validés par RT-qPCR, de préférence sur une cohorte différente afin de s'assurer de la reproductibilité et donc de la force de ces résultats. Il faudrait également tester les protéines par Western blot, comme c-Fos, afin de mettre en relation la régulation transcriptionnelle avec la traduction effective en protéine.



Il y a moins de gènes sous-exprimés dans CA1 ventral par rapport à CA1 dorsal en réponse à l'apprentissage et à la lésion. Il y a également peu de gènes communément sous-exprimés dans ces deux régions par condition.

### 2.3 – Conclusion générale sur le séquençage des ARNm de CA1 ventral

L'analyse du séquençage des ARNm surexprimés et sous-exprimés en réponse à la lésion et/ou à l'apprentissage dans la sous-région CA1 ventrale suggère un rôle limité de cette structure, à la fois dans la régulation des processus liés à l'apprentissage spatial, mais également en réponse à la lésion des noyaux ReRh, comparativement à la sous-région CA1 dorsale. L'implication modérée dans les processus mnésiques est plutôt cohérente avec la littérature qui montre un rôle majoritaire de CA1 dorsal dans ce domaine (Moser et al., 1993, 1995; Hunsaker et al., 2008; Klur et al., 2009; Fanselow and Dong, 2010). Ces résultats suggèrent que l'effet de la lésion reste discret à l'état basal, mais se révèle plutôt en conditions d'apprentissage, lorsque la structure est sollicitée (c'est-à-dire au sein de CA1 dorsal par rapport à CA1 ventral, qui semble l'être moins à ce délai de trois jours).

Les noyaux ReRh seraient donc impliqués dans les processus transcriptionnels qui sous-tendent l'encodage efficace d'un apprentissage au sein de la sous-région CA1 dorsale. Autrement dit, en l'absence des noyaux ReRh, un dysfonctionnement de la transcription a lieu dans cette structure. Ce dysfonctionnement n'a pas de conséquences visibles sur le comportement de l'animal au cours du rappel d'un souvenir récent, mais il se répercutera sur le rappel d'un souvenir ancien. Cela suppose que les dérégulations produites par la lésion se répercutent sur la consolidation à long terme du souvenir.

### **3 – Analyse de l'expression des gènes dans le CPFm**

#### **3.1 – Contexte scientifique**

Selon la théorie standard de la consolidation systémique, la mise en place du dialogue hippocampo-cortical intervient au cours de la consolidation de la trace mnésique (Marr, 1971; Alvarez and Squire, 1994; Frankland and Bontempi, 2005). Néanmoins, il se peut qu'un « tagging » prenne place très précocément dans des neurones des modules corticaux, notamment le cortex préfrontal, afin de les identifier comme « interlocuteurs » des neurones hippocampiques pour le dialogue à venir (Lesburguères et al., 2011). Le CPFm pourrait donc être impliqué dès l'encodage du souvenir. La phase d'acquisition du test de la piscine de Morris fait intervenir, à partir du deuxième jour, à la fois des processus d'encodage, de consolidation et de rappel de l'information. Aussi, il se peut que le CPFm soit actif dès ce moment, et également au bout de trois jours d'apprentissage (nos conditions expérimentales). C'est pourquoi nous avons réalisé une série de RT-qPCR sur des ARNm extraits à partir de cette structure, sur une cohorte de rats différente de celle utilisée pour les séquençages de l'hippocampe (expérience 1 pour l'hippocampe, expérience 2 pour le CPFm) afin d'analyser l'activité transcriptionnelle de cette structure. Les échantillons du CPFm issus de l'expérience 1 ont également fait l'objet de RT-qPCR et donnent des résultats similaires à ceux présentés ci-après, ce qui suggère que les résultats obtenus sont fiables et reproductibles.

L'expérience 2 comportait initialement 32 rats. Après retrait des animaux qui présentaient une lésion non conforme à nos critères de sélection, nous disposons de 24 rats, répartis dans les quatre groupes suivant : des rats « Sham » et « Lésés » restés simplement dans leur cage de stabulation (HCS n=6 et HCL n=6) et des rats « Sham » et « Lésés » entraînés à retrouver une plate-forme cachée durant trois jours dans un test de piscine de Morris (PTCS n=6 et PTCL n=6). Cette expérience ne comportait pas de groupe « plate-forme visible ».

### 3.2 – Résultats

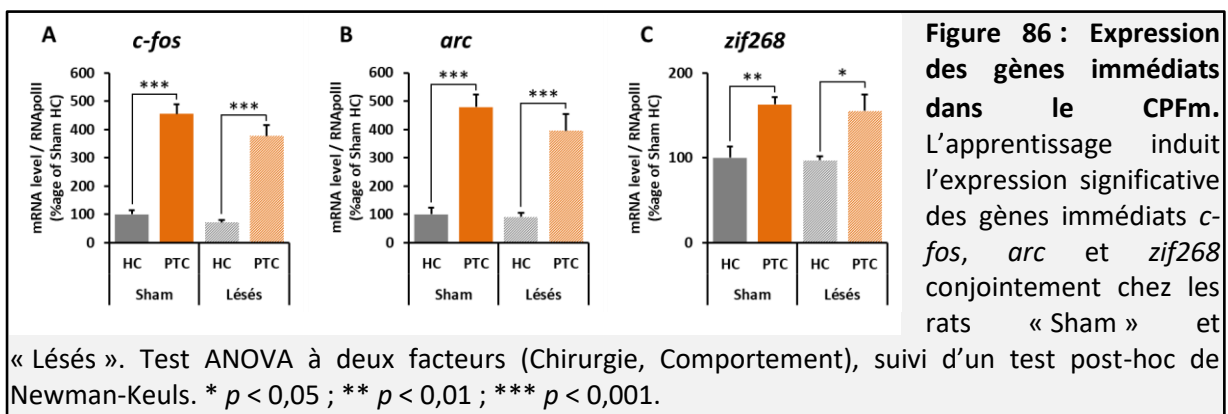
#### 3.2.1 - L'expression des gènes immédiats *c-fos*, *zif268* et *arc* n'est pas affectée par la lésion

Pour effectuer un parallèle avec les résultats des séquençages hippocampiques, nous avons analysé le niveau d'expression des gènes immédiats *c-fos*, *zif268* et *arc*.

Globalement, un test ANOVA révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre les rats « Sham » et « Lésés » concernant l'expression du gène *c-fos*, bien qu'une tendance soit relevée ( $F_{(1,20)} = 3,9$  ;  $p = 0,06$ ). Par contre, on note un effet du comportement ( $F_{(1,20)} = 147,6$  ;  $p < 0,001$ ). Les groupes PTCS et PTCL surexpriment le gène *c-fos* comparativement aux groupes HCS et HCL (respectivement 4,6 fois,  $p < 0,001$  et 5,3 fois,  $p < 0,001$ ) (Figure 86A).

La lésion des noyaux ReRh n'affecte pas la régulation de la transcription du gène *zif268* de façon significative ( $F_{(1,20)} = 0,18$  ;  $p = 0,68$ ). Comme pour *c-fos*, ce gène est surexprimé au cours de l'apprentissage spatial ( $F_{(1,20)} = 23,0$  ;  $p < 0,001$ ) chez le groupe PTCS par rapport au groupe HCS (1,6 fois,  $p = 0,006$ ), et chez le groupe PTCL comparativement au groupe HCL (1,6 fois,  $p = 0,01$ ) (Figure 86B).

Enfin, l'activité du gène *arc* est similaire à celles des gènes *c-fos* et *zif268*, avec une expression qui ne diffère pas significativement entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,20)} = 1,4$  ;  $p = 0,26$ ), mais qui augmente significativement avec la formation d'un souvenir spatial ( $F_{(1,20)} = 75,3$  ;  $p < 0,001$  ; PTCS vs HCS : 4,8 fois,  $p < 0,001$  ; PTCL vs HCL : 4,4 fois,  $p < 0,001$ ) (Figure 86C).



### 3.2.2 - La lésion entraîne une sous-expression du gène du *bdnf*

Le BDNF est un facteur neurotrophique qui favorise le développement du système nerveux central et la survie cellulaire (Woźniak, 1993). Le BDNF est exprimé dans tout le cerveau, mais de façon prépondérante dans la région CA2 et CA3 de l'hippocampe, ainsi que dans les cellules pyramidales du cortex cérébral (Ernfors et al., 1990; Kawamoto et al., 1996). Cette protéine joue également un rôle important dans la plasticité synaptique, plus particulièrement dans la PLT, et est le support de la consolidation des souvenirs (Soulé et al., 2006; Bekinschtein et al., 2007, 2008). Le BDNF agit principalement via son récepteur TrkB (tropomyosin receptor kinase B) (Minichiello et al., 2002). Chez le rat, le gène *bdnf* comporte neuf exons non-codants (notés de I à IXA), chacun possédant son propre promoteur, et un exon codant pour la protéine (voir Partie 1 : Contexte Scientifique - Figure 5). L'ensemble des neuf exons non-codants est transcrit en un ARN pré-messager, mais, au cours de l'épissage de cet ARN pré-messager, un seul des neuf exons non-codants sera associé à l'exon codant, qui code pour une seule et unique protéine (Aid et al., 2007). Il existe une différence dans la répartition des différents exons au sein de l'hippocampe. Ainsi, les exons I et IV y sont plus fortement exprimés. Leur expression diffère également selon les conditions environnementales. Les exons I, IV et IX sont, par exemple, surexprimés dans l'hippocampe et le cortex, suite à une injection locale d'acide kaïnique (Timmusk et al., 1993; Aid et al., 2007; Koppel et al., 2009). La spécificité d'expression des exons est également retrouvée au cours de tests expérimentaux (Rattiner et al., 2004).

Les exons que nous avons testés dans le CPFm sont les exons I, IV et VI, ainsi que l'ensemble des ARNm codant pour le *bdnf* (*bdnf total*).

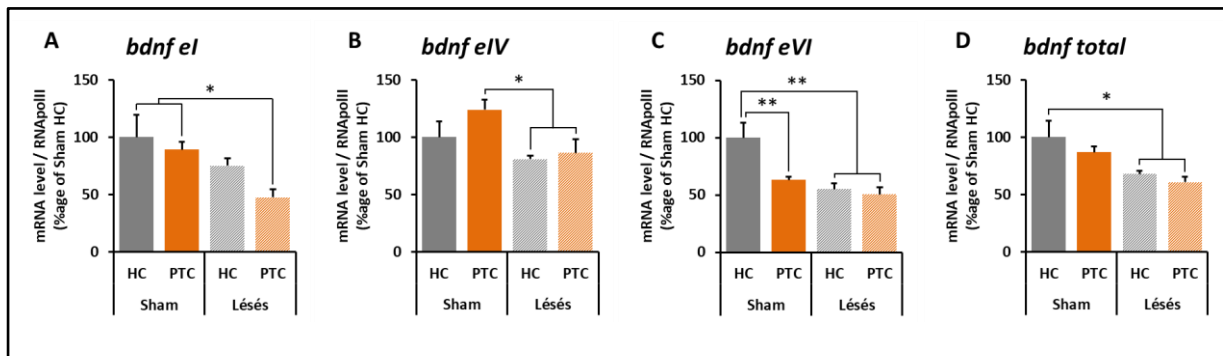
Il existe une différence significative entre les rats « Sham » et « Lésés » concernant l'expression du *bdnf eI* ( $F_{(1,20)} = 8,6$  ;  $p = 0,008$ ), qui n'est pas biaisée par le comportement ( $F_{(1,20)} = 0,55$  ;  $p = 0,47$ ). Il n'y a pas de différence entre les groupes PTCS et HCS, mais le groupe PTCL sous-exprime significativement cet ARNm comparé aux groupes HCS (0,48 fois,  $p = 0,02$ ) et PTCS (0,53 fois,  $p = 0,04$ ) (Figure 85A).

Une différence significative est également présente concernant l'expression du *bdnf eIV* entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,20)} = 7,6$  ;  $p = 0,01$ ), qui ne dépend pas du comportement ( $F_{(1,20)} = 0,78$  ;  $p = 0,39$ ). Plus précisément, les groupes HCL et PTCL sous-

expriment le *bdnf eIV* en comparaison du groupe PTCS (respectivement 0,64 fois,  $p = 0,036$  et 0,70 fois,  $p = 0,046$ ) (Figure 87B).

Concernant le *bdnf eVI*, on observe un effet significatif de la lésion ( $F_{(1,19)} = 13,0$  ;  $p = 0,002$ ) ainsi qu'un effet significatif du comportement ( $F_{(1,19)} = 6,8$  ;  $p = 0,02$ ) sur l'expression de cet ARNm, mais pas d'effet significatif de l'interaction entre les deux facteurs, bien qu'une tendance soit visible ( $F_{(1,19)} = 4,1$  ;  $p = 0,06$ ). Chez les rats « Sham », l'apprentissage est à l'origine d'une baisse de l'expression du *bdnf eVI* (0,63 fois,  $p = 0,004$ ). Chez les rats « Lésés », nous n'observons pas de différence entre les groupes PTCL et HCL. Par contre, ces deux groupes sous-expriment de façon significative le *bdnf eVI* par rapport au groupe HCS (HCL : 0,55 fois,  $p = 0,002$  et PTCL : 0,51 fois,  $p = 0,002$ ) (Figure 87C).

Enfin, la quantification de l'ensemble des ARNm codant pour le *bdnf* (*bdnf total*) met en avant une différence significative entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,20)} = 13,4$  ;  $p = 0,002$ ), mais pas d'incidence du comportement ( $F_{(1,20)} = 1,6$  ;  $p = 0,22$ ). En effet, que ce soit chez les rats « Sham » ou « Lésés », la quantité de *bdnf total* ne varie pas significativement entre les rats PTC et HC. Par contre, on observe une baisse globale de l'expression de l'ensemble des ARNm du *bdnf* chez les groupes HCL (0,68 fois,  $p = 0,02$ ) et PTCL (0,61 fois,  $p = 0,01$ ), comparativement au groupe HCS (Figure 87D).



**Figure 87 : Expression des différents transcrits du *bdnf* dans le CPFm.** Chez les rats « Sham », l'apprentissage ne modifie pas l'expression du *bdnf*, à l'exception du *bdnf eVI* qui est sous-exprimé. La lésion des noyaux ReRh, quant à elle, provoque une sous-expression des différents ARNm de ce gène. La lésion des noyaux ReRh provoque une perturbation de la transcription du *bdnf* dans le CPFm après trois jours d'un apprentissage spatial. Test ANOVA à deux facteurs (Chirurgie, Comportement), suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.3 – Conclusion sur l'expression des gènes dans le CPFm

Dans le CPFm, après trois jours d'apprentissage spatial, l'expression des gènes immédiats *c-fos*, *arc* et *zif268* augmente de façon équivalente entre les rats « Sham » et « Lésés ». La lésion des noyaux ReRh n'affecterait donc pas les mécanismes à l'origine de la transcription de ces gènes induit par l'apprentissage à ce délai.

L'apprentissage est à l'origine d'une sous-expression du *bdnf eVI* chez les rats « Sham », tandis que les autres formes ne sont pas significativement modulées, tout comme lorsqu'on analyse l'ensemble des ARNm du gène. En revanche, l'absence des noyaux ReRh est responsable d'une perturbation de l'expression des différents ARNm du gène du *bdnf*, qui se répercute au niveau global (*bdnf total*) par une sous-expression de ce gène.

Le *bdnf eVI* n'est pas le variant le plus étudié du *bdnf*, comparé aux *bdnf eI* et *eIV*. Le *bdnf eVI* est présent dans les neurones, en quantité moins importante que les isoformes *eI*, *eII* et *eIV*, mais il est fortement exprimé dans les astrocytes (Rousseaud et al., 2015). Avec le *bdnf eII*, le *bdnf eVI* est principalement dirigé vers les dendrites apicales distales suite à une dépolarisation neuronales, tandis que les *bdnf eI* et *eIV* migrent vers les dendrites apicales proximales. Les exons non-codants contiendraient donc un signal permettant l'affectation de chaque isoforme vers des compartiments spécifiques (Pattabiraman et al., 2005; Chiaruttini et al., 2008; Baj et al., 2011). Ces ARNm sont traduits localement et la protéine BDNF, sécrétée au niveau des dendrites, active le récepteur TrkB et conduit à un remodelage dendritique (Matsuda et al., 2009; Baj et al., 2011). Le décours temporel des différents isoformes semblent varier suite à l'activation de la protéine kinase C, une kinase impliquée dans la cascade de signalisation intracellulaire déclenchée par le récepteur TrkB. Alors que les *bdnf eI* et *eIV* présentent un pic de production 3h après l'activation de la PKC et se maintient dans le temps, le *bdnf eVI* est produit principalement dans l'heure qui suit avant de retourner à un niveau basal 2h après l'activation de la PKC (Morioka et al., 2013). La production et le rôle des différents isoformes seraient donc propres à chacun, du moins en partie. Cela n'explique pas pourquoi nous observons une baisse de *bdnf eVI* en réponse à l'apprentissage chez les rats « Sham », mais justifie les différences observées entre le *bdnf eI*, *eIV* et *eVI*.

Les exons I, IV et VI sont néanmoins tous sous le contrôle du promoteur CRE, un site de fixation du FT CREB, ainsi que sous le contrôle du FT NK- $\kappa$ B (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998; Pruunsild et al., 2011; Morioka et al., 2013). La lésion des noyaux ReRh pourrait perturber la voie de signalisation menant à l'activation de ces FT et, de ce fait, conduire à la sous-expression des différentes isoformes que nous observons.



Partie 3 : Analyse de l'activation des structures pendant  
l'apprentissage en réponse à la lésions des noyaux ReRh :  
production des facteurs de transcription c-Fos et Zif268.

*Partie 3 : Analyse de l'activation des structures pendant  
l'apprentissage en réponse à la lésions des noyaux ReRh :  
production des facteurs de transcription c-Fos et Zif268.*

---

Cette troisième partie est consacrée à l'étude protéique des facteurs de transcription c-Fos et Zif268, au cours de la formation d'un souvenir spatial, dans la sous-région hippocampique CA1 dorsale ainsi que dans le CPFm de rats présentant, ou non, une lésion des noyaux reuniens et rhomboïde. Le but de cette expérience est d'analyser l'activité des régions cérébrales ciblées à l'aide de deux techniques complémentaires : le Western blot et la quantification stéréologique.

## **1 – Contexte scientifique**

La production des protéines c-Fos et/ou Zif268 reflète la quantité de neurones activés dans une structure (Wisden et al., 1990; Worley et al., 1991; Vann et al., 2000; Okuno, 2011). En effet, ces gènes immédiats sont rapidement induits par l'activation des récepteurs NMDA et AMPA suite à la fixation du glutamate libéré par le neurone présynaptique. L'activation de ces récepteurs engendre une cascade d'évènements intracellulaires conduisant à l'activation de kinases (CaMKII, PKC, etc), qui activent à leur tour les facteurs de transcription, stimulant ainsi l'expression génique et la synthèse protéique (voir Partie 1, Chapitre 1, Bases moléculaires de la plasticité et de la mémoire). Peu d'études rapportent l'activation de ces facteurs **au cours** de l'encodage/apprentissage. Généralement, ils sont observés après un test de rappel d'un souvenir acquis au cours d'une tâche comportementale afin de mettre en évidence les régions cérébrales ayant été activées au moment du rappel ; ces régions sont censées être impliquées dans l'encodage et/ou le rappel de l'information, comme indiqué à plusieurs reprises au sein du laboratoire (Lopez et al., 2012; Loureiro et al., 2012; Cholvin et al., 2013; Ali et al., 2017).

Cette partie est consacrée à l'étude de l'expression de ces facteurs de transcription protéiques au sein de CA1 dorsal et du CPFm chez les rats « Sham » et « Lésés ». Les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment, c'est à dire après trois jours d'apprentissage spatial (+1h). Dans un premier temps, une analyse par Western blot a été réalisée sur différentes protéines dans les deux régions disséquées (CA1d et CPFm). Puis une quantification stéréologique de la protéine c-Fos a été effectuée dans CA1 dorsal et le cortex cingulaire antérieur (CCA). Nous avons focalisé notre attention sur le CCA, car plusieurs études montrent que cette région est particulièrement impliquée dans la consolidation et l'ancrage à long terme de tout ou partie du souvenir (Bontempi et al., 1999; Maviel et al., 2004; Lopez et al., 2012; Aceti et al., 2015).

## **2 – Quantifications par Western blot**

Cette analyse a été effectuée sur les 32 rats de l'expérience 2 composée des seuls groupes HC et PTC (pas de PTV). Suite au retrait des rats dont la lésion n'était pas conforme aux

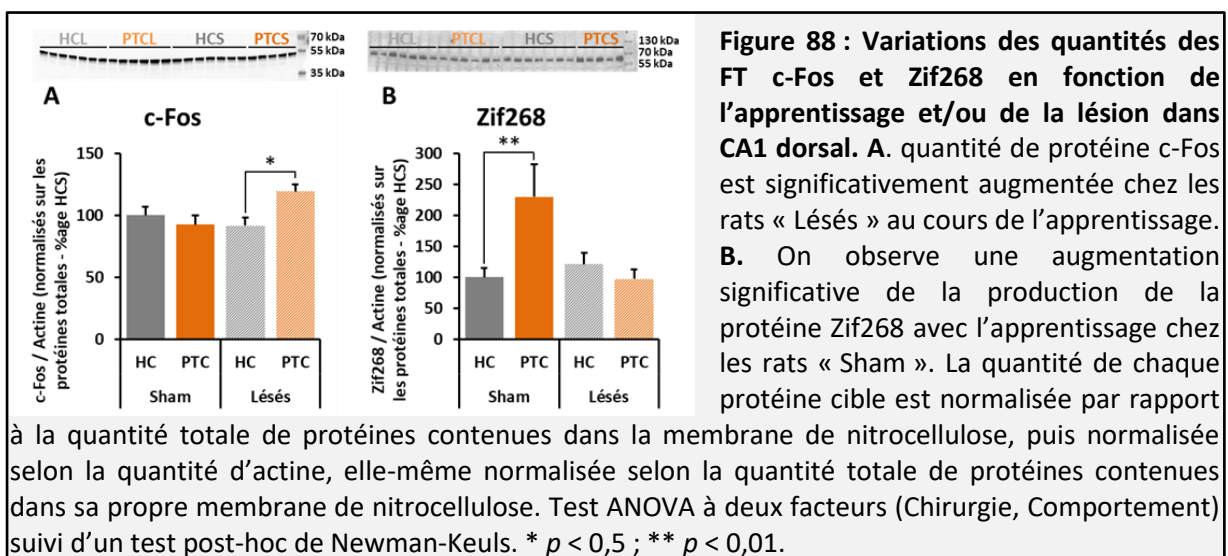
critères de sélection, le nombre d'animaux par groupe est le suivant : HCS,  $n = 7$  ; PTCS,  $n = 6$  ; HCL,  $n = 7$  et PTCL,  $n = 5$ .

## 2.1 – La lésion des noyaux ReRh provoque une augmentation des niveaux de la protéine c-Fos dans CA1 dorsal en réponse à l'apprentissage

L'analyse de c-Fos montre que cette protéine est différentiellement régulée entre les rats « Sham » et les rats « Lésés » en réponse à l'apprentissage ( $F_{(1,41)} = 13,5$  ;  $p = 0,001$ ) (Figure 88A). En effet, les niveaux de c-Fos n'augmentent pas en réponse à l'apprentissage chez le groupe « Sham » (PTCS par rapport au groupe HCS ;  $p = 0,49$ ) tandis qu'on observe une production significative de c-Fos chez le groupe « Lésés » (PTCL comparativement au groupe HCL, 1,4 fois,  $p = 0,015$ ). Il semblerait donc qu'à ce délai de 3 jours, CA1 dorsal ne soit pas (plus ?) activé chez les rat « Sham », alors qu'il le serait (encore ?) chez les rats « Lésés ».

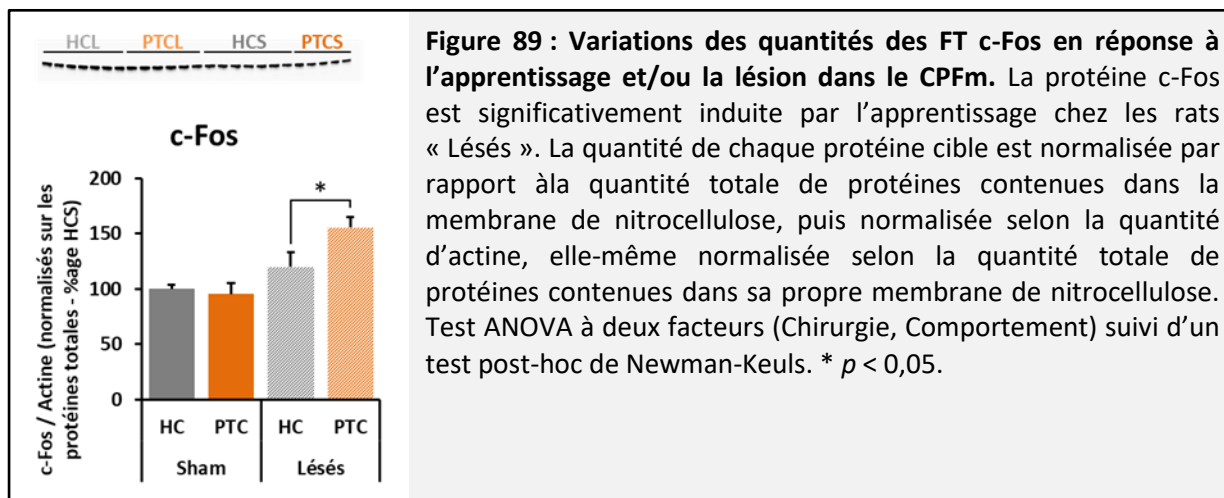
Concernant la protéine Zif268, il y a, là aussi, une différence dans sa production entre les rats « Sham » et « Lésés » en fonction de l'apprentissage ( $F_{(1,21)} = 10,3$  ;  $p = 0,004$ ) (Figure 88B). A l'inverse de c-Fos, l'apprentissage (PTCS vs HCS) est à l'origine d'une forte induction de Zif268 chez les rats « Sham » (2,3 fois,  $p = 0,003$ ), tandis que chez les rats « Lésés », cette protéine reste au niveau basal du HCL chez le groupe PTCL ( $p = 0,69$ ).

L'activation différentielle des gènes précoces c-Fos et Zif268 dans cette structure chez les rats « Lésés » comparés aux rats « Sham » suggère que la cinétique d'activation des neurones pyramidaux de CA1 dorsal est perturbée au cours de l'apprentissage par la lésion des noyaux ReRh.



## 2.2 – La lésion des noyaux ReRh provoque une augmentation des niveaux de la protéine c-Fos dans le CPFm en réponse à l'apprentissage

A l'instar de ce que nous avons observé dans CA1 dorsal, les niveaux de protéines c-Fos sont régulés de façon différente entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,21)} = 16,2 ; p < 0,001$ ) (Figure 89), En effet, la quantité de protéines ne varie pas chez les rats « Sham » au cours de l'apprentissage, tandis qu'elle est significativement augmentée chez les rats « Lésés » (1,3 fois,  $p = 0,02$ ).

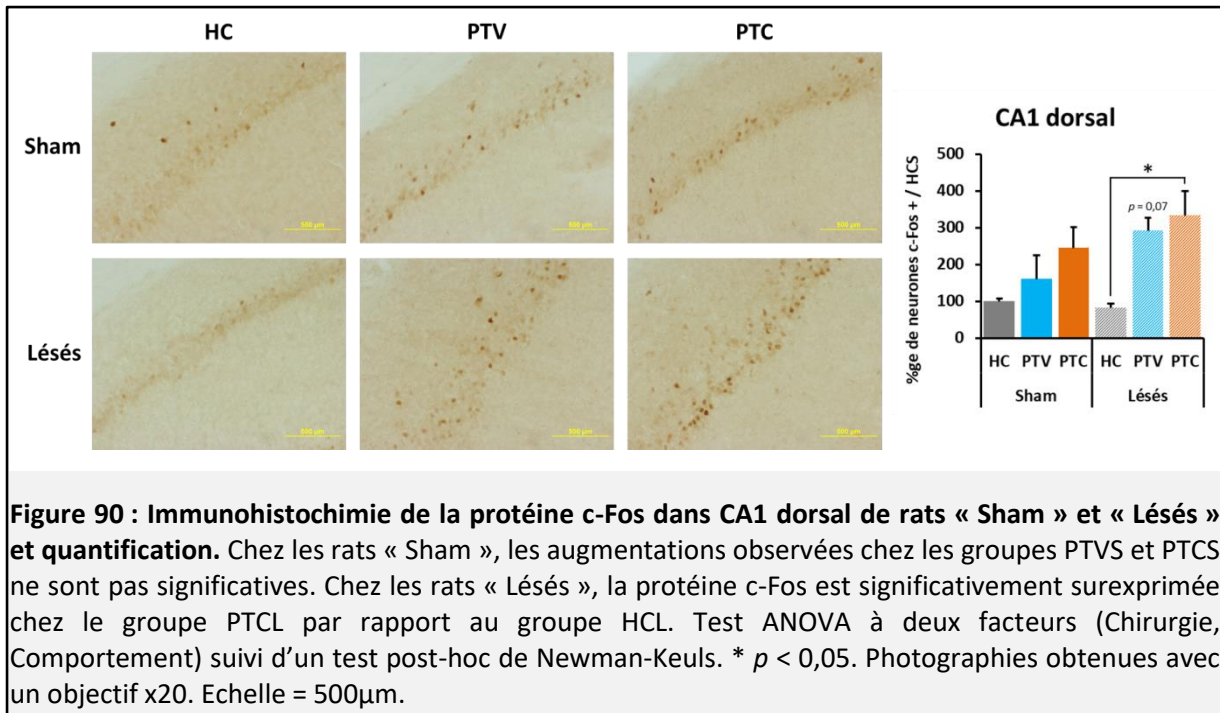


## 3 – Quantifications stéréologiques de la protéine c-Fos

J'ai effectué une quantification stéréologique de la protéine c-Fos après immunohistochimie au sein de deux structures, CA1 dorsal et le CCA, dans les mêmes conditions que précédemment (3 jours d'apprentissage + 1h). Initialement composée de 28 rats, la cohorte finale n'en contient plus que 22, ceci du fait du retrait des animaux n'ayant pas une lésion satisfaisante, qui se répartissent en six groupes suivant : HCS, PTVS, PTCS, HCL, PTVL et PTCL.

### 3.1 – La lésion des noyaux ReRh provoque une augmentation des niveaux de c-Fos dans CA1 dorsal en réponse à l'apprentissage

La composition des groupes pour la quantification effectuée au sein de CA1 dorsal est la suivante : HCS,  $n = 4$  ; PTVS,  $n = 3$  ; PTCS,  $n = 4$  ; HCL,  $n = 3$  ; PTVL,  $n = 3$  et PTCL,  $n = 5$ .

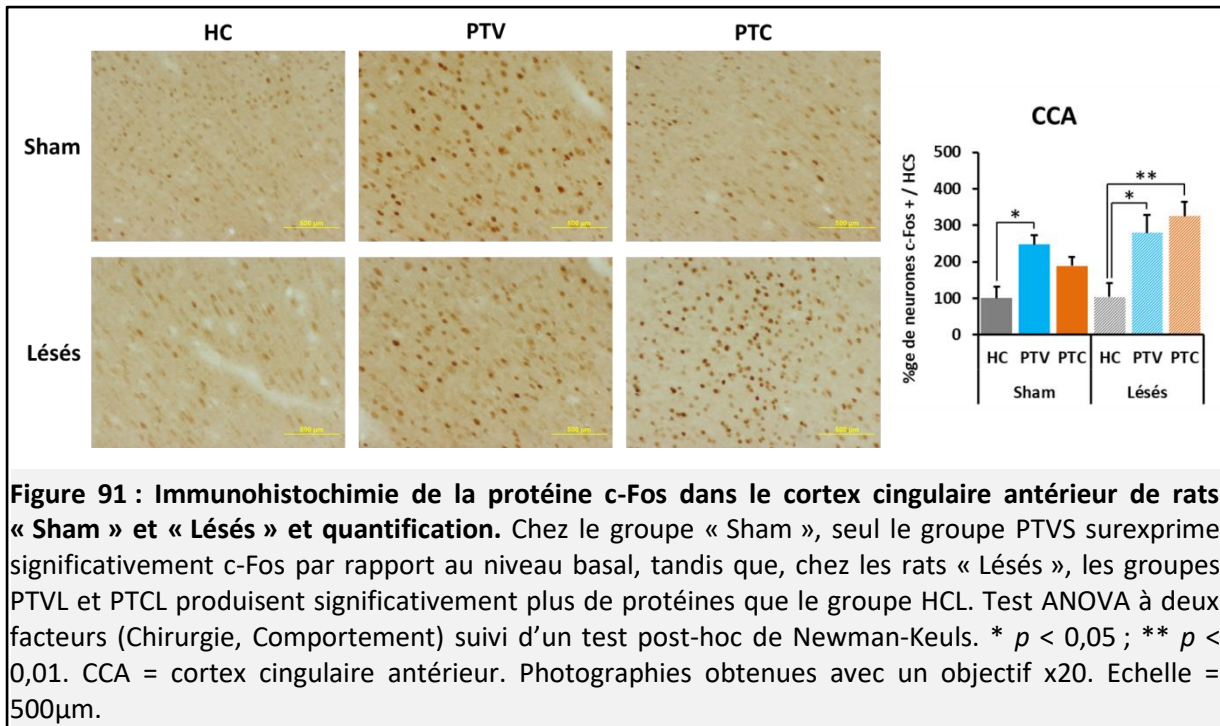


L'ANOVA ne montre pas de différence significative entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,16)} = 2,5 ; p = 0,15$ ), mais révèle un effet global de l'apprentissage ( $F_{(2,16)} = 8,2 ; p = 0,004$ ) (Figure 90) sur la quantité de la protéine c-Fos. Un test post-hoc de Newman-Keuls montre que le groupe PTCL surexprime la protéine c-Fos comparativement au groupe HCL (4,1 fois,  $p = 0,04$ ), tandis que l'augmentation observée dans le groupe PTCS ne diffère pas significativement du groupe HCS (2,5 fois,  $p = 0,15$ ) (Figure 90). Il faut noter une induction de 3 fois de la protéine c-Fos dans le groupe plateforme visible « Lésés » ; cette augmentation, qui tend vers la significativité ( $p = 0,07$ ), n'est pas retrouvée dans le groupe « Sham ».

On retrouve donc ici une induction de c-Fos en réponse à l'apprentissage, plus importante dans le groupe des rats « Lésés » par rapport aux rats « Sham ».

### 3.2 – La lésion des noyaux ReRh provoque une augmentation des niveaux de c-Fos dans le CCA en réponse à l'apprentissage

La composition des groupes pour la quantification effectuée au sein du CCA est la suivante : HCS,  $n = 3$  ; PTVS,  $n = 3$  ; PTCS,  $n = 3$  ; HCL,  $n = 4$  ; PTVL,  $n = 4$  et PTCL,  $n = 5$ .



Tout comme pour CA1 dorsal, le test ANOVA ne montre pas de différence significative globale entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,16)} = 3,0$  ;  $p = 0,10$ ), mais on relève un effet significatif du comportement ( $F_{(2,16)} = 12,3$  ;  $p < 0,001$ ) (Figure 91). Le test post-hoc met en avant une augmentation significative de la quantité de c-Fos chez le groupe PTVS par rapport au groupe HCS (2,5 fois,  $p = 0,04$ ), mais pas chez le groupe PTCS (1,9 fois,  $p = 0,12$ ). Par contre, on observe une surexpression de la protéine c-Fos chez le groupe PTVL (2,7 fois,  $p = 0,02$ ) et PTCL (3,6 fois,  $p = 0,006$ ) comparativement au groupe HCL. Il ressort donc que le CCA est également activé au cours de l'apprentissage chez les rats « Lésés » uniquement. Il faut noter que les conditions expérimentales en elles-mêmes (PTV) semblent induire l'expression de c-Fos dans cette structure (CCA), quel que soit le groupe de rats (« Lésés » ou « Sham »).

Remarque : Le faible nombre d'animaux dans certains groupes limite la portée de cette analyse. En effet, les résultats obtenus auraient été plus fiables, moins variables et les effets statistiques éventuellement plus forts si nous avions eu six à huit rats par groupe au lieu de trois à cinq. Malgré ce bémol, pris dans leur ensemble, les résultats obtenus par Western blot et par quantification stéréologique montrent tous deux les mêmes résultats : on retrouve une régulation différente de la production de la protéine c-Fos entre les groupes « Sham » et « Lésés ». Plus précisément, la protéine c-Fos n'est pas significativement produite après trois jours d'apprentissage spatial dans CA1 dorsal ni dans le CCA des rats « Sham », alors qu'on observe une surexpression chez les rats « Lésés » au même délai. Ces

résultats montrent que la lésion des noyaux ReRh modifie les niveaux de protéine c-Fos au sein de CA1 dorsal et du CCA, à ce temps d'expérimentation au moins, au cours de la formation d'un souvenir spatial.

#### **4 – Conclusion générale sur l'activité de CA1 dorsal et du CPFm au cours de la formation d'une mémoire spatiale**

Chez les rats « Sham », seule la quantité de la protéine Zif268 est significativement augmentée dans CA1 dorsal en réponse à l'apprentissage, tandis que nous n'observons pas de changements significatifs concernant la production de c-Fos. Dans le CPFm, les niveaux de c-Fos ne diffèrent pas du niveau basal. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Farina et Commins (2016) qui, après 5 jours de piscine, notent une augmentation de la quantité de Zif268 dans CA1, mais pas de c-Fos, ainsi qu'une absence d'induction de c-Fos dans le CPF (Farina and Commins, 2016). Ces auteurs suggèrent que la protéine c-Fos pourrait présenter un pic de production à un délai plus précoce au cours de l'encodage dans l'hippocampe, avant de retourner à un niveau basal. C'est aussi ce que d'autres résultats obtenus au laboratoire (Gasser et al, en révision) montrent chez des rats entraînés dans une tâche de mémoire spatiale dans un labyrinthe en double-H : les niveaux protéiques de c-Fos sont élevés après 1 jour d'entraînement dans CA1 dorsal, alors qu'ils sont au niveau du groupe HC après 7 jours d'apprentissage spatial. Il est à noter que dans cette étude, les rats ont été mis à mort après un *probe trial*. He et collaborateurs (2002) ont obtenu des résultats similaires dans la région CA3 chez des rats entraînés dans un labyrinthe radial à huit branches. En effet, ces auteurs ont observé une augmentation du nombre de cellules c-Fos positives dans la région CA3 au bout de trois jours d'apprentissage et un retour au niveau basal après cinq jours (He et al., 2002).

Chez les rats « Lésés », la cinétique de production de c-Fos et de Zif268 diffère de celle des rats « Sham ». Pour c-Fos, on observe une augmentation du niveau protéique après trois jours d'apprentissage dans CA1 dorsal et le CPFm (dont au moins le CCA) chez les rats « Lésés » contrairement aux rats « Sham ». Dans le CCA, l'augmentation de c-Fos est retrouvée chez le groupe PTV aussi bien chez les rats « Sham » que « Lésés ». Ce résultat laisse à penser que seule l'augmentation chez le groupe PTCL serait la conséquence de la lésion. Concernant Zif268, la protéine est induite chez les rats « Sham » alors qu'elle reste au



niveau de base chez les rats « Lésés ». L'absence des noyaux ReRh affecterait donc la dynamique d'activation de ces structures.

En l'état, nous ne savons pas si la cinétique d'activation est « simplement » décalée dans le temps entre les rats « Sham » et « Lésés », ou bien si elle est identique mais avec des protéines plus stables chez les rats « Lésés », ce qui expliquerait qu'on les détecte à ce délai. Ces modèles seront explicités dans la discussion générale.

Un des modèles repose sur une perturbation de la voie de dégradation de ces protéines, qui requiert notamment le système ubiquitine-protéasome (Stancovski et al., 1995; Sasaki et al., 2006; Roeb et al., 2008; Manente et al., 2011). Cela pourrait engendrer une accumulation de la protéine c-Fos au cours des jours (cette idée sera développée dans la partie « Discussion générale »). Dans le cas de Zif268, la protéine n'est pas détectée chez les rats « Lésés » malgré une forte induction chez les rats « Sham ». Ces deux facteurs de transcription ont donc des cinétiques d'apparition et/ou d'activation différentes en réponse à l'apprentissage ce qui suggère un dysfonctionnement au niveau des régulations de Zif268 en réponse à la lésion.

On peut noter que les mécanismes de dégradation de c-Fos et Zif268 ne sont pas tout à fait les mêmes. Alors que la protéine c-Fos est directement ubiquitinylée (Stancovski et al., 1995; Sasaki et al., 2006), Zif268 requiert soit une interaction avec le complexe protéine PAX3-FOXO1, soit une sumoylation, préalablement à sa dégradation (Roeb et al., 2008; Manente et al., 2011). Cela peut également intervenir dans les régulations différentes observées chez les rats « Lésés ».

Pour conclure, la lésion des noyaux ReRh perturbe la dynamique de l'expression protéique de c-Fos et de Zif268, à la fois dans l'hippocampe et le CPFm, et donc la dynamique d'activation de ces structures au cours de la formation d'un souvenir spatial. Les mécanismes mis en jeu restent néanmoins inconnus. Il pourrait être intéressant d'étudier le décours temporel de l'expression des FT c-Fos, Zif268, mais également de Arc, chez les rats « Sham » et « Lésés » au cours de cette acquisition en piscine de Morris (aux délais de 1 jour, 2 jours, etc.), et ce afin de mieux connaître la cinétique des mécanismes impliqués dans la consolidation et le moment auquel la lésion les perturbe.







# **Partie 4 : Discussion** **générale et Perspectives**



*Préambule à la discussion générale*





## *Préambule à la discussion générale*

---

Dans ce préambule à la discussion, j'ai voulu traiter de la difficulté technique à réaliser une lésion excitotoxique des noyaux reuniens et rhomboïde, et de la pertinence du modèle qui en résulte.

### **1 – La lésion des noyaux reRh...**

#### **1.1 - ... un parcours du combattant**

Pourtant réalisée en routine depuis plusieurs années au sein du laboratoire, la lésion des noyaux ReRh par injection stéréotaxique de NMDA reste une technique délicate, souvent source de nombreux problèmes. La difficulté principale de cette lésion réside dans la précision nécessaire au ciblage de ces noyaux, certes relativement étendus dans l'axe antéro-postérieur, mais restreints dans l'axe médio-latéral et dorso-ventral. Deux doctorants avant mon arrivée ont permis de mettre en place un protocole solide (environ 70% de réussite), sur lequel je me suis appuyée. Néanmoins, mes premiers essais ont résulté en l'absence de lésion dans plus de la moitié des cas. A la même époque, un autre doctorant avait également réalisé des lésions des noyaux ReRh et, dans son cas, aucun rat n'avait été correctement lésé. Nous nous sommes alors intéressés aux travaux de Mathieu Wolff et au matériel que son équipe utilise pour réaliser la lésion des noyaux intralaminaires du thalamus. Le système repose sur l'utilisation d'une micro-pompe à air, nommée picospritzer, qui permet d'envoyer des micros-pulses d'air dont on peut régler la pression et la durée. Cette micro-pompe est reliée par un cathéter à une micropipette de verre remplie de la solution à instiller. Leurs résultats, qui montrent une lésion présente dans près de 100% des cas, nous ont suffisamment convaincus pour que nous changions notre système pour le leur. Cependant, malgré plusieurs mois de mises au point, l'expérience planifiée sur 54 rats opérés et comprenant 33 rats « lésés » a débouché sur un taux de 100% de rats non-lésés. Ainsi, nous avons décidé de retourner au système initial. Avec Mme Brigitte Cosquer, la technicienne de notre équipe que je remercie pour son soutien indéfectible, j'ai participé à l'amélioration des lésions de ces noyaux. J'ai rectifié une des coordonnées d'instillation, permettant ainsi l'obtention d'une lésion plus symétrique. Nous avons également changé les

seringues Hamilton pour un modèle supérieur et plus fiable, et nous avons bénéficié de l'acquisition d'un poste de chirurgie neuf, à affichage digital des coordonnées stéréotaxiques. Finalement, un an et demi après mes premiers essais avec le système initial, ma première expérience comportant des rats lésés est enfin arrivée. Preuve que les changements furent bénéfiques, toutes les lésions que j'ai effectuées par la suite sont apparues correctes sur 80% des rats de chaque cohorte.

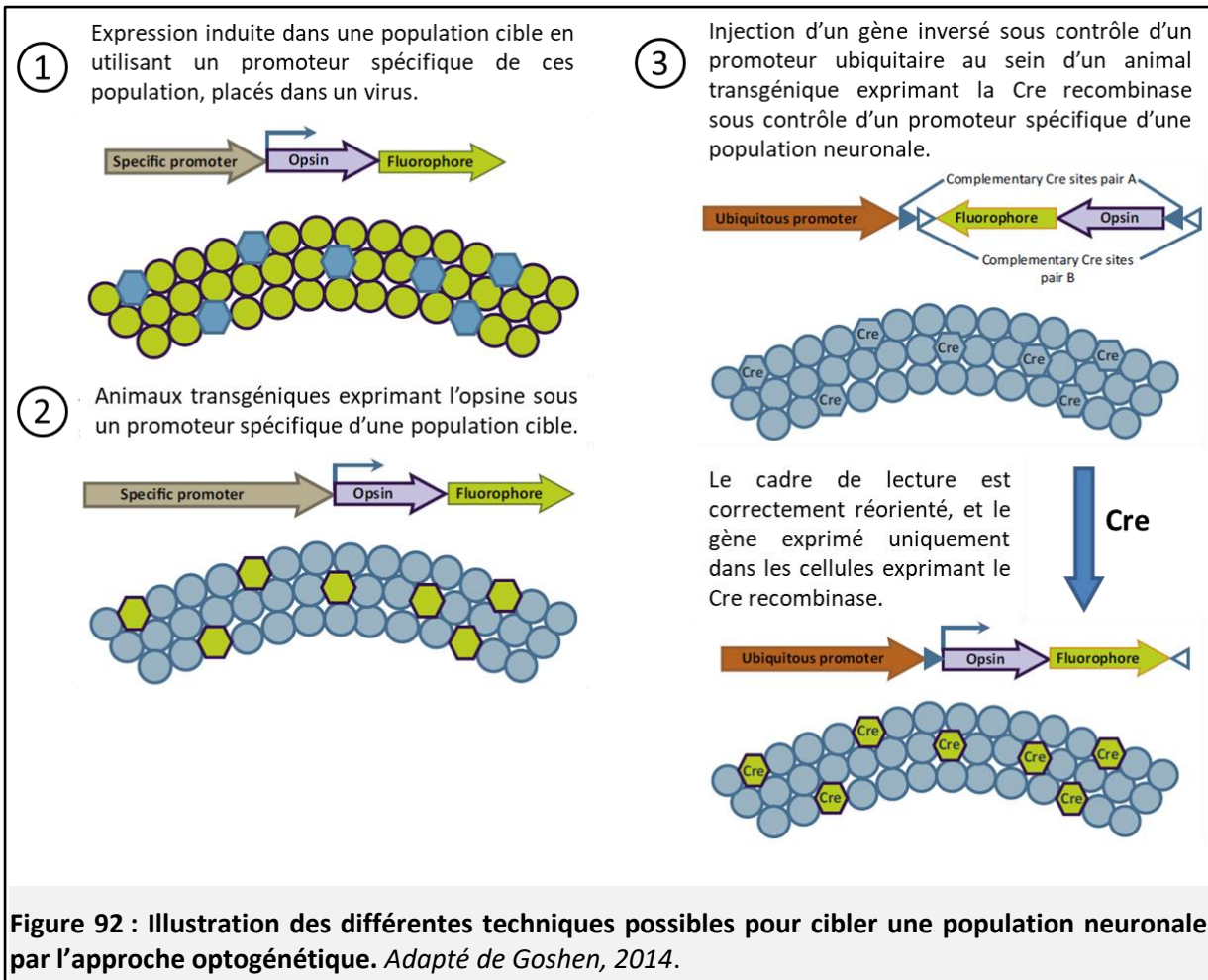
## **1.2 - ... un modèle pertinent ?**

La lésion est une technique couramment employée pour étudier le rôle des noyaux ReRh dans diverses fonctions cognitives (Hembrook and Mair, 2011; Cholvin et al., 2013; Prasad et al., 2013; Ito et al., 2015; Linley et al., 2016; Loureiro et al., 2012). Lorsqu'elle est réalisée par l'injection d'une solution de NMDA, elle présente l'avantage d'épargner les fibres en passage, c'est-à-dire celles qui traversent les noyaux ReRh. De plus, une fois la chirurgie effectuée, le rat ne subit plus de manipulations stressantes, comme la contention. Néanmoins, cette technique présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, il est difficile, voire impossible, de limiter la lésion aux seuls noyaux ReRh. Les noyaux limitrophes sont souvent touchés, même faiblement, et peuvent biaiser les résultats obtenus par la suite. De plus, une lésion effectuée avant l'acquisition d'une tâche comportementale, comme ce fut le cas pour mes travaux, ne permet pas de savoir à quel moment la structure lésée intervient dans le processus étudié. Enfin, toujours dans ces mêmes circonstances, on ne peut pas exclure qu'un mécanisme de compensation se mette en place dans l'intervalle de temps entre la lésion et le test, mécanisme qui pourrait également biaiser les résultats et l'interprétation.

L'inactivation fonctionnelle réversible est une technique pharmacologique également employée à plusieurs reprises dans l'étude des noyaux ReRh (Davoodi et al., 2011; Hembrook et al., 2012; Loureiro et al., 2012; Cholvin et al., 2013; Hallock et al., 2013, 2016; Layfield et al., 2015). Elle utilise soit la lidocaïne, un inhibiteur des canaux sodiques, qui présente donc l'inconvénient d'affecter les fibres de passage, soit le muscimol, un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> qui n'inactive que les corps cellulaires (les axones ne possédant pas de récepteurs GABA). L'inactivation fonctionnelle présente l'avantage d'être temporaire, donc réversible, et de ne pas induire de mécanismes de compensation. Néanmoins, elle nécessite

la mise en place à demeure d'un guide-canule, ce qui perturbe le réseau neuronal qu'elle traverse (Davoodi et al., 2009), et la contention de l'animal lors de l'instillation qui peut s'avérer stressante. De plus, la solution instillée peut, comme pour la lésion, diffuser au-delà des noyaux ReRh, ce qui pose le problème de la spécificité des résultats. Malgré tout, elle offre l'avantage d'inhiber la structure au cours d'une période choisie (mais néanmoins restreinte à la durée d'action de la molécule) lors d'une tâche comportementale (encodage ou rappel principalement).

Ces dernières années, l'utilisation d'une approche optogénétique s'est largement répandue (Xu and Südhof, 2013; Ito et al., 2015; Rajasethupathy et al., 2015). Cette technique repose sur l'incorporation, dans les neurones, de protéines (opsines) sensibles à la lumière (voir Figure 92). Les opsines produites sont alors incorporées au niveau des dendrites et des axones sous forme d'un canal cationique. L'activation du canal se fait par l'utilisation d'une fibre optique implantée au niveau du site d'intérêt et qui permet d'y acheminer de la lumière. Selon le type d'opsine utilisé, l'activation par la lumière entraînera une sortie de cations, hyperpolarisant la membrane des neurones et, de ce fait, inhibant la structure, ou bien une entrée de cations dépolarisant cette membrane (Goshen, 2014). Le délai entre l'activation des opsines et la réponse neuronale étant de l'ordre de la milliseconde, cette technique permet une modulation spatiotemporelle précise de l'activité d'une structure d'intérêt au cours d'une tâche comportementale. Les vecteurs viraux contenant également un gène codant pour un fluorochrome, il est possible de vérifier, *a posteriori*, l'emplacement des neurones transfectés. De plus, de par l'incorporation de ces canaux au niveau des axones, on peut activer ou inhiber les projections axonales d'une région d'intérêt vers une structure cible (dans notre cas, le CPFm ou l'hippocampe après injection des vecteurs dans les noyaux ReRh, voir Duan et al., 2015). Une approche optogénétique pour étudier les fonctions des noyaux ReRh a déjà été utilisée (Xu and Südhof, 2013; Duan et al., 2015; Ito et al., 2015) et peut donc s'avérer très utile pour définir la fenêtre d'activité de ces noyaux au cours de la formation d'un souvenir. Cependant, cette technique est difficilement compatible avec une tâche de piscine de Morris où l'animal est placé dans l'eau, eau dans laquelle il peut s'immerger complètement en plongeant sous la surface.



Une dernière approche envisageable qui émerge ces dernières années est celle de la technique du DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated By Designer Drugs). Cette technique repose sur l'utilisation de récepteurs couplés aux protéines G, qui ne peuvent être activés que par un agoniste exogène, apporté par injection intrapéritonéale ou par l'eau de boisson. Suivant la protéine G, l'activation du récepteur conduira à une activation du neurone, ou, à l'inverse, à son inhibition (Roth, 2016). De façon similaire à l'optogénétique, ces récepteurs sont incorporés dans les neurones par l'injection stéréotaxique d'un vecteur viral porteur de la séquence codante sous contrôle d'un promoteur spécifique, associé à un fluorochrome. Bien que la modulation neuronale soit moins rapide par cette approche comparée à celle de l'optogénétique, elle est peu invasive et permet une action sur une durée continue plus longue (jours, semaines). On pourrait, par exemple, imaginer inhiber en continu les noyaux ReRh durant la période de consolidation du souvenir avant un rappel à long terme (par exemple, 25 jours). Cette technique a déjà été utilisée par Vetere et collaborateurs (2017) pour inhiber le noyau ReRh au cours d'une tâche de conditionnement de peur au contexte (Vetere et al., 2017). Cette méthode sera d'ailleurs très prochainement

employée au laboratoire pour inhiber les noyaux ReRh au cours du rappel d'un souvenir spatial en piscine de Morris, ainsi que d'un souvenir de peur au contexte.

En conclusion, la lésion n'est pas la technique la plus avancée qui soit pour étudier le rôle des noyaux ReRh dans la formation d'un souvenir. Néanmoins, elle a le mérite d'être une technique relativement bien maîtrisée au laboratoire, moins couteuse que l'optogénétique ou le DREADD, très compatible avec le test que nous avons utilisé, et qui nous permet d'avoir un premier aperçu global de l'activité du réseau neuronal en l'absence de ces noyaux.



## *Discussion générale*





## *Discussion générale et perspectives*

---

Ma thèse avait pour but d'étudier l'impact des noyaux ReRh sur les mécanismes moléculaires - régulations transcriptionnelles et protéiques - prenant place au sein de l'hippocampe et du CPFm au cours de la formation d'un souvenir spatial. Il est admis qu'une altération rapide et précoce de l'activité transcriptionnelle prend place dans l'hippocampe au cours de l'encodage d'un souvenir (Guzowski et al., 2001; Cavallaro et al., 2002; Bousiges et al., 2010). Bien que la théorie de la consolidation systémique suggère que le CPFm n'interviendrait qu'une fois l'encodage passé, des études d'imagerie fonctionnelle menées chez l'Homme montrent que le CPF est activé au cours de l'encodage d'un souvenir associatif et que l'amplitude de cette activation est prédictive de la capacité à correctement rappeler l'information ultérieurement (Wagner et al., 1998; Buckner et al., 1999; Sperling et al., 2001). Des études menées chez l'animal ont également montré qu'un « tagging » neuronal prenait place au sein du CPF (Lesburguères et al., 2011) à des temps précoces, et qu'une tâche d'inhibition passive (Zhang et al., 2011) ou de conditionnement de peur au contexte (Bero et al., 2014) entraîne une surexpression de gènes immédiats dans le CPFm, au cours de l'encodage d'un souvenir. C'est pourquoi il était intéressant d'étudier les régulations transcriptionnelles et protéiques, à la fois dans l'hippocampe et le CPFm, au cours de la formation d'une mémoire spatiale chez des rats avec et sans noyaux ReRh.

Dans ce paragraphe de discussion, j'aimerais essayer dans un premier temps de replacer les résultats de l'expression des gènes dans le cadre de la consolidation systémique. Nos résultats nous conduisent à deux hypothèses (non exclusives) qui pourraient expliquer le défaut de consolidation d'un souvenir ancien par les systèmes en réponse à la lésion des noyaux ReRh. La première hypothèse repose sur la possibilité d'un changement de métabolisme des neurones pyramidaux de CA1 dorsal qui se révéleraient alors inefficaces dans la poursuite de la consolidation d'un souvenir ancien. La deuxième hypothèse repose sur l'impossibilité du CPFm à répondre correctement aux signaux de l'apprentissage, dû à la baisse des niveaux du facteur neurotrophique BDNF chez le groupe de rats « Lésés ». Ces deux hypothèses ne sont d'ailleurs pas exclusives. Enfin, un dernier point de discussion portera sur la dynamique d'activation des gènes précoces, en particulier *c-fos*, au cours de l'encodage spatial dans chacun des deux groupes, qui nous montre que CA1 dorsal et le

## ***Discussion générale et Perspectives***

CPFm/CCA ne sont pas activés au même moment dans la cinétique d'apprentissage chez les rats « Sham » et chez les rats « Lésés ». Cette discussion sera suivie des perspectives qu'ouvre ce travail de thèse.

### **1 – Hypothèse d'un changement de métabolisme dans CA1 dorsal**

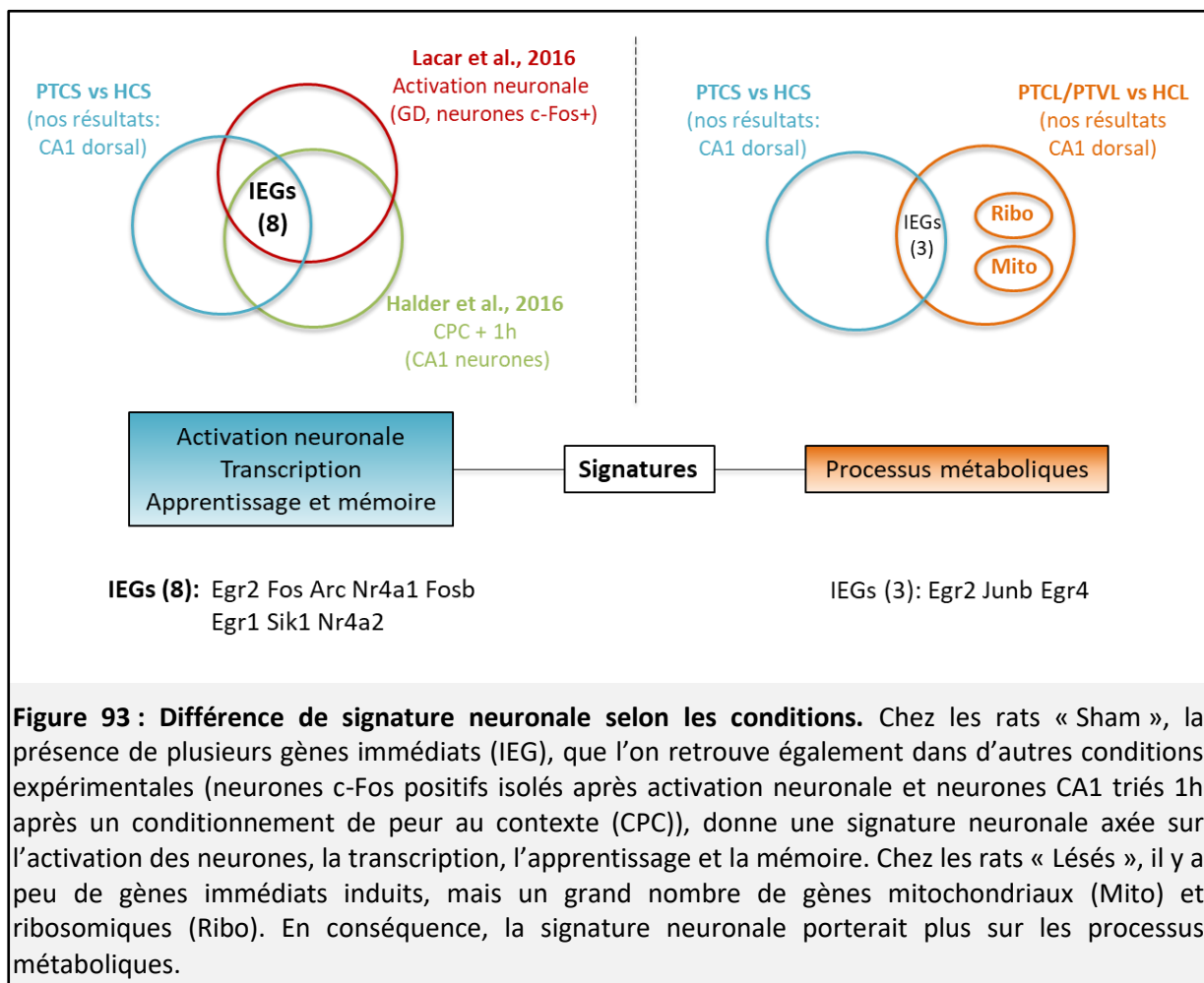
Le noyau reuniens projetant directement sur la sous-région CA1 de l'hippocampe (Herkenham, 1978; Vertes et al., 2006), sa lésion résulte en l'absence d'une entrée excitatrice majeure (Bertram and Zhang, 1999). Cela peut se répercuter sur l'activité de l'hippocampe lorsque cette structure est sollicitée de façon importante, comme lors de l'encodage d'un souvenir. Nos résultats vont dans ce sens puisqu'on observe une différence dans l'analyse fonctionnelle des voies activées entre les rats lésés et pseudo-lésés (sham) (Figure 92).

Chez les rats « Sham », l'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement régulés est en faveur de **la transcription et de l'activation des des voies intracellulaires favorisant l'apprentissage et la mémoire**. Ces résultats sont cohérents avec la littérature rapportant l'étude du transcriptome (par séquençage des ARNm) suite à une stimulation neuronale dans l'hippocampe. Lacar et collaborateurs (2016) ont injecté une solution de pentylentétrazol (un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub> qui induit une activation neuronale) dans le GD de souris et ont séquencé les ARNm présents uniquement dans les cellules c-Fos positives (Lacar et al., 2016). Halder et collaborateurs (2016) ont, eux, séquencé les ARNm des neurones de CA1 isolés (tris des cellules non neuronales par FACS) une heure après un test de conditionnement de peur au contexte effectué sur des souris (Halder et al., 2016). Nous avons comparé notre liste de gènes surexprimés dans CA1 dorsal chez les rats « Sham » en réponse à l'apprentissage (PTCS vs HCS) à celle des gènes surexprimés dans ces deux expériences. Nous avons constaté qu'une dizaine de gènes était commune aux trois expériences et qu'il s'agissait, en majorité, de gènes immédiats comme *c-fos*, *arc* et *zif268* (Figure 93).

Chez les rats « Lésés », les résultats du séquençage effectué sur CA1 dorsal ne font pas ressortir ces gènes immédiats dans la comparaison « PTCL vs HCL ». En revanche, nous voyons une induction significative de **gènes ribosomiques**. Une comparaison incluant le groupe PTVS fait apparaître une activation **des gènes mitochondriaux**, suggérant un lien

## Discussion générale et Perspectives

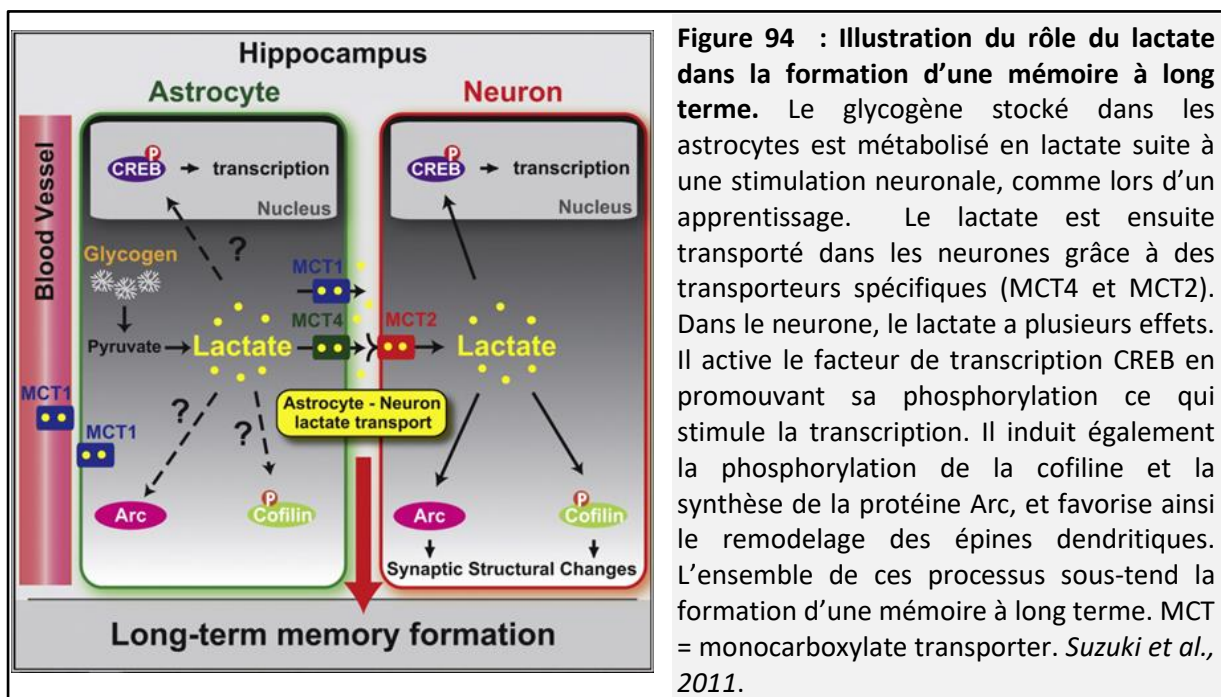
avec des **processus métaboliques** (Figure 93). La lésion des noyaux ReRh, en supprimant une entrée excitatrice importante, pourrait contraindre l'hippocampe à effectuer **un effort énergétique plus important en réponse à une stimulation** (d'où l'activation des processus métaboliques et des gènes mitochondriaux), nécessaire au rappel d'un souvenir récent, mais néanmoins insuffisant pour consolider durablement le souvenir. On peut d'ailleurs noter que chez les rats HC, quelques gènes appartenant à la voie des ribosomes sont diminués dans le groupe « Lésés » comparé au groupe « Sham » (Figure 93), et il est probable que cette perte doit être compensée fonctionnellement en réponse à une stimulation (ici, l'apprentissage).



L'énergie principalement disponible dans le sang s'y trouve sous forme de glucose et d'acides gras, mais seul le glucose est utilisé par le cerveau, car la barrière hématoencéphalique bloque l'entrée des acides gras. Les neurones n'ont pas directement accès au glucose : en effet, les astrocytes couvrent presque en totalité les capillaires, de ce fait ce sont eux qui captent le glucose (Mathiisen et al., 2010). Dans les astrocytes, le glucose est transformé en pyruvate au cours de la glycolyse, puis ce pyruvate, sous l'action de

## Discussion générale et Perspectives

l'enzyme lactate déshydrogénase, est transformé en acide lactique (ou lactate). Longtemps vu comme un système permettant la production d'énergie en absence d'oxygène, il est maintenant connu que l'utilisation du lactate, dans le cerveau, a lieu au cours d'une stimulation neuronale, même en présence d'une quantité suffisante d'oxygène (Prichard et al., 1991; Hu and Wilson, 1997). Cette glycolyse aérobie a pour la première fois été mise en lien avec l'activité synaptique par Pellerin et Magistretti (1994). Ces auteurs ont mis en évidence que la récupération par les astrocytes du glutamate, libéré par une stimulation neuronale, induit la consommation de glucose par ces mêmes astrocytes et la production de lactate (Pellerin and Magistretti, 1994). Des études plus récentes ont montré que l'échange de lactate entre les astrocytes et les neurones était nécessaire pour la mémoire à long terme (et non la mémoire à court terme), en lien avec le maintien d'une PLT et d'une expression des FT Arc et CREB phosphorylé (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011) (Figure 94).



En accord avec ces études, Goyal et collaborateurs (2014) mettent en corrélation la présence d'une glycolyse aérobie avec l'expression de gènes en relation avec la formation des synapses et la croissance (comme cela a été montré au cours du développement), tandis que l'utilisation d'une glycolyse oxydative serait associée à l'expression de gènes en relation avec la transmission synaptique et les mitochondries (Goyal et al., 2014) (Figure 95).

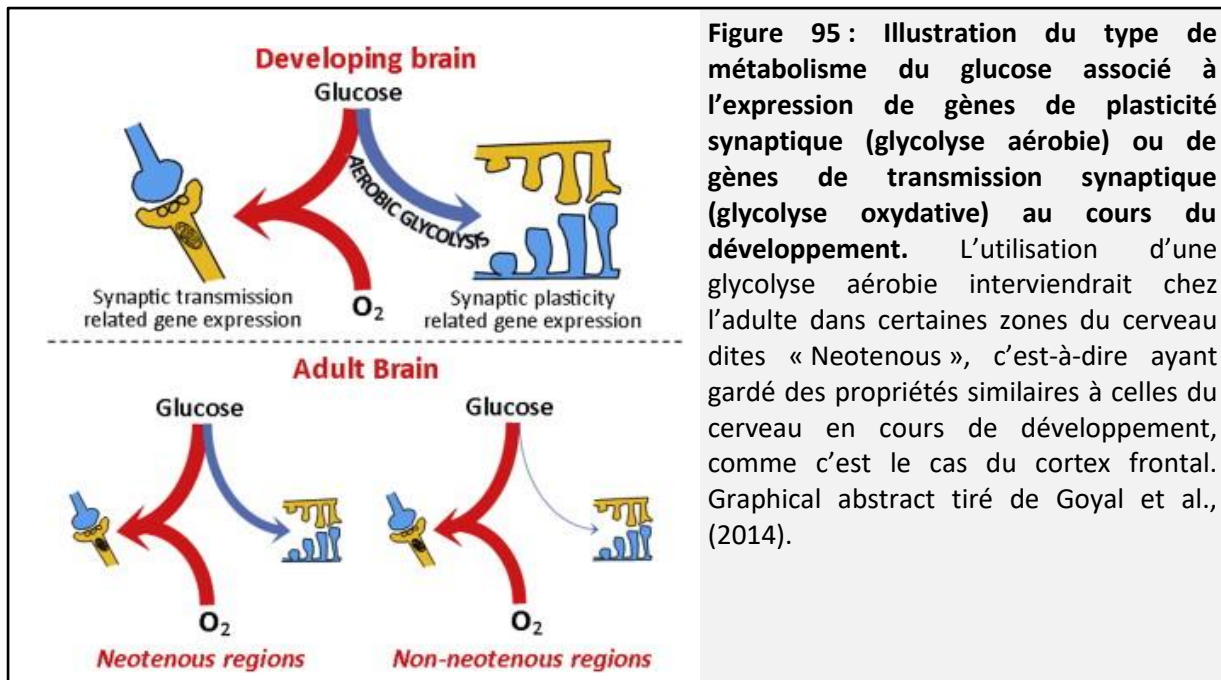


Figure 95 : Illustration du type de métabolisme du glucose associé à l'expression de gènes de plasticité synaptique (glycolyse aérobie) ou de gènes de transmission synaptique (glycolyse oxydative) au cours du développement. L'utilisation d'une glycolyse aérobie interviendrait chez l'adulte dans certaines zones du cerveau dites « Neotenuous », c'est-à-dire ayant gardé des propriétés similaires à celles du cerveau en cours de développement, comme c'est le cas du cortex frontal. Graphical abstract tiré de Goyal et al., (2014).

Or, nos résultats mettent justement en évidence une surexpression des gènes ribosomiques et mitochondriaux (impliqués dans la phosphorylation oxydative) chez les rats lésés comparés à des rats contrôles. On pourrait alors imaginer que **la lésion des noyaux ReRh, en supprimant l'entrée excitatrice sur l'hippocampe, perturbe le métabolisme énergétique local, contraignant les neurones à passer d'une utilisation du lactate à un autre processus, comme la respiration oxydative.** Celle-ci paraissant être moins appropriée pour la mémoire à long terme, car favorisant la transmission synaptique aux dépens de la formation des synapses, les rats lésés ne parviendraient pas à consolider durablement le souvenir.

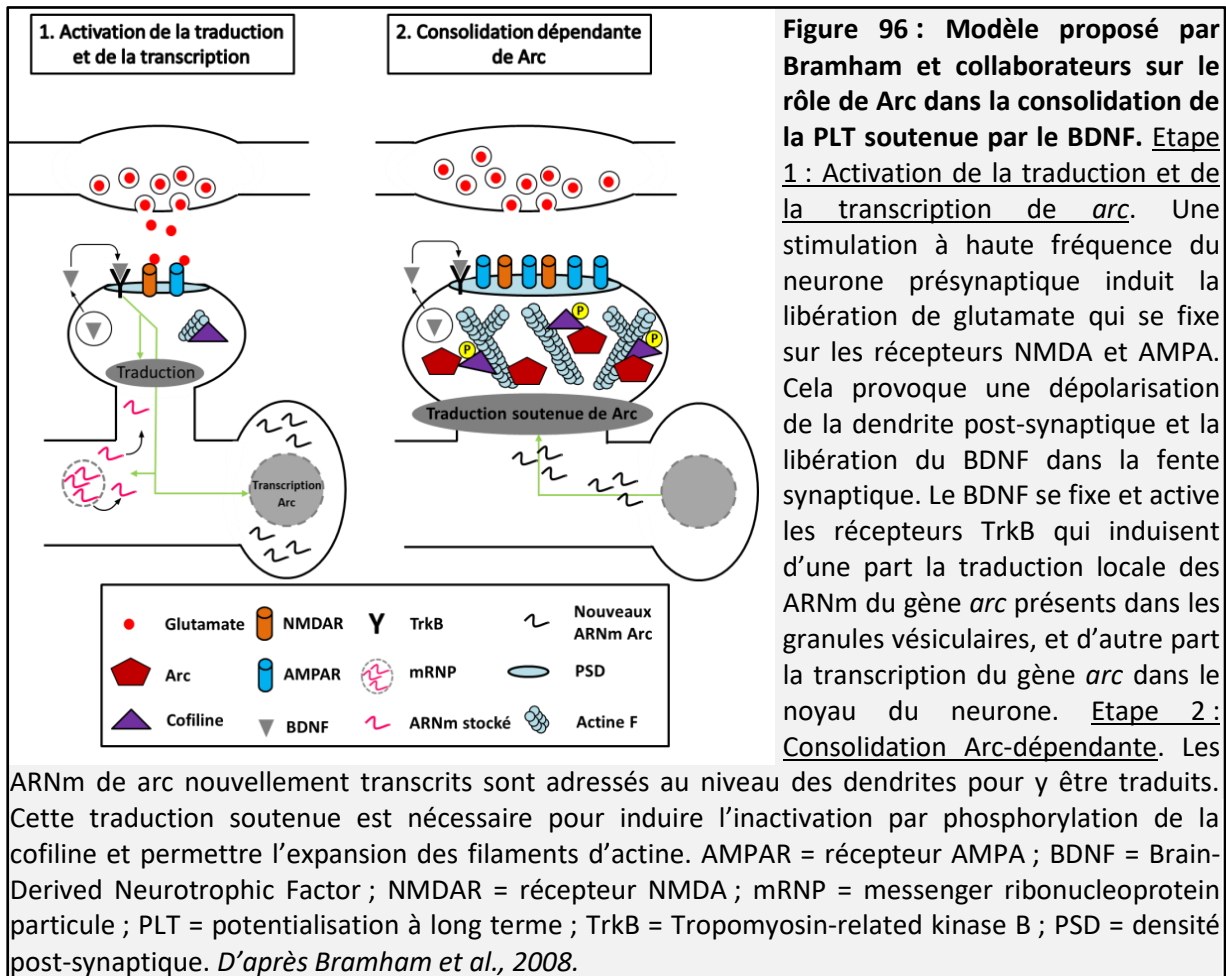
## 2 – La lésion des noyaux ReRh abaisse l'expression du *bdnf* dans le CPFm

Un résultat intéressant obtenu lors de ma thèse montre une sous-expression du gène du *bdnf* dans le CPFm au cours de l'apprentissage (PTCL vs PTCS) (Figure 86). Ceci suggère que le dysfonctionnement observé au sein de l'hippocampe semble avoir des conséquences négatives au sein du CPFm. De plus, cette diminution transcriptionnelle du gène du *bdnf* est déjà présente en conditions basales (HCL vs HCS). Cela pourrait provenir directement de la réduction en nombre des projections venant des noyaux ReRh, ou d'une perturbation indirecte engendrée par la lésion de ces noyaux.

## ***Discussion générale et Perspectives***

Le BDNF est un membre de la famille des facteurs neurotrophiques impliqué dans la régulation de la survie et de la différenciation neuronale au cours du développement (Huang and Reichardt, 2001). Dans le cerveau mature, le BDNF est un acteur majeur de la plasticité synaptique (Leal et al., 2014, 2015). En effet, supprimer le gène du BDNF par knock-out, ou bloquer l'action de son récepteur TrkB, inhibe la mise en place d'une PLT (Korte et al., 1995, 1998). Le mécanisme d'action du BDNF serait étroitement lié au remodelage des épines dendritiques. Par exemple, l'application exogène de BDNF au niveau de la voie perforante hippocampique induit une PLT et une augmentation de la densité des épines dendritiques (Messaoudi et al., 2002; Ying et al., 2002; Alonso et al., 2004). Ces effets seraient assurés par le remodelage du cytosquelette d'actine au niveau des dendrites (Rex et al., 2007). Le remodelage des épines dendritiques, sous le contrôle du BDNF, serait dépendant du gène immédiat *arc* (Messaoudi et al., 2002; Ying et al., 2002; Bramham et al., 2008). Bramham et collaborateurs (2008) proposent un modèle en deux étapes du rôle de Arc dans la consolidation de la PLT soutenue par le BDNF (Figure 96). Une stimulation d'un neurone entraîne la libération de glutamate au niveau de la synapse. Ce glutamate active ses récepteurs NMDA, qui laissent entrer le calcium, ce qui dépolarise la dendrite. Cela conduit à la libération locale du BDNF et à sa fixation sur son récepteur TrkB (Matsuda et al., 2009; Baj et al., 2011). L'activation des voies de signalisation intracellulaire, suite à l'activation du récepteur TrkB, conduirait à la traduction locale des ARNm du gène *arc*, présents au niveau des dendrites (Lyford et al., 1995), ainsi qu'à une activation de sa transcription dans le noyau du neurone (Messaoudi et al., 2002). La traduction serait notamment modulée par la régulation de l'activité des facteurs de traduction, comme eEF2 (Kanhema et al., 2006; Takei et al., 2009), la mobilisation des ARNm depuis les granules vésiculaires et le contrôle de la localisation de la machinerie de traduction locale.

La deuxième étape proposée par le modèle est une étape de consolidation dépendante de Arc. Les ARNm nouvellement transcrits au sein du noyau sont transportés dans les dendrites actives et traduits localement (Steward and Worley, 2001). Cette traduction soutenue serait nécessaire pour inactiver la cofiline (une protéine de clivage de l'actine polymérisée) par phosphorylation, afin de permettre l'expansion du cytosquelette d'actine et, *in fine*, la consolidation de la PLT (Gehler et al., 2004; Rex et al., 2007).



La plasticité synaptique étant le support de l'apprentissage et la mémoire, le BDNF joue également un rôle important dans ces processus. En effet, plusieurs tâches comportementales induisent l'expression du *bdnf* dans l'hippocampe (Hall et al., 2000; Mizuno et al., 2000) et son inhibition conduit à des déficits (Linnarsson et al., 1997; Mu et al., 1999). En plus d'un rôle dans la formation des souvenirs, le BDNF serait aussi impliqué dans leur conservation à long terme (Bekinschtein et al., 2007, 2008). En effet, Bekinschtein et collaborateurs (2007, 2008) ont mis en évidence qu'une phase de synthèse protéique tardive (12h après un test d'inhibition passive), dépendante du BDNF, était nécessaire dans l'hippocampe pour le rappel du souvenir 7 jours, et non 2 jours, après l'encodage. Cette phase tardive étayée par le BDNF s'accompagne d'une augmentation de la production des protéines c-Fos et Zif268. La plupart des études comportementales ont été menées sur l'hippocampe, mais Choi et collaborateurs (2010) ont montré que le BDNF était aussi nécessaire au sein du cortex prélimbique pour la consolidation d'un souvenir de peur (Choi et al., 2010).

## ***Discussion générale et Perspectives***

Ces études soulignent l'importance du BDNF dans les processus mnésiques. La diminution de l'expression de ce gène, que l'on observe chez les rats lésés au sein du CPFm, pourrait donc avoir des conséquences très néfastes à long terme, si elle s'accompagne d'une moindre production de la protéine (ce que nous n'avons pas pu tester). On pourrait alors imaginer que **la chute de BDNF ne permettrait pas un remodelage optimal des dendrites au niveau du CPFm, empêchant ainsi les processus de consolidation des réseaux nécessaires à la mémoire ancienne.**

### **3 – Dynamique d'activation du gène immédiat c-Fos au cours d'un apprentissage spatial**

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'expression de l'ARNm de *c-fos* et celle de sa protéine nous amènent à deux constatations :

- 1/ la production de la protéine c-Fos ne suit pas forcément l'apparition des ARNm *c-fos*, notamment chez les rats « Sham ».
- 2/ à ce temps d'acquisition, la protéine c-Fos n'est pas induite chez les rats « Sham », alors qu'elle l'est chez les rats « Lésés », que ce soit dans CA1 dorsal ou le CPFm (CCA).

Nous avons observé que le niveau de la protéine c-Fos ne différait pas du niveau basal chez les rats « Sham » après trois jours d'entraînement, alors que les ARNm de *c-fos* sont bien induits par l'apprentissage chez les rats « Sham ». Nous pensions donc que cela reflétait l'activité de cette structure à ce temps expérimental (3 jours d'acquisition + 1h ; cf. Bousiges et al., 2010). C'est d'ailleurs dans ce contexte que nous avons réalisé les expériences de séquençage des ARNm.

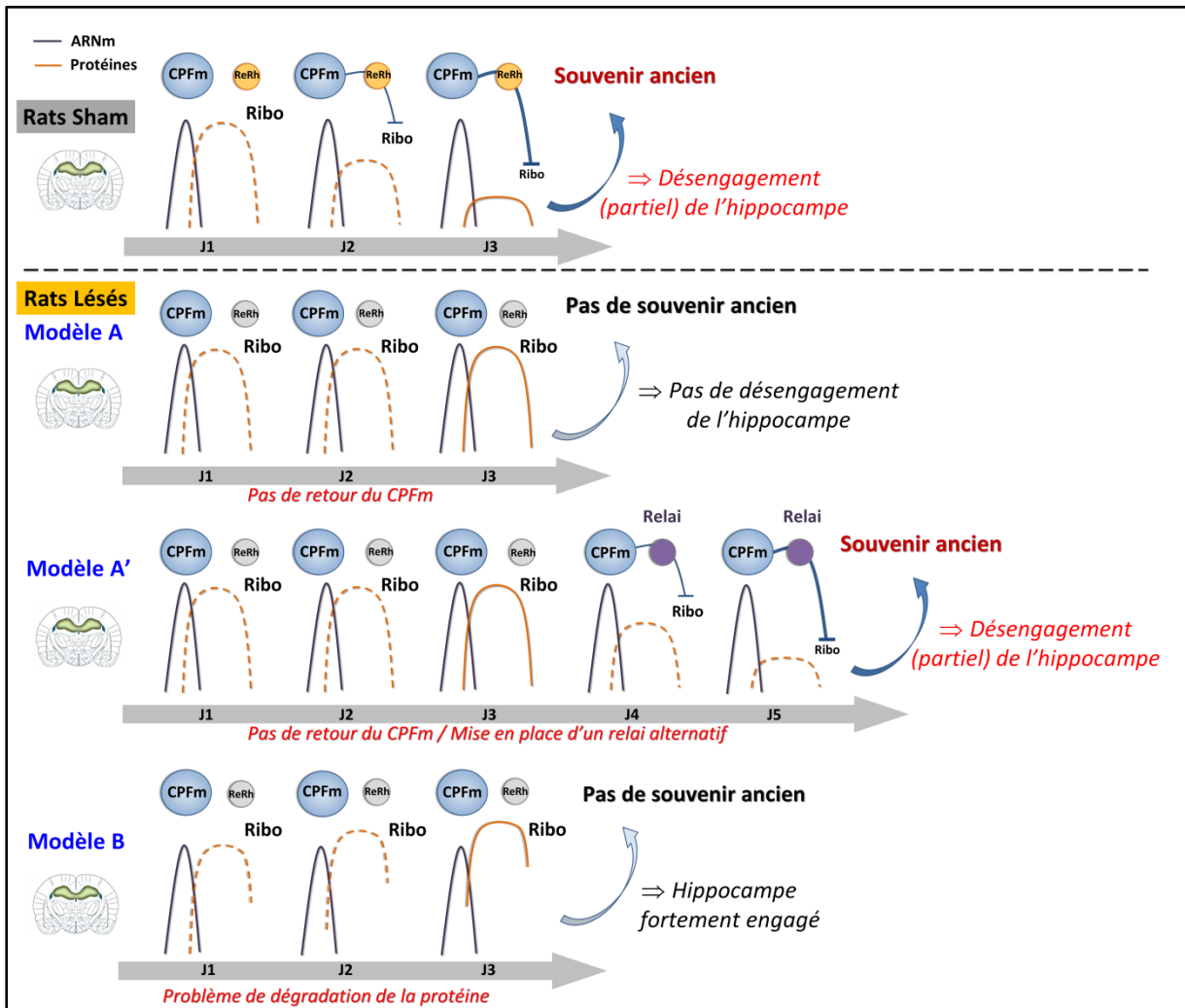
Le fait est que **la cinétique d'expression de la protéine c-Fos au cours d'un apprentissage en piscine de Morris n'est pas entièrement connue.** Par exemple, Carter et collaborateurs (2015) ont étudié les variations de la protéine c-Fos à différents délais au cours du premier jour d'entraînement, et ce dans CA1. Ils ont observé une induction de c-Fos entre 45min et 2h après le premier essai du premier jour (Carter et al., 2015). Barry et collaborateurs (2017) ont analysé l'expression de c-Fos avec un délai de 90min, 4h et 8h après 3 jours de piscine. Leurs résultats montrent que, dans CA1, la protéine est induite après 90min avant de retourner au niveau basal (Barry and Commins, 2017). Farina et Commins (2016) ont étudié



## ***Discussion générale et Perspectives***

l'expression de c-Fos après 5 jours d'apprentissage en piscine dans CA1 et ont montré que la protéine n'était pas induite à ce délai (Farina and Commins, 2016). Les résultats de Barry et al. (2017) et de Farina et al. (2016) s'accordent avec ceux de He et al. (2002) qui montrent que la protéine c-Fos est produite dans CA3 après 3 jours d'un entraînement dans un labyrinthe radial avant de retourner à un niveau basal après 5 jours (He et al., 2002). Pris dans l'ensemble de ces études, nos résultats suggèrent que **la protéine c-Fos pourrait être induite plus tôt chez les rats « Sham » (dès le premier jour)** (voir Figure 97, Rats Sham).

## Discussion générale et Perspectives



**Figure 97 : Hypothèses du rôle du retour du CPFm via les noyaux ReRh sur le contrôle de l'expression de c-Fos dans l'hippocampe, au cours de la formation d'un souvenir spatial. Rats Sham :** L'expression de l'ARNm de c-fos à J1 conduit à sa traduction grâce au pool important d'ARN ribosomiques présent. Dès J2, un dialogue s'instaure entre l'hippocampe et le CPFm, ce dernier exerçant un contrôle inhibiteur sur l'hippocampe, se traduisant par une baisse de la production de la protéine c-Fos. A J3, le retour inhibiteur du CPFm se fait plus pesant, par exemple sur les ribosomes, ce qui expliquerait la faible production de c-Fos dans l'hippocampe. L'induction de l'ARNm persiste cependant, reflet de l'activation du neurone par la tâche comportementale (stimuli sensoriels). Ce mécanisme permettrait un désengagement progressif partiel de l'hippocampe au profit d'un encrage cortical du souvenir.

**Rats Lésés : Modèle A** – La tâche comportementale engendre la production d'ARNm et de protéines à J1. Cependant, la lésion des noyaux ReRh ne permet pas la communication du CPFm vers l'hippocampe. Il n'y aurait alors pas de retour inhibiteur sur la traduction de c-Fos. De ce fait, chacun des jours suivants, les protéines c-Fos sont produites dans l'hippocampe, cette structure reste alors fortement engagée, empêchant la formation d'un souvenir ancien. **Modèle A'** – Le début est identique au modèle A, mais dans ce cas-ci, un relais différent des noyaux ReRh serait trouvé et permettrait au CPFm d'exercer son rôle inhibiteur, aboutissant au désengagement partiel de l'hippocampe et à la formation d'un souvenir ancien. Cette hypothèse suggère que des rats lésés entraînés plus longtemps seraient capables de rappeler un souvenir ancien. **Modèle B** – Ce modèle se base sur l'idée d'une perturbation des processus de dégradation de la protéine c-Fos. Chaque jour, les protéines sont produites en réponse à l'apprentissage, mais n'étant pas dégradées en totalité, le

## **Discussion générale et Perspectives**

niveau augmenterait progressivement au fil des jours. L'hippocampe resterait engagé, le souvenir ancien ne serait pas formé.

La consolidation par les systèmes repose sur le dialogue entre l'hippocampe et le CPFm, ce dernier permettant le désengagement progressif (plus ou moins partiel) de l'hippocampe (Bontempi et al., 1999; Maviel et al., 2004; Frankland et Bontempi, 2005; Teixeira et al., 2006). On peut donc imaginer que la lésion des noyaux ReRh empêcherait une signalisation retour importante du CPFm sur l'hippocampe. Dans notre cas, ceci conduirait à une surproduction de la protéine c-Fos dans CA1 dorsal. On ne connaît cependant pas les mécanismes impliqués dans le maintien d'un niveau élevé de c-Fos dans CA1 dorsal. Nos résultats montrent que le niveau des gènes ribosomiques est élevé dans l'hippocampe des animaux « Lésés » (alors qu'il ne l'est pas chez les rats « Sham » à ce moment), ceci pouvant rendre compte d'une traduction accrue de la protéine c-Fos (entre autre). La spécificité d'un tel mécanisme reste à établir. Nous émettons l'hypothèse que **les projections excitatrices du CPFm pourraient contrôler, en retour, les mécanismes de traduction dans l'hippocampe et jouer ainsi sur les niveaux de la protéine c-Fos** (Figure 97, Rats Sham). *In fine*, ceci permettrait de moduler l'engagement de l'hippocampe dans le mécanisme de consolidation systémique. Chez les rats « Lésés », la perte de ce contrôle résulterait en une production continue de protéine c-Fos dans CA1 dorsal, aboutissant à un engagement plus fort de l'hippocampe (Figure 97, Rats Lésés - Modèle A). Selon un tel schéma, il est possible que le cerveau trouve une voie alternative au retour du CPFm *via* les noyaux ReRh (par exemple, le cortex entorhinal), auquel cas, des rats lésés « surentraînés » devraient être capables de rappeler un souvenir ancien (Figure 97, Rats Lésés Modèle A'). Ce modèle pourrait notamment expliquer les résultats obtenus au laboratoire concernant l'effet bénéfique d'une stabulation de rats lésés dans un environnement leur offrant un enrichissement physique et social, avant d'effectuer un apprentissage spatial (Ali et al., 2017). Les animaux lésés élevés dans cet environnement enrichi ne présentent plus le déficit de rappel d'un souvenir spatial ancien (25 jours post-acquisition), observé sur des rats gardés en environnement dit « standard » (un par cage, sans objet). On peut imaginer que l'enrichissement de l'environnement ait favorisé la réorganisation des réseaux neuronaux, permettant aux rats lésés de palier à l'absence des noyaux ReRh, peut-être en trouvant plus rapidement un autre relai.

## ***Discussion générale et Perspectives***

Dans un cas physiologique, la protéine c-Fos augmente rapidement, mais elle est instable, c'est-à-dire rapidement dégradée par le système ubiquitine-protéasome (Stancovski et al., 1995; Sasaki et al., 2006). Une augmentation seule de sa traduction ne suffirait peut-être pas à maintenir des niveaux élevés, c'est pourquoi nous avons envisagé un dernier modèle où les processus de dégradation seraient endommagés chez les rats « Lésés ». Les niveaux de protéines, stimulés chaque jour par la tâche comportementale, seraient alors plus élevés après 3 jours d'entraînement chez les rats « Lésés » que chez les rats « Sham », comparativement à leur groupe contrôle respectif (PTCL vs HCL > PTCS vs HCS) (Figure 97, Rats Lésés Modèle B).

Il faut noter que, chez les rats « Lésés », la synthèse de la protéine c-Fos est induite alors que le niveau d'expression de l'ARNm ne diffère pas de celui des HC, dans les deux structures. Cependant, si les niveaux d'ARNm sont tout de même élevés (Figure 53), ils semblent simplement moins inductibles. Dans une étude récente menée au laboratoire, Ali et collaborateurs (2017) ont montré que la lésion des noyaux ReRh provoque une sur-activation de l'amygdale (mise en évidence par une augmentation du nombre de neurones c-Fos positifs) aussi bien à l'état basal que lors du rappel d'un souvenir spatial ancien (25 jours post-acquisition) acquis en piscine de Morris. On peut envisager que la sur-activation de l'amygdale perturbe le fonctionnement de l'hippocampe et/ou du CPFm.

Pris dans leur ensemble, nos résultats montrent que la lésion des noyaux ReRh perturbe l'activité de l'hippocampe et du CPFm, **dès trois jours d'apprentissage spatial (et peut-être même auparavant)**. Chez les rats lésés, on note des perturbations métaboliques dans l'hippocampe, une expression du *bndf* diminuée dans le CPFm, et une activation de l'hippocampe plus soutenue au cours de l'acquisition. Ces événements vont sans doute contribuer à la perturbation de la consolidation d'un souvenir ancien chez les animaux privés des noyaux ReRh.

Ce travail de thèse ouvre plusieurs perspectives.

Concernant l'hypothèse d'une perturbation du métabolisme énergétique, il pourrait être intéressant de séparer les neurones des glies afin de voir où sont retrouvés les changements dans l'expression des gènes. Une étude visant à mesurer les taux de lactate et de glucose extracellulaires dans l'hippocampe au cours de la formation d'un souvenir permettrait de valider, ou non, l'hypothèse que la lésion des noyaux ReRh affecte la glycolyse aérobie dans l'hippocampe. Ceci est possible selon une technique de microdialyse décrite par Newman et collaborateurs (2011). Une sonde pourrait être implantée dans l'hippocampe dorsal *via* un guide-canule. Cette sonde est recouverte par les enzymes de dégradation du glucose (glucose oxydases) ou du lactate (lactate oxydases) qui, en présence de leur substrat respectif, vont le métaboliser et ainsi générer un courant mesuré par la sonde (Newman et al., 2011).

Il est également nécessaire de s'assurer qu'une moindre expression du *bdnf* se traduise par une moindre synthèse de sa protéine dans le CPFm. Si cela est confirmé, ce résultat apporterait une explication très intéressante quant aux travaux effectués sur le remodelage des épines dendritiques dans le CPFm chez les rats lésés (actuellement en cours au sein de notre équipe). Il serait alors intéressant d'étudier plus avant les voies de signalisation intracellulaires du BDNF perturbées par la lésion. L'étude des mécanismes épigénétiques pourrait également être envisagée sur des gènes cibles, comme le *bdnf*, qui semble fortement affecté par la lésion. Les régulations épigénétiques jouant un rôle important dans l'expression des gènes en relation avec l'environnement, il se peut que la perte des noyaux ReRh affecte ces processus et contribue par ce biais aux déficits observés. Des analyses à un délai plus tardif (mémoire à long terme) pourraient être faites, notamment en ce qui concerne la régulation du BDNF dans le CPFm, afin de voir si les perturbations moléculaires que nous avons observées se poursuivent au cours de la consolidation et si d'autres en découlent.

Enfin, il faudrait effectuer une analyse stéréologique d'apparition de la protéine c-Fos à différents temps d'acquisition dans CA1 dorsal et le CPFm, ce qui permettrait de valider, ou

### ***Discussion générale et Perspectives***

non, les différents modèles que nous proposons. Une expérience visant à surentraîner les rats lésés nous apporterait également des informations importantes sur les possibles mécanismes de compensations mis en place dans le cerveau de ces animaux.







# Annexes



## **1 – Contexte scientifique**

Le but de cette étude était de réaliser une analyse cinétique des modulations génétiques et épigénétiques qui prennent place au cours de la formation d'un souvenir spatial en piscine de Morris chez des rats. L'idée initiale était de voir si, au cours de l'acquisition et après celle-ci, des modulations biochimiques apparaissaient de façon plus prononcée à un/des moments donnés afin de choisir ces délais pour étudier par la suite l'impact de la lésion des noyaux ReRh. En effet, l'hypothèse était qu'à ces délais où les régulations génétiques et épigénétiques sont plus fortes, la lésion des noyaux ReRh pourrait affecter ces régulations et, de ce fait, expliquer l'absence de rétention à long terme du souvenir spatial.

Deux cinétiques distinctes ont été réalisées ; l'une au cours de la phase d'acquisition d'une tâche de piscine de Morris, l'autre au cours de la période de consolidation (phase de post-acquisition). Les délais choisis pour la phase d'acquisition étaient de **1 jour**, pour évaluer les régulations ayant lieu au tout début de la tâche, de **3 jours** pour avoir un temps intermédiaire, qui est aussi un délai ayant déjà été étudié préalablement par notre équipe au cours d'une tâche spatiale (Bousiges et al., 2010, 2013), et de **8 jours**, qui correspondent à la fin de la phase d'acquisition normalement effectuée chez des rats opérés (nous avons souhaité nous placer dans des conditions identiques à celles utilisées avec des rats opérés). Les délais retenus pour la phase de post-acquisition étaient de **+2 jours** (2 jours après la fin de la phase d'acquisition) pour analyser les régulations prenant place au cours de la mémoire à long terme récente (Loureiro et al., 2012), de **+7 jours** pour rester dans la mémoire à long terme récente mais avec un délai plus long, et de **+20 jours** pour étudier la mémoire à long terme ancienne (Loureiro et al., 2012; Lesburguères et al., 2011).

## **2 – Méthodes**

Les méthodes utilisées pour cette étude sont les mêmes que celles décrites dans la partie 2, aussi elles ne seront que brièvement expliquées.

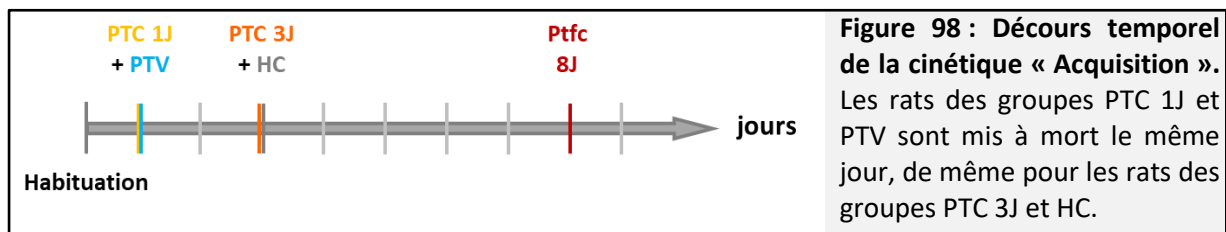
## Annexe 1

### 2.1 – La piscine de Morris

La tâche débute par un jour d' « habitude » et se poursuit par la phase d'acquisition.

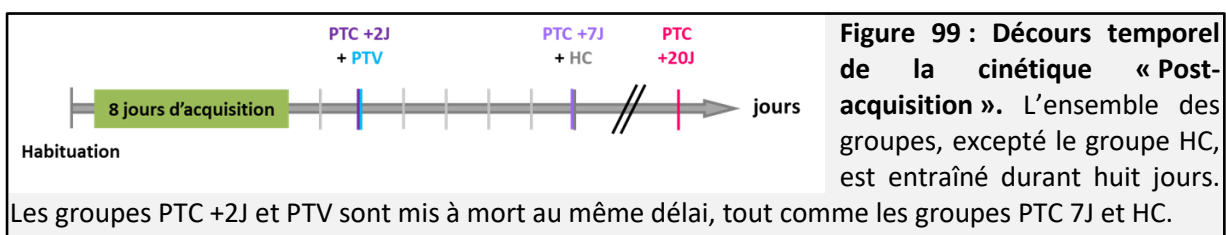
#### 2.1.1 – Cinétique « Acquisition »

Cette étude a été réalisée avec 5 groupes de 5 rats chacun. Le premier est un groupe de rats HC, le second est un groupe PTV entraîné durant 1 jour et les trois autres sont des groupes PTC effectuant soit 1 jour, 3 jours ou 8 jours d'acquisition (ci-après nommés PTC 1J, PTC 3J, PTC 8J), à raison de quatre essais par jour (Figure 98). Tous les groupes ont commencé la tâche le même jour.



#### 2.1.2 – Cinétique « Post-acquisition »

Cinq nouveaux groupes de cinq rats ont été utilisés pour cette étude. Le premier est un groupe de rats HC, le second un groupe PTV entraîné durant 8 jours et mis à mort 2 jours après la fin du dernier essai, et les trois autres sont des groupes PTC entraînés également pendant 8 jours, mais mis à mort 2 jours, 7 jours ou 20 jours après le dernier essai (ci-après nommés PTC +2J, PTC +7J, PTC +20J) (Figure 99). Tous les groupes ont commencé la tâche le même jour.



Nous avons décidé d'entraîner les rats au maximum 8 jours afin de se situer dans des conditions identiques à celles utilisées pour des rats opérés. En effet, habituellement une durée d'acquisition de 5 jours est suffisante pour permettre à des rats non-opérés de rappeler un souvenir à long terme ancien. Cependant, des rats ayant subi une chirurgie ont

## **Annexe 1**

besoin de plus de temps pour acquérir le souvenir et le rappeler à long terme, même des rats pseudo-lésés.

### **2.2 – Mise à mort et dissections**

Pour les groupes de la cinétique « Acquisition », les rats ont été mis à mort une heure après le dernier essai. Le groupe HC a, lui, été mis à mort en même temps que le groupe PTC 3J. Pour les groupes de la cinétique « Post-acquisition », les rats HC ont été mis à mort en même temps que le groupe PTC +20J.

Les régions cérébrales analysées pour la cinétique « Acquisition » sont l'HD (qui n'a pas été sous-disséqué) et le CPFm. Pour la cinétique « Post-acquisition », les structures analysées sont la sous-région CA1 dorsale de l'hippocampe et le CPFm.

### **2.3 – Analyses biochimiques**

Les analyses effectuées sont des RT-qPCR pour évaluer l'expression des gènes via leur ARNm, ainsi que des Western blots pour quantifier des protéines ciblées.

### **2.4 – Analyses statistiques**

Les performances en piscine ont été analysées par un test ANOVA à mesures répétées, et lorsque celui-ci était significatif ( $p < 0,05$ ), un test post-hoc de Newman-Keuls a été appliqué. Pour les analyses biochimiques, un test ANOVA à un facteur (Groupe) a été réalisé pour chaque résultat, suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls lorsque le test ANOVA était significatif ( $p < 0,05$ ).

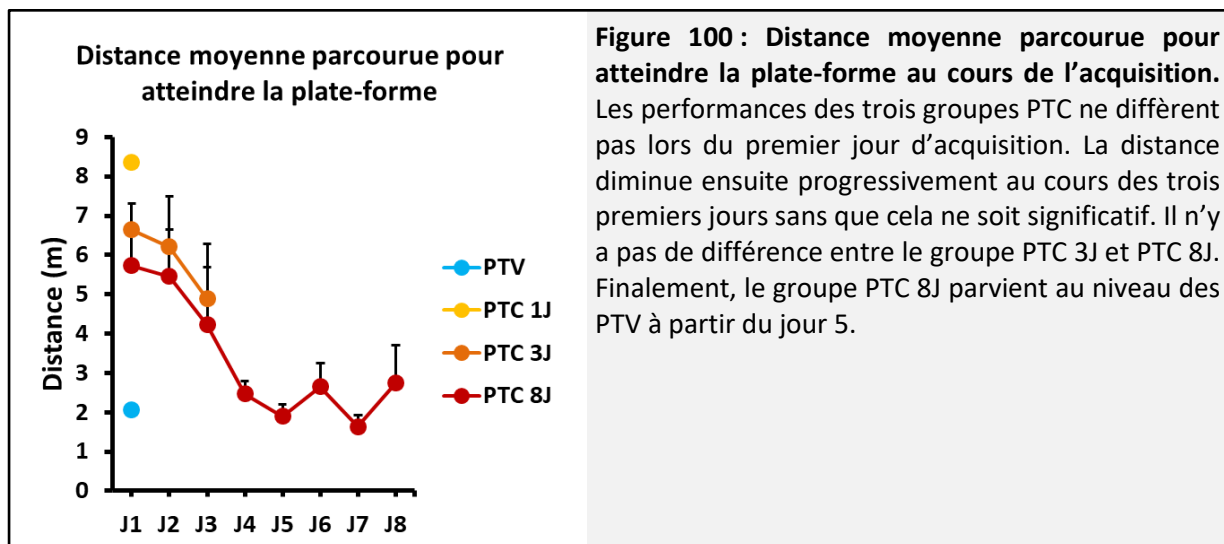
## **3 – Résultats – Cinétique « Acquisition »**

### **3.1 – Piscine de Morris**

Au cours de l'« habituation », la distance moyenne parcourue pour atteindre la plate-forme visible diminue progressivement au cours des Essais ( $F_{(3,45)} = 32,14$  ;  $p < 0,001$ ), ce qui signifie que les rats comprennent la tâche. Globalement, il n'y a pas de différence entre les Groupes ( $F_{(1,15)} = 0,49$  ;  $p = 0,69$ ).

## Annexe 1

Au cours de l'acquisition, à l'issue du Jour 1, l'analyse statistique montre un effet Groupe ( $F_{(3,16)} = 8,64$  ;  $p = 0,001$ ), les animaux PTV parcourant une distance significativement plus courte que les trois groupes PTC. Aucune différence n'est présente entre ces trois derniers. Au cours des trois premiers jours d'acquisition, la distance parcourue diminue progressivement mais pas de façon significative chez les groupes PTC 3J et PTC 8J ( $F_{(2,16)} = 1,32$  ;  $p = 0,29$ ). Il n'y a pas de différence entre les Groupes ( $F_{(1,8)} = 0,43$  ;  $p = 0,53$ ) ni pour l'interaction Jours x Groupes ( $F_{(2,16)} = 0,008$  ;  $p = 0,99$ ). Enfin, un test t pour échantillons appariés effectué sur les performances du groupe PTC 8J montre une diminution progressive de la distance parcourue au cours des jours. A partir du jour 5, la distance est significativement plus courte que celle du jour 1. Cependant, les performances au jour 8 ne diffèrent pas significativement de celles du jour 1 ( $p = 0,10$ ) (Figure 100).



### 3.2 – Analyse de l'expression des gènes

#### 3.2.1 – Modulation de l'activité transcriptionnelle par l'apprentissage dans CA1 dorsal

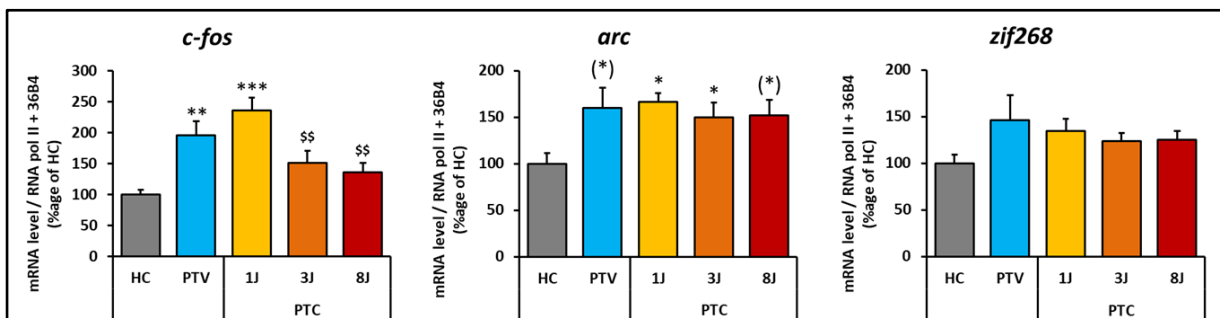
Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'expression des gènes immédiats. Les résultats montrent que la transcription du gène *c-fos* augmente significativement chez les groupes PTV (1,96 fois,  $p = 0,007$ ) et PTC 1J (2,35 fois,  $p < 0,001$ ) comparé au groupe HC, ce qui n'est pas le cas des groupes PTC 3J et PTC 8J. Il faut noter que cette augmentation peut être associée au changement d'environnement plutôt qu'à l'encodage spatial puisque l'induction est également présente chez le groupe PTV. Dans cette condition expérimentale, les

## Annexe 1

analyses statistiques ne montrent pas d'induction significative de *c-fos* après 3 jours d'entraînement, bien que nous l'ayons détectée dans des conditions similaires (même temps d'investigation), par séquençage des ARNm ainsi que par RT-qPCR, dans CA1 dorsal (Figure 55) et dans l'hippocampe dorsal dans une étude antérieure (Bousiges et al., 2010). Il est possible que le nombre d'animaux par groupe (5) soit insuffisant pour faire statistiquement ressortir l'augmentation (1,5 fois) que nous avons obtenue.

L'activité du gène *arc* est différente de celle de *c-fos*. Son expression est significativement augmentée chez les groupes PTC 1J (1,7 fois,  $p = 0,047$ ) et PTC 3J (1,5 fois,  $p = 0,03$ ) comparativement au groupe HC, et tend à l'être chez les groupes PTV (1,6 fois,  $p = 0,06$ ) et PTC 8J (1,5 fois,  $p = 0,07$ ). L'expression de ce gène semble donc se maintenir au cours de la tâche, sans être spécifique de l'encodage spatial.

Enfin, pour le gène *zif268*, il n'y a aucune variation significative entre les groupes ( $F_{(4,20)} = 1,30$  ;  $p = 0,30$ ) (Figure 101).



**Figure 101 : Expression de trois gènes immédiats dans l'HD au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats de chaque gène cible sont normalisés par rapport à la moyenne de l'expression des gènes contrôles ARNpolII et 36B4. Ils sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC sous forme de moyenne + EC. L'expression du gène *c-fos* augmente significativement chez les groupes PTV et PTC 1J. L'expression du gène *arc* augmente également avec l'apprentissage et tend à se stabiliser durant les huit jours que dure la tâche. Le gène *zif268* n'est, lui, pas induit en réponse à l'apprentissage. ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \* = significativement différent de HC ; § = significativement différent de PTC 1J ; (\*) = tendance par rapport à HC ( $0,05 < p < 0,1$ ).

Nous avons regardé si l'induction des gènes immédiats *c-fos* et *arc* se répercutait sur l'expression de gènes tardifs, comme ceux codant pour des sous-unités des récepteurs glutamatergiques NMDA (*grin2a*, anciennement nommé *nr2a*) ou AMPA (*gria1* anciennement nommé *glur1*), pour le BDNF (*bdnf total* et *bdnf eIV*) ou encore pour des régulateurs de l'acétylation des histones (*hdac2* et *cbp*). Nous avons ciblé des gènes codant

## Annexe 1

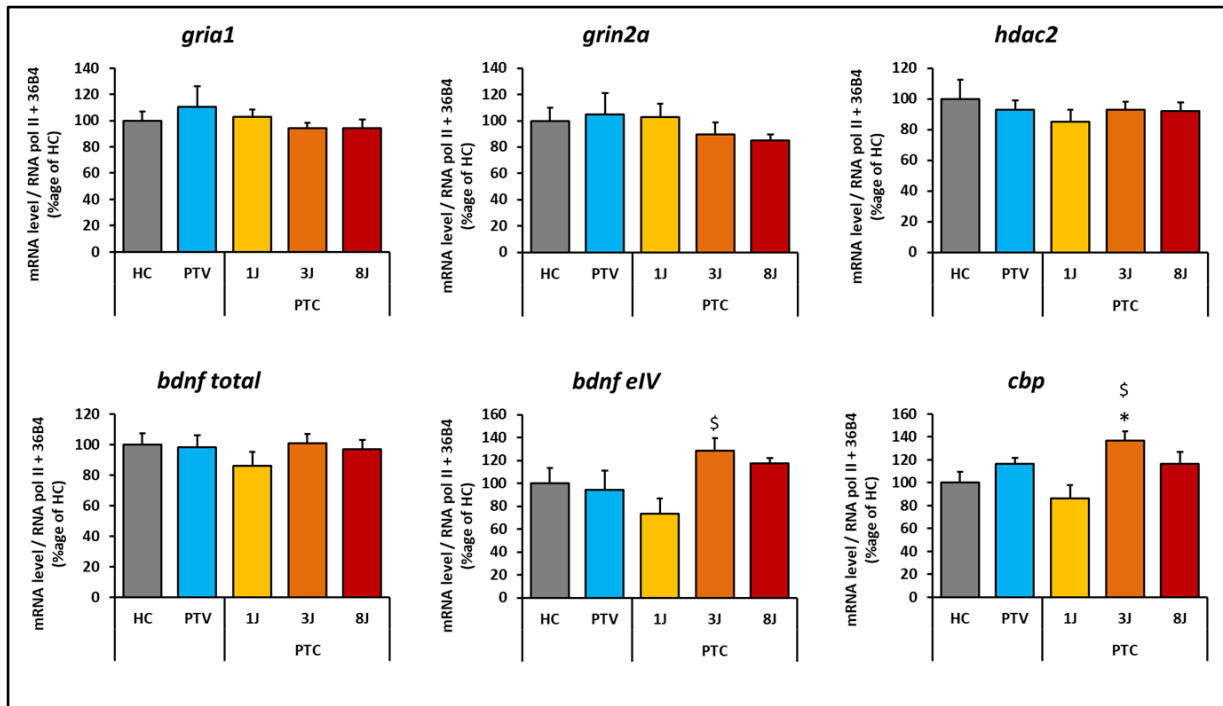
pour des sous-unités des récepteurs glutamatergiques, car ceux-ci sont impliqués dans la PLT qui intervient dans la consolidation des souvenirs en lien avec la transcription des gènes immédiats *c-fos* et *arc* (Morris et al., 1986; Fleischmann et al., 2003; Köhr et al., 2003; Chowdhury et al., 2006). Le BDNF joue un rôle dans la plasticité synaptique (Shieh et al., 1998; Novkovic et al., 2015; Rösch et al., 2005) et la consolidation à long terme (Soulé et al., 2006; Bekinschtein et al., 2007, 2008). Enfin, les modulateurs de l'acétylation des histones, notamment CBP et les HDAC, jouent également un rôle important dans la plasticité synaptique, l'activation de la transcription des gènes ainsi que la mémoire spatiale (Vecsey et al., 2007; Bousiges et al., 2010; Barrett et al., 2011; Chatterjee et al., 2013; Haettig et al., 2011).

Les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence une modulation de l'expression des gènes codant pour les sous-unités des récepteurs au glutamate *grin1* ( $F_{(4,20)} = 0,62$  ;  $p = 0,65$ ) ou *grin2a* ( $F_{(4,20)} = 0,63$  ;  $p = 0,64$ ), mais des différences apparaissent concernant la régulation du gène codant le *bdnf* (Figure 102).

Chez le rat, ce gène comporte huit exons non-codants et neuf promoteurs alternatifs (Aid et al., 2007 ; voir Figure 3 partie 1 - Contexte Scientifique). Plusieurs ARNm différents sont donc obtenus à partir du même gène. On observe une augmentation de l'expression du gène *bdnf* *eV* chez le groupe PTC 3J comparé au groupe PTC 1J (1,7 fois,  $p = 0,04$ ) mais pas de variation significative sur l'ensemble des ARNm du *bdnf* au sein de l'HD ( $F_{(4,20)} = 0,67$  ;  $p = 0,62$ ) (Figure 102).

Nous avons également constaté une augmentation de l'expression du gène codant la protéine CBP après 3 jours d'acquisition comparé au contrôle HC (1,4 fois,  $p = 0,04$ ), mais également au groupe PTC 1J (1,6 fois,  $p = 0,007$ ), en accord avec les études précédentes réalisées au laboratoire (Bousiges et al., 2010) (Figure 102).

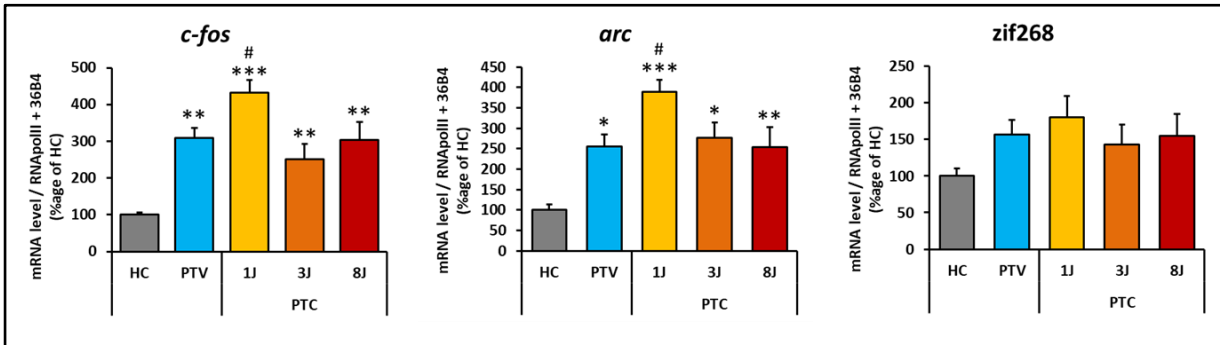




**Figure 102 : Expression de six gènes tardifs dans l'HD au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats de chaque gène cible sont normalisés par rapport à la moyenne de l'expression des gènes contrôles ARNpolII et 36B4. Ils sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC sous forme de moyenne + EC. L'apprentissage n'induit pas de modification de l'expression des sous-unités *gria1* et *grin2a* des récepteurs glutamatergiques, du gène *hdac2* ni du niveau global du *bdnf*. En revanche, après trois jours d'entraînement, les animaux ont un niveau d'expression du *bdnf IV* et de *cbp* augmenté. ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \* = significativement différent de HC ; § = significativement différent de PTC 1J.

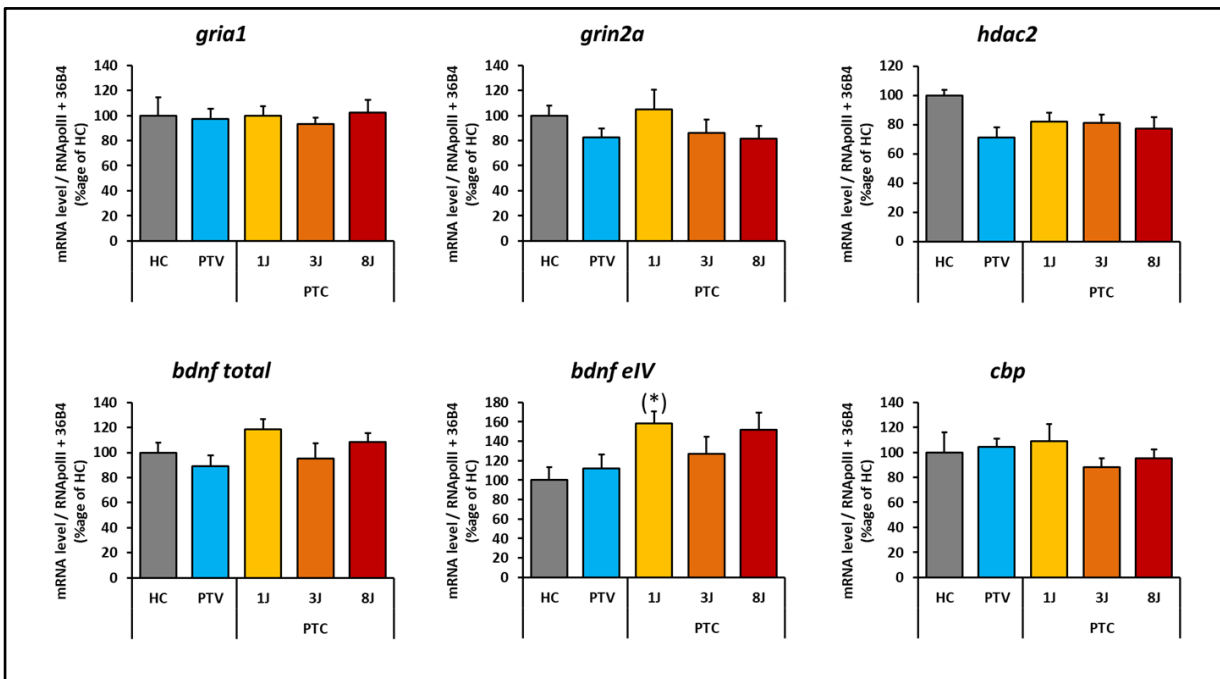
### 3.2.2 – Modulation de l'activité transcriptionnelle par l'apprentissage dans le CPFm

Tout comme pour l'HD, nous avons regardé l'expression de certains gènes immédiats dans le CPFm. Nous avons observé que l'expression des gènes *c-fos* et *arc* était significativement augmentée chez l'ensemble des groupes expérimentaux comparés au contrôle HC. Cependant, seul le groupe PTC 1J exprime significativement plus ces gènes que le groupe PTV (*c-fos* : 1,4 fois,  $p = 0,03$  ; *arc* : 1,5 fois,  $p < 0,001$ ). L'expression du gène *zif268* ne varie pas de façon significative entre les groupes ( $F_{(4,19)} = 1,26$  ;  $p = 0,32$ ) (Figure 103).



**Figure 103 : Expression de trois gènes immédiats dans le CPFm au cours de l’acquisition d’un souvenir spatial.** Les résultats de chaque gène-cible sont normalisés par rapport à la moyenne de l’expression des gènes contrôles ARNpolIII et 36B4. Ils sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC sous forme de moyenne + SEM. Les gènes *c-fos* et *arc* présentent le même profil d’expression, à savoir une augmentation tout au long de l’acquisition comparé au groupe HC, avec une expression supérieure à celle des PTV au délai 1 jour. ANOVA à un facteur suivi d’un test post-hoc de Newman-Keuls. \* = significativement différent de HC ; # = significativement différent de PTV.

A la différence de l’HD, la transcription des gènes tardifs ciblés ne varie pas significativement au cours de la cinétique dans le CPFm (*grin1* :  $F_{(4,19)} = 0,15$   $p = 0,96$  ; *grin2a* :  $F_{(4,19)} = 0,98$   $p = 0,44$  ; *hdac2* :  $F_{(4,19)} = 2,51$   $p = 0,08$  ; *bdnf total* :  $F_{(4,19)} = 1,65$   $p = 0,20$  ; *bdnf eIV* :  $F_{(4,19)} = 2,52$   $p = 0,08$  ; *cbp* :  $F_{(4,19)} = 0,63$   $p = 0,64$ ) à ces délais. On notera cependant que le *bdnf eIV* tend à être significativement plus transcrit (Figure 104).



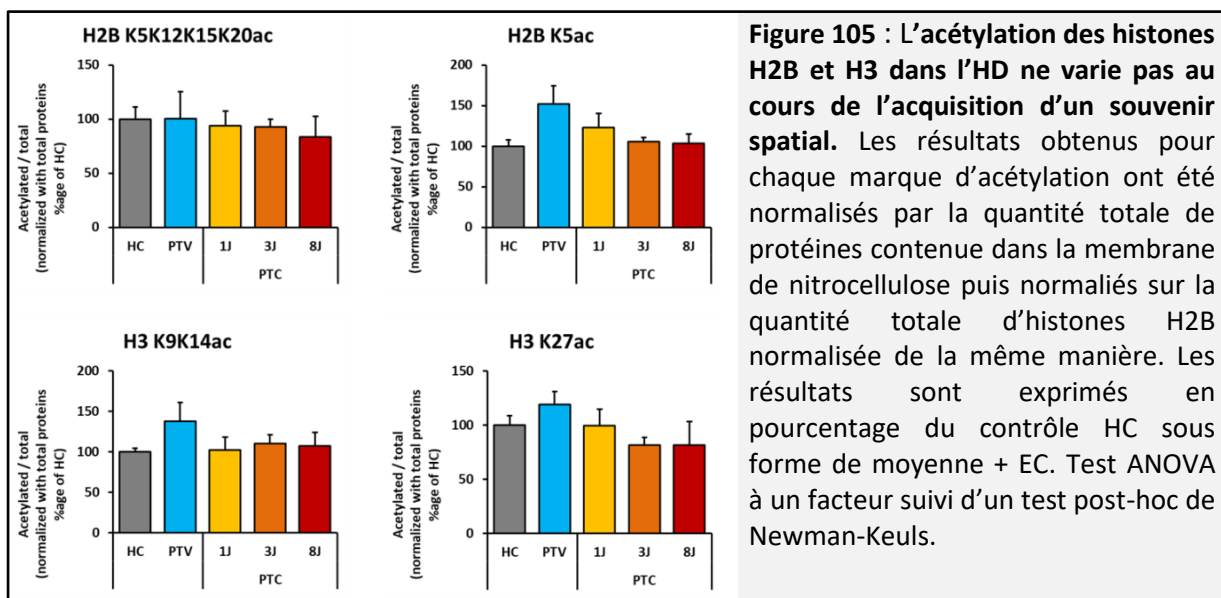
**Figure 104 : Expression de six gènes tardifs dans le CPFm au cours de l’acquisition d’un souvenir spatial.** Les résultats de chaque gène-cible sont normalisés par rapport à la moyenne de l’expression des gènes contrôles ARNpolIII et 36B4. Ils sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC sous forme de moyenne + SEM. L’apprentissage spatial n’a pas d’impact significatif sur l’expression de gènes tardifs ciblés par RT-qPCR. ANOVA à un facteur suivi d’un test post-hoc de Newman-Keuls. (\*) tendance par rapport au groupe HC ( $p = 0,10$ ).

### 3.3 – Analyse de l'acétylation des histones au cours de l'apprentissage

L'analyse protéique a exclusivement porté sur la détection de l'acétylation des histones. En effet, la littérature montre qu'une augmentation des niveaux d'acétylation des histones dans l'hippocampe (Bousiges et al., 2010, 2013 ; Zhong et al., 2014 ; Carter et al., 2015) et le CPF (Gräff et al., 2012, Vieira et Korzus, 2014) est nécessaire pour permettre une bonne rétention à long terme du souvenir spatial. Nous avons donc regardé comment évoluait l'acétylation des histones H2B, H3 et H4 au sein de l'HD et du CPFm au cours des différents jours d'acquisition du souvenir spatial.

#### 3.3.1 – Pas de changement dans l'acétylation des histones au niveau global dans l'hippocampe dorsal

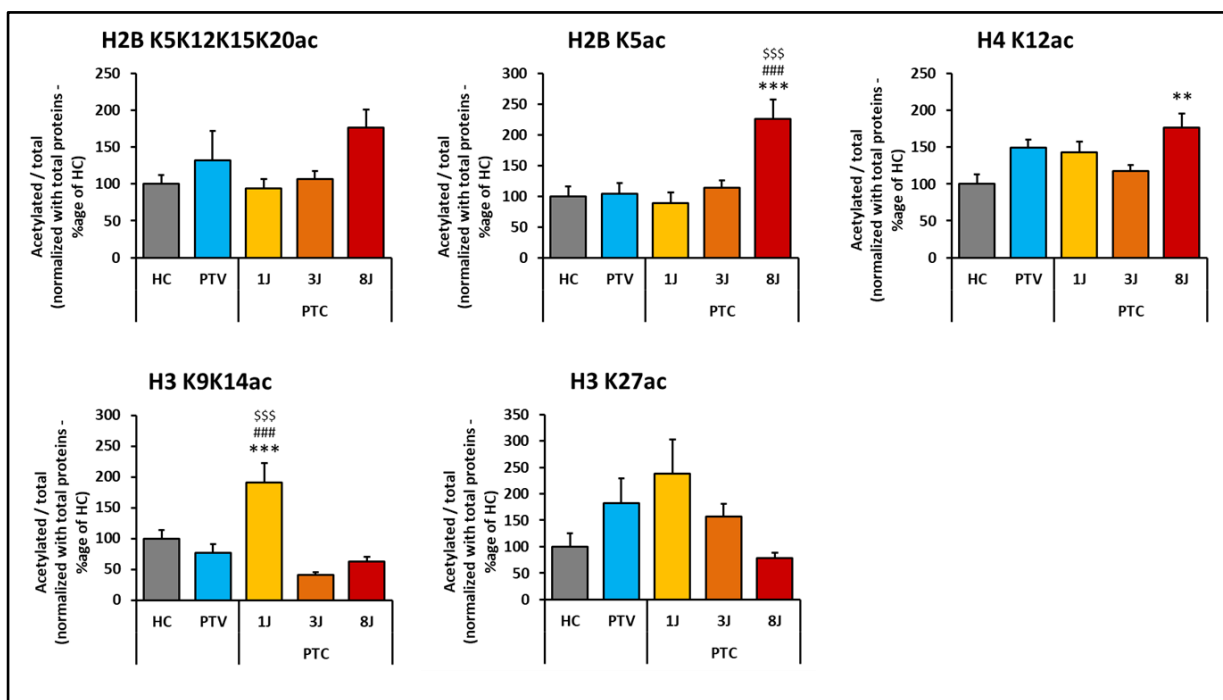
L'acétylation de l'histone H2B sur les lysines 5, 12, 15 et 20 (H2B K5K12K15K20ac) ne varie pas significativement au cours de l'apprentissage ( $F_{(4,20)} = 1,31 ; p = 0,30$ ), ni H2B K5ac seule ( $F_{(4,19)} = 2,31 ; p = 0,10$ ). L'acétylation de l'histone H3, que ce soit sur les lysines 9 et 14 ( $F_{(4,19)} = 0,93 ; p = 0,47$ ) ou sur la lysine 27 ( $F_{(4,19)} = 1,12 ; p = 0,38$ ), ne change pas au cours du temps (Figure 105). L'apprentissage spatial n'engendrait donc pas de modification majeure concernant l'acétylation des histones au sein de l'ensemble de l'HD. Pour le temps 3 jours, ce résultat n'est pas en accord avec une étude précédente du laboratoire (Bousiges et al., 2010) qui avait été pourtant réalisée dans des conditions expérimentales similaires (mémoire spatiale en piscine de Morris chez des rats naïfs).



**Figure 105 : L'acétylation des histones H2B et H3 dans l'HD ne varie pas au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats obtenus pour chaque marque d'acétylation ont été normalisés par la quantité totale de protéines contenue dans la membrane de nitrocellulose puis normalisés sur la quantité totale d'histones H2B normalisée de la même manière. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle HC sous forme de moyenne + EC. Test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls.

### 3.3.2 – L'apprentissage induit l'acétylation des histones dans le CPFm

Dans le CPFm, les niveaux d'acétylation sont plus sensibles à l'apprentissage que dans l'HD. En effet, si H2B K5K12K15K20ac ne varie pas significativement ( $F_{(4,20)} = 2,17$  ;  $p = 0,11$ ), H2B K5ac augmente après huit jours d'acquisition, comparativement au groupe HC (2,3 fois,  $p < 0,001$ ), au groupe PTV (2,2 fois,  $p < 0,001$ ), mais également par rapport aux groupes PTC 3J et 8J (respectivement 2,5 fois,  $p < 0,001$  et 2 fois,  $p < 0,001$ ). Le profil de H4 K12ac est sensiblement similaire, avec une augmentation chez le groupe PTC 8J comparé au contrôle HC (1,8 fois,  $p < 0,001$ ). Concernant l'acétylation de l'histone H3, H3 K9K14ac augmente de façon significative après un jour d'acquisition par rapport au groupe HC (1,9 fois,  $p < 0,001$ ), mais aussi par rapport au groupe PTV (2,5 fois,  $p < 0,001$ ) et aux groupes PTC 3J et 8J (respectivement 5 fois,  $p < 0,001$  et 3 fois,  $p < 0,001$ ). H3 K27ac, malgré une forte tendance, ne varie pas significativement entre les groupes ( $F_{(4,20)} = 2,61$  ;  $p = 0,07$ ) (Figure 106).



**Figure 106 : Evolution de l'acétylation des histones H2B, H3 et H4 dans le CPFm au cours de l'acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats obtenus pour chaque marque d'acétylation ont été normalisés par la quantité totale de protéines contenue dans la membrane de nitrocellulose. Ce résultat a ensuite été rapporté sur la quantité totale d'histones H2B normalisée de la même manière. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle HC sous forme de moyenne + SEM). L'acétylation des histones H2B et H4 augmente significativement après 8 jours d'acquisition tandis que l'acétylation de H3 est induite après 3 jours d'apprentissage mais ne persiste pas dans le temps. ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \* = significativement différent de HC ; # = significativement différent de PTV ; \$ = significativement différent des autres groupes PTC.

### **3.3 – Conclusion sur l'expression des gènes et l'acétylation des histones induites par l'apprentissage spatial**

Au cours d'un apprentissage spatial en piscine de Morris, on constate une activation des gènes immédiats *c-fos* et *arc*, à la fois dans l'HD et le CPFm, ce qui est cohérent avec la littérature (Bousiges et al., 2010, 2013; Zhong et al., 2014; Carter et al., 2015). Cependant, cette production d'ARNm ne semble pas avoir de conséquences immédiates sur l'expression des gènes tardifs que nous avons testés. On peut imaginer qu'1h après le dernière essai, nous nous placions un peu trop tôt pour détecter leur transcription. Cependant, à partir du troisième jour, nous aurions pu attendre une augmentation des gènes tardifs du fait des possibles activations au cours des jours précédents (J1 et J2, pour le délai 3 jours, et de J1 à J7 pour le délai 8 jours). Une technique plus sensible que la RT-qPCR, telle que le séquençage des ARNm, aurait peut-être permis de détecter des changements sur ces gènes tardifs (dont l'induction transcriptionnelle est plus faible que celle des gènes immédiats, donc plus difficile à détecter).

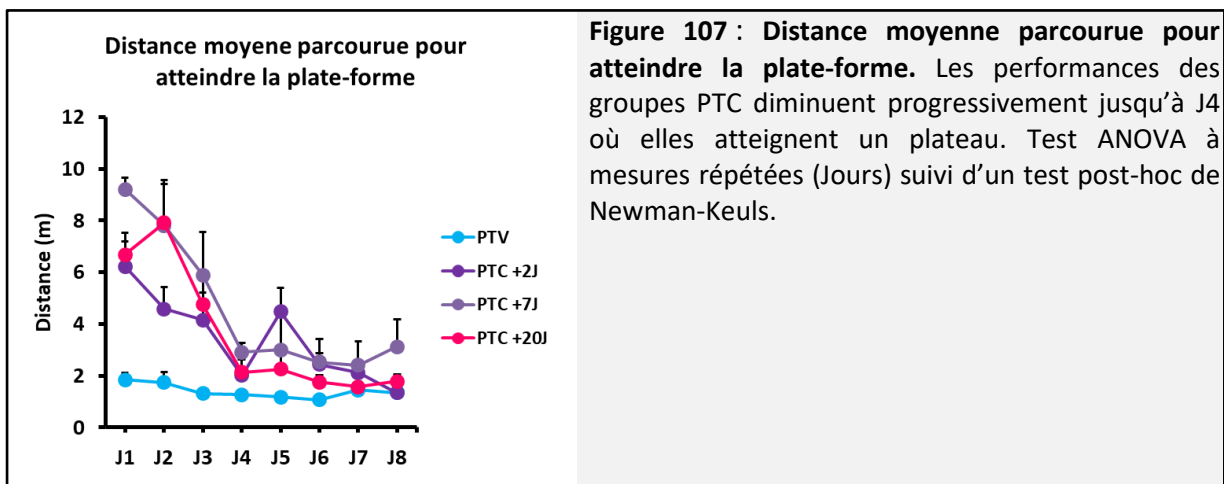
Concernant l'acétylation des histones, il semble que l'apprentissage spatial induise des variations selon les histones et la structure, mais nous ne pouvons pas savoir si ces variations sont directement impliquées dans l'activation de la transcription des gènes, notamment des gènes *c-fos* et *arc*, dont l'expression augmente avec l'apprentissage. Néanmoins, des études antérieures réalisées au sein du laboratoire ont montré que trois jours de piscine de Morris induisaient une augmentation significative de H2B K5K12K15K20ac et de H4 K12ac que celles-ci étaient directement associées à une activation du gène *c-fos* chez des rats WT (Bousiges et al., 2010). On peut donc imaginer que cela soit également le cas ici, néanmoins une analyse par chromatine immunoprécipitation serait nécessaire pour le mettre en évidence.

## 4 – Résultats – Cinétique « Post-acquisition »

### 4.1 – Piscine de Morris

Les résultats du jour d' « habitude » montrent une diminution progressive de la distance moyenne parcourue pour atteindre la plate-forme cachée au cours des Essais ( $F_{(3,48)} = 16,37$  ;  $p < 0,001$ ), sans différence significative entre les Groupes ( $F_{(3,16)} = 0,65$  ;  $p = 0,59$ ) ni pour l'interaction Essais x Groupes ( $F_{(3,48)} = 1,10$  ;  $p = 0,38$ ).

Au cours de l'acquisition, la distance parcourue pour atteindre la plate-forme diminue progressivement au cours des Jours ( $F_{(7,112)} = 27,29$  ;  $p < 0,001$ ). Il a une différence de performance entre les Groupes ( $F_{(3,16)} = 6,45$  ;  $p = 0,004$ ), ainsi que pour l'interaction Jours x Groupes ( $F_{(21,112)} = 3,75$  ;  $p < 0,001$ ), les groupes PTC +2J, +7J et +20J parcourant une distance significativement plus grande que le groupe PTV lors des trois premiers jours (Figure 107).

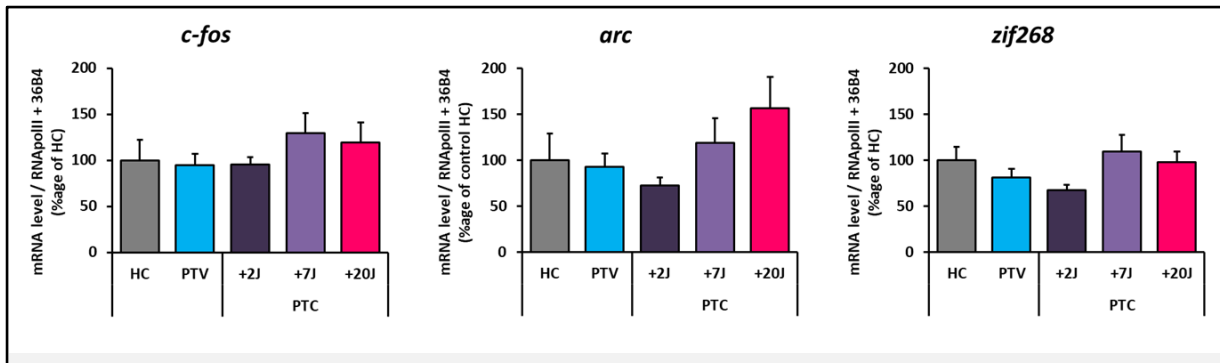


### 4.2 – Analyse de l'expression des gènes dans CA1 dorsal et le CPFm

#### 4.2.1 – Il n'y a pas de changement dans l'expression des gènes dans CA1 dorsal après l'apprentissage

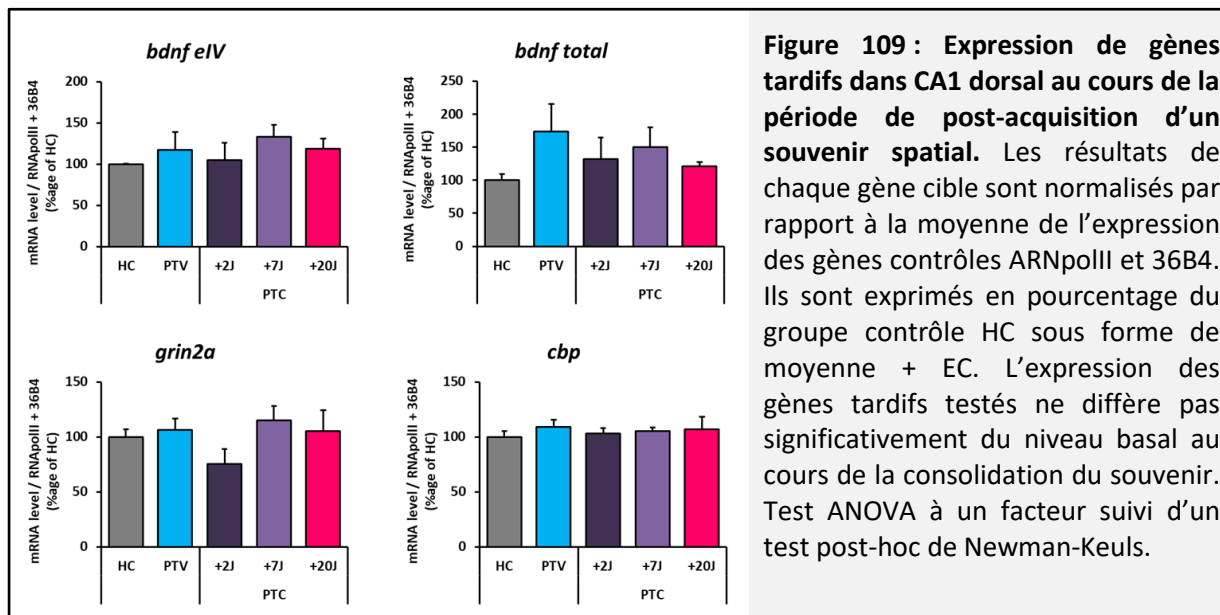
Alors qu'ils sont activés au cours de l'acquisition, la transcription des gènes immédiats *c-fos* et *arc* ne persiste pas après l'apprentissage dans la sous-région CA1 dorsal de l'hippocampe. En effet, l'expression du gène *c-fos* ne montre pas de variation significative au cours du temps ( $F_{(4,18)} = 0,96$  ;  $p = 0,50$ ), tout comme l'expression du gène *arc* ( $F_{(4,17)} = 1,88$  ;  $p = 0,16$ ) et *zif268* ( $F_{(4,17)} = 1,81$  ;  $p = 0,17$ ) (Figure 108). On note cependant une grande variabilité entre les échantillons d'un même groupe, surtout pour le gène *arc*.

## Annexe 1



**Figure 108 : Expression de trois gènes immédiats dans CA1 dorsal au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats de chaque gène-cible sont normalisés par rapport à la moyenne de l'expression des gènes contrôles RNAPolIII et 36B4. Ils sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC sous forme de moyenne + SEM. L'activité des gènes immédiats ne diffère pas significativement du niveau de base après la fin de l'apprentissage. Test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls.

De la même façon, nous n'avons pas observé de changement dans l'expression de certains gènes tardifs comme le *bdnf eIV* ( $F_{(4,18)} = 0,62$  ;  $p = 0,64$ ), le *bdnf total* ( $F_{(4,18)} = 0,97$  ;  $p = 0,44$ ), *grin2a* ( $F_{(4,18)} = 1,22$  ;  $p = 0,34$ ) et *cbp* ( $F_{(4,18)} = 0,25$  ;  $p = 0,91$ ) (Figure 109).



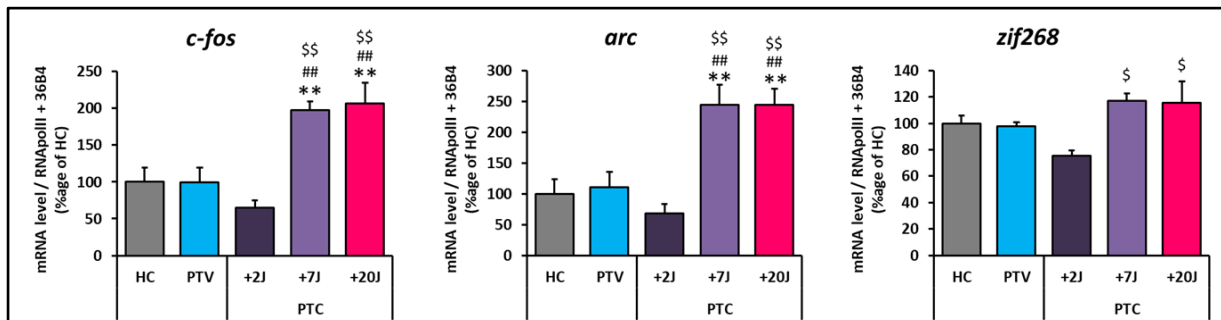
**Figure 109 : Expression de gènes tardifs dans CA1 dorsal au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats de chaque gène cible sont normalisés par rapport à la moyenne de l'expression des gènes contrôles RNAPolIII et 36B4. Ils sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC sous forme de moyenne + EC. L'expression des gènes tardifs testés ne diffère pas significativement du niveau basal au cours de la consolidation du souvenir. Test ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls.

### 4.2.2 – L'apprentissage spatial induit une persistance de la transcription des gènes immédiats dans le CPFm

De façon surprenante, alors que chez le groupe PTC +2J l'expression des gènes immédiats *c-fos* et *arc* se situe au niveau basal, elle augmente fortement chez le groupe PTC +7J (*c-fos* : 2 fois,  $p = 0,002$  ; *arc* 2,4 fois,  $p = 0,003$ ) et se stabilise jusqu'à 20 jours après la fin de l'apprentissage (*c-fos* : 2 fois,  $p = 0,003$  ; *arc* : 2 fois,  $p = 0,004$ ) (Figure 110). Pour le gène

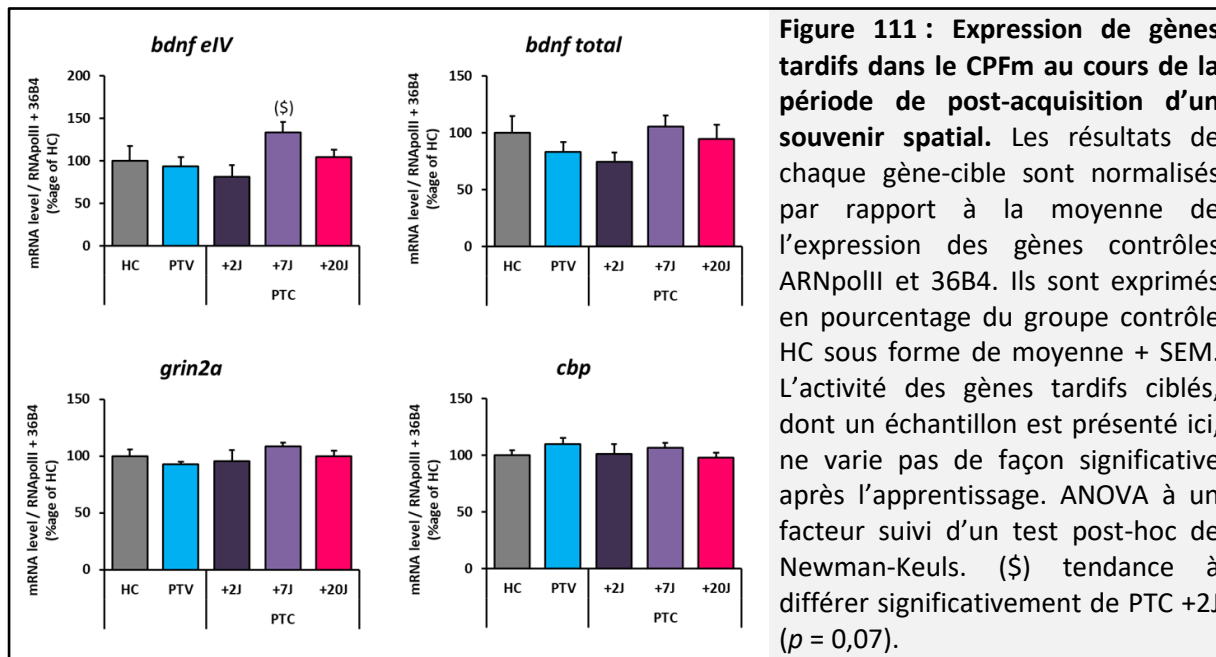
## Annexe 1

*zif268*, cet effet est moindre, avec une augmentation de 1,2 fois non-significative comparée au groupe HC, mais de 1,5 fois significative comparée au groupe PTC +2J (Figure 110).



**Figure 110 : Expression de trois gènes immédiats dans le CPFm au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats de chaque gène-cible sont normalisés par rapport à la moyenne de l'expression des gènes contrôles ARNpolIII et 36B4. Ils sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC sous forme de moyenne + SEM. L'activité des gènes immédiats augmente 7 jours après la fin de la phase d'acquisition et se maintient au moins durant deux semaines. ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \* = significativement différent de HC ; # = significativement différent de PTV ; \$ = significativement différent de PTC +2J.

Cependant, la présence d'une transcription importante des gènes *c-fos* et *arc* ne se répercute pas par une augmentation de l'expression des gènes tardifs que nous avons ciblés, comme le *bdnf eIV* ( $F_{(4,17)} = 2,24$  ;  $p = 0,11$ ), le *bdnf total* ( $F_{(4,17)} = 1,46$  ;  $p = 0,26$ ), *grin2a* ( $F_{(4,17)} = 0,99$  ;  $p = 0,44$ ) ou *cbp* ( $F_{(4,17)} = 0,69$  ;  $p = 0,61$ ) (Figure 111).



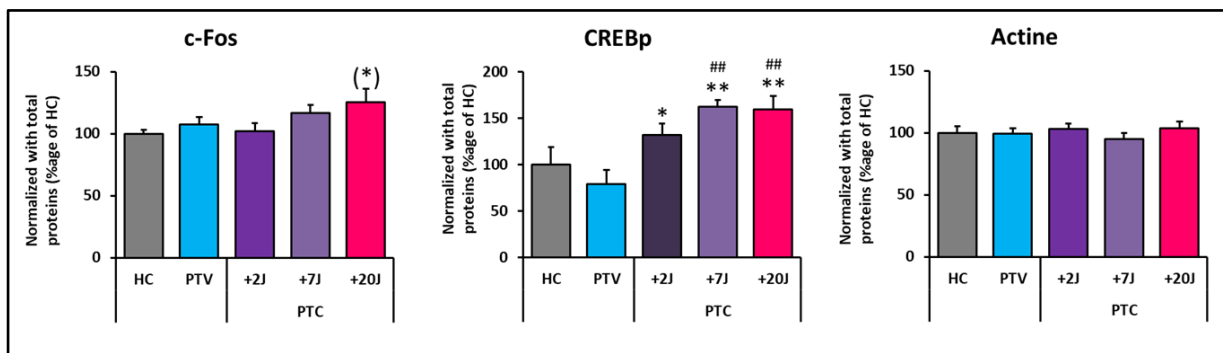
**Figure 111 : Expression de gènes tardifs dans le CPFm au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats de chaque gène-cible sont normalisés par rapport à la moyenne de l'expression des gènes contrôles ARNpolIII et 36B4. Ils sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC sous forme de moyenne + SEM. L'activité des gènes tardifs ciblés, dont un échantillon est présenté ici, ne varie pas de façon significative après l'apprentissage. ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls. (\$) tendance à différer significativement de PTC +2J ( $p = 0,07$ ).



### 4.3 – Analyse de l'expression protéique dans le CPFm

L'analyse protéique a été effectuée uniquement sur les échantillons du CPFm, puisque c'est dans cette structure que nous avons observé l'augmentation des gènes immédiats au cours du temps. Nous avons regardé les niveaux d'acétylation des histones, mais aucune variation significative n'a été trouvée (données non montrées).

Nous avons également voulu savoir si l'expression des gènes immédiats se retrouvait au niveau protéique. Concernant c-Fos, nous observons une tendance ( $F_{(4,20)} = 2,42$  ;  $p = 0,08$ ), que nous retrouvons chez le groupe PTC +20J (Figure 112). Nous n'avons malheureusement pas pu tester les protéines Arc et Zif268 car nous ne disposons pas d'anticorps fonctionnels dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, nous avons testé le FT CREB, sous sa forme active phosphorylée (CREBp) et nous avons observé une augmentation significative de sa production chez les groupes PTC +7J (1,6 fois,  $p = 0,003$ ) et +20J (1,6 fois,  $p = 0,003$ ), mais également chez le groupe PTC +2J (1,3 fois,  $p = 0,04$ ) comparativement au groupe HC.



**Figure 112 : Expression de protéines dans le CPFm au cours de la période de post-acquisition d'un souvenir spatial.** Les résultats obtenus ont été normalisés sur la quantité totale de protéines contenues dans la membrane de nitrocellulose. Les résultats sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle HC, sous forme d'une moyenne + EC. La protéine c-Fos tend à être plus produite chez le groupe PTC +20J et le FT actif, CREB phosphorylé (CREBp) est lui significativement plus présent chez les groupes PTC comparé au groupe HC. Les valeurs de l'actine sont montrées à titre de contrôle. ANOVA à un facteur suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls. \* = significativement différent de HC ; # = significativement différent de PTV. (\*) tendance par rapport au groupe HC ( $p = 0,10$ ).

### 4.3 – Conclusion sur l'expression des gènes et des protéines induite après un apprentissage spatial

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent qu'au cours de la période de consolidation, le CPFm est plus sollicité que l'hippocampe, notamment à des délais longs comme 7 et 20

## **Annexe 1**

jours après la fin de l'apprentissage. On observe une activité importante des gènes immédiats *c-fos* et *arc*, sans que cela se retrouve sur la transcription des gènes tardifs. En ce qui concerne les analyses de l'expression des FT par Western blot, la protéine c-Fos tend à être produite de façon significative, tandis que CREBp l'est effectivement dès 2 jours après la fin de l'apprentissage. Ces résultats semblent cohérents avec la surexpression des ARNm de *c-fos* et *arc* à ces mêmes délais.

## **5 – Conclusion générale sur l'effet de l'apprentissage sur l'expression génique et protéique**

Dans la recherche des mécanismes moléculaires associés à un processus biologique, il est toujours difficile de connaître le temps le plus approprié pour mettre en évidence des effets significatifs en conditions physiologiques ou pathologiques. C'est pourquoi nous avons réalisé cette étude prospective sur la cinétique d'apparition des régulations génétiques, protéiques et épigénétiques, au sein de l'hippocampe et du CPFm, au cours et après un apprentissage spatial en piscine de Morris. Une telle étude n'a, à ma connaissance, jamais été publiée auparavant.

Nous avons observé une activité transcriptionnelle au cours de l'acquisition, à la fois dans l'hippocampe dorsal et le CPFm, puis une persistance de l'activité transcriptionnelle de *c-fos* uniquement dans le CPFm à des temps post-acquisition très tardifs. Ces données originales vont dans le sens de la théorie de la consolidation à l'échelle des systèmes, une théorie qui propose que le souvenir encodé au sein de l'hippocampe est transféré vers les aires corticales, sous contrôle du CPFm, pour y être durablement conservé (Frankland et Bontempi, 2005). Ces données peuvent également être mises en parallèle avec les résultats obtenus par Restivo et collaborateurs (2009) concernant le déroulement temporel de la formation des épines dendritiques. Ces auteurs ont mis en évidence qu'à la suite d'une tâche de conditionnement de peur au contexte, les épines dendritiques se formaient de façon rapide (après un jour) et importante au sein de la sous-région hippocampique CA1 dorsal, tandis qu'elles apparaissent plus tardivement (après 36 jours) dans le CCA (Restivo et al., 2009). Aceti et collaborateurs (2015) ont, eux, montré que l'augmentation de l'expression de *c-fos* au cours du temps, suite à un conditionnement de peur au contexte, était corrélée à une augmentation de la densité des épines dendritiques dans le CCA (Aceti et al., 2015). Le

## **Annexe 1**

gène *arc* est également impliqué dans la formation et le remodelage des épines (Lyford et al., 1995; Steward et al., 1998; Peebles et al., 2010). L'activité des gènes immédiats observée après 20 jours au sein du CPFm pourrait donc être associée à la formation des épines dendritiques, donc à l'intégration corticale du souvenir.

Le but de cette étude était de fixer nos conditions expérimentales, c'est-à-dire de choisir un délai auquel des modifications transcriptionnelles, traductionnelles ou encore épigénétiques semblaient importantes dans l'hippocampe et le CPFm, afin de déterminer le meilleur temps pour étudier l'effet de la lésion des noyaux ReRh. De plus, nous avons également testé l'éventualité de sous-disséquer l'hippocampe pour affiner notre analyse dans CA1 dorsal. Cette étude nous a finalement permis de choisir deux temps d'investigation : 3 jours d'acquisition (+1h) à l'instar des études de Bousiges et al. (2010 ; 2013), travaux présentés dans la partie « Contributions expérimentales », et 20 jours post-acquisition, temps auquel nous avons mis en évidence une transcription persistante des gènes immédiats. L'étude de l'impact de la lésion des noyaux ReRh sur l'activation du CPFm à ce dernier délai est présentée en Annexe 2. En effet, elle n'a malheureusement pas abouties car nous n'avons pas retrouvé l'induction de *c-fos* dans nos nouvelles conditions expérimentales (rats opérés).

Finalement, avec le recul et les expériences que nous avons réalisées chez les rats lésés (partie Contributions expérimentales), nous pourrions à présent réaliser des Western blots sur les extraits de CA1 dorsal que nous possédons, afin de connaître la cinétique de production de la protéine c-Fos au cours de la formation du souvenir.



## **1 – Contexte scientifique**

Cette étude avait pour objectif l'étude des régulations transcriptionnelles et protéiques qui prennent place au sein de la sous-région CA1 dorsale et du CPFm, au cours de la consolidation d'un souvenir spatial, chez des rats présentant, ou non, une lésion des noyaux ReRh. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les résultats obtenus lors de la cinétique « Post-acquisition » (Annexe 1), qui montrent une persistance de l'activation transcriptionnelle des gènes immédiats *c-fos*, *zif268* et *arc* au sein de CPFm, jusqu'à 20 jours après la fin de l'apprentissage. Des études effectuées au laboratoire ont montré que 25 jours après un apprentissage spatial en piscine de Morris, des rats lésés étaient incapables de rappeler le souvenir de l'emplacement de la plate-forme. Nous avons donc choisi le délai de 20 jours pour observer l'activité de ces gènes, et des protéines correspondantes, ainsi que leurs cibles, dans CA1 dorsal et le CPFm de rats lésés afin de voir si le déficit comportemental observé pouvait être mis en relation avec une perturbation des processus biochimiques dans ces deux structures.

## **2 – Méthodes**

Les méthodes utilisées pour cette expérience sont identiques aux précédentes (Partie 2 et Annexe 1) et seront succinctement décrites ici.

### **2.1 – Chirurgie stéréotaxique**

Les 32 rats de cette expérience ont été instillés avec soit une solution de NMDA, soit une solution de PSB (voir partie 2 : Matériel et Méthodes). Les lésions obtenues n'ont pas encore fait l'objet d'une quantification de leur étendue, mais leur aspect est similaire à celui des lésions retenues pour les expériences 1, 2 et 3 décrites dans la partie 3 (Contributions expérimentales – Partie 1 : Lésions et test comportemental).

## **Annexe 2**

### **2.2 – Piscine de Morris**

Sur les 32 rats opérés, 16 forment un groupe HC (7 « Sham » et 9 « Lésés ») et les 16 autres (7 « Sham » et 9 « Lésés ») ont été entraînés à retrouver une plate-forme cachée en piscine de Morris, durant **10 jours**, à raison de 4 essais par jour.

### **2.3 – Mise à mort**

L'ensemble des 32 rats a été mis à mort 20 jours après le dernier jour d'acquisition (sans test de rappel), et le CPFm a été disséqué.

### **2.4 – Analyses biochimiques**

Les analyses effectuées sont des RT-qPCR pour évaluer l'expression des gènes immédiats *c-fos*, *zif268* et *arc*, ainsi que des Western blots pour évaluer les niveaux de la protéine c-Fos.

### **2.5 – Analyses statistiques**

Les différents paramètres relevés en piscine de Morris ont fait l'objet d'un test ANOVA à un facteur (Chirurgie) à mesures répétées (Jours). Lorsque celle-ci était significative ( $p < 0,05$ ), un test post-hoc de Newman-Keuls a été appliqué.

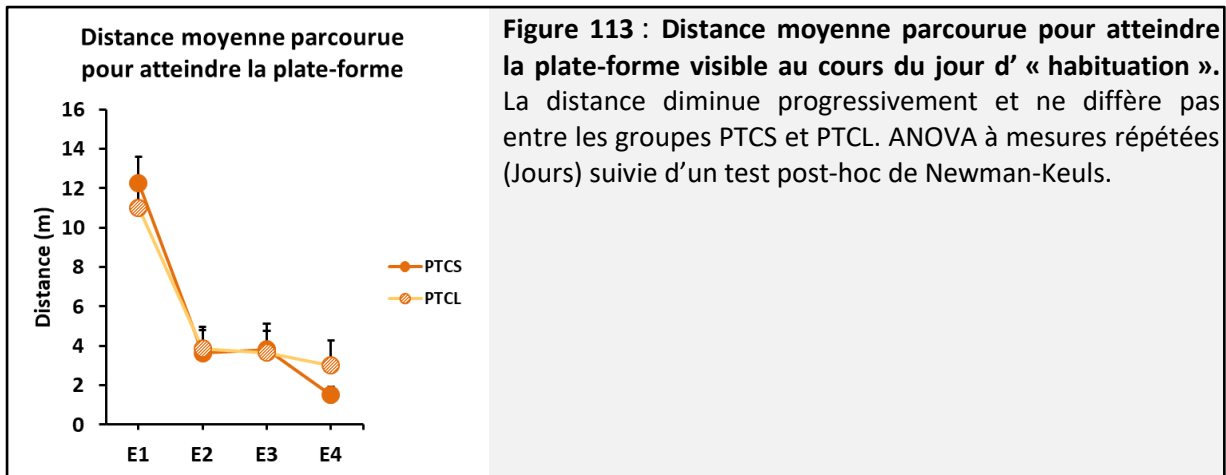
Pour les analyses biochimiques, un test ANOVA à deux facteurs (Chirurgie, Groupe) a été fait, suivi d'un test post-hoc de Newman-Keuls lorsque cela était approprié ( $p < 0,05$ ).

## **3 – Résultats**

### **3.1 – Piscine de Morris**

Au cours du jour d'« habitude », la distance parcourue pour atteindre la plate-forme diminue progressivement au cours des essais ( $F_{(3,36)} = 34,2$  ;  $p < 0,001$ ). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,12)} = 0,006$  ;  $p = 0,94$ ) (Figure 113).

## Annexe 2

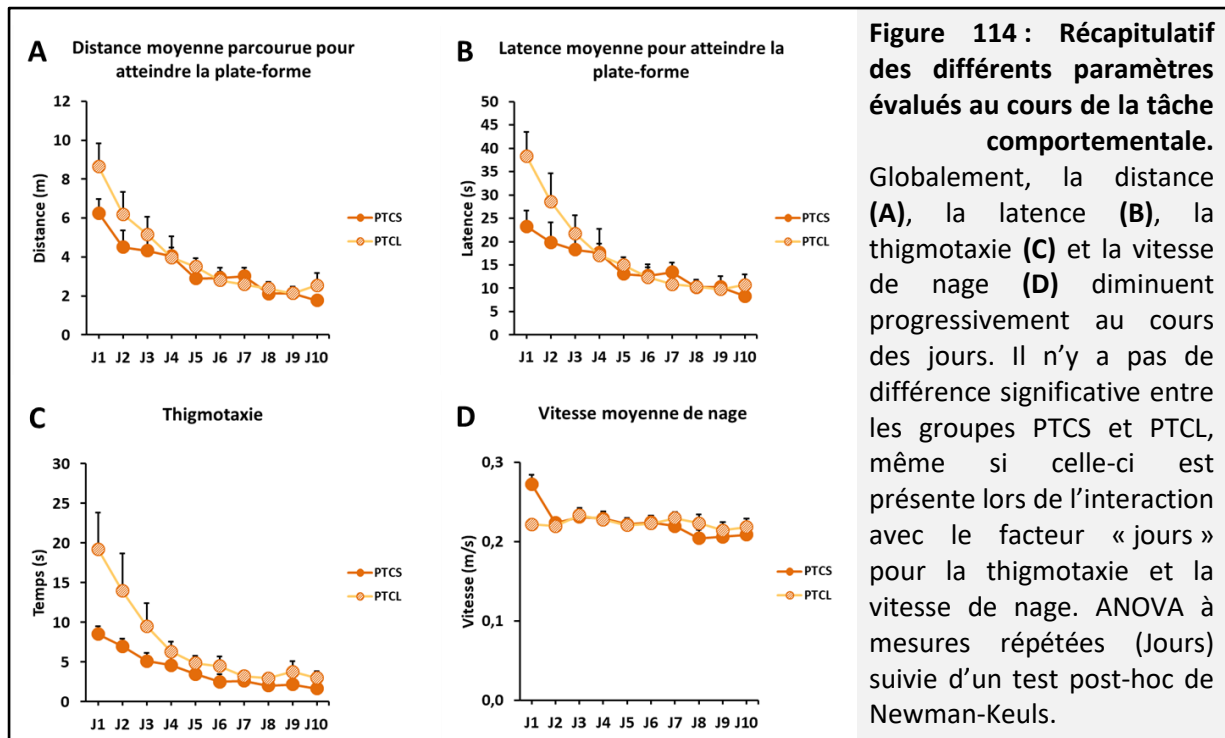


Lors de l'acquisition, la distance moyenne parcourue pour atteindre la plate-forme diminue progressivement au cours des jours ( $F_{(9,108)} = 16,3$  ;  $p < 0,001$ ). Il n'y a pas de différence entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,12)} = 1,8$  ;  $p = 0,21$ ), ni pour l'interaction Groupes x Jours ( $F_{(9,108)} = 1,1$  ;  $p = 0,39$ ) (Figure 114A).

La latence diminue également au cours des jours ( $F_{(9,108)} = 12,6$  ;  $p < 0,001$ ). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes ( $F_{(1,12)} = 1,5$  ;  $p = 0,24$ ), ni pour l'interaction Groupes x Jours ( $F_{(9,108)} = 1,8$  ;  $p = 0,07$ ) (Figure 114B).

La thigmotaxie baisse progressivement au cours des jours ( $F_{(9,108)} = 11,6$  ;  $p < 0,001$ ). Elle tend à différer significativement entre les groupes « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,12)} = 4,3$  ;  $p = 0,06$ ). L'interaction Groupes x Jours est significative ( $F_{(9,108)} = 2,1$  ;  $p = 0,04$ ) (Figure 114C).

La vitesse de nage diminue entre les jours ( $F_{(9,108)} = 0,4$  ;  $p = 0,001$ ). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes ( $F_{(1,12)} = 0,02$  ;  $p = 0,89$ ) mais l'interaction Groupes x Jours est significative ( $F_{(9,108)} = 2,6$  ;  $p = 0,009$ ) (Figure 114D).

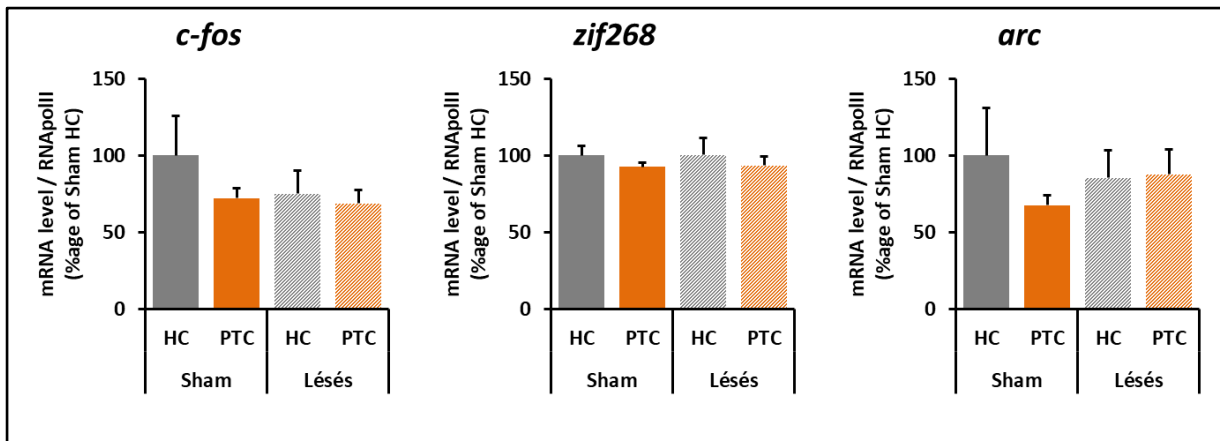


### 3.2 – Absence de persistance de l’expression des gènes immédiats dans le CPFm de rats opérés

J’ai testé par RT-qPCR les niveaux d’expression des gènes immédiats *c-fos*, *zif268* et *arc* (Figure 115).

L’expression du gène *c-fos* ne varie pas de façon significative au cours de l’apprentissage chez les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,24)} = 0,82$  ;  $p = 0,37$ ). Il n’y a également pas de différence significative entre les deux groupes ( $F_{(1,24)} = 1,18$  ;  $p = 0,29$ ). De la même façon, l’expression du gène *zif268* ne diffère pas significativement avec l’apprentissage ( $F_{(1,24)} = 0,96$  ;  $p = 0,34$ ), ni en fonction du groupe ( $F_{(1,24)} = 0,009$  ;  $p = 0,93$ ). Enfin, l’expression du gène *arc* ne varie pas significativement entre les groupes PTC et HC, quel que soit le groupe ( $F_{(1,24)} = 0,59$  ;  $p = 0,45$ ), ni entre les rats « Sham » et « Lésés » ( $F_{(1,24)} = 0,02$  ;  $p = 0,89$ ) (Figure 115).





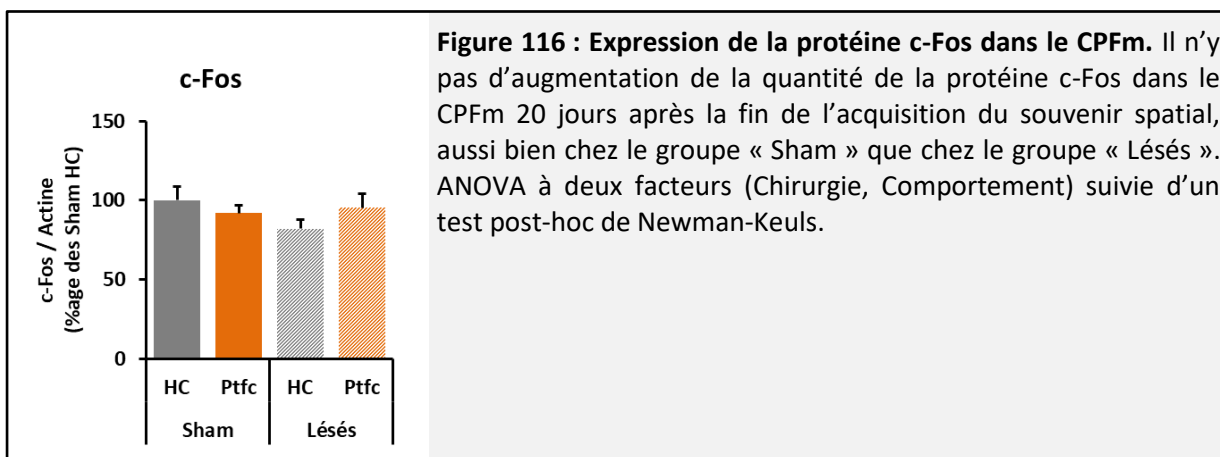
**Figure 115 : Expression des gènes immédiats *c-fos*, *zif268* et *arc* dans le CPFm.** Les gènes immédiats *c-fos*, *zif268* et *arc* ne semblent pas induits de façon significative au délai de 20 jours post-acquisition chez le groupe « Sham ». Les résultats sont similaires chez les rats « Lésés ». ANOVA à deux facteurs (Chirurgie, Comportement) suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls.

Nous ne retrouvons donc pas l'augmentation des gènes immédiats chez les rats « Sham » qui avait été observée chez les rats naïfs de la cinétique « Post-acquisition » (Annexe 1). Quoiqu'il en soit, à ce délai de 20 jours post-acquisition, la lésion n'affecte pas l'expression de ces trois gènes immédiats dans le CPFm.

### 3.3 – Absence de production de c-Fos dans le CPFm après un délai de 20 jours

Je n'ai pas réussi à valider l'expression des protéines Zif268 et Arc par Western blot. Je présente donc uniquement le résultat obtenu pour c-Fos.

Le test ANOVA montre qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'apprentissage sur la quantité de la protéine ( $F_{(1,21)} = 0,15$  ;  $p = 0,71$ ). De plus, les groupes ne diffèrent pas statistiquement entre eux ( $F_{(1,21)} = 1,12$  ;  $p = 0,30$ ) (Figure 116). L'expression de la protéine c-Fos coïncide donc avec l'expression de son gène.



**Figure 116 : Expression de la protéine c-Fos dans le CPFm.** Il n'y pas d'augmentation de la quantité de la protéine c-Fos dans le CPFm 20 jours après la fin de l'acquisition du souvenir spatial, aussi bien chez le groupe « Sham » que chez le groupe « Lésés ». ANOVA à deux facteurs (Chirurgie, Comportement) suivie d'un test post-hoc de Newman-Keuls.

## **4 – Conclusion sur l'activité transcriptionnelle et protéique dans le CPFm de rats opérés**

Nous avons montré qu'il était possible de détecter, dans le CPFm, une activation significative de la transcription du gène *c-fos* après un délai post-acquisition de 20 jours, délai suffisamment long pour se situer à l'échelle d'une mémoire à long terme ancienne. Cette augmentation suggère que certains réseaux neuronaux pourraient encore être actifs dans le CPFm à ce délai. Notre hypothèse était donc que la lésion des noyaux ReRh pouvait affecter l'expression de ces gènes immédiats dans le CPFm, et ainsi expliquer le déficit de rappel d'un souvenir spatial ancien observé chez ces rats (Loureiro et al., 2012). Malheureusement, nous n'avons pas retrouvé l'augmentation de la production de ces gènes (ni de la protéine pour c-Fos) chez les rats « Sham ». De ce fait, nous ne pouvons pas dire si la lésion affecte ou non leur production.

La différence observée entre les résultats obtenus chez les rats « Sham » et les rats non-opérés de la cinétique « Post-acquisition » pourrait être due à l'anesthésie subie par les animaux, au préalable de la tâche comportementale. En effet, il existe des différences entre des animaux anesthésiés ou non. Par exemple, on observe une différence de performance en mémoire spatiale entre des rats n'ayant pas été anesthésiés et des rats anesthésiés. Dans le premier cas, six jours d'acquisition en piscine de Morris suffisent pour permettre un encodage solide et un rappel efficace du souvenir 25 jours après la fin de l'acquisition en piscine de Morris (Lopez et al., 2008, 2012). Cela n'est pas le cas pour des animaux préalablement anesthésiés pour une chirurgie (données obtenues au laboratoire mais non publiées). C'est pourquoi ces animaux opérés sont généralement entraînés huit jours et non six (Loureiro et al., 2012; Cholvin et al., 2013; Ali et al., 2017). Dans cette expérience, nous avons même entraîné les rats 2 jours de plus (10 jours) pour palier à ce déficit. De plus, l'anesthésie est connue pour induire des changements dans la transcription des gènes. Par exemple, une injection de pentobarbital sodique est responsable d'une augmentation de l'expression du gène *c-fos* dans les 30 premières minutes suivant l'anesthésie (Marota et al., 1992). Une anesthésie à l'isoflurane induit une baisse de l'expression des gènes *c-fos* et *bdnf* dans une population de neurones hippocampiques en développement 24h après l'intervention. Cela est notamment lié à des perturbations épigénétiques au niveau de leur

## **Annexe 2**

promoteur (Dalla Massara et al., 2016). On ne peut donc pas exclure l'hypothèse que des mécanismes moléculaires aient été affectés au cours de l'anesthésie et qu'ils pourraient donc être responsables de l'absence de transcription des gènes immédiats observés chez les rats « Sham » à long terme.

Enfin, avec le recul, il aurait été intéressant d'effectuer un test de rappel sur un petit groupe de rats lésés, afin de voir si les deux jours d'entraînement supplémentaires leur auraient suffi pour rappeler l'emplacement de la plate-forme, dans le but d'étayer le modèle A' présenté dans la partie Discussion générale (Figure 97).







# Bibliographie





**-A-**

---

Aceti, M., Vetere, G., Novembre, G., Restivo, L., and Ammassari-Teule, M. (2015). Progression of activity and structural changes in the anterior cingulate cortex during remote memory formation. *Neurobiol. Learn. Mem.* *123*, 67–71.

Addis, D.R., Moscovitch, M., Crawley, A.P., and McAndrews, M.P. (2004). Recollective qualities modulate hippocampal activation during autobiographical memory retrieval. *Hippocampus* *14*, 752–762.

Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., and Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.* *85*, 525–535.

Ali, M., Cholvin, T., Muller, M.A., Cosquer, B., Kelche, C., Cassel, J.-C., and Pereira de Vasconcelos, A. (2017). Environmental enrichment enhances systems-level consolidation of a spatial memory after lesions of the ventral midline thalamus. *Neurobiol. Learn. Mem.* *141*, 108–123.

Alonso, M., Medina, J.H., and Pozzo-Miller, L. (2004). ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *11*, 172–178.

Alvarez, P., and Squire, L.R. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 7041–7045.

Aoto, J., Martinelli, D.C., Malenka, R.C., Tabuchi, K., and Südhof, T.C. (2013). Presynaptic neurexin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. *Cell* *154*, 75–88.

Arai, R., Jacobowitz, D.M., and Deura, S. (1994). Distribution of calretinin, calbindin-D28k, and parvalbumin in the rat thalamus. *Brain Res. Bull.* *33*, 595–614.

Arthur, J.S.C. (2008). MSK activation and physiological roles. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *13*, 5866–5879.

Arthur, J.S.C., Fong, A.L., Dwyer, J.M., Davare, M., Reese, E., Obrietan, K., and Impey, S. (2004). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 4324–4332.

Atkins, C.M., Selcher, J.C., Petraitis, J.J., Trzaskos, J.M., and Sweatt, J.D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat. Neurosci.* *1*, 602–609.

Atkinson, R.C., and Shiffrin, R.M. (1971). The control of short-term memory. *Sci. Am.* *225*, 82–90.

**-B-**

---

Bading, H. (2013). Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 593–608.

Baj, G., Leone, E., Chao, M.V., and Tongiorgi, E. (2011). Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16813–16818.

Ballarini, F., Moncada, D., Martinez, M.C., Alen, N., and Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14599–14604.

Barco, A., Lopez de Armentia, M., and Alarcon, J.M. (2008). Synapse-specific stabilization of plasticity processes: the synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *32*, 831–851.

Barrett, R.M., Malvaez, M., Kramar, E., Matheos, D.P., Arrizon, A., Cabrera, S.M., Lynch, G., Greene, R.W., and Wood, M.A. (2011). Hippocampal focal knockout of CBP affects specific histone modifications, long-term potentiation, and long-term memory. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *36*, 1545–1556.

Barria, A., Derkach, V., and Soderling, T. (1997a). Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J. Biol. Chem.* *272*, 32727–32730.

Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L.C., and Soderling, T.R. (1997b). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* *276*, 2042–2045.

Barry, D.N., and Commins, S. (2017). Temporal dynamics of Immediate Early Gene expression during cellular consolidation of spatial memory. *Behav. Brain Res.*

Barry, D.N., Coogan, A.N., and Commins, S. (2015). The time course of systems consolidation of spatial memory from recent to remote retention: A comparison of the Immediate Early Genes *Zif268*, *c-Fos* and *Arc*. *Neurobiol. Learn. Mem.* *128*, 46–55.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* *53*, 261–277.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Kathe, C., Slipczuk, L., Rossato, J.I., Goldin, A., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 2711–2716.

Benito, E., Valor, L.M., Jimenez-Minchan, M., Huber, W., and Barco, A. (2011). cAMP response element-binding protein is a primary hub of activity-driven neuronal gene expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 18237–18250.

## ***Bibliographie***

- Berman, D.E. (2003). Modulation of taste-induced Elk-1 activation by identified neurotransmitter systems in the insular cortex of the behaving rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79, 122–126.
- Bero, A.W., Meng, J., Cho, S., Shen, A.H., Canter, R.G., Ericsson, M., and Tsai, L.-H. (2014). Early remodeling of the neocortex upon episodic memory encoding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11852–11857.
- Bertram, E.H., and Zhang, D.X. (1999). Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92, 15–26.
- Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2011). Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front. Neurosci.* 5, 35.
- Besnard, A., Laroche, S., and Caboche, J. (2014). Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct. Funct.* 219, 415–430.
- Bishop, J.F., Mueller, G.P., and Mouradian, M.M. (1994). Alternate 5' exons in the rat brain-derived neurotrophic factor gene: differential patterns of expression across brain regions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 26, 225–232.
- Blum, R., and Konnerth, A. (2005). Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiol. Bethesda Md* 20, 70–78.
- Blum, S., Moore, A.N., Adams, F., and Dash, P.K. (1999). A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 3535–3544.
- Bokor, H., Csáki, A., Kocsis, K., and Kiss, J. (2002). Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1227–1239.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 786–801.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., and Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400, 671–675.
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., and Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* 82, 444–459.

## **Bibliographie**

Bousiges, O., Vasconcelos, A.P. de, Neidl, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., Panteleeva, I., Loeffler, J.-P., Cassel, J.-C., and Boutillier, A.-L. (2010). Spatial memory consolidation is associated with induction of several lysine-acetyltransferase (histone acetyltransferase) expression levels and H2B/H4 acetylation-dependent transcriptional events in the rat hippocampus. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *35*, 2521–2537.

Bousiges, O., Neidl, R., Majchrzak, M., Muller, M.-A., Barbelivien, A., Pereira de Vasconcelos, A., Schneider, A., Loeffler, J.-P., Cassel, J.-C., and Boutillier, A.-L. (2013). Detection of histone acetylation levels in the dorsal hippocampus reveals early tagging on specific residues of H2B and H4 histones in response to learning. *PLoS One* *8*, e57816.

Bramham, C.R., Worley, P.F., Moore, M.J., and Guzowski, J.F. (2008). The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 11760–11767.

Brami-Cherrier, K., Lavour, J., Pagès, C., Arthur, J.S.C., and Caboche, J. (2007). Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J. Neurochem.* *101*, 697–708.

Brami-Cherrier, K., Roze, E., Girault, J.-A., Betuing, S., and Caboche, J. (2009). Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J. Neurochem.* *108*, 1323–1335.

Brigman, J.L., Wright, T., Talani, G., Prasad-Mulcare, S., Jinde, S., Seabold, G.K., Mathur, P., Davis, M.I., Bock, R., Gustin, R.M., et al. (2010). Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 4590–4600.

Broadbent, N.J., Squire, L.R., and Clark, R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 14515–14520.

Buckner, R.L., Kelley, W.M., and Petersen, S.E. (1999). Frontal cortex contributes to human memory formation. *Nat. Neurosci.* *2*, 311–314.

## **-C-**

---

Cammarota, M., Bevilacqua, L.R., Ardenghi, P., Paratcha, G., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *76*, 36–46.

Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* *296*, 1655–1657.

Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *MMBR* *75*, 50–83.

## ***Bibliographie***

Carter, S.D., Mifsud, K.R., and Reul, J.M.H.M. (2015). Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training. *Front. Behav. Neurosci.* *9*, 156.

Cavallaro, S., D'Agata, V., Manickam, P., Dufour, F., and Alkon, D.L. (2002). Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 16279–16284.

Chatterjee, S., Mizar, P., Cassel, R., Neidl, R., Selvi, B.R., Mohankrishna, D.V., Vedamurthy, B.M., Schneider, A., Bousiges, O., Mathis, C., et al. (2013). A novel activator of CBP/p300 acetyltransferases promotes neurogenesis and extends memory duration in adult mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 10698–10712.

Chiaruttini, C., Sonogo, M., Baj, G., Simonato, M., and Tongiorgi, E. (2008). BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol. Cell. Neurosci.* *37*, 11–19.

Choi, D.C., Maguschak, K.A., Ye, K., Jang, S.-W., Myers, K.M., and Ressler, K.J. (2010). Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2675–2680.

Cholvin, T., Loureiro, M., Cassel, R., Cosquer, B., Geiger, K., De Sa Nogueira, D., Raingard, H., Robelin, L., Kelche, C., Pereira de Vasconcelos, A., et al. (2013). The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 8772–8783.

Cholvin, T., Loureiro, M., Cassel, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., de Vasconcelos, A.P., and Cassel, J.-C. (2014). Dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex each contribute to the retrieval of a recent spatial memory in rats. *Brain Struct. Funct.* *221*, 91–102.

Chowdhury, S., Shepherd, J.D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R.S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R.L., and Worley, P.F. (2006). Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* *52*, 445–459.

Chwang, W.B., Arthur, J.S., Schumacher, A., and Sweatt, J.D. (2007). The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 12732–12742.

Cirulli, F., Berry, A., Chiarotti, F., and Alleva, E. (2004). Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus* *14*, 802–807.

Clark, R.E., Broadbent, N.J., and Squire, L.R. (2005). Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* *15*, 260–272.

Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R., and Wang, Y.T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 952–962.

## **Bibliographie**

Corcoran, K.A., and Quirk, G.J. (2007). Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 840–844.

Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Harding, H., Herdy, B., Azzi, M., Bruno, M., Bidinosti, M., Ben Mamou, C., Marcinkiewicz, E., Yoshida, M., et al. (2005). Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature* 436, 1166–1173.

Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuello, C., Sossin, W., Kaufman, R., Pelletier, J., Rosenblum, K., et al. (2007). eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 129, 195–206.

Cui, M.-Z., Laag, E., Sun, L., Tan, M., Zhao, G., and Xu, X. (2006). Lysophosphatidic acid induces early growth response gene 1 expression in vascular smooth muscle cells: CRE and SRE mediate the transcription. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1029–1035.

## **-D-**

---

Dalla Massara, L., Osuru, H.P., Oklopcic, A., Milanovic, D., Joksimovic, S.M., Caputo, V., DiGruccio, M.R., Ori, C., Wang, G., Todorovic, S.M., et al. (2016). General Anesthesia Causes Epigenetic Histone Modulation of c-Fos and Brain-derived Neurotrophic Factor, Target Genes Important for Neuronal Development in the Immature Rat Hippocampus. *Anesthesiology* 124, 1311–1327.

Dalley, J.W., Cardinal, R.N., and Robbins, T.W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 771–784.

Daumas, S., Hunter, C.J., Mistry, R.B., Morè, L., Privitera, L., Cooper, D.D., Reyskens, K.M., Flynn, H.T., Morris, R.G.M., Arthur, J.S.C., et al. (2017). The Kinase Function of MSK1 Regulates BDNF Signaling to CREB and Basal Synaptic Transmission, But Is Not Required for Hippocampal Long-Term Potentiation or Spatial Memory. *ENeuro* 4.

Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., and Laroche, S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 4563–4572.

Davoodi, F.G., Motamedi, F., Naghdi, N., and 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.

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

## ***Bibliographie***

Dever, T.E., and Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a013706.

D'Hooge, R., and De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36, 60–90.

Di Prisco, G.V., and Vertes, R.P. (2006). Excitatory actions of the ventral midline thalamus (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synap. N. Y. N* 60, 45–55.

Dietz, B., and Manahan-Vaughan, D. (2017). Hippocampal long-term depression is facilitated by the acquisition and updating of memory of spatial auditory content and requires mGlu5 activation. *Neuropharmacology* 115, 30–41.

Dolleman-Van Der Weel, M.J., and Witter, M.P. (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, M.J., Lopes da Silva, F.H., and Witter, M.P. (1997). Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 5640–5650.

Duan, A.R., Varela, C., Zhang, Y., Shen, Y., Xiong, L., Wilson, M.A., and Lisman, J. (2015). Delta frequency optogenetic stimulation of the thalamic nucleus reuniens is sufficient to produce working memory deficits: relevance to schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 77, 1098–1107.

## **-E-**

---

Eleore, L., López-Ramos, J.C., Guerra-Narbona, R., and Delgado-García, J.M. (2011). Role of Reuniens Nucleus Projections to the Medial Prefrontal Cortex and to the Hippocampal Pyramidal CA1 Area in Associative Learning. *PLoS ONE* 6.

English, J.D., and Sweatt, J.D. (1997). A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.* 272, 19103–19106.

Ernfors, P., Wetmore, C., Olson, L., and Persson, H. (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 5, 511–526.

## **-F-**

---

Fanselow, M.S., and Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7–19.

Farina, F.R., and Commins, S. (2016). Differential expression of immediate early genes Zif268 and c-Fos in the hippocampus and prefrontal cortex following spatial learning and glutamate receptor antagonism. *Behav. Brain Res.* 307, 194–198.

Fields, G.B. (2013). Interstitial collagen catabolism. *J. Biol. Chem.* 288, 8785–8793.

## **Bibliographie**

Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2014). Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 337–356.

Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L.E., Kvello, A., Reschke, M., Spanagel, R., Sprengel, R., et al. (2003). Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 9116–9122.

Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 119–130.

Frankland, P.W., O'Brien, C., Ohno, M., Kirkwood, A., and Silva, A.J. (2001). Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* *411*, 309–313.

Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., and Silva, A.J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* *304*, 881–883.

Frémaux, N., and Gerstner, W. (2015). Neuromodulated Spike-Timing-Dependent Plasticity, and Theory of Three-Factor Learning Rules. *Front. Neural Circuits* *9*, 85.

Frey, U., and Morris, R.G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* *385*, 533–536.

Frey, U., Huang, Y.Y., and Kandel, E.R. (1993). Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* *260*, 1661–1664.

Fryer, R.H., Kaplan, D.R., Feinstein, S.C., Radeke, M.J., Grayson, D.R., and Kromer, L.F. (1996). Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *J. Comp. Neurol.* *374*, 21–40.

## **-G-**

---

Gehler, S., Shaw, A.E., Sarmiere, P.D., Bamburg, J.R., and Letourneau, P.C. (2004). Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone filopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor/cofilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 10741–10749.

Gladding, C.M., Fitzjohn, S.M., and Molnár, E. (2009). Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. *Pharmacol. Rev.* *61*, 395–412.

Goldin, M., and Segal, M. (2003). Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 2529–2539.

Goshen, I. (2014). The optogenetic revolution in memory research. *Trends Neurosci.* *37*, 511–522.



## **Bibliographie**

Goyal, M.S., Hawrylycz, M., Miller, J.A., Snyder, A.Z., and Raichle, M.E. (2014). Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenus gene expression. *Cell Metab.* *19*, 49–57.

Gräff, J., and Tsai, L.-H. (2013). Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 97–111.

Gräff, J., Kim, D., Dobbin, M.M., and Tsai, L.-H. (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol. Rev.* *91*, 603–649.

Gräff, J., Woldemichael, B.T., Berchtold, D., Dewarrat, G., and Mansuy, I.M. (2012). Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation. *Nat. Commun.* *3*, 991.

Guzowski, J.F., Lyford, G.L., Stevenson, G.D., Houston, F.P., McGaugh, J.L., Worley, P.F., and Barnes, C.A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 3993–4001.

Guzowski, J.F., Setlow, B., Wagner, E.K., and McGaugh, J.L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 5089–5098.

## **-H-**

---

Haettig, J., Stefanko, D.P., Multani, M.L., Figueroa, D.X., McQuown, S.C., and Wood, M.A. (2011). HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *18*, 71–79.

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* *436*, 801–806.

Halder, R., Hennion, M., Vidal, R.O., Shomroni, O., Rahman, R.-U., Rajput, A., Centeno, T.P., van Bebber, F., Capece, V., Garcia Vizcaino, J.C., et al. (2016). DNA methylation changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nat. Neurosci.* *19*, 102–110.

Hall, J., Thomas, K.L., and Everitt, B.J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat. Neurosci.* *3*, 533–535.

Hallock, H.L., Wang, A., Shaw, C.L., and Griffin, A.L. (2013). Transient inactivation of the thalamic nucleus reuniens and rhomboid nucleus produces deficits of a working-memory dependent tactile-visual conditional discrimination task. *Behav. Neurosci.* *127*, 860–866.

Hallock, H.L., Wang, A., and Griffin, A.L. (2016). Ventral Midline Thalamus Is Critical for Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Spatial Working Memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *36*, 8372–8389.

## ***Bibliographie***

Hampton, R.R., Hampstead, B.M., and Murray, E.A. (2004). Selective hippocampal damage in rhesus monkeys impairs spatial memory in an open-field test. *Hippocampus* 14, 808–818.

Harter, C., and Reinhard, C. (2002). The Secretory Pathway From History to the State of the Art. In *Fusion of Biological Membranes and Related Problems*, (Springer, Boston, MA), pp. 1–38.

He, J., Yamada, K., and Nabeshima, T. (2002). A role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 26, 259–268.

Hebert, A.E., and Dash, P.K. (2002). Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinal cortex is necessary for long-term spatial memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 9, 156–166.

Hembrook, J.R., and Mair, R.G. (2011). Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21, 815–826.

Hembrook, J.R., Onos, K.D., and Mair, R.G. (2012). Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus* 22, 853–860.

Henke, P.G. (1990). Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain Res. Bull.* 25, 691–695.

Herkenham, M. (1978). The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.* 177, 589–610.

Herring, B.E., and Nicoll, R.A. (2016). Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 351–365.

Hoover, W.B., and Vertes, R.P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212, 149–179.

Hoover, W.B., and Vertes, R.P. (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.

Hu, Y., and Wilson, G.S. (1997). A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *J. Neurochem.* 69, 1484–1490.

Hu, X., Huang, Q., Yang, X., and Xia, H. (2007). Differential regulation of AMPA receptor trafficking by neurabin-targeted synaptic protein phosphatase-1 in synaptic transmission and long-term depression in hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 4674–4686.

Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 677–736.

## **Bibliographie**

Huang, D.W., Sherman, B.T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., Guo, Y., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C., et al. (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* *35*, W169-175.

Hunsaker, M.R., Fieldsted, P.M., Rosenberg, J.S., and Kesner, R.P. (2008). Dissociating the roles of dorsal and ventral CA1 for the temporal processing of spatial locations, visual objects, and odors. *Behav. Neurosci.* *122*, 643–650.

Hunter, C.J., Remenyi, J., Correa, S.A., Privitera, L., Reyskens, K.M.S.E., Martin, K.J., Toth, R., Frenguelli, B.G., and Arthur, J.S.C. (2017). MSK1 regulates transcriptional induction of Arc/Arg3.1 in response to neurotrophins. *FEBS Open Bio* *7*, 821–834.

### **-I-**

---

Ito, H.T., Zhang, S.-J., Witter, M.P., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2015). A prefrontal-thalamo-hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature* *522*, 50–55.

### **-J-**

---

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 113–127.

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* *86*, 45–93.

James, A.B., Conway, A.-M., and Morris, B.J. (2005). Genomic profiling of the neuronal target genes of the plasticity-related transcription factor -- Zif268. *J. Neurochem.* *95*, 796–810.

Jankowski, M.M., Islam, M.N., Wright, N.F., Vann, S.D., Erichsen, J.T., Aggleton, J.P., and O'Mara, S.M. (2014). Nucleus reuniens of the thalamus contains head direction cells. *ELife* *3*.

Jankowski, M.M., Passecker, J., Islam, M.N., Vann, S., Erichsen, J.T., Aggleton, J.P., and O'Mara, S.M. (2015). Evidence for spatially-responsive neurons in the rostral thalamus. *Front. Behav. Neurosci.* *9*, 256.

Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, A., Bliss, T.V., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., and Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat. Neurosci.* *4*, 289–296.

### **-K-**

---

Kanhema, T., Dagestad, G., Panja, D., Tiron, A., Messaoudi, E., Håvik, B., Ying, S.-W., Nairn, A.C., Sonenberg, N., and Bramham, C.R. (2006). Dual regulation of translation initiation and peptide chain elongation during BDNF-induced LTP in vivo: evidence for compartment-specific translation control. *J. Neurochem.* *99*, 1328–1337.

## **Bibliographie**

- Kapur, N., and Brooks, D.J. (1999). Temporally-specific retrograde amnesia in two cases of discrete bilateral hippocampal pathology. *Hippocampus* 9, 247–254.
- Karelina, K., Hansen, K.F., Choi, Y.-S., DeVries, A.C., Arthur, J.S.C., and Obrietan, K. (2012). MSK1 regulates environmental enrichment-induced hippocampal plasticity and cognitive enhancement. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 19, 550–560.
- Karin, M., Liu, Z. g, and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 240–246.
- Kawamoto, Y., Nakamura, S., Nakano, S., Oka, N., Akiguchi, I., and Kimura, J. (1996). Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* 74, 1209–1226.
- Kawasaki, H., Fujii, H., Gotoh, Y., Morooka, T., Shimohama, S., Nishida, E., and Hirano, T. (1999). Requirement for mitogen-activated protein kinase in cerebellar long term depression. *J. Biol. Chem.* 274, 13498–13502.
- Kawashima, T., Okuno, H., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Kyo, N., Okamura, M., Takemoto-Kimura, S., Worley, P.F., and Bito, H. (2009). Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 316–321.
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., and Stamm, S. (2013). Function of alternative splicing. *Gene* 514, 1–30.
- Kelleher, R.J., Govindarajan, A., Jung, H.-Y., Kang, H., and Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116, 467–479.
- Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N., and Edwards, D.R. (2015). The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 16, 113.
- Kennedy, M.B. (2013). Synaptic Signaling in Learning and Memory. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a016824.
- Kesslak, J.P., So, V., Choi, J., Cotman, C.W., and Gomez-Pinilla, F. (1998). Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci.* 112, 1012–1019.
- Keyse, S.M. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 27, 253–261.
- Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.-A., Murison, R., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10825–10830.
- Klur, S., Muller, C., Pereira de Vasconcelos, A., Ballard, T., Lopez, J., Galani, R., Certa, U., and Cassel, J.-C. (2009). Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* 19, 800–816.

## **Bibliographie**

Köhr, G., Jensen, V., Koester, H.J., Mihaljevic, A.L.A., Utvik, J.K., Kvello, A., Ottersen, O.P., Seeburg, P.H., Sprengel, R., and Hvalby, Ø. (2003). Intracellular domains of NMDA receptor subtypes are determinants for long-term potentiation induction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 10791–10799.

Koppel, I., Aid-Pavlidis, T., Jaanson, K., Sepp, M., Pruunsild, P., Palm, K., and Timmusk, T. (2009). Tissue-specific and neural activity-regulated expression of human BDNF gene in BAC transgenic mice. *BMC Neurosci.* *10*, 68.

Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., and Bonhoeffer, T. (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8856–8860.

Korte, M., Kang, H., Bonhoeffer, T., and Schuman, E. (1998). A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* *37*, 553–559.

Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* *9*, 5233–5252.

Krout, K.E., Belzer, R.E., and Loewy, A.D. (2002). Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* *448*, 53–101.

**-L-**

---

Lacar, B., Linker, S.B., Jaeger, B.N., Krishnaswami, S., Barron, J., Kelder, M., Parylak, S., Paquola, A., Venepally, P., Novotny, M., et al. (2016). Nuclear RNA-seq of single neurons reveals molecular signatures of activation. *Nat. Commun.* *7*, 11022.

Lavaur, J., Bernard, F., Trifilieff, P., Pascoli, V., Kappes, V., Pagès, C., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2007). A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 14448–14458.

Lavenex, P.B., Amaral, D.G., and Lavenex, P. (2006). Hippocampal lesion prevents spatial relational learning in adult macaque monkeys. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 4546–4558.

Layfield, D.M., Patel, M., Hallock, H., and Griffin, A.L. (2015). Inactivation of the nucleus reuniens/rhomboid causes a delay-dependent impairment of spatial working memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* *125*, 163–167.

Leal, G., Comprido, D., and Duarte, C.B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* *76 Pt C*, 639–656.

Leal, G., Afonso, P.M., Salazar, I.L., and Duarte, C.B. (2015). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res.* *1621*, 82–101.

Lein, E.S., Zhao, X., and Gage, F.H. (2004). Defining a molecular atlas of the hippocampus using DNA microarrays and high-throughput in situ hybridization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 3879–3889.

## **Bibliographie**

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

Lessmann, V., Gottmann, K., and Malcangio, M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374.

Levenson, J.M., O’Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., and Sweatt, J.D. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 279, 40545–40559.

Lever, C., Burton, S., Jeewajee, A., O’Keefe, J., and Burgess, N. (2009). Boundary vector cells in the subiculum of the hippocampal formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9771–9777.

Li, H., Wu, X., Bai, Y., Huang, Y., He, W., and Dong, Z. (2012). Unilateral lesion of dorsal hippocampus in adult rats impairs contralateral long-term potentiation in vivo and spatial memory in the early postoperative phase. *Behav. Brain Res.* 230, 428–432.

Lin, C., Yang, L., Yang, J.J., Huang, Y., and Liu, Z.-R. (2005). ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7484–7493.

Lindecke, A., Korte, M., Zagrebelsky, M., Horejschi, V., Elvers, M., Widera, D., Prüllage, M., Pfeiffer, J., Kaltschmidt, B., and Kaltschmidt, C. (2006). Long-term depression activates transcription of immediate early transcription factor genes: involvement of serum response factor/Elk-1. *Eur. J. Neurosci.* 24, 555–563.

Linder, P. (2006). Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* 34, 4168–4180.

Linley, S.B., Gallo, M.M., and Vertes, R.P. (2016). Lesions of the ventral midline thalamus produce deficits in reversal learning and attention on an odor texture set shifting task. *Brain Res.* 1649, 110–122.

Linnarsson, S., Björklund, A., and Ernfors, P. (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2581–2587.

Lisman, J. (2017). Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 372.

Lisman, J., Grace, A.A., and Duzel, E. (2011). A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends Neurosci.* 34, 536–547.

Lonergan, M.E., Gafford, G.M., Jarome, T.J., and Helmstetter, F.J. (2010). Time-dependent expression of Arc and zif268 after acquisition of fear conditioning. *Neural Plast.* 2010, 139891.

## **Bibliographie**

Lopez, J., de Vasconcelos, A.P., and Cassel, J.-C. (2008). Environmental cue saliency influences the vividness of a remote spatial memory in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* *90*, 285–289.

Lopez, J., Herbeaux, K., Cosquer, B., Engeln, M., Muller, C., Lazarus, C., Kelche, C., Bontempi, B., Cassel, J.-C., and de Vasconcelos, A.P. (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, J.-C., and Pereira de Vasconcelos, A. (2012). The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 9947–9959.

Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., and Worley, P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* *14*, 433–445.

Lyons, M.R., and West, A.E. (2011). Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog. Neurobiol.* *94*, 259–295.

## **-M-**

---

Maguire, E.A., and Frith, C.D. (2003). Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 5302–5307.

Maguire, E.A., Frackowiak, R.S., and Frith, C.D. (1997). Recalling routes around london: activation of the right hippocampus in taxi drivers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 7103–7110.

Maguire, E.A., Burgess, N., Donnett, J.G., Frackowiak, R.S., Frith, C.D., and O’Keefe, J. (1998). Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science* *280*, 921–924.

Makino, H., and Malinow, R. (2009). AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* *64*, 381–390.

Manahan-Vaughan, D., Kulla, A., and Frey, J.U. (2000). Requirement of translation but not transcription for the maintenance of long-term depression in the CA1 region of freely moving rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 8572–8576.

Manente, A.G., Pinton, G., Tavian, D., Lopez-Rodas, G., Brunelli, E., and Moro, L. (2011). Coordinated sumoylation and ubiquitination modulate EGF induced EGR1 expression and stability. *PLoS One* *6*, e25676.

Marota, J.J., Crosby, G., and Uhl, G.R. (1992). Selective effects of pentobarbital and halothane on c-fos and jun-B gene expression in rat brain. *Anesthesiology* *77*, 365–371.

## **Bibliographie**

Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 262, 23–81.

Martin, S.J., de Hoz, L., and Morris, R.G.M. (2005). Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* 43, 609–624.

Matera, A.G., and Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 108–121.

Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., and Ottersen, O.P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58, 1094–1103.

Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., and Poo, M.-M. (2009). Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 14185–14198.

Maviel, T., Durkin, T.P., Menzaghi, F., and Bontempi, B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305, 96–99.

McClung, C.A., and Nestler, E.J. (2008). Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 3–17.

McKenna, J.T., and Vertes, R.P. (2004). Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 480, 115–142.

Messaoudi, E., Ying, S.-W., Kanhema, T., Croll, S.D., and Bramham, C.R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor triggers transcription-dependent, late phase long-term potentiation in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 7453–7461.

Meyer, D., Bonhoeffer, T., and Scheuss, V. (2014). Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron* 82, 430–443.

Miller, G.A. (1994). The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. 1956. *Psychol. Rev.* 101, 343–352.

Minichiello, L., Calella, A.M., Medina, D.L., Bonhoeffer, T., Klein, R., and Korte, M. (2002). Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36, 121–137.

Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., and Nabeshima, T. (2000). Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 7116–7121.

Morioka, N., Yoshida, Y., Nakamura, Y., Hidaka, N., Hisaoka-Nakashima, K., and Nakata, Y. (2013). The regulation of exon-specific brain-derived neurotrophic factor mRNA expression by protein kinase C in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.* 1509, 20–31.



## ***Bibliographie***

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* *319*, 774–776.

Moser, M.B., and Moser, E.I. (1998). Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 7535–7542.

Moser, E., Moser, M.B., and Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *13*, 3916–3925.

Moser, M.B., Moser, E.I., Forrest, E., Andersen, P., and Morris, R.G. (1995). Spatial learning with a minilab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9697–9701.

Moser, M.-B., Rowland, D.C., and Moser, E.I. (2015). Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a021808.

Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., and Murphy, R.A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.* *276*, 12660–12666.

Mu, J.S., Li, W.P., Yao, Z.B., and Zhou, X.F. (1999). Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res.* *835*, 259–265.

Mulkey, R.M., Herron, C.E., and Malenka, R.C. (1993). An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* *261*, 1051–1055.

## **-N-**

---

Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C.D., Lin, J.Y., Tsien, R.Y., and Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* *511*, 348–352.

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

Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V.V., Yang, J., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2009). Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1267–1272.

Newman, L.A., Korol, D.L., and Gold, P.E. (2011). Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One* *6*, e28427.

Nikitina, T.V., Tischenko, L.I., and Schulz, W.A. (2011). Recent insights into regulation of transcription by RNA polymerase III and the cellular functions of its transcripts. *Biol. Chem.* *392*, 395–404.

## **Bibliographie**

Novkovic, T., Mittmann, T., and Manahan-Vaughan, D. (2015). BDNF contributes to the facilitation of hippocampal synaptic plasticity and learning enabled by environmental enrichment. *Hippocampus* 25, 1–15.

Nunn, J.A., Polkey, C.E., and Morris, R.G. (1998). Selective spatial memory impairment after right unilateral temporal lobectomy. *Neuropsychologia* 36, 837–848.

## **-O-**

---

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

Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci. Res.* 69, 175–186.

Okuno, H., Akashi, K., Ishii, Y., Yagishita-Kyo, N., Suzuki, K., Nonaka, M., Kawashima, T., Fujii, H., Takemoto-Kimura, S., Abe, M., et al. (2012). Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII $\beta$ . *Cell* 149, 886–898.

Oliet, S.H., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18, 969–982.

Olton, D.S. (1979). Mazes, maps, and memory. *Am. Psychol.* 34, 583–596.

Owens, D.M., and Keyse, S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26, 3203–3213.

## **-P-**

---

Paine, T.A., Asinof, S.K., Diehl, G.W., Frackman, A., and Leffler, J. (2013). Medial prefrontal cortex lesions impair decision-making on a rodent gambling task: reversal by D1 receptor antagonist administration. *Behav. Brain Res.* 243, 247–254.

Parslow, D.M., Rose, D., Brooks, B., Fleminger, S., Gray, J.A., Giampietro, V., Brammer, M.J., Williams, S., Gasston, D., Andrew, C., et al. (2004). Allocentric spatial memory activation of the hippocampal formation measured with fMRI. *Neuropsychology* 18, 450–461.

Pattabiraman, P.P., Tropea, D., Chiaruttini, C., Tongiorgi, E., Cattaneo, A., and Domenici, L. (2005). Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* 28, 556–570.

Patterson, M.A., Szatmari, E.M., and Yasuda, R. (2010). AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15951–15956.

Paxinos, G., and Watson (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 7th Edition.*

## **Bibliographie**

Peebles, C.L., Yoo, J., Thwin, M.T., Palop, J.J., Noebels, J.L., and Finkbeiner, S. (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 18173–18178.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 10625–10629.

Penke, Z., Morice, E., Veyrac, A., Gros, A., Chagneau, C., LeBlanc, P., Samson, N., Baumgärtel, K., Mansuy, I.M., Davis, S., et al. (2014). Zif268/Egr1 gain of function facilitates hippocampal synaptic plasticity and long-term spatial recognition memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *369*, 20130159.

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., et al. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* *52*, 437–444.

Poplawski, S.G., Peixoto, L., Porcari, G.S., Wimmer, M.E., McNally, A.G., Mizuno, K., Giese, K.P., Chatterjee, S., Koberstein, J.N., Risso, D., et al. (2016). Contextual fear conditioning induces differential alternative splicing. *Neurobiol. Learn. Mem.* *134 Pt B*, 221–235.

Postman, L., and Phillips, L.W. (1965). Short-term temporal changes in free recall. *Q. J. Exp. Psychol.* *17*, 132–138.

Pothuizen, H.H.J., Zhang, W.-N., Jongen-Rêlo, A.L., Feldon, J., and Yee, B.K. (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.

Prasad, J.A., Macgregor, E.M., and Chudasama, Y. (2013). Lesions of the thalamic reuniens cause impulsive but not compulsive responses. *Brain Struct. Funct.* *218*, 85–96.

Prichard, J., Rothman, D., Novotny, E., Petroff, O., Kuwabara, T., Avison, M., Howseman, A., Hanstock, C., and Shulman, R. (1991). Lactate rise detected by <sup>1</sup>H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 5829–5831.

Pruunsild, P., Sepp, M., Orav, E., Koppel, I., and Timmusk, T. (2011). Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human BDNF gene. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 3295–3308.

## **-R-**

---

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

## ***Bibliographie***

Rajasethupathy, P., Sankaran, S., Marshel, J.H., Kim, C.K., Ferenczi, E., Lee, S.Y., Berndt, A., Ramakrishnan, C., Jaffe, A., Lo, M., et al. (2015). Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* 526, 653–659.

Ramiro-Cortés, Y., and Israely, I. (2013). Long lasting protein synthesis- and activity-dependent spine shrinkage and elimination after synaptic depression. *PLoS One* 8, e71155.

Rattiner, L.M., Davis, M., and Ressler, K.J. (2004). Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 11, 727–731.

Redondo, R.L., and Morris, R.G.M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 17–30.

Restivo, L., Vetere, G., Bontempi, B., and 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 8206–8214.

Rex, C.S., Lin, C.-Y., Kramár, E.A., Chen, L.Y., Gall, C.M., and Lynch, G. (2007). Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3017–3029.

Roeb, W., Boyer, A., Cavenee, W.K., and Arden, K.C. (2008). Guilt by association: PAX3-FOXO1 regulates gene expression through selective destabilization of the EGR1 transcription factor. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 837–841.

Rösch, H., Schweigreiter, R., Bonhoeffer, T., Barde, Y.-A., and Korte, M. (2005). The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7362–7367.

Rossow, K.L., and Janknecht, R. (2003). Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene* 22, 151–156.

Roth, B.L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694.

Rousseaud, A., Delépine, C., Nectoux, J., Billuart, P., and Bienvenu, T. (2015). Differential Expression and Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) mRNA Isoforms in Brain Cells from *Mecp2(308/y)* Mouse Model. *J. Mol. Neurosci. MN* 56, 758–767.

## **-S-**

---

Sananbenesi, F., Fischer, A., Schrick, C., Spiess, J., and Radulovic, J. (2002). Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1, and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: interactions between Erk-1/2 and Elk-1. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 463–476.

## **Bibliographie**

Sasaki, T., Kojima, H., Kishimoto, R., Ikeda, A., Kunimoto, H., and Nakajima, K. (2006). Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role. *Mol. Cell* *24*, 63–75.

Schafe, G.E., Atkins, C.M., Swank, M.W., Bauer, E.P., Sweatt, J.D., and LeDoux, J.E. (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 8177–8187.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *103*, 211–225.

Schultz, C., and Engelhardt, M. (2014). Anatomy of the hippocampal formation. *Front. Neurol. Neurosci.* *34*, 6–17.

Schultz, T.E., and Blumenthal, A. (2016). The RP105/MD-1 complex: molecular signaling mechanisms and pathophysiological implications. *J. Leukoc. Biol.* *101*, 183–192.

Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *20*, 11–21.

Selcher, J.C., Atkins, C.M., Trzaskos, J.M., Paylor, R., and Sweatt, J.D. (1999). A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *6*, 478–490.

Selcher, J.C., Nekrasova, T., Paylor, R., Landreth, G.E., and Sweatt, J.D. (2001). Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *8*, 11–19.

Selcher, J.C., Weeber, E.J., Christian, J., Nekrasova, T., Landreth, G.E., and Sweatt, J.D. (2003). A role for ERK MAP kinase in physiologic temporal integration in hippocampal area CA1. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* *10*, 26–39.

Shalin, S.C., Zirrgiebel, U., Honsa, K.J., Julien, J.-P., Miller, F.D., Kaplan, D.R., and Sweatt, J.D. (2004). Neuronal MEK is important for normal fear conditioning in mice. *J. Neurosci. Res.* *75*, 760–770.

Shandilya, J., and Roberts, S.G.E. (2012). The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1819*, 391–400.

Shen, J., Zhang, Y., Yu, H., Shen, B., Liang, Y., Jin, R., Liu, X., Shi, L., and Cai, X. (2016). Role of DUSP1/MKP1 in tumorigenesis, tumor progression and therapy. *Cancer Med.* *5*, 2061–2068.

Sheng, M., Dougan, S.T., McFadden, G., and Greenberg, M.E. (1988). Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 2787–2796.

Shieh, P.B., Hu, S.C., Bobb, K., Timmusk, T., and Ghosh, A. (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* *20*, 727–740.

## ***Bibliographie***

Shipton, O.A., El-Gaby, M., Apergis-Schoute, J., Deisseroth, K., Bannerman, D.M., Paulsen, O., and Kohl, M.M. (2014). Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 15238–15243.

Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., and Wang, Y. (1992a). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* *257*, 201–206.

Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M., and Tonegawa, S. (1992b). Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* *257*, 206–211.

Smith, W.B., Starck, S.R., Roberts, R.W., and Schuman, E.M. (2005). Dopaminergic stimulation of local protein synthesis enhances surface expression of GluR1 and synaptic transmission in hippocampal neurons. *Neuron* *45*, 765–779.

Solstad, T., Boccarda, C.N., Kropff, E., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2008). Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science* *322*, 1865–1868.

Soulé, J., Messaoudi, E., and Bramham, C.R. (2006). Brain-derived neurotrophic factor and control of synaptic consolidation in the adult brain. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 600–604.

Sperling, R.A., Bates, J.F., Cocchiarella, A.J., Schacter, D.L., Rosen, B.R., and Albert, M.S. (2001). Encoding novel face-name associations: a functional MRI study. *Hum. Brain Mapp.* *14*, 129–139.

Squire, L.R., Slater, P.C., and Chace, P.M. (1975). Retrograde amnesia: temporal gradient in very long term memory following electroconvulsive therapy. *Science* *187*, 77–79.

Stancovski, I., Gonen, H., Orian, A., Schwartz, A.L., and Ciechanover, A. (1995). Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 7106–7116.

Steward, O., and Worley, P.F. (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* *30*, 227–240.

Steward, O., Wallace, C.S., Lyford, G.L., and Worley, P.F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* *21*, 741–751.

Stolt, C.C., and Wegner, M. (2010). SoxE function in vertebrate nervous system development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 437–440.

Stolt, C.C., Lommes, P., Sock, E., Chaboissier, M.-C., Schedl, A., and Wegner, M. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev.* *17*, 1677–1689.

Stone, J.C. (2011). Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer* *2*, 320–334.

## **Bibliographie**

Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., and Moser, E.I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 655–669.

Sun, Y., Liu, W.-Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., and Zhou, H.-F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* *35*, 600–604.

Suzuki, A., Stern, S.A., Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., and Alberini, C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* *144*, 810–823.

Sweatt, J.D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 311–317.

Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P., et al. (2017). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* *45*, D362–D368.

## **-T-**

---

Takehara, K., Kawahara, S., and Kirino, Y. (2003). Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 9897–9905.

Takei, N., Kawamura, M., Ishizuka, Y., Kakiya, N., Inamura, N., Namba, H., and Nawa, H. (2009). Brain-derived neurotrophic factor enhances the basal rate of protein synthesis by increasing active eukaryotic elongation factor 2 levels and promoting translation elongation in cortical neurons. *J. Biol. Chem.* *284*, 26340–26348.

Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., and Greenberg, M.E. (1998). Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* *20*, 709–726.

Taube, J.S., Muller, R.U., and Ranck, J.B. (1990). Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *10*, 420–435.

Teixeira, C.M., Pomedli, S.R., Maei, H.R., Kee, N., and Frankland, P.W. (2006). Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 7555–7564.

Thiels, E., Kanterewicz, B.I., Norman, E.D., Trzaskos, J.M., and Klann, E. (2002). Long-term depression in the adult hippocampus in vivo involves activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphorylation of Elk-1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 2054–2062.

## **Bibliographie**

Thomas, G.M., and Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 173–183.

Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* *10*, 475–489.

Timmusk, T., Lendahl, U., Funakoshi, H., Arenas, E., Persson, H., and Metsis, M. (1995). Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice. *J. Cell Biol.* *128*, 185–199.

Travis, S.G., Huang, Y., Fujiwara, E., Radomski, A., Olsen, F., Carter, R., Seres, P., and Malykhin, N.V. (2014). High field structural MRI reveals specific episodic memory correlates in the subfields of the hippocampus. *Neuropsychologia* *53*, 233–245.

Treisman, R. (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* *46*, 567–574.

Trifilieff, P., Calandreau, L., Herry, C., Mons, N., and Micheau, J. (2007). Biphasic ERK1/2 activation in both the hippocampus and amygdala may reveal a system consolidation of contextual fear memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* *88*, 424–434.

Trifilieff, P., Lavaur, J., Pascoli, V., Kappès, V., Brami-Cherrier, K., Pagès, C., Micheau, J., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2009). Endocytosis controls glutamate-induced nuclear accumulation of ERK. *Mol. Cell. Neurosci.* *41*, 325–336.

Tulving, E., Donaldson, W., Bower, G.H., and Research, U.S.O. of N. (1972). *Organization of memory* (Academic Press).

Tyan, S.-W., Tsai, M.-C., Lin, C.-L., Ma, Y.-L., and Lee, E.H.Y. (2008). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances zif268 expression through the mediation of SRF and CREB1 associated with spatial memory formation. *J. Neurochem.* *105*, 820–832.

## **-U-**

---

Urban, K.R., Layfield, D.M., and Griffin, A.L. (2014). Transient inactivation of the medial prefrontal cortex impairs performance on a working memory-dependent conditional discrimination task. *Behav. Neurosci.* *128*, 639–643.

## **-V-**

---

Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslin, H., Corvol, J.-C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., et al. (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 491–496.



## ***Bibliographie***

Van der Werf, Y.D., Witter, M.P., and Groenewegen, H.J. (2002). The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *39*, 107–140.

Vanhoutte, P., Barnier, J.V., Guibert, B., Pagès, C., Besson, M.J., Hipskind, R.A., and Caboche, J. (1999). Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 136–146.

Vann, S.D., Brown, M.W., Erichsen, J.T., and Aggleton, J.P. (2000). Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 2711–2718.

Varela, C., Kumar, S., Yang, J.Y., and Wilson, M.A. (2014). Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Struct. Funct.* *219*, 911–929.

Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., et al. (2007). Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 6128–6140.

Vertes, R.P. (2002). Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J. Comp. Neurol.* *442*, 163–187.

Vertes, R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synap. N. Y. N* *51*, 32–58.

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

Vertes, R.P., Hoover, W.B., Do Valle, A.C., Sherman, A., and Rodriguez, J.J. (2006). Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* *499*, 768–796.

Vertes, R.P., Hoover, W.B., Szigeti-Buck, K., and Leranth, C. (2007). Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res. Bull.* *71*, 601–609.

Vertes, R.P., Linley, S.B., and Hoover, W.B. (2010). Pattern of distribution of serotonergic fibers to the thalamus of the rat. *Brain Struct. Funct.* *215*, 1–28.

Vetere, G., Kenney, J.W., Tran, L.M., Xia, F., Steadman, P.E., Parkinson, J., Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2017). Chemogenetic Interrogation of a Brain-wide Fear Memory Network in Mice. *Neuron* *94*, 363-374.e4.

Viskontas, I.V., McAndrews, M.P., and Moscovitch, M. (2000). Remote episodic memory deficits in patients with unilateral temporal lobe epilepsy and excisions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 5853–5857.

## ***Bibliographie***

Vithayathil, J., Pucilowska, J., Friel, D., and Landreth, G.E. (2017). Chronic impairment of ERK signaling in glutamatergic neurons of the forebrain does not affect spatial memory retention and LTP in the same manner as acute blockade of the ERK pathway. *Hippocampus* 27, 1239–1249.

## **-W-**

---

Wagner, A.D., Schacter, D.L., Rotte, M., Koutstaal, W., Maril, A., Dale, A.M., Rosen, B.R., and Buckner, R.L. (1998). Building memories: remembering and forgetting of verbal experiences as predicted by brain activity. *Science* 281, 1188–1191.

Walker, S.A., Cullen, P.J., Taylor, J.A., and Lockyer, P.J. (2003). Control of Ras cycling by Ca<sup>2+</sup>. *FEBS Lett.* 546, 6–10.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., and Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097.

Winocur, G., Moscovitch, M., Caruana, D.A., and Binns, M.A. (2005). Retrograde amnesia in rats with lesions to the hippocampus on a test of spatial memory. *Neuropsychologia* 43, 1580–1590.

Winsky, L., Montpied, P., Arai, R., Martin, B.M., and Jacobowitz, D.M. (1992). Calretinin distribution in the thalamus of the rat: immunohistochemical and in situ hybridization histochemical analyses. *Neuroscience* 50, 181–196.

Wisden, W., Errington, M.L., Williams, S., Dunnett, S.B., Waters, C., Hitchcock, D., Evan, G., Bliss, T.V., and Hunt, S.P. (1990). Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron* 4, 603–614.

Witter, M.P., Ostendorf, R.H., and Groenewegen, H.J. (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.

Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* 8, 1069–1077.

Worley, P.F., Christy, B.A., Nakabeppu, Y., Bhat, R.V., Cole, A.J., and Baraban, J.M. (1991). Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5106–5110.

Wouterlood, F.G., Saldana, E., and Witter, M.P. (1990). Projection from the nucleus reuniens 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.

Woźniak, W. (1993). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF): role in neuronal development and survival. *Folia Morphol.* 52, 173–181.

## **Bibliographie**

Wu, G.Y., Deisseroth, K., and Tsien, R.W. (2001). Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat. Neurosci.* *4*, 151–158.

Wymann, M.P., Zvelebil, M., and Laffargue, M. (2003). Phosphoinositide 3-kinase signalling-- which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* *24*, 366–376.

### **-X-**

---

Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C.K., and Greenberg, M.E. (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 5425–5436.

Xu, W., and Südhof, T.C. (2013). A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* *339*, 1290–1295.

### **-Y-**

---

Ying, S.-W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M.J., Hunt, S.P., Bliss, T.V.P., and Bramham, C.R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 1532–1540.

### **-Z-**

---

Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B.D., Miyakawa, T., Bear, M.F., and Tonegawa, S. (2001). Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* *107*, 617–629.

Zhang, W.-N., Pothuizen, H.H.J., Feldon, J., and Rawlins, J.N.P. (2004). Dissociation of function within the hippocampus: effects of dorsal, ventral and complete excitotoxic hippocampal lesions on spatial navigation. *Neuroscience* *127*, 289–300.

Zhang, Y., Fukushima, H., and 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.

Zhao, X., Lein, E.S., He, A., Smith, S.C., Aston, C., and Gage, F.H. (2001). Transcriptional profiling reveals strict boundaries between hippocampal subregions. *J. Comp. Neurol.* *441*, 187–196.

Zhong, T., Qing, Q.J., Yang, Y., Zou, W.Y., Ye, Z., Yan, J.Q., and Guo, Q.L. (2014). Repression of contextual fear memory induced by isoflurane is accompanied by reduction in histone acetylation and rescued by sodium butyrate. *Br. J. Anaesth.* *113*, 634–643.

Zhu, J.J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., and Malinow, R. (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* *110*, 443–455.

## ***Bibliographie***

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

Zonta, E., Bittencourt, D., Samaan, S., Germann, S., Dutertre, M., and Auboeuf, D. (2013). The RNA helicase DDX5/p68 is a key factor promoting c-fos expression at different levels from transcription to mRNA export. *Nucleic Acids Res.* 41, 554–564.



## Le rôle des noyaux reuniens et rhomboïde de la ligne médiane du thalamus ventral dans la consolidation d'un souvenir spatial chez le rat : approches comportementales et moléculaires

### Résumé

La formation des souvenirs repose sur un dialogue entre l'hippocampe et le cortex préfrontal médian (CPFm) qui se met en place progressivement et durablement après l'encodage de l'information. La lésion des noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh), relai anatomo-fonctionnel entre ces deux structures, perturbe la consolidation à long terme d'un souvenir spatial. A ce jour, les mécanismes mis en jeu ne sont, pas connus. Nous avons donc étudié les processus moléculaires impliqués dans la formation d'un souvenir spatial, au sein de l'hippocampe et du CPFm, et les conséquences induites par la lésion des noyaux ReRh. Pour cela, nous avons lésé les noyaux ReRh de rats, puis nous les testés dans une tâche de piscine de Morris pendant trois jours. Nous avons alors effectué un séquençage des ARNm des sous-régions hippocampiques CA1 dorsale et ventrale, une analyse par RT-qPCR des ARNm du CPFm, ainsi qu'une analyse de l'activation de ces structures par quantification de la protéine issue du gène immédiat *c-fos*. Nos résultats montrent que la lésion des noyaux ReRh modifie les processus transcriptionnels et traductionnels qui prennent place dans l'hippocampe et le CPFm, dès trois jours d'apprentissage spatial. Ces résultats pourraient expliquer la non persistance d'un souvenir spatial et les déficits comportementaux qui en résultent à la suite d'une lésion des noyaux ReRh.

Mots-clés : Noyaux reuniens et rhomboïde, consolidation systémique, gènes immédiats, séquençage des ARNm, mémoire spatiale

### Summary

Memorization relies on a dialogue between the hippocampus and the medial prefrontal cortex (mPFC). This dialog takes place progressively after the encoding of an event. Given their connectivity, the thalamic nuclei named reuniens and rhomboid (ReRh) may modulate the functional loop between these two structures. Indeed, a lesion of these nuclei impairs the persistence of a spatial memory. The mechanisms underlying this process are still unknown. Therefore, we analyzed the molecular mechanisms underlying spatial memory consolidation within the hippocampus and the mPFC, and the consequences of a lesion of the ReRh nuclei. After a stereotaxic lesion of the ReRh nuclei, rats were subjected to three days of a spatial training in the Morris water maze. We then performed a RNA sequencing of the dorsal and ventral hippocampus (CA1 regions), RT-qPCR analysis of the mPCF, and a quantification of the expression of *c-fos* in these two structures. Results show that ReRh nuclei lesion impairs the transcriptional and translational mechanisms within the hippocampus and the mPFC as soon as after three days of a spatial learning. These alterations could lead to the retrieval deficit observed after a long post-acquisition delay.

Keywords : Reuniens and rhomboid nuclei, systemic consolidation, immediate early genes, RNA sequencing, spatial memory