

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

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

LABORATOIRE DES NEUROSCIENCES COGNITIVES ET ADAPTATIVES

## THÈSE présentée par Étienne QUET

soutenue le : 21 février 2019

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

Discipline/S spécialité : **Neurosciences**

## Noyaux Reuniens et Rhomboïde du thalamus et persistance d'un souvenir chez le rat

Thèse dirigée par :

Dr. PEREIRA DE VASCONCELOS Anne

Université de Strasbourg

Rapporteurs :

Dr. RAVEL Nadine

Université de Lyon

Pr. VAN DER WERF Ysbrand

Université d'Amsterdam

Autres membres du jury :

Pr. VEINANTE Pierre

Université de Strasbourg

Membre invitée :

Dr. STÉPHAN Aline

Université de Strasbourg

# **TABLE DES MATIÈRES**

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Partie 1 : La mémoire</b>	<b>1</b>
1. La mémoire : définition et organisation	1
2. La mémoire à long terme et ses sous-systèmes	3
2.1. Mémoire déclarative	3
2.2. La mémoire non-déclarative	5
3. La notion d'engramme	5
<b>Partie 2. La consolidation à l'échelle des systèmes</b>	<b>8</b>
1. Consolidation synaptique	8
2. Consolidation systémique	10
2.1. Émergence du concept de consolidation systémique	10
2.2. Théorie standard de la consolidation	10
2.3. Théorie des traces multiples	12
2.4. Théorie de la transformation	14
2.5. Sommeil et consolidation systémique	15
<b>Partie 3. Les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) dans le réseau hippocampo-cortico-thalamique</b>	<b>19</b>
1. Organisation neuroanatomique	19
2. Connexions neuroanatomiques	20
2.1. Afférences du noyau Re	20
2.2. Afférences du noyau rhomboïde	22
2.3. Efférences du noyau Re	23
2.4. Efférences du noyau rhomboïde	24
3. Neurotransmission	25
4. Modulation de l'activité hippocampique et corticale par les noyaux ReRh	26
4.1. Modulation de l'activité du CPFm	26
4.2. Modulation de l'activité hippocampique	27
4.3. Modulation de la synchronisation HP-CPFm	29
5. Implication des noyaux ReRh dans des processus cognitifs	30
5.1. Mémoire de travail	30
5.2. Mémoire spatiale	31
5.3. Mémoire associative	33
5.4. Consolidation mnésique et persistance des souvenirs	34
<b>Objectif du projet de thèse</b>	<b>36</b>
<b>Matériels &amp; Méthodes</b>	<b>39</b>
1. Animaux	39
2. Interventions chirurgicales	40
2.1. Lésions excitotoxiques	40
2.1.1 Principe	40
2.1.2 Protocole expérimental	40
2.2. Inactivation DREADD des noyaux ReRh	41
2.2.1. Principe	41
2.2.2 Protocole expérimental	43
2.2.3. Inactivation pharmacogénétique des noyaux ReRh	43
3. Test comportementaux	44
3.1. Transmission sociale de préférence alimentaire	44
3.1.1. Principe	44
3.1.2 Habituation et restriction alimentaire	46
3.1.3. Transmission sociale	47
3.1.4 Test de préférence alimentaire	48

3.2. Conditionnement de peur	49
3.2.1. Principe	49
3.2.2. Dispositif	50
3.2.3. Conditionnement	51
Conditionnement de peur au son et au contexte	51
Conditionnement de peur au contexte uniquement	51
3.2.4. Test de la peur conditionnée au contexte	51
3.2.5. Test de la peur conditionnée au son	52
3.2.6. Quantification du <i>freezing</i>	52
3.3. Piscine de Morris	54
3.3.1. Dispositif	54
3.3.2. Tâche comportementale	55
3.3.3. Phase d'acquisition	56
3.3.4. Test de rétention	57
3.4. Le labyrinthe en double-H	58
3.4.1. Dispositif	58
3.4.2. Tâche comportementale	59
3.4.3. Phase d'acquisition	60
3.4.4. Test de rappel	60
4. Histologie	63
4.1. Prélèvement des cerveaux	63
4.2. Evaluation de l'étendue des lésions	63
4.2.1. Immunohistochimie de la protéine NeuN	63
4.2.2. Quantification de l'étendue des lésions	64
4.3. Evaluation de l'étendue des infections virales	65
4.4. Immunohistochimie de la protéine c-Fos	65
5. Statistiques	67
<b>Resultats</b>	<b>69</b>
1. Implication des noyaux ReRh dans la mémoire associative olfactive	69
1.1. Évaluation de la préférence spontanée des animaux pour le thym ou le cumin	70
1.2. Effet de la lésion des noyaux ReRh sur la transmission sociale de préférence alimentaire	71
2- Publication : Implication des noyaux ReRh dans la mémoire de peur	74
3- Données supplémentaires : caractérisation de l'infection DREADD des noyaux ReRh	100
4- Données supplémentaires : validation du DREADD dans le labyrinthe en double H	103
5- Implication des noyaux ReRh dans le rappel d'une mémoire spatiale	106
<b>Discussion &amp; conclusion</b>	<b>111</b>
Récapitulatif des résultats obtenus	111
De la difficulté d'étudier la consolidation systémique	112
• L'approche lésionnelle	112
• Avantages et limites de l'approche DREADD	115
Absence d'implication des noyaux ReRh dans la TSPA, une affaire de circuiterie neuronale ?	117
Noyaux ReRh et précision du souvenir	120
Implication des noyaux ReRh dans la consolidation systémique	123
<b>Bibliographie</b>	<b>129</b>

# **LISTE DES FIGURES**

Figure 1: Modèle de Atkinson et Shiffrin	2
Figure 2 : Modèle d'organisation hiérarchique des sous-systèmes de mémoire à long terme	4
Figure 3 : Evolution temporelle d'un engramme	7
Figure 4 : Plasticité synaptique : LTD et LTP	9
Figure 5 : Théorie standard de la consolidation	11
Figure 6: Comparaison des prédictions du modèle standard et du modèle des traces multiples	13
Figure 7: Mécanismes de consolidation pendant le sommeil à ondes lentes	17
Figure 8: Organisation neuro-anatomique des noyaux de la ligne médiane du thalamus chez le Rat	20
Figure 9. Afférences du noyau reuniens (Re) du thalamus	21
Figure 10 : Afférences du noyau rhomboïde (Rh)	22
Figure 11 : Efférences du noyau reuniens (Re)	23
Figure 12 : Efférences du noyau rhomboïde (Rh)	25
Figure 13 : Modèle de modulation de l'activité de l'HP par le noyau Re	28
Figure 14: Rat Long-Evans	39
Figure 15: Principe général de la technologie DREADD	42
Figure 16: Construction génétique utilisée pour inactiver les noyaux ReRh par la technologie DREADD.	42
Figure 17: Paradigme de TSPA	45
Figure 18: Protocole de TSPA utilisé afin d'évaluer la mémoire récente ou ancienne	46
Figure 19: Déroulement de l'étape d'interaction sociale	48
Figure 20: La piscine de Morris	55
Figure 21: Protocole expérimental utilisé en piscine de Morris	57
Figure 22: La labyrinthe en double H	58
Figure 23: Protocole d'entraînement dans le labyrinthe en double H	61
Figure 24: Test de rappel dans le labyrinthe en double H	62
Figure 25 : Test de préférence spontanée pour la paire thym/cumin	71
Figure 26: Une lésion préapprentissage des noyaux ReRh n'altère pas les performances des rats en TSPA	72
Figure 27: Caractérisation de l'infection DREADD des noyaux ReRh	101
Figure 28: Implication du ReRh dans le changement de stratégie en double H	104
Figure 29 : Inactivation DREADD des noyaux ReRh pendant le test de rappel en piscine de Morris	107
Figure 30: Influence du <i>timing</i> d'inactivation sur les résultats comportementaux	114
Figure 31: Implication du noyau Re dans la généralisation des souvenirs: modèle de Xu et Südhof, 2013.	121
Figure 32: Le noyau Re est impliqué dans les processus <i>offline</i> de consolidation	125

# **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

3V : 3ème ventricule  
Agm : Agranulaire médian  
CA : Corne d'Ammon  
CCA: Cortex Cingulaire Antérieur  
CEM : Centromédian  
CNO : Clozapine-N-Oxyde  
CPFm : Cortex Préfrontal Médian  
DH : Double H  
DREADD : Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs  
HP : Hippocampe  
HPd : Hippocampe dorsal  
HPv : Hippocampe ventral  
IAM : Interantéromédian  
IL : Infralimbique  
IMD : Interméiodorsal  
IP : Intra-péritonéal  
LTD : Dépression à long terme  
LTP : Potentialisation à long terme  
NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate  
OFC: cortex orbitofrontal  
PAF : Paraformaldéhyde  
PL : Prélimbique  
pRe : Périréuniens  
PT : Paraténial  
PV : Paraventriculaire  
Re : Réuniens  
REM : Sommeil paradoxal (Rapid Eye Movement)  
Rh : Rhomboïde  
RI : Réponse Inconditionnelle  
SC : Stimulus Conditionnel  
SI : Stimulus Inconditionnel  
SWR : Sharp Waves Ripples  
SWS : Sommeil à ondes lentes (Slow Wave Sleep)  
TSPA : Transmission Sociale de Préférence Alimentaire



# INTRODUCTION

# Introduction

## Partie 1 : La mémoire

### 1. La mémoire : définition et organisation

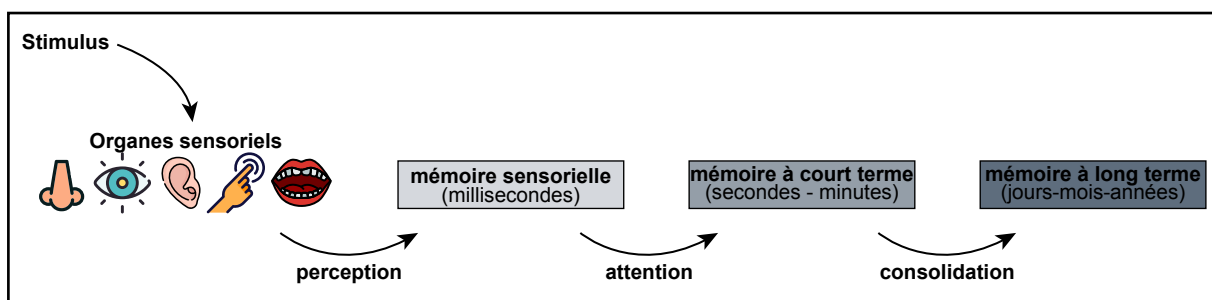
La mémoire peut être définie comme l'ensemble des activités mentales qui permettent d'enregistrer, de stocker puis de restituer des informations du passé. Cette définition met en évidence les 3 processus élémentaires du traitement mnésique que sont l'encodage, la consolidation et le rappel. L'encodage correspond à l'acquisition des informations et leur enregistrement sous la forme d'une représentation mentale ou trace mnésique. Cette représentation mentale est ensuite sujette à consolidation, processus permettant la stabilisation et la rétention à long terme de l'information. Enfin, celle-ci peut être restituée, partiellement ou dans son intégralité, lors de la phase de rappel.

Cette définition pourrait laisser penser que la mémoire est une capacité cognitive relativement simple et unitaire. Or, bien au contraire, des décennies de recherche en neurobiologie et neuropsychologie cognitive ont mis en évidence que la fonction mnésique implique un ensemble de processus dynamiques complexes, sous-tendus par différents circuits neuroanatomiques. Ainsi, derrière le terme de « mémoire » se cachent en réalité plusieurs sous-systèmes, qui ont été classifiés et hiérarchisés selon divers critères. Un système de mémoire peut être défini comme un réseau neuronal spécialisé dans le traitement d'un type d'information spécifique (Tulving, 1972). Ces systèmes sont organisés mais surtout en interaction permanente pour permettre l'accomplissement optimal des fonctions mnésiques.

Les classifications des systèmes de mémoire sont basées sur les modalités sensorielles (e.g. tactile, visuel, auditif), le décours temporel (mémoire à court ou long

terme), le type de représentation (e.g. mémoire déclarative ou non) ou encore le mode de récupération du souvenir (explicite ou implicite).

Une classification couramment utilisée est celle initialement proposée par William James en 1890, opposant la mémoire à court terme (alors qualifiée de mémoire primaire) et la mémoire à long terme (mémoire secondaire). En 1968, Atkinson et Shiffrin enrichissent cette classification en proposant un modèle qui distingue trois registres de mémoire : la mémoire sensorielle, la mémoire à court terme et la mémoire à long terme (Figure 1). La mémoire sensorielle permet le maintien éphémère (<1 seconde) et donc le traitement de l'ensemble des informations provenant des organes sensoriels. Les processus attentionnels régulent le passage d'une partie de ces informations sensorielles en mémoire à court terme. Celle-ci a une capacité limitée (caractérisée par un empan mnésique) et permet le maintien temporaire (quelques secondes à quelques minutes) des informations perçues. Lorsque les informations stockées en mémoire à court terme peuvent être manipulées mentalement, on parle alors 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 sera consolidée pour être maintenue en mémoire à long terme pour une durée beaucoup plus importante (de plusieurs jours à toute la vie). La mémoire à long terme est elle-même sous-divisée en deux catégories : la mémoire à long terme récente (quelques jours/semaines chez l'Homme, généralement évaluée entre 1 et 5 jours chez le rongeur) et la mémoire à long terme ancienne (plusieurs mois/années chez l'Homme, évaluée à plus d'une dizaine de jours chez le rongeur).



**Figure 1: Modèle de Atkinson et Shiffrin.**

Adapté de Atkinson et Shiffrin (1968)

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de l'étude des mécanismes cérébraux de la mémoire à long terme et particulièrement des processus de consolidation permettant le passage de mémoire à long terme récente à une mémoire à long terme ancienne.

## **2. La mémoire à long terme et ses sous-systèmes**

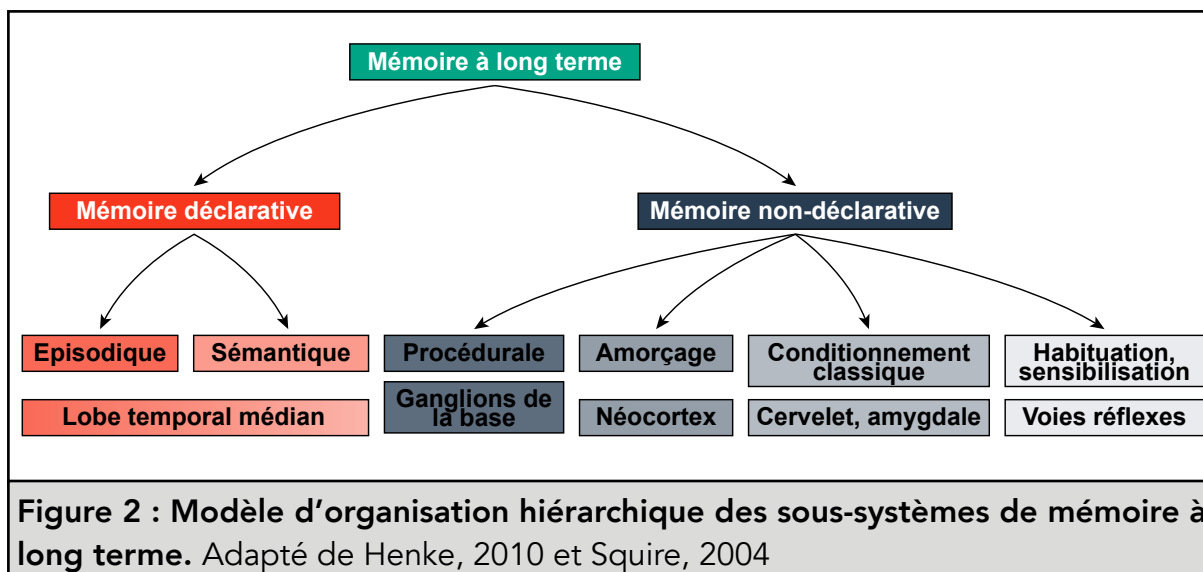
Au cours du vingtième siècle, de nombreux cas de patients atteints d'amnésies de natures diverses suite à des lésion cérébrales spécifiques ont permis la compréhension progressive et la classification des systèmes de mémoire, notamment les mémoires à long terme.

Le plus célèbre d'entre eux est le patient HM qui, après avoir subi une ablation bilatérale des lobes temporaux dans le but de soigner son épilepsie, souffrait d'une amnésie antérograde (incapacité à former de nouveaux souvenirs) quasi-totale ainsi que d'une amnésie rétrograde (incapacité à se souvenir d'évènements préalables) d'environ 11 ans (Corkin, 2002). Néanmoins, sa mémoire à court-terme, tout comme sa mémoire de travail, ses capacités perceptives et intellectuelles, ainsi que ses habiletés motrices étaient préservées, indiquant que différentes fonctions cognitives mettent en jeu différentes aires cérébrales.

Ainsi les études neuropsychologiques de patients amnésiques ont notamment permis de dissocier les mémoires déclaratives et non-déclaratives (Figure 2).

### **2.1. Mémoire déclarative**

La mémoire déclarative, ou mémoire explicite, désigne le stockage d'informations qu'un individu peut rappeler consciemment et exprimer par le langage (Squire et al., 1993). Celle-ci est sous-divisée en mémoire sémantique et épisodique (Tulving, 1972). La mémoire sémantique est la mémoire des connaissances générales, des faits et des concepts théoriques, qui ne sont pas associés à un contexte spatio-temporel précis (exemple : savoir que la cathédrale de Strasbourg mesure 142m de haut mais ne pas savoir l'endroit et le moment où cette information cruciale a été apprise).



Par opposition, la mémoire épisodique est la mémoire des expériences personnellement vécues, inscrites dans un contexte spatio-temporel. Ainsi chaque souvenir épisodique inclut trois composantes : le « quoi », le « où » et le « quand » (Tulving, 1983).

Cette mémoire est celle qui confère la capacité de voyager mentalement dans le temps, à la fois en se remémorant les expériences passées et en imaginant le futur. L'étude de la mémoire épisodique constitue un enjeu majeur puisque c'est une des formes de mémoire affectée de façon prépondérante dans le cadre de pathologies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer. Cependant, de par la difficulté d'entretenir des échanges verbaux avec les animaux de laboratoire, l'étude de la mémoire épisodique dans les modèles animaux est complexe et sujette à débat. En effet, aucun paradigme comportemental de laboratoire ne permet d'évaluer de manière évidente simultanément les 3 composantes « quoi », « où » et « quand ». C'est pourquoi le terme de mémoire « *episodic-like* » est utilisé dès lors que les études sont menées chez l'animal mais que le type de mémoire évalué est assimilé à celui de la mémoire épisodique humaine. Néanmoins quelques rares expériences ont permis de valider l'existence d'une mémoire épisodique chez l'animal. C'est le cas des travaux de Clayton et Dickinson (1998) et Clayton et al. (2001), réalisés sur des geais à gorge blanche, qui ont montré que ces oiseaux ont la capacité de mémoriser à la fois l'endroit, la temporalité et la nature de la nourriture dissimulée par l'expérimentateur. En 2015,

Veyrac et al. ont développé un nouveau paradigme comportemental dans lequel les rats doivent mémoriser deux associations odeur-boisson (ce qui constitue le « quoi»), qu'ils expérimentent à des endroits («où») et dans des contextes multisensoriels («quel contexte») différents. Par cette approche, les auteurs ont confirmé la capacité des rats à former des souvenirs de type épisodique persistants dans le temps et à les rappeler.

## **2.2. La mémoire non-déclarative**

La mémoire non déclarative n'implique pas un rappel conscient des informations. Ce système inclut notamment les apprentissages procéduraux, les conditionnements classiques, ainsi que les phénomènes d'amorçage, d'habituation et de sensibilisation.

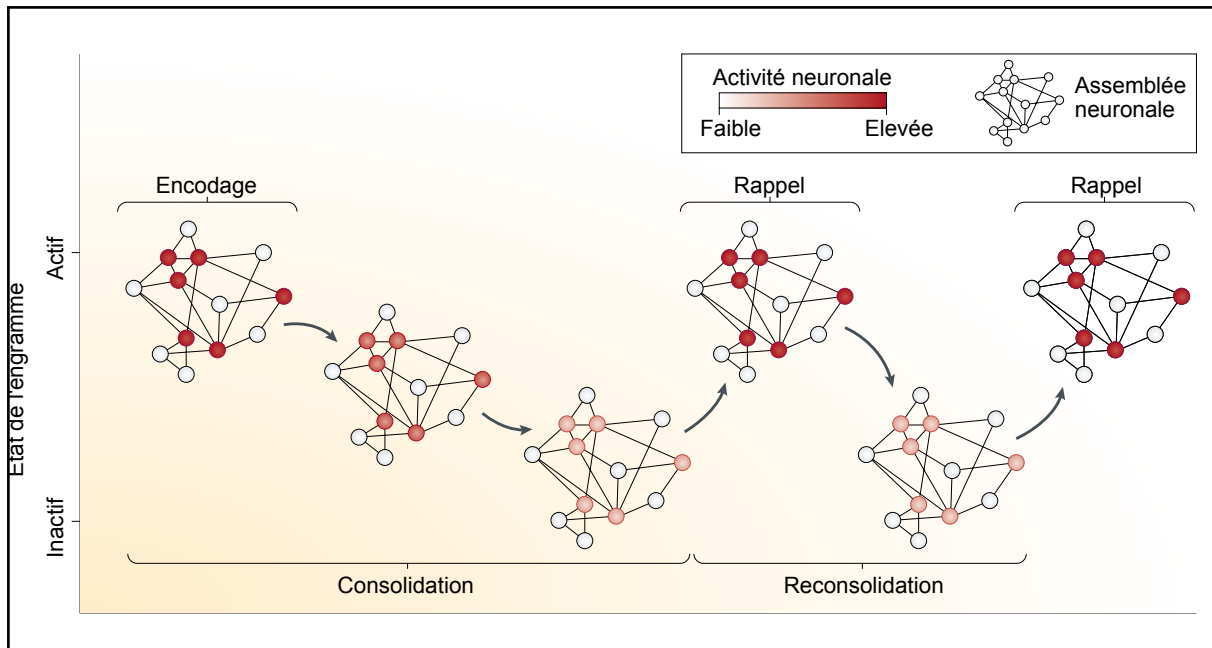
La mémoire procédurale permet le rappel d'habiletés motrices, de séquences de mouvements et de savoir-faire. Celle-ci est très durable et ce même si les informations ne sont pas utilisées pendant une longue période de temps (« le vélo, ça ne s'oublie pas !»). Le conditionnement classique, ou pavlovien, provoque l'association entre un élément neutre et un élément ayant une valence (par exemple émotionnelle), de telle manière que l'élément neutre finit par déclencher la même réaction chez le sujet que celui auquel il est associé. Les phénomènes d'amorçage, d'habituation et de sensibilisation correspondent à des modifications de la réponse comportementale selon l'expérience individuelle.

## **3. La notion d'engramme**

Pendant plusieurs décennies, deux types d'approche ont été utilisés de façon relativement indépendante pour comprendre les processus mnésiques. Il y avait d'une part les études du comportement animal pendant l'acquisition, la consolidation et le rappel de l'information ainsi que des structures cérébrales sous-tendant ces processus. Et il y avait d'autre part les études à l'échelle cellulaire, évaluant l'activité neuronale et la transmission synaptique. Bien que de nombreuses découvertes aient été faites de part et d'autre, aucun lien entre ces 2 types d'approche n'était fait et le substrat neurobiologique de la mémoire demeurait une énigme.

Pourtant dès 1923, R. Semon proposa le concept d'engramme, désignant les modifications physiques durables s'établissant dans le cerveau suite à un apprentissage. Mais la nature physico-chimique de cet engramme était parfaitement inaccessible pour les biologistes de l'époque. En 1949, D. Hebb suggéra de façon conceptuelle que la mémoire réside dans des assemblées cellulaires, formées par le renforcement de connexions entre des neurones ayant des activités corrélées pendant l'acquisition de l'information («cells that fire together, wire together») et que le rappel de l'information correspond à une réactivation de cette même assemblée cellulaire. Les phénomènes de potentialisation et de dépression à long terme (LTP/LTD), découverts au cours des années 1970-80 (Bliss and Lomo, 1973), constituent les premiers mécanismes cellulaires décrits permettant d'expliquer la formation d'engrammes. En effet, ils permettent la modification de la force de synapses existantes mais peuvent également mener à la formation ou l'élimination de synapses, modifiant ainsi la connectivité structurale au sein du cerveau. Par la suite, de nombreux travaux de recherche ont progressivement validé et étayé la théorie selon laquelle la mémoire est supportée par une assemblée de neurones distribuée dans de multiples régions cérébrales et dont les interconnexions sont renforcées suite à un apprentissage (Josselyn et al., 2015; Poo et al., 2016).

Le développement récent d'outils permettant « d'étiqueter » les neurones activés lors d'un apprentissage et même de les manipuler ultérieurement par des approches optogénétiques a permis de valider l'idée que la formation d'un souvenir implique le recrutement d'une assemblée neuronale spécifique (distribuée sur plusieurs structures cérébrales) et que la réactivation de cette population cellulaire permet le rappel de l'information stockée (Figure 3 ; Josselyn et al., 2015, 2017; Liu et al., 2012, Poo et al., 2016). Néanmoins il est important de noter que si une assemblée neuronale constitue le support physique de la trace mnésique, celle-ci n'est pas figée dans le temps. En effet les structures cérébrales sous-tendant un souvenir peuvent évoluer avec le temps, de par les processus de consolidation/reconsolidation mnésique (Dudai, 2004; Frankland et Bontempi, 2005).



**Figure 3 : Evolution temporelle d'un engramme.**

La formation d'un engramme (encodage) correspond au renforcement de connexions au sein d'une assemblée de neurones qui sont activés pendant l'évènement (rouge). Les processus de consolidation implique un renforcement «*offline*» de ces connexions et le passage progressif de l'engramme dans un état inactif. Le rappel du souvenir implique une réactivation de l'engramme, le ramenant ainsi à un état actif et sujet à modification. L'engramme peut ensuite être reconsolidé et réactivé de multiples fois. Adapté de Josselyn et al., 2015.



## Partie 2. La consolidation à l'échelle des systèmes

Certaines informations peuvent être mémorisées pendant plusieurs années voir toute la vie. Cette persistance des souvenirs nécessite que l'information initialement encodée dans un état labile soit progressivement consolidée, la rendant ainsi résistante aux interférences. Le terme de « consolidation » a été utilisé pour la première fois par Müller et Pilzecker au début du vingtième siècle pour décrire l'ensemble des processus qui surviennent consécutivement à l'apprentissage et qui permettent la stabilisation du souvenir (Müller and Pilzecker, 1900; Lechner et al., 1999). Ces mécanismes impliquent principalement des modifications à l'échelle des synapses et des systèmes.

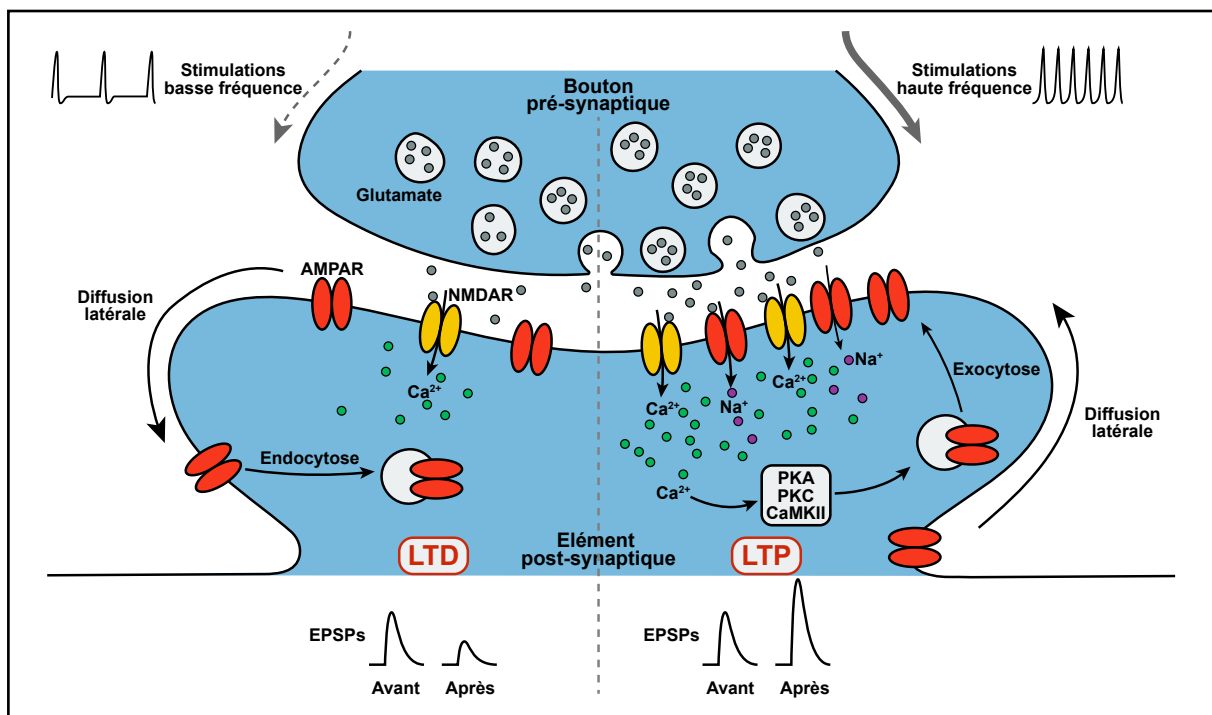
### 1. Consolidation synaptique

La consolidation à l'échelle des synapses intervient dès les premières minutes/heures consécutives à l'apprentissage et met en jeu différents phénomènes de plasticité synaptique. Les synapses constituent les points de contact fonctionnels entre les neurones et leur activité et structure sont sujettes à modification. Ces modifications, tant fonctionnelles que morphologiques, sont regroupées sous le terme de « plasticité synaptique ».

Les modifications d'activité des synapses peuvent ne durer que quelques minutes, on parle alors de plasticité à court terme ; quelques heures, il s'agit alors de plasticité à long terme précoce ou alors plus de 10 heures (pouvant durer plusieurs jours/mois) auquel cas on parle de plasticité à long terme tardive. On distingue globalement 2 types de processus opposés et complémentaires : les phénomènes de potentialisation (long term potentiation - LTP) et de dépression (long term depression – LTD) de la transmission synaptique (Andersen et al., 2017; Malenka, 1994; Malenka and Bear, 2004).

De façon générale, l'arrivée d'informations à la synapse déclenche une cascade de réactions intracellulaires, pouvant notamment activer l'expression de gènes

précoces, des facteurs de transcription qui vont moduler l'expression de gènes tardifs, conduisant à la modification de la configuration de la synapse (notamment du nombre de récepteurs présents à la membrane) et ainsi à la modulation de l'excitabilité synaptique (Figure 4 ; Bailey et al., 2015; Dudai, 2004). Si elle est suffisamment sollicitée, la synapse va ainsi être modifiée, remodelée, et cette plasticité appliquée à l'échelle de réseaux neuronaux est considérée comme le support de la mémoire à long terme (Clopath, 2012). La consolidation synaptique ne constituant pas le sujet de ce travail de thèse, cette partie ne sera pas développée d'avantage.



**Figure 4 : Plasticité synaptique : LTD et LTP.**

LTD : Des stimulations à basse fréquence induisent une entrée modérée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'élément post-synaptique, ce qui aboutit à l'endocytose de récepteurs AMPA, provoquant une baisse de l'efficacité synaptique.

LTP : Des stimulations à haute fréquence provoquent une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'élément post-synaptique, induisant l'activation de kinases dont l'action aboutit à l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA dans la fente synaptique et ainsi à l'augmentation de l'efficacité synaptique.

## **2. Consolidation systémique**

### **2.1. Émergence du concept de consolidation systémique**

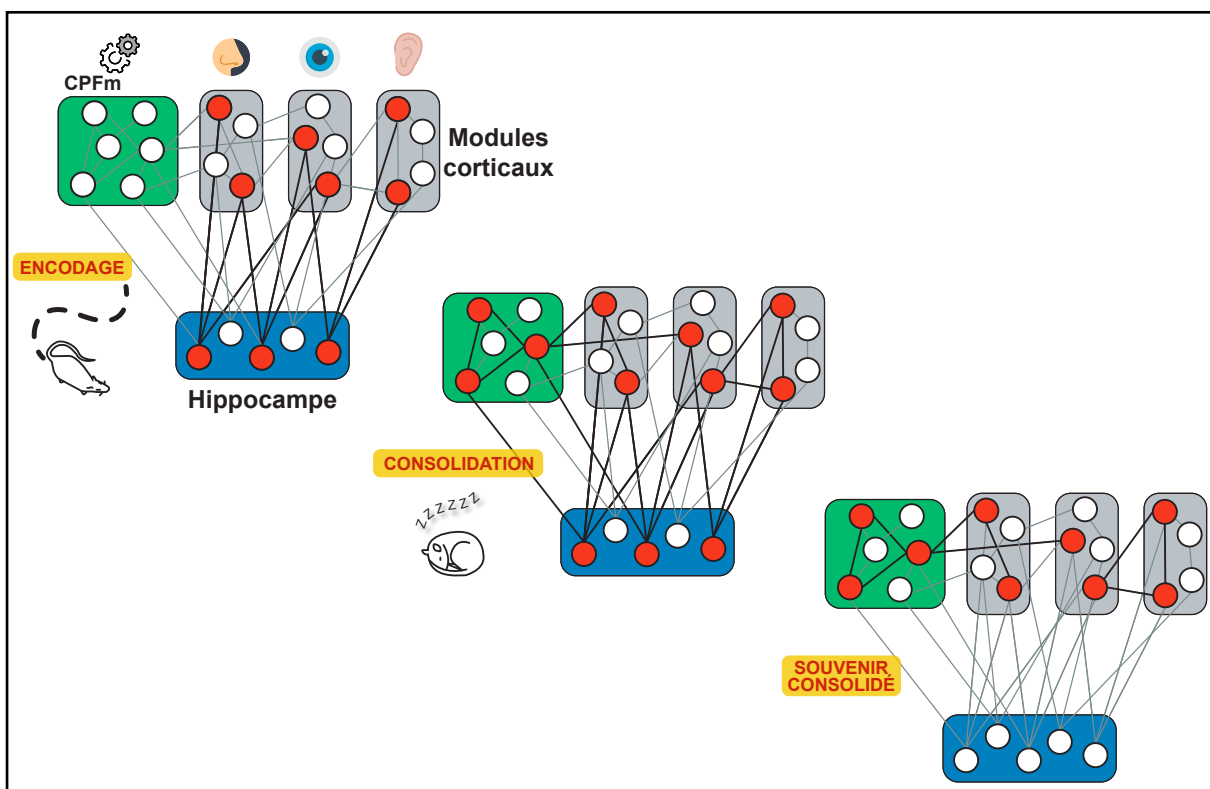
L'idée d'une relocalisation de la trace mnésique au sein du cerveau avec le temps est née des observations faites par le philosophe Théodule Ribot dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Celui-ci s'intéressait à des patients souffrants d'amnésie rétrograde et remarqua que certains patients conservaient une partie de leurs souvenirs. Le niveau de conservation était d'autant meilleur que les souvenirs étaient anciens. Par la suite, les études de neuropsychologie ont établi des liens entre une ou plusieurs régions cérébrales et diverses formes d'amnésie, et donc de mémoire. La plus célèbre de ces études a déjà été mentionnée précédemment et concerne le patient H.M.

Ainsi la consolidation à l'échelle des systèmes correspond à la réorganisation progressive des structures cérébrales qui sous-tendent la trace mnésique, afin de permettre sa persistance. Ces processus de consolidation systémique surviennent de façon parallèle et séquentielle à ceux de consolidation synaptique. Plusieurs théories et modèles ont été développés pour expliquer le phénomène de consolidation systémique et seront exposés par la suite. Tous ces modèles ont en commun le fait que, pour une mémoire de type déclarative, l'hippocampe (HP) est une structure cérébrale indispensable à l'acquisition d'informations nouvelles et à leur restitution après de courts délais mais que celui-ci se désengage progressivement (partiellement voire totalement selon le type de mémoire considéré) au profit des aires néocorticales.

### **2.2. Théorie standard de la consolidation**

La théorie standard de la consolidation, proposée par Marr en 1971, stipule que l'HP permet le maintien en mémoire des événements récents avant que ces informations ne soient « transférées » au néocortex pour y être stockées à long terme. Marr émettait déjà l'hypothèse que ces réorganisations, nécessaires à la rétention à long terme, surviennent pendant le sommeil par des processus de réactivation des circuits hippocampo-corticaux impliqués dans l'encodage de l'information et la formation de la trace mnésique.

Ce modèle, désormais qualifié de « standard », a depuis été largement discuté, étayé et affiné par de nombreux travaux de recherche, chez l'Homme comme chez l'animal (revues: Dudai, 2004; Frankland and Bontempi, 2005; Hardt and Nadel, 2018; Squire et al., 2015). Ainsi l'information initiale serait traitée par des modules néocorticaux et intégrée au niveau de l'HP pour former une trace mnésique cohérente. Après l'apprentissage, des réactivations hippocampo-corticales « *offline* », survenant pendant la veille calme et le sommeil, permettraient le renforcement de connexions cortico-corticales (Born and Wilhelm, 2012). Ainsi l'HP se désengagerait progressivement et le rappel du souvenir deviendrait alors dépendant de l'activation de réseaux néocorticaux, avec un rôle prépondérant du cortex préfrontal médian (CPFm) (Figure 5).



**Figure 5 : Théorie standard de la consolidation.**

Le traitement de l'ensemble des informations d'une expérience s'effectue au sein de modules corticaux distribués (gris). L'HP (bleu) intègre ces informations et les rassemble en une représentation cohérente ou trace mnésique. Les réactivations successives du réseau hippocampo-cortical (notamment au cours du sommeil) permettent la création et le renforcement, au cours du temps, des connexions cortico-corticales ainsi que le désengagement de l'HP. (Adapté de Frankland et Bontempi, 2005)

Cette théorie standard de la consolidation systémique, bien qu'étant un modèle de référence, présente certaines limites notamment par le fait qu'elle n'opère aucune distinction selon le type de mémoire déclarative considéré. Or les données obtenues chez les patients souffrant d'amnésie temporellement graduée indiquent une nécessité de distinguer les processus de consolidation pour la mémoire sémantique et la mémoire épisodique. C'est en partie pour répondre à ces limitations que Nadel et Moscovitch ont proposé un nouveau modèle, largement inspiré de celui de Marr, qu'ils qualifièrent de théorie des traces multiples (Nadel and Moscovitch, 1997).

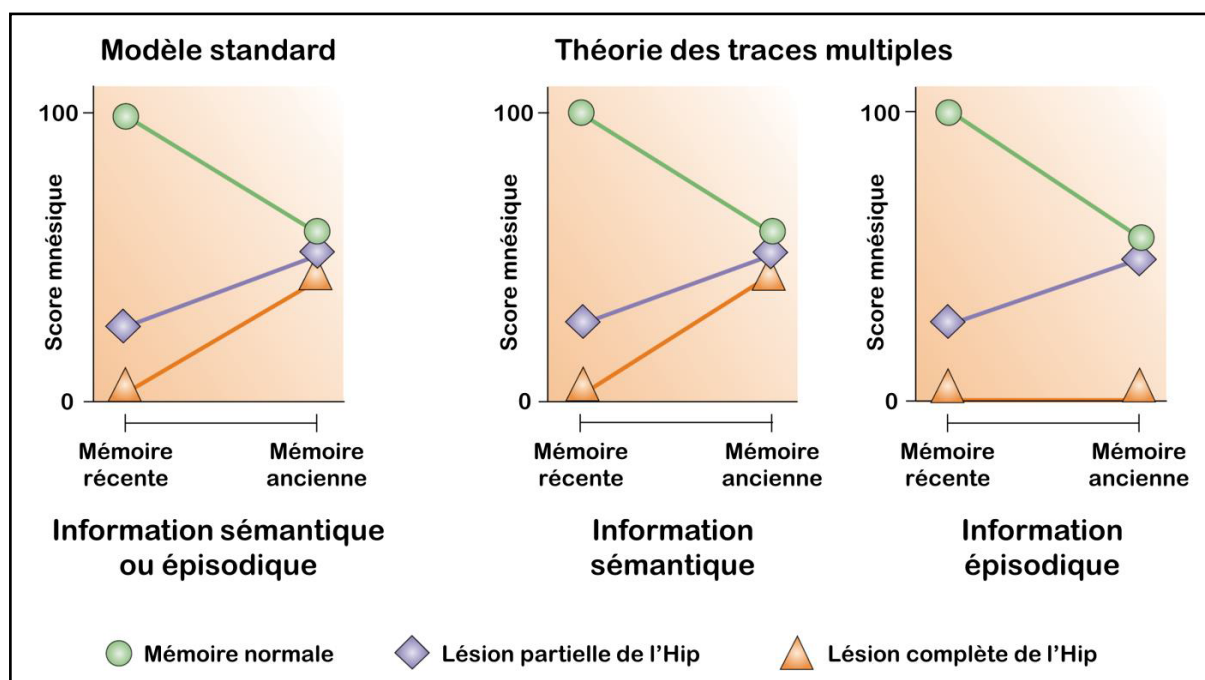
### **2.3. Théorie des traces multiples**

La théorie des traces multiples reprend une partie des concepts théoriques énoncés par le modèle standard de la consolidation systémique. En effet, elle stipule que l'HP est nécessaire à l'encodage des informations et à la création de la trace mnésique et que l'assemblée cellulaire hippocampique joue le rôle « d'index » pour les neurones néocorticaux impliqués dans la représentation de l'information, permettant de les relier en une trace mnésique cohérente (distribuée entre l'HP et le néocortex). Les nouveautés conceptuelles proposées par cette théorie sont que chaque réactivation de la trace, intervenant dans un contexte différent de celui de l'encodage, va provoquer la création d'une nouvelle trace mnésique. Ces traces mnésiques nouvelles partagent partiellement ou intégralement les informations de l'événement initial. Les informations factuelles (sémantiques) peuvent ainsi être progressivement extraites de leur contexte et intégrées dans un circuit néocortical. Les informations spatio-temporelles, qui confèrent la nature épisodique au souvenir, dépendent quant à elles d'une implication permanente de l'HP (pour le contexte spatial) et du cortex frontal (pour le contexte temporel) (Winocur and Moscovitch, 2011).

Ainsi, selon ce modèle les interactions entre l'HP et le néocortex permettent une réorganisation de la trace mnésique, mais les souvenirs autobiographiques dépendent toujours de l'HP. Avec le temps, les souvenirs épisodiques peuvent être oubliés ou au contraire renforcés par la formation de multiples traces hippocampo-corticales.

Ce phénomène faciliterait leur rappel et permettrait aux souvenirs épisodiques anciens de mieux résister lors d'atteinte de l'HP que les souvenirs récents, expliquant l'amnésie rétrograde temporellement graduée observée chez certains patients. En revanche, une lésion totale de l'HP provoquerait une amnésie rétrograde complète non temporellement graduée, et ce quel que soit l'âge de la trace dès lors qu'il s'agit de souvenirs épisodiques, autobiographiques.

En revanche les souvenirs sémantiques deviennent indépendants de l'HP, c'est pourquoi, une atteinte hippocampique provoquerait une altération de la mémoire récente, alors que la mémoire plus ancienne serait préservée. Ainsi, en accord avec la théorie standard de la consolidation, la mémoire sémantique ne dépendrait de l'HP que pendant une période transitoire (Figure 6).



**Figure 6: Comparaison des prédictions du modèle standard et du modèle des traces multiples.**

Représentation schématique des capacités mnésiques (mémoires récente et ancienne) à la suite de lésions partielles ou totales de l'HP selon les deux modèles. Les deux modèles s'accordent sur l'importance de l'HP dans la mémoire récente. La théorie des traces multiples fait la distinction entre mémoire sémantique (dont la consolidation et le stockage en mémoire ancienne pourraient, comme le suggère le modèle standard, ne plus dépendre de l'HP à terme), et la mémoire épisodique (toujours dépendante de l'intégrité de l'HP, quel que soit l'âge du souvenir).

Adapté de Frankland et Bontempi, 2005.

Bien que conforté par un certain nombre de données expérimentales, tant chez l'Homme que chez l'animal, ce modèle ne permet pas d'expliquer les variations importantes du niveau d'activation de l'HP au moment du rappel des informations, selon leurs charges émotionnelles et la richesse en détails notamment. Il semblerait en effet que l'HP soit essentiel au rappel détaillé du passé et non au rappel d'une version plus générale de l'évènement qui serait devenu indépendant du contexte d'acquisition. La mise en évidence d'une perte de détails au cours du vieillissement de souvenirs autobiographiques conforte cette hypothèse (Levine et al., 2002). Ainsi au cours du temps, les souvenirs épisodiques seraient progressivement «sémantisés» (Piolino et al., 2003), ce qui a amené le développement d'un nouveau modèle : la théorie de la transformation.

## **2.4. Théorie de la transformation**

La théorie de la transformation, proposée par Winocur, Bontempi et Moscovitch en 2010 est une évolution directe de la théorie des traces multiples. Cette théorie propose que tant que les souvenirs épisodiques sont associés à des détails contextuels, ils sont dépendants de l'HP, peu importe leur âge. Avec le temps, la trace hippocampique permet la mise en place progressive d'une trace néocorticale plus schématique, qui conserve l'essentiel du souvenir initial mais est appauvrie en détails contextuels. Ce phénomène est qualifié de généralisation et est notamment régulé par le passage du temps, l'intensité de l'apprentissage, la saillance du contexte, et les aspects émotionnels (Moscovitch et al. 2005 ; Winocur et al. 2007, 2010a).

Ces deux formes de représentation (riche en détails et généralisée) peuvent coexister et interagir de façon dynamique. C'est pourquoi, un souvenir s'exprimant sous sa forme schématique pourrait retrouver sa spécificité contextuelle et à nouveau engager l'HP en fonction des conditions dans lesquelles le rappel a lieu (Winocur and Moscovitch, 2011; Winocur et al., 2010b).

Les différentes théories de la consolidation à l'échelle des systèmes développées dans ce manuscrit, dérivés de celui initialement proposé par Marr, constituent le cadre principal des recherches cliniques et expérimentales depuis plusieurs décennies. Tous ces modèles impliquent la mise en place d'un dialogue entre l'HP et le néocortex, particulièrement le CPFm, pour permettre la consolidation à long terme des souvenirs sous la forme d'une trace stabilisée et ancrée, au moins partiellement, dans des réseaux néocorticaux. Ainsi de nombreux travaux menés pendant les dernières décennies visaient à déterminer la nature biologique de ces interactions hippocampo-corticales, supports des processus de consolidation. Il est apparu au cours de ces recherches que le sommeil joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de consolidation.

## **2.5. Sommeil et consolidation systémique**

L'idée d'un rôle du sommeil dans la mémorisation est apparue très tôt dans la recherche expérimentale sur la mémoire (Ebbinghaus, 1885) et depuis la première mise en évidence expérimentale des effets bénéfiques du sommeil sur les performances mnésiques chez l'Homme (Jenkins and Dallenbach, 1924), de très nombreuses études ont confirmé son rôle actif positif sur la persistance de la mémoire déclarative et procédurale (Born and Wilhelm, 2012; Marshall and Born, 2007). Bien que ne faisant partie intégrante d'aucun des modèles de consolidation systémique décrits précédemment, le sommeil était déjà évoqué par Marr en 1971 comme possiblement impliqué dans le transfert de la trace mnésique de l'HP au néocortex.

Le sommeil est classiquement divisé en deux phases distinctes : le sommeil à ondes lentes (Slow Wave Sleep, SWS) et le sommeil paradoxal (Rapid Eye Movement, REM), qui auraient des rôles complémentaires dans les processus de consolidation (Ackermann and Rasch, 2014; Diekelmann and Born, 2010).

Au cours du SWS, les séquences d'activation spatio-temporelles des neurones activés pendant l'encodage sont « rejoués » (Wilson and McNaughton, 1994). Ces réactivations des assemblés cellulaires semblent être associées à la réorganisation progressive de la trace mnésique de l'HP vers des circuits néocorticaux et donc être

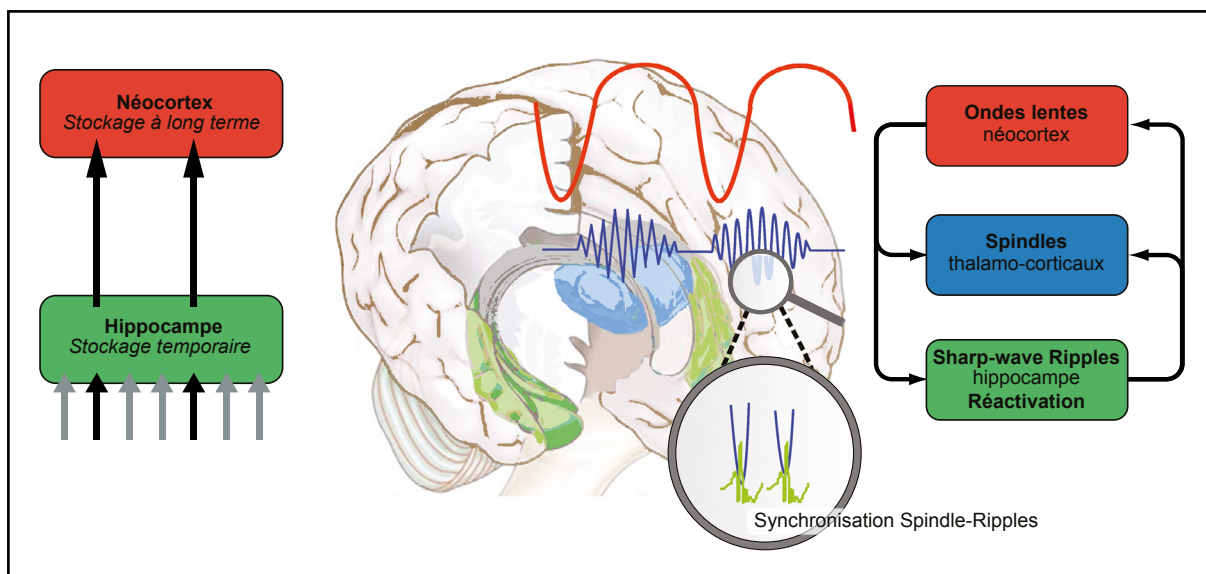


un des substrats biologiques de la consolidation systémique. Ces processus sont concomittants avec des activités oscillatoires particulières, observées notamment dans l'HP et le néocortex. Comme son nom l'indique, au cours du sommeil à onde lentes, des oscillations de basse fréquence (<1Hz) sont observées dans le néocortex. Celles-ci induisent des états « *up* » et « *down* » d'activité neuronale et fournissent ainsi un cadre temporel pour la mise en place d'un dialogue entre des structures cérébrales distantes. De façon intéressante, les caractéristiques des oscillations lentes (amplitude, pente) sont modifiées après un apprentissage (Huber et al., 2004).

C'est au cours de cette phase de sommeil que sont également enregistrés les *spindles* thalamo-corticaux, bouffées d'activité corticale (11-15Hz) d'origine thalamique d'une durée d'environ deux secondes. Le nombre de *spindles* enregistré dans le cortex est augmenté lors du sommeil consécutif à un apprentissage, que celui-ci soit de type déclaratif ou procédural (Gais et al., 2002; Morin et al., 2008; Schabus et al., 2004) et est corrélé aux performances de rappel (Clemens et al., 2005; Nishida and Walker, 2007). Les *spindles* seraient ainsi un des mécanismes permettant l'induction de processus de plasticité dans le néocortex, notamment la LTP (Rosanova and Ulrich, 2005), nécessaires à l'ancrage progressif de la trace mnésique dans les réseaux corticaux et ainsi à son stockage à long terme.

Également au cours du SWS, des *sharp wave-ripples* (SWR) sont observés dans l'HP. Cette activité particulière correspond à une oscillation lente de grande amplitude sur laquelle se superpose une oscillation très rapide (140-220 Hz). C'est au cours des SWR que sont observées les réactivations *offline* des assemblées cellulaires préalablement activées au moment de l'encodage. Il a été mis en évidence qu'une altération spécifique des *ripples* lors du sommeil post-apprentissage empêche la formation d'un souvenir spatial durable, suggérant qu'ils ont un rôle causal dans les processus de consolidation mnésique (Girardeau et al., 2009).

De façon intéressante une régulation précise de l'organisation temporelle des oscillations lentes corticales et de la survenue des *spindles* thalamo-corticaux et SWR hippocampiques est observée (Figure 7).



**Figure 7: Mécanismes de consolidation pendant le sommeil à ondes lentes.**

La consolidation systémique pendant le SWS repose sur un dialogue entre le néocortex et l'HP, contrôlé par les ondes lentes néocorticales (rouge). Les réactivations de la trace mnésique pendant les *Sharp-waves Ripples* (vert) surviennent de façon synchrone avec les *spindles* thalamo-corticaux (bleu) de façon répétée, permettant potentiellement un transfert d'informations de l'HP vers le néocortex. Adapté de Rasch et Born, 2013

En effet les *spindles* et SWR surviennent de façon synchrone spécifiquement pendant l'état « up » des ondes lentes (Mölle et al., 2002, 2006; Sirota et al., 2003). Ainsi la synchronisation *spindles*-SWR pourrait constituer un mécanisme autorisant le transfert d'informations de l'HP au néocortex : une réactivation de la trace mnésique dans l'HP (pendant les SWR) survient pendant l'induction d'un état de plasticité dans le néocortex (*spindles*), permettant le stockage de la trace dans le cortex et ainsi sa stabilisation à long terme (Colgin, 2011).

Pendant longtemps, l'implication du sommeil paradoxal (REM) dans les processus de consolidation est restée sujette à controverse, notamment de par la difficulté d'étudier spécifiquement cette phase de sommeil. De études descriptives et corrélatives, montrant par exemple une augmentation du nombre d'épisode de REM lors d'un sommeil post-apprentissage (Smith and Lapp, 1991; Smith et al., 1974), suggéraient un rôle du REM dans la consolidation. En plus de ces changements quantitatifs, des changements qualitatifs ont également été observés. Au cours du

REM, le rythme thêta (6-10 Hz), qui est également observé pendant l'éveil actif, est prédominant dans l'ensemble du cortex et l'HP. L'amplitude de l'oscillation thêta est augmentée lors du sommeil consécutif à un apprentissage (Fogel et al., 2009) et la cohérence thêta entre différentes structures cérébrales peut être prédictive des performances de rappel (Popa et al., 2010), indiquant là encore une implication du REM dans la consolidation. Le développement récent de nouvelles approches a permis de démontrer pour la première fois un rôle causal des activités neuronales pendant le REM dans la consolidation de souvenirs HP-dépendants chez la souris. En effet, Boyce et al. (2016) ont mis en évidence que la suppression de l'oscillation thêta (sans affecter les autres caractéristiques du REM) lors des épisodes de REM du sommeil post-apprentissage, impactait les performances mnésiques des animaux dans un test de conditionnement de peur au contexte et de reconnaissance d'objets.

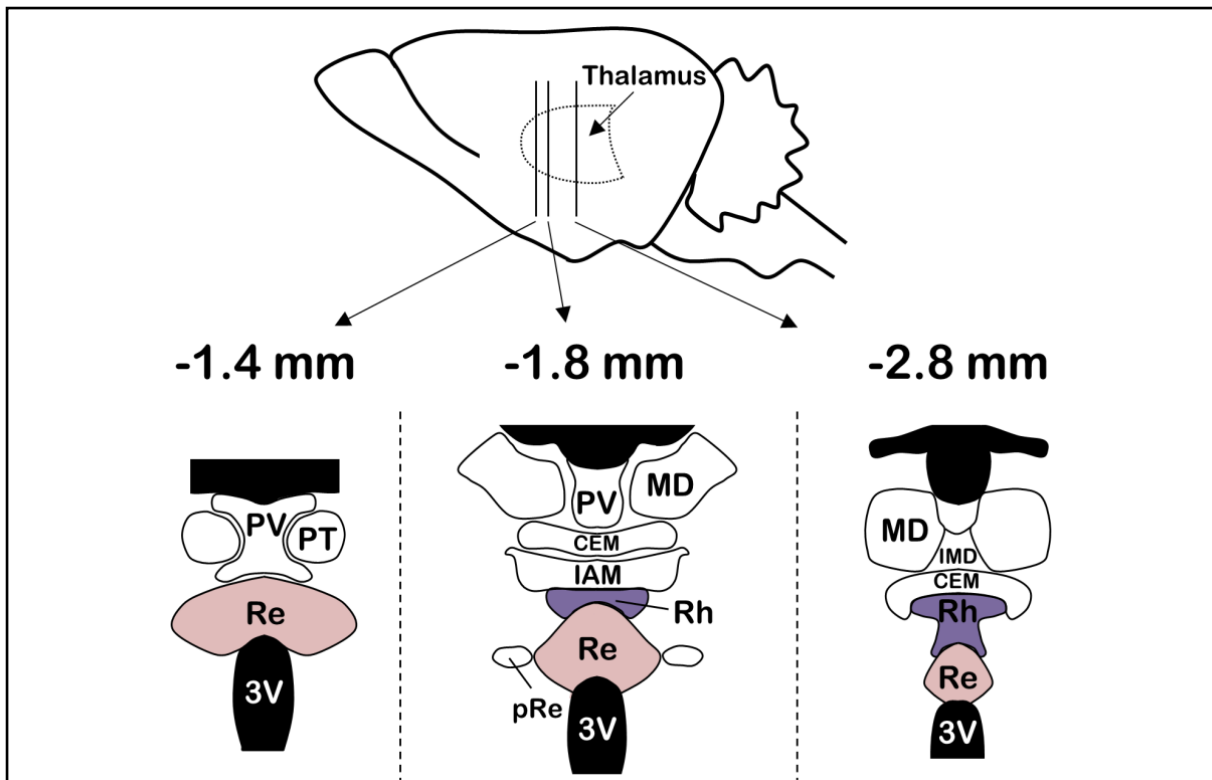
Les mécanismes électrophysiologiques présentés ici sont aujourd'hui considérés comme les processus de base permettant le transfert d'information entre l'HP et le néocortex et donc la consolidation systémique. Malgré le développement de ces connaissances mécanistiques générales, les circuits neuroanatomiques spécifiquement impliqués dans ces processus de réorganisation progressive de la trace mnésique reste en partie inconnus. Comme expliqué précédemment, l'HP et le CPFm constituent deux structures clés des processus mnésiques, respectivement pour la mémoire récente et la mémoire ancienne. Ainsi, le maintien à long terme des informations nécessite l'établissement d'un dialogue entre ces deux structures, permettant le transfert (total ou partiel) de la trace mnésique vers le CPFm. Or si l'HP possède une voie de projection monosynaptique vers le CPFm (Jay and Witter, 1991), celui-ci ne projette pas directement à l'HP en retour. L'absence de connexion réciproque directe entre ces 2 structures dont les interactions semblent indispensables aux processus de consolidation a suscité un intérêt pour les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) du thalamus, structures a priori capables d'intervenir comme relai dans les interactions HP-CPFm (Cassel et al., 2013). La troisième partie de cette introduction sera dédiée à la description des noyaux ReRh au sein d'un réseau hippocampo-cortico-thalamique.

## **Partie 3. Les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) dans le réseau hippocampo-cortico-thalamique**

### **1. Organisation neuroanatomique**

Le thalamus est une structure diencephalique, constitué d'une soixantaine de noyaux distincts, qui possède des connexions anatomiques avec l'ensemble du système nerveux, l'impliquant dans de nombreuses fonctions. Il est un relai essentiel des informations sensorielles et motrices du cortex, participe à la régulation du sommeil et des états de vigilance et de conscience. De plus, il est aujourd'hui établi que certains noyaux thalamiques jouent un rôle prépondérant dans les processus cognitifs, notamment de mémorisation (Pereira de Vasconcelos and Cassel, 2015; Van Der Werf et al., 2003; Vertes, 2006). En effet, il a été observé en clinique que des lésions d'origines diverses des noyaux thalamiques antérieurs et médians (AVC, traumatismes, syndrome de Korsakoff, tumeurs, etc.) sont associées à d'importants troubles cognitifs, notamment mnésiques, qualifiés d'amnésies diencephaliques (Fama et al., 2012; Van der Werf et al., 2003).

Les noyaux ReRh font partie des noyaux de la ligne médiane, qui couvrent toute l'étendue dorso-ventrale du thalamus (Figure 8). Les noyaux rostraux de la ligne médiane sont constitués des noyaux paraventriculaire (PV) et paraténial (PT) au niveau dorsal et au niveau ventral, des noyaux ReRh, juste au-dessus du troisième ventricule. Plus caudalement, les noyaux interantéromédian (IAM) puis intermédiodorsal (IMD) et le noyau centromédian (CEM) sont positionnés entre les noyaux PV et Rh. Dans sa partie rostrale, le noyau Re est divisé en deux parties séparées par le troisième ventricule (3V), qui fusionnent dans sa région médiane, puis caudale. Il est alors entouré latéralement par les noyaux périreuniens (pRe). Enfin, le Rh apparaît plus postérieurement, juste sous la limite antérieure de l'HP. Il est situé au-dessus du Re et ce tout au long de l'axe antéro-postérieur (Cassel et al., 2013; Paxinos and Watson, 2014).



**Figure 8: Organisation neuro-anatomique des noyaux de la ligne médiane du thalamus chez le Rat.**

Les noyaux ReRh sont situés dans la partie la plus ventrale de la ligne médiane du thalamus, immédiatement au dessus du 3<sup>e</sup> ventricule. Les coordonnées en mm indiquent la distance par rapport au Bregma selon Paxinos et Watson, 2007. Abréviations : CEM, noyau central médian ; IAM, noyau interoantéromédian ; IMD, noyau interomédiodorsal ; MD, noyau médiodorsal ; pRe, périreuniens ; PT, noyau paraténial ; PV, noyau paraventriculaire ; Re, noyau reuniens ; Rh, noyau rhomboïde. Cassel et al. 2013.

## 2. Connexions neuroanatomiques

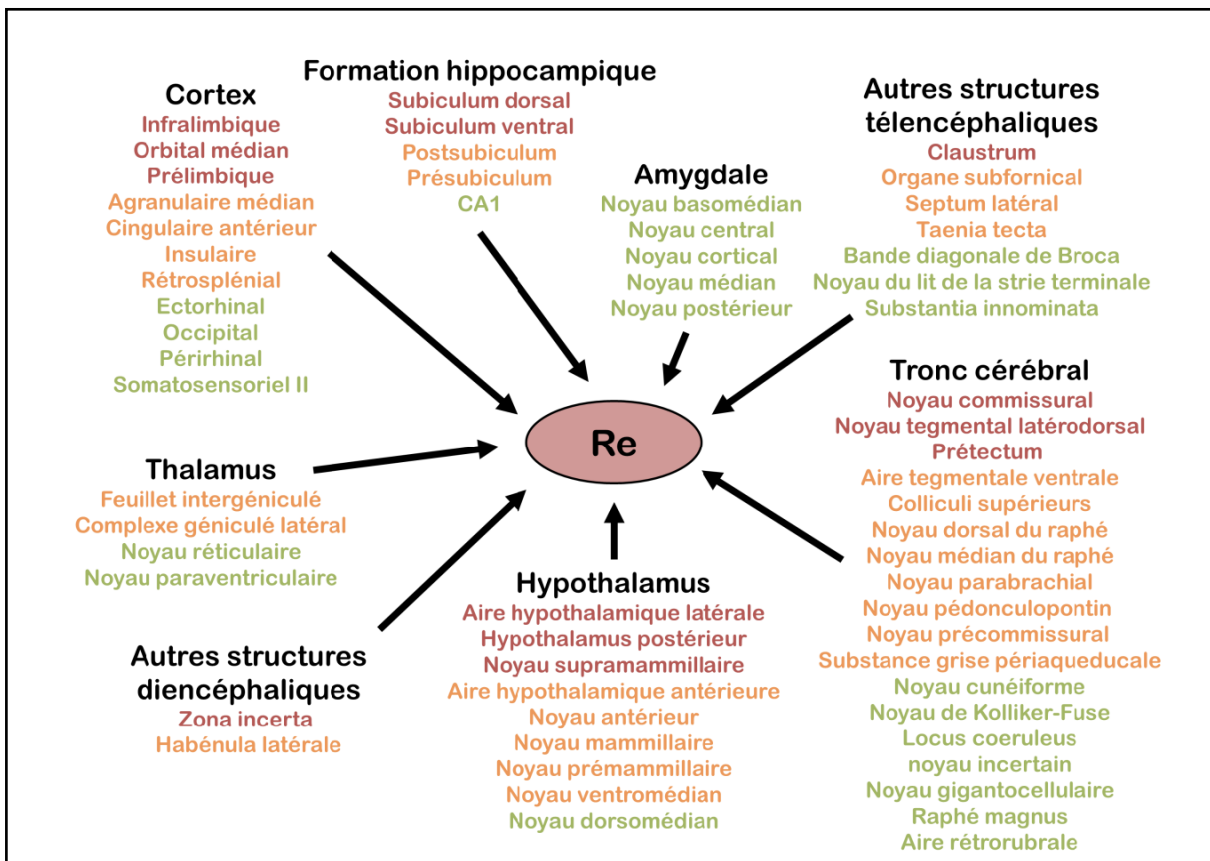
Les noyaux ReRh sont une zone de convergence de fibres provenant de nombreuses structures télencéphaliques, diencephaliques et du tronc cérébral et ils projettent eux-mêmes vers de très nombreuses structures cérébrales. Ce vaste champ de projection, notamment corticales, a longtemps valu aux noyaux ReRh d'être qualifiés de noyaux thalamiques « non-spécifiques ».

### 2.1. Afférences du noyau Re

Les neurones du cortex préfrontal médian (CPFm) composé des cortex agrulaire médian (AGm), cingulaire antérieur (CCA), infralimbique (IL) et prélimbique (PL)

fournissent une innervation dense au Re (Deschênes et al., 1998; Herkenham, 1978; McKenna and Vertes, 2004). Les cortex orbital médian, insulaire, ectorhinal, périrhinal et rétrosplénial ainsi que le subiculum et la corne d'Ammon de l'hippocampe (CA1) sont d'autres sources d'afférences corticales (McKenna and Vertes, 2004; Witter et al., 1990).

D'autres projections sont originaires des noyaux médians et antérieurs de l'amygdale (Herkenham, 1978), de la branche horizontale de la bande diagonale de Broca et du septum (McKenna and Vertes, 2004). Les projections diencephaliques sur le Re incluent également le noyau réticulaire du thalamus, le noyau géniculé latéral, la zona incerta, les aires préoptiques médiales et latérales, l'hypothalamus latéral et médian et les noyaux prémammillaire et supramammillaire (Figure 9).



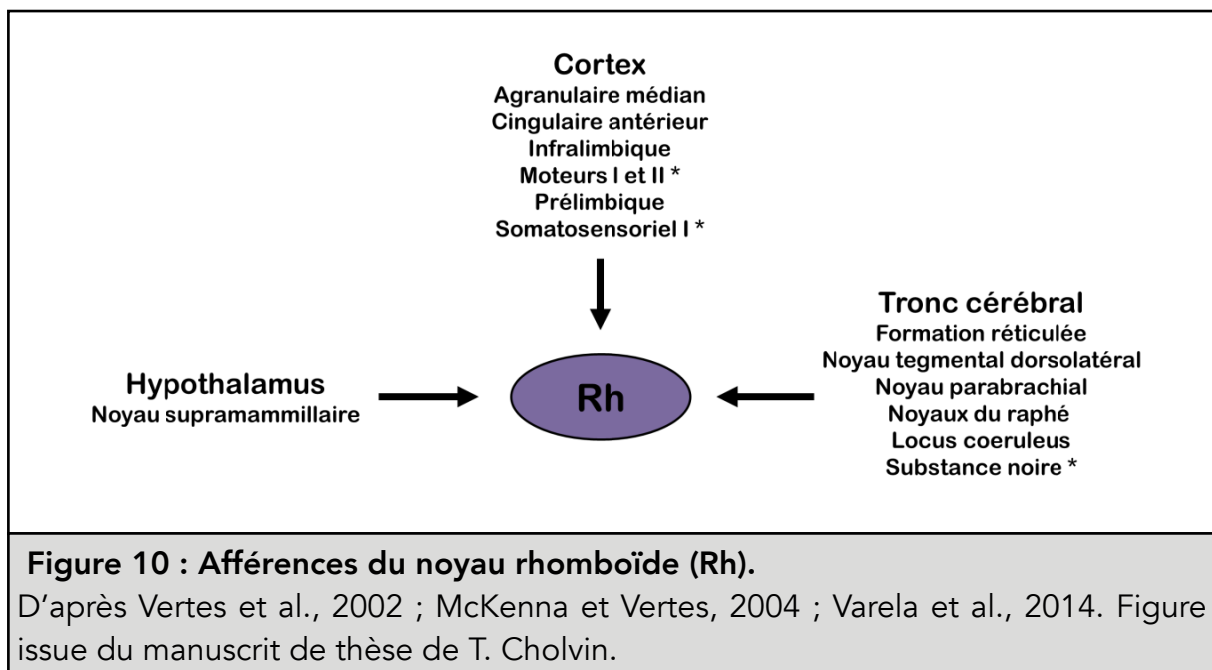
**Figure 9. Afférences du noyau reuniens (Re) du thalamus.**

Le code couleur indique l'intensité des projections ciblant le Re : rouge = projections denses, orange = projections modérées, vert = projections peu nombreuses. D'après Vertes, 2002 ; Van der Werf et al. 2002 ; McKenna et Vertes, 2004 ; Vertes et al. 2010. Figure issue du manuscrit de thèse de T. Cholvin.

Le Re reçoit également des projections du tronc cérébral issues de l'aire tegmentale ventrale, la formation réticulée, le colliculus supérieur, la substance grise périaqueducale, le noyau rostral du raphé, le locus coeruleus et le noyau parabrachial (Krout et al., 2002; Vertes et al., 2010).

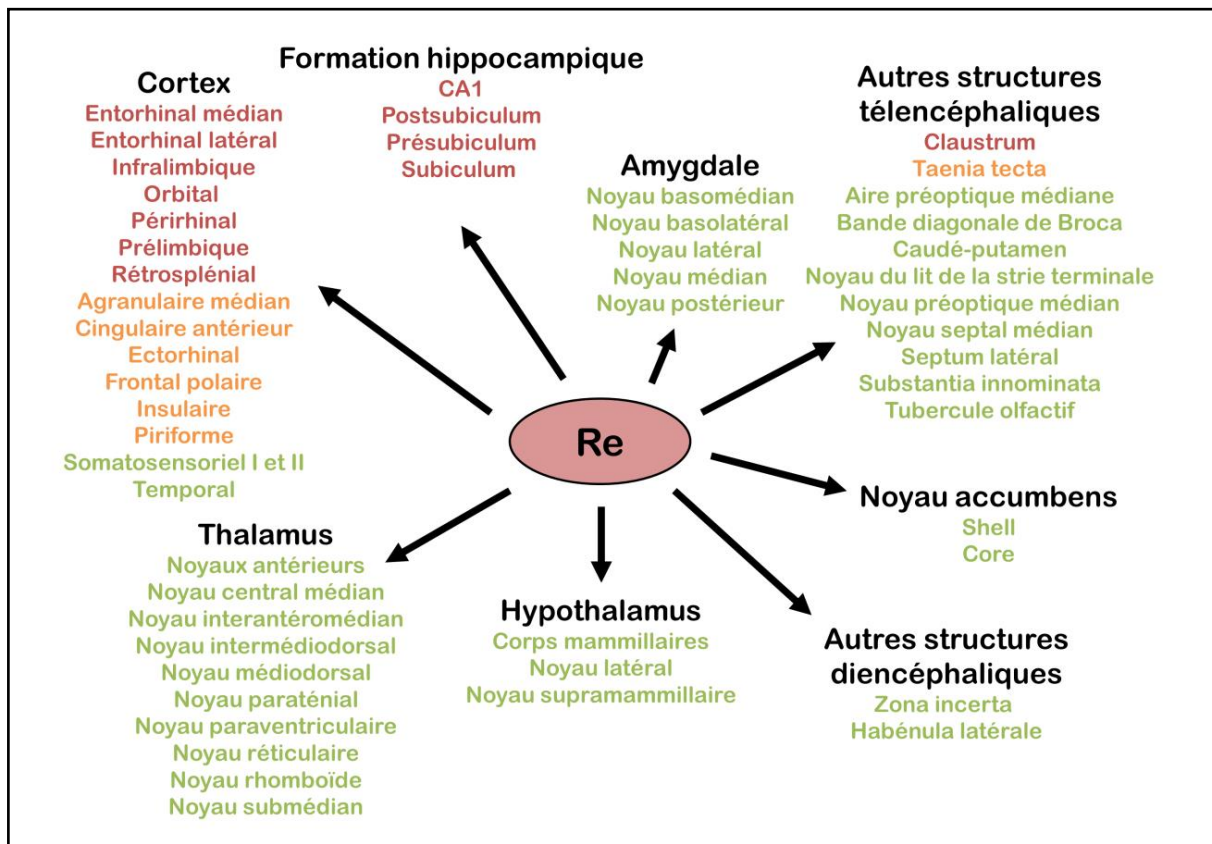
## 2.2. Afférences du noyau rhomboïde

Bien que les afférences du noyau Rh soient moins bien décrites que celles du noyau Re, il semble que le tronc cérébral en soit la source majeure, particulièrement des afférences sérotoninergiques provenant des noyaux du raphé (Vertes et al., 2010). Le noyau Rh reçoit également des projections de la formation réticulée, du noyau tegmental dorso-latéral, de la substance noire, du noyau supramammillaire et du locus coeruleus (Vertes et al., 2010). Les noyaux parabrachiaux ventraux et latéraux projettent également sur le Rh (Krout and Loewy, 2000). De plus, le Rh reçoit des afférences corticales provenant des cortex infralimbique, prélimbique, cingulaire antérieur et agrulaire médian (Vertes, 2002), de même que des cortex moteurs primaires et secondaires et du cortex primaire somatosensoriel (Figure 10 ; Vertes, 2004).



### 2.3. Efférences du noyau Re

Le noyau Re projette essentiellement sur le manteau cortical et la formation hippocampique (Figure 11). Au niveau du CPFm, il projette de façon abondante sur le PL et l'IL et de façon moins prononcée sur le CCA et l'AGm (notamment sur les couches 1, 5 et 6). Il projette également aux cortex entorhinal latéral et médian, entorhinal, périrhinal, piriforme, orbital, insulaire, frontal polaire et somatosensoriels (Van der Werf et al., 2002 ; Vertes et al., 2006 ; Hoover et Vertes, 2007 ; Varela et al., 2014). Il innerve aussi des structures télencéphaliques dont le claustrum, la bande diagonale de Broca, le caudé-putamen, le septum médian, le septum latéral, ou encore les tubercules olfactifs. Le noyau Re constitue la principale afférence thalamique vers la formation hippocampique, où il innerve de manière massive la région CA1 (stratum lacunosum-moleculare), le subiculum, le parasubiculum et le présubiculum.



**Figure 11 : Efférences du noyau reuniens (Re).**

D'après Vertes et al., 2002 ; McKenna et Vertes, 2004 ; Varela et al., 2014. Figure issue du manuscrit de thèse de T. Cholvin.



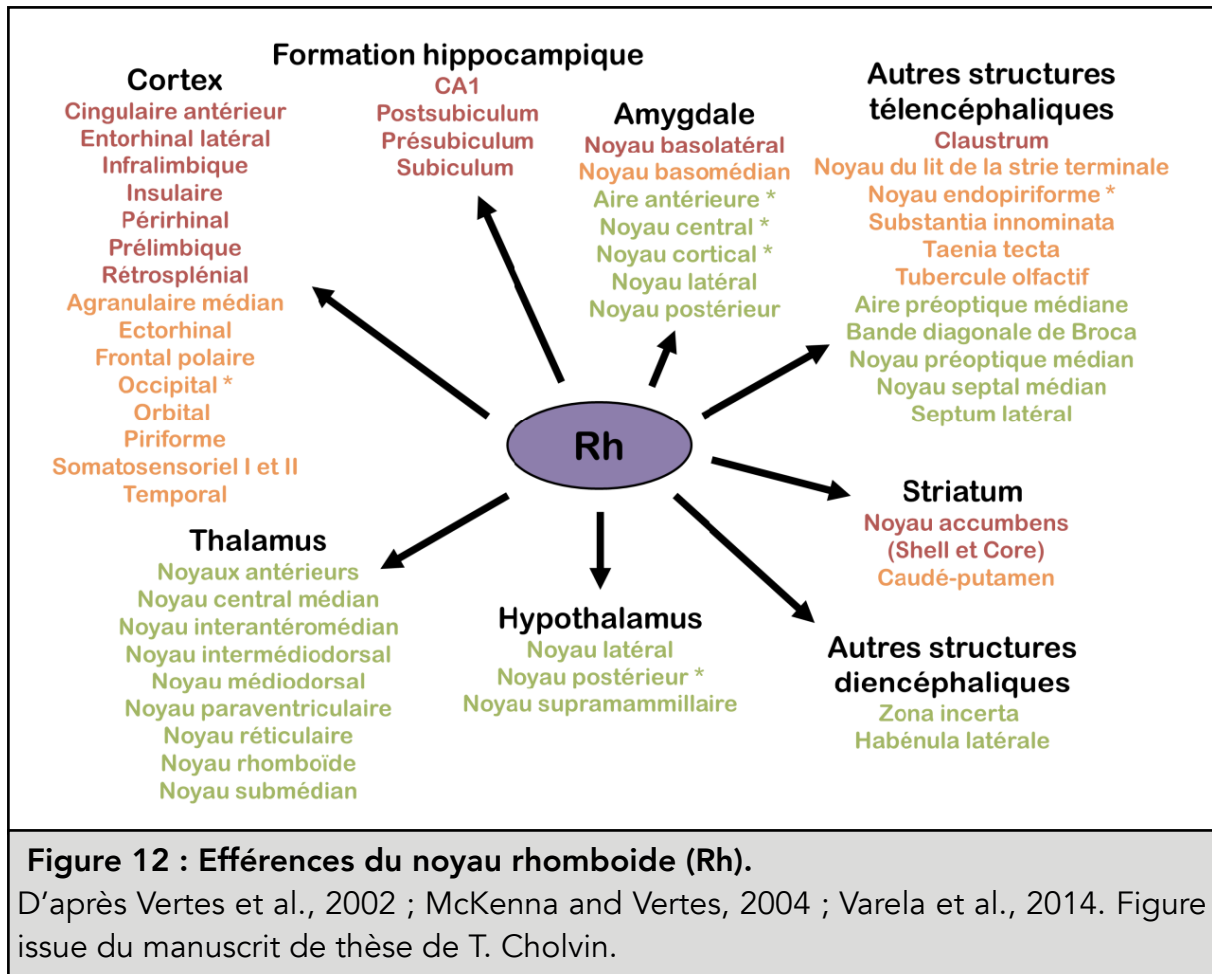
Aucune projection n'a été mise en évidence au niveau de CA2, CA3 ou DG (Van der Werf et al., 2002 ; Vertes et al., 2006 ; Varela et al., 2014). Ces connexions hippocampiques sont 10 fois plus nombreuses dans l'HP ventral (HPv) que dans l'HP dorsal (HPd), suggérant une connexion privilégiée du noyau Re à l'HPv (Vertes et al., 2007 ; Hoover et Vertes, 2012). De façon très intéressante, il a été montré qu'environ 5% des neurones du noyau Re envoient des collatérales d'axones à la fois à l'HP et au CPFm (Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014), fournissant ainsi un argument neuroanatomique majeur concernant un potentiel rôle du noyau Re dans les interactions hippocampo-corticales.

Une ségrégation des neurones du noyau Re en fonction de leurs structures de projection a été observée, tant dans l'axe rostro-caudal que médio-latéral et dorso-ventral, lors de différentes études de traçage (Dolleman-Van Der Weel and Witter, 1996; Hoover and Vertes, 2012). De façon générale, la partie rostrale du noyau Re possède d'avantage de neurones projetant à l'HP qu'au CPFm, et le profil inverse est observé dans la partie caudale (Hoover and Vertes, 2012). Les neurones projetant au CPFm sont principalement localisés à proximité de la ligne médiane et dans les noyaux pRe, tandis que ceux projetant à l'HP sont localisés entre ces deux populations neuronales avec une ségrégation dorso-ventrale : les neurones projetant à l'HPd sont localisés dorsalement par rapport à ceux projetant à l'HPv.

Enfin, le noyau Re innerve aussi de façon moins importante l'amygdale, l'hypothalamus, le noyau accumbens, la zona incerta ou encore l'habénula latérale (Dolleman-Van der Weel et Witter, 1996 ; Vertes et al., 2006).

## **2.4. Efférences du noyau rhomboïde**

Les efférences du noyau rhomboïde sont moins bien décrites mais semblent globalement identiques à celles du noyau Re (Figure 12). Cependant, ces dernières sont plus diffuses, non pas en termes de structures cérébrales ciblées, mais plutôt en termes d'intensité d'innervation. Une différence majeure est que le noyau Rh ne projette que sur l'HPd alors que le noyau Re, lui, projette sur l'ensemble de l'axe dorso-ventral de l'HP (Vertes et al., 2006).



### 3. Neurotransmission

De façon surprenante, relativement peu d'études ont été menées pour caractériser avec précision la nature neurochimique des différentes populations neuronales présentes dans les noyaux ReRh à l'heure actuelle. L'utilisation future d'outils tels que l'optogénétique et la pharmacogénétique pour moduler spécifiquement l'activité de populations cellulaires ciblées nécessitera une amélioration des connaissances dans ce domaine.

Les neurones de projection des noyaux ReRh semblent utiliser des acides aminés excitateurs (glutamate/aspartate) comme principaux neurotransmetteurs (Bokor et al., 2002). La nature excitatrice des projections du noyau Re à l'HP et au CPFm a été confirmé par des approches électrophysiologiques (Di Prisco and Vertes, 2006; Dolleman-Van der Weel et al., 1997). Une proportion importante de cellules du noyau Re exprime à la fois la calrétinine et la calbindine (des protéines liant le calcium ; Arai

et al., 1994), mais pas ou très peu de cellules du noyau Re expriment la parvalbumine (protéine liant le calcium caractéristique de certains interneurons GABAergiques ; Arai et al., 1994). Il en est de même pour les neurones du noyau Rh, qui expriment la calbindine et la calrétinine (mais de manière moins intense que dans le noyau Re), et pas ou peu la parvalbumine (Arai et al., 1994; Bokor et al., 2002; Winsky et al., 1992).

## **4. Modulation de l'activité hippocampique et corticale par les noyaux ReRh**

### **4.1. Modulation de l'activité du CPFm**

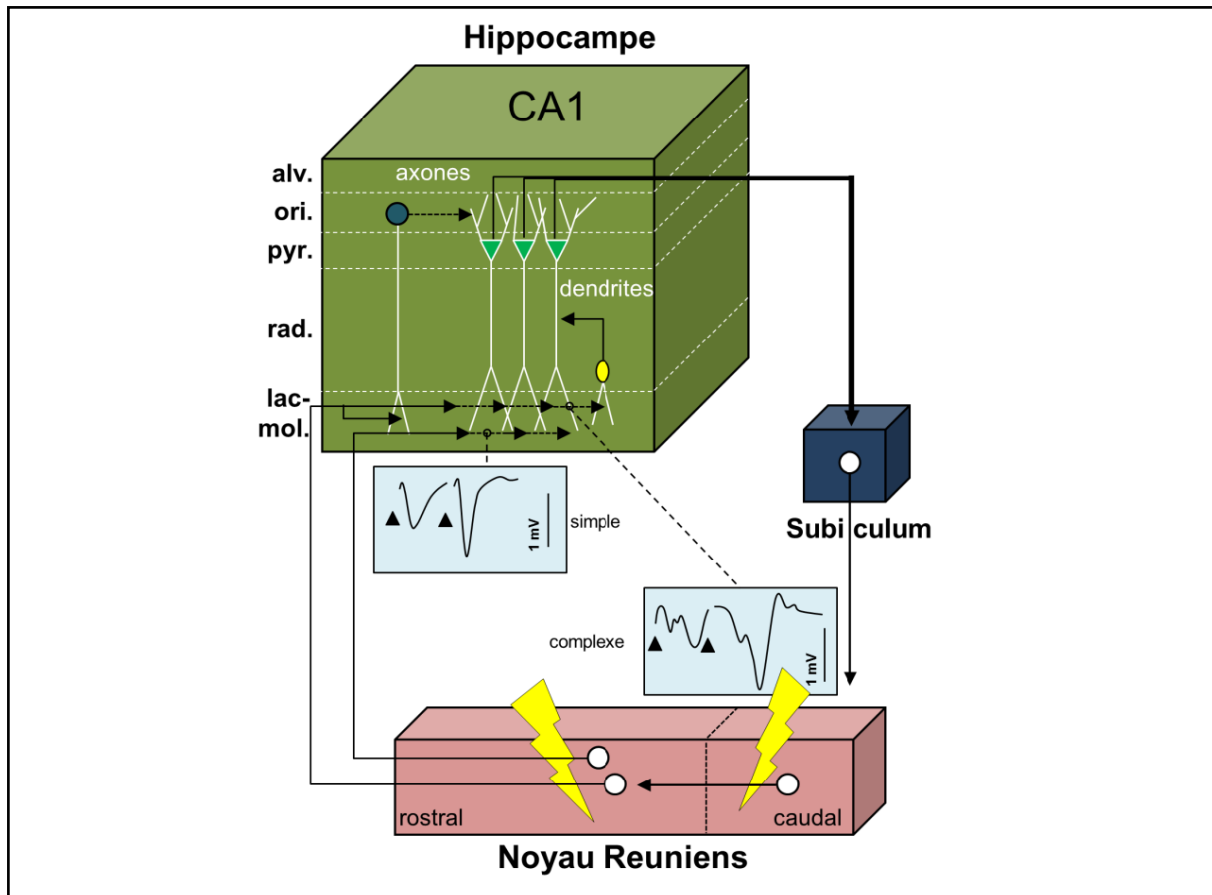
En 2006, Di Prisco et Vertes ont examiné l'effet de la stimulation des noyaux ReRh sur l'activité du CPFm chez le rat en implantant d'une part une électrode de stimulation sur la ligne médiane du thalamus et d'autre part des électrodes d'enregistrement dans les quatre sous-régions du CPFm (AGm, ACC, PL et IL). La stimulation des noyaux ReRh entraîne des potentiels évoqués de large amplitude dans les quatre sous-divisions du CPFm, ceux à l'amplitude la plus large étant observés au niveau des cortex IL et PL. De plus, la latence des réponses évoquées enregistrées indique que les connexions mises en jeu sont monosynaptiques. Les caractéristiques de ces potentiels évoqués sont similaires à celles des potentiels évoqués obtenus à la suite de la stimulation des noyaux médiodorsaux du thalamus, de l'hippocampe ou du CPFm controlatéral, structures dont l'influence sur l'activité du CPFm est avérée. Les noyaux ReRh représentent donc une source directe d'afférences excitatrices pour le CPFm, dont les propriétés laissent à penser qu'elle pourrait jouer un rôle fonctionnel important dans la modulation de l'activité de cette région corticale (Di Prisco and Vertes, 2006). En 2011, Eleore et al. ont montré que, chez la souris, des stimulations appariées (paired-pulse stimulation) du noyau Re entraînent une facilitation de la seconde réponse enregistrée dans le CPFm, suggérant que l'activation du noyau Re serait capable d'induire des phénomènes de plasticité à court terme dans le CPFm.

## 4.2. Modulation de l'activité hippocampique

En 1997, Dolleman-Van der Weel et al. ont étudié les effets de stimulations électriques des noyaux ReRh sur l'activité de CA1 dorsal au niveau de la stratum lacunosum-moleculare (couches où sont retrouvées les dendrites apicales des cellules pyramidales), de la stratum oriens et de la stratum radiatum (où sont localisés de nombreux interneurons). Ils ont mis en évidence que les réponses aux stimulations différaient selon les couches considérées et que, conformément aux données anatomiques, aucune modification d'activité n'était observée dans le gyrus denté. Dans la stratum lacunosum-moleculare et la stratum radiatum, la stimulation des noyaux ReRh induit respectivement une dépolarisation des cellules pyramidales et des interneurons (Figure 13). Comme observé dans le CPFm, des stimulations répétées du noyau Re induisent une facilitation robuste et soutenue de la réponse des cellules pyramidales, indiquant l'induction de mécanismes de plasticité synaptique (Bertram and Zhang, 1999; Dolleman-Van der Weel et al., 1997). De façon très intéressante, les stimulations du noyau Re n'induisent pas d'émission de potentiels d'action par les neurones pyramidaux. En revanche, les stimulations du noyau Re peuvent provoquer des potentiels d'actions dans les interneurons hippocampiques.

Ainsi, le noyau Re semble capable de moduler positivement et/ou négativement l'activité de CA1. Ses neurones auraient d'une part une action excitatrice sur les cellules pyramidales via des connexions monosynaptiques sur leurs dendrites apicales (stratum moleculare). D'autre part, ces neurones auraient aussi une action excitatrice sur les interneurons inhibiteurs ou excitateurs de CA1 (stratum radiatum et oriens/alveus) possédant des prolongements dans la stratum lacunosum moleculare. Enfin, la région CA1 de l'HP projetant, via le subiculum, sur la partie caudale du Re, ces données mettent en évidence une boucle fonctionnelle hippocampo-thalamique permettant de moduler l'activité de CA1 (Dolleman Van der Weel et al., 1997).

En plus de ces données obtenues par stimulation « artificielle » du noyau Re, d'autres ont confirmé la relation étroite entre l'activité de ce noyau et de l'HP, notamment à l'échelle des oscillations cérébrales.



**Figure 13 : Modèle de modulation de l'activité de l'HP par le noyau Re.**

Le noyau Re caudal projette sur le noyau Re rostral. Les neurones du Re rostral projettent ensuite directement dans la couche lacunosum-moléculaire, sur les dendrites de cellules pyramidales de CA1 dont les corps cellulaires se situent dans la couche pyramidale (triangle vert), ainsi que sur des interneurons dont le corps cellulaire réside dans les couches oriens et radiatum (en bleu et en jaune respectivement). Les cellules pyramidales de CA1 projettent sur le subiculum, qui clôt le circuit via une projection sur le Re caudal. La plupart des connexions indiquées ici sont excitatrices, exceptée celle entre les interneurons inhibiteurs présents dans la couche oriens et les cellules pyramidales de CA1. ».

Abréviations : alv, couche alveus; lac-mol, couche lacunosum-moléculaire; ori, couche oriens; pyr, couche pyramidale, rad, couche radiatum.

Schéma issu de Cassel et al. 2013 sur la base des résultats obtenus par Dolleman-Van der Weel et al. 1997,

Morales et al. (2007) ont mis en évidence, sur des animaux anesthésiés, une augmentation de la fréquence de décharge des neurones du noyau Re pendant les époques de thêta dans l'HP. Plus récemment, Lara-Vásquez et al. (2016) ont mis en évidence, dans les noyaux de la ligne médiane du thalamus de souris anesthésiées à l'uréthane, l'existence de différentes populations neuronales (identifiables par

l'expression spécifique de la calbindine et/ou la calrétinine), dont l'activité est différentiellement modulée par les oscillations de l'HPd. Il y a d'une part les cellules calrétinine positives, dont la fréquence de décharge est faible, même en présence de thêta, et est inhibée pendant les SWR. D'autre part, les cellules n'exprimant pas la calrétinine ont une fréquence de décharge supérieure, qui est augmentée pendant les époques de thêta et leur activité n'est pas affectée par les SWR. Ces deux populations neuronales fonctionnellement distinctes présentes dans le thalamus médian pourraient être recrutées sélectivement lors des différentes étapes du traitement mnésique, particulièrement l'encodage (thêta) et la consolidation (SWR).

### **4.3. Modulation de la synchronisation HP-CPFm**

Récemment, plusieurs études ont évalué l'implication des noyaux ReRh dans la synchronisation des activités du CPFm et de l'HP, en étudiant notamment la cohérence des oscillations entre ces structures, sur des animaux anesthésiés ou en situation comportementale (Ferraris et al., 2018; Hallock et al., 2016; Roy et al., 2017).

Roy et al. ont montré sur des rats anesthésiés à l'uréthane qu'une inactivation réversible du noyau Re diminue la cohérence des oscillations entre l'HP et le CPFm spécifiquement dans la bande de fréquence delta (2-5Hz). Hallock et al. (2016) ont mis en évidence qu'une inactivation réversible du noyau Re pendant une tâche de mémoire de travail spatiale induit une diminution de la cohérence de l'oscillation thêta entre l'HP et le CPFm. Très récemment, Ferraris et al. (2018) ont montré sur des animaux anesthésiés qu'une inactivation du noyau Re abolit spécifiquement la synchronisation de l'oscillation gamma entre l'HP et le CPFm.

Ces travaux constituent les premières preuves que le noyau Re est directement impliqué dans la modulation des interactions HP-CPFm, mécanismes clé des processus d'apprentissage et de mémorisation. Néanmoins, des études supplémentaires seront nécessaires pour avoir une vision précise de la nature de l'implication du noyau Re dans les interactions HP-CPFm et pour établir un lien de cause à effet entre ces implications et des résultats comportementaux.

## 5. Implication des noyaux ReRh dans des processus cognitifs

De par leurs relations anatomiques privilégiées avec l'HP et le CPFm, l'implication des noyaux ReRh dans divers processus cognitifs (Cassel et al., 2013) et dans certaines pathologies psychiatriques (schizophrénie (Duan et al., 2015), dépression (Kafetzopoulos et al., 2017), PTSD (Silva et al., 2018)) a suscité un intérêt important et croissant.

L'objectif de cette partie n'étant pas d'établir une revue extensive des données de la littérature, seules les données concernant l'implications des noyaux ReRh dans les processus mnésiques seront présentées.

### 5.1. Mémoire de travail

Chez l'animal, la mémoire de travail est généralement évaluée dans des tâches composées d'une phase d'échantillonnage et d'une phase de test, séparées par un délai relativement court. Différentes tâches de discrimination peuvent être utilisées, notamment des tâches spatiales telles que le labyrinthe en T ou les labyrinthes radiaux. Selon le protocole utilisé, ces tâches impliquent le CPFm voire aussi l'HP, et peuvent nécessiter une coopération active entre ces deux structures lors de tâches spatiales (Colgin, 2011; Marshuetz and Smith, 2006; Spellman et al., 2015). A ce titre, il n'est pas surprenant que de nombreuses études aient évalué l'implication des noyaux ReRh dans la mémoire de travail (spatiale).

Vann et al., (2000) furent les premiers à mettre en évidence une augmentation de l'expression de la protéine c-Fos dans le noyau Re suite au test de rappel d'une tâche de mémoire de travail spatiale dans un labyrinthe à 8 branches. Hembrook et al. (2011; 2012) ainsi que Layfield et al. (2015) ont mis en évidence qu'une lésion pré-apprentissage ou une inactivation réversible des noyaux ReRh provoque des déficits de mémoire de travail spatiale, spécifiquement lorsque la tâche utilisée est dépendante des interactions entre l'HP et le CPFm. Par des approches électrophysiologiques in vivo, Hallock et al. (2016) ont mis en évidence que les déficits de performances en

mémoire de travail spatiale provoqués par l'inactivation des noyaux ReRh étaient corrélés avec une diminution de la cohérence des oscillations thêta entre l'HP et le CPFm pendant le test de rappel. Très récemment, Maisson et al. (2018) ont mis à profit la résolution temporelle offerte par l'optogénétique pour étudier plus en détail l'implication des noyaux ReRh dans les processus de mémoire de travail, dans un labyrinthe en T. Ils ont mis en évidence que seule l'inactivation des noyaux ReRh pendant la phase d'échantillonnage provoque des déficits de performance au cours du test de rappel, démontrant ainsi que ces noyaux sont nécessaires à l'encodage des informations utilisées en mémoire de travail spatiale.

## 5.2. Mémoire spatiale

Sur la bases des connexions anatomiques massives entre les noyaux ReRh et l'HP, quelques études ont été menées pour évaluer l'éventuelle implication de ces noyaux dans la mémoire spatiale. Les premiers travaux, réalisés par Dolleman-van der Weel et al. (2009) ont montré qu'une lésion du noyau Re n'altère ni l'apprentissage ni le rappel à 24h dans une tâche de mémoire spatiale de référence en piscine de Morris. En 2011, Davoodi et al. ont réalisé des inactivations réversibles du noyau Re par injection de tetracaïne (bloquant des canaux sodiques) avant l'apprentissage, après l'apprentissage ou encore avant le rappel à 24h. Chacune de ces inactivations provoque une différence significative entre les animaux inactivés et les contrôles, et les auteurs concluent donc à une implication du noyau Re dans l'encodage, la consolidation et le rappel d'une mémoire spatiale. Néanmoins cette étude doit être prise avec des précaution car en réalité, dans leurs conditions expérimentales, les animaux contrôles ne sont pas capable de rappeler l'emplacement de la plateforme lors du test de rappel, rendant (à mes yeux) impossible l'interprétation de leurs résultats. Au laboratoire, Loureiro et al. (2012) ont mis en évidence qu'une lésion des noyaux ReRh provoque des déficits de performances lors d'un test de rappel à 25j (mémoire ancienne) mais pas à 5j (mémoire récente), suggérant un rôle dans la consolidation systémique d'un souvenir spatial. De façon intéressante, ils ont également observé une augmentation massive



de l'expression de c-Fos dans les noyaux ReRh spécifiquement suite au test de rappel à 25j (pas à 5j). En revanche, une inactivation réversible de ces noyaux au moment du test de rappel n'altérerait nullement les performances des animaux, laissant planer le doute sur l'implication des noyaux ReRh dans le rappel actif d'une information spatiale. Il se pourrait en effet que ces noyaux soient impliqués dans le rappel actif des informations spatiales anciennes, sans être pour autant être indispensables.

Ce doute est notamment renforcé par le fait que Cholvin et al. (2013) ont observé une altération des performances de rappel à 24h en piscine de Morris suite à une injection de muscimol dans les noyaux ReRh. Cependant les performances des rats inactivés sont supérieures au hasard, montrant qu'ils se souviennent de la localisation de la plateforme. Dans cette même publication, les auteurs ont également mis en évidence, dans un labyrinthe en double-H (qui sera décrit ultérieurement) un rôle des noyaux ReRh dans le processus de changement de stratégie spatiale. En effet, une inactivation de ces noyaux empêche les animaux de passer d'une stratégie de navigation procédurale égocentrée (séquence de mouvements) à une stratégie spatiale allocentrée (basée sur des indices visuelles).

Ces données impliquant les noyaux de la ligne médiane ventrale du thalamus dans la cognition spatiale sont d'autant plus intéressante que Jankowski et al. (2014, 2015) ont démontré la présence de neurones possédant des propriétés spatiales particulières dans le noyau Reuniens. En effet, ce noyau contient des cellules de lieu, de bordure et de direction de la tête, qui sont autant de populations cellulaires capables de participer au codage neuronal de l'environnement et qui sont majoritairement retrouvées dans l'HP et le cortex entorhinal (Moser et Moser, 2011). De plus, Cholvin et al. (2018) ont récemment mis en évidence que les noyaux ReRh sont impliqués dans la stabilité à long terme des champs d'activité des cellules de lieu de CA1.

L'ensemble de ces données indiquent une implication des noyaux ReRh dans la mémoire spatiale, mais au vue des résultats parfois discordants entre les études leur rôle exact dans des processus reste à déterminer. Une question majeure qui est encore en suspens et à laquelle l'une de nos expériences tentera de répondre est de

savoir si les noyaux ReRh sont impliqués dans le rappel actif d'une information spatiale (récente ou ancienne).

### 5.3. Mémoire associative

Parmi les modèles de mémoire *episodic-like* chez l'animal, la mémoire associative est définie comme la capacité à retenir la relation (l'association) entre des items initialement non liés. Au laboratoire, celle-ci peut être évaluée par différents paradigmes comportementaux utilisant des stimuli aversifs ou non. Parmi ces paradigmes figurent l'un des tests les plus utilisés dans le cadre de la recherche sur la mémoire : le conditionnement de peur, au cours duquel l'animal forme une association entre un stimulus aversif (chocs électriques) et un contexte ou un stimulus (un son par exemple) neutre. Les circuits neuronaux impliqués dans la mémoire de peur ont été étudiés de façon intensive et il est désormais établi que dans le cadre d'un apprentissage contextuel, les structures cérébrales principalement impliquées sont l'amygdale, le CPFm (particulièrement le cortex cingulaire antérieur) et l'HP (Frankland et al., 2004; Izquierdo et al., 2016; Vetere et al., 2017). A cet égard, il est surprenant de constater qu'avant le début de ce projet de thèse, seules deux études publiées traitaient de l'implication des noyaux ReRh dans la mémoire associative.

Davoodi et al. (2011) ont montré, dans une tâche d'évitement passif (assimilable au conditionnement de peur au contexte (Zhang et al., 2011)), qu'une inactivation du noyau Re pendant l'encodage, la consolidation précoce ou le rappel altère les performances des animaux lors du test de rappel (24h post-apprentissage).

En 2013, Xu et Südhof ont utilisé des approches pharmacogénétiques et optogénétiques spécifiques de voies de projections neuroanatomiques dans une tâche de conditionnement de peur au contexte pour mettre en évidence que le noyau Re, par ses afférences venant du CPFm, fait partie intégrante du réseau neuronal contrôlant la spécificité des souvenirs. En effet la suppression de la transmission synaptique dans les neurones du CPFm projetant au noyau Re préalablement au conditionnement provoque une généralisation de la peur au contexte, c'est à dire une

perte de spécificité du souvenir contextuel. De plus, des stimulations optogénétiques phasiques ou toniques des neurones du noyau Re spécifiquement pendant le conditionnement induisent respectivement une augmentation et une diminution de la généralisation du souvenir.

Aujourd'hui, l'état de la littérature est très différent puisque les publications traitant de l'implication des noyaux ReRh dans la mémoire associative, particulièrement de peur au contexte, se sont multipliées au cours des deux dernières années. Afin que cette section de l'introduction soit représentative de l'état des connaissances au moment de l'élaboration de ce projet de thèse, ces travaux récents ne seront pas évoqués d'avantage ici mais seront en revanche détaillés dans la partie dédiée à la discussion de nos résultats expérimentaux.

#### **5.4. Consolidation mnésique et persistance des souvenirs**

L'HP et le CPFm sont des structures clés des processus de consolidation mnésique. Au vu des connexions anatomiques denses et réciproques reliant les noyaux ReRh avec l'HP et le CPFm, il paraît crédible d'envisager un rôle de ces noyaux dans la persistance des souvenirs en mémoire ancienne.

Or, au commencement de ce projet de thèse, seule une étude issue de notre laboratoire et réalisée dans une tâche de mémoire spatiale de référence en piscine de Morris avait établi un rôle des noyaux ReRh dans la persistance des souvenirs. En effet, Loureiro et al. (2012) ont mis en évidence qu'une lésion préapprentissage des noyaux ReRh altère la capacité des animaux à retrouver l'emplacement d'une plateforme lors d'un test de rappel à un délai de 25 jours (mémoire ancienne), tandis que les performances des animaux lésés lors d'un test à 5 jours (mémoire récente) étaient équivalentes à celles des rats contrôles. De plus une inactivation réversible des noyaux ReRh pendant le test de rappel n'altère pas les performances des animaux, à 5 jours comme à 25 jours. Ces données suggèrent un rôle des noyaux ReRh dans la persistance des souvenirs mais indiquent qu'ils ne sont pas nécessaires à l'encodage et au rappel des informations, ce qui pointe vers un rôle de ces noyaux dans les processus *offline* de consolidation.

Les rares recherches menées chez l'Homme concernant l'implication des noyaux ReRh dans les processus mnésiques sont basées sur des tests de reconnaissance visuelle, couplés à des approches d'imageries cérébrales. Takashima et al. (2006) ont mis en évidence que l'activité de l'HP pendant le rappel d'informations, observée en IRM fonctionnelle, décroît progressivement au court du temps. Ainsi le rappel des informations anciennes (30j, 90j) provoque une activation moindre de l'HP en comparaison aux informations récentes (1j, 2j). A l'inverse, l'activation du CPFm augmente progressivement avec le délai. Ces résultats sont en accord avec la vision classique de la consolidation systémique (Frankland and Bontempi, 2005). Ces auteurs ont ensuite ré-analysé ces données en centrant leurs analyses sur la partie ventrale de la ligne médiane du thalamus, c'est à dire une région d'intérêt incluant les noyaux ReRh (Thielen et al., 2015). Leurs analyses de connectivité fonctionnelle entre cette région thalamique d'intérêt, l'HP et le CPFm suggère que les noyaux de la ligne médiane du thalamus servent de relais entre l'HP et le CPFm lors du rappel d'une information, spécifiquement lorsque celle-ci est en phase précoce de consolidation. Ainsi, chez l'homme, les noyaux ReRh joueraient un rôle transitoire dans les processus de consolidation.

Depuis le début de ce projet de thèse, quelques travaux ont confirmé l'implication des noyaux ReRh dans la persistance des souvenirs en mémoire ancienne. Là encore, afin que cette section de l'introduction soit représentative de l'état des connaissances au moment de l'élaboration de ce projet de thèse, ces travaux récents ne seront pas évoqués d'avantage ici mais seront en revanche détaillés dans la partie dédiée à la discussion de nos résultats expérimentaux.

Pour résumer, d'importantes données anatomiques et électrophysiologiques indiquent que les noyaux ReRh pourraient être un relai de communication entre l'HP et le CPFm, nécessaire aux processus de consolidation systémique. Cependant, au début de ce travail de thèse, seule une étude menée chez l'animal avait mis en exergue un rôle de ces noyaux dans la consolidation d'une mémoire spatiale, dépendante de l'HP.

## Objectif du projet de thèse

Dans ce contexte scientifique général, l'objectif de l'ensemble des travaux menés au cours de ces 3 années de doctorat était de contribuer à l'expansion des connaissances concernant l'implication des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans la mémoire à long terme, avec un intérêt particulier pour les processus de consolidation. Les connexions anatomiques réciproques des noyaux ReRh avec l'HP et le CPFm en font des structures idéales pour permettre la stabilisation à long terme des souvenirs, ce qui avait déjà été mis en évidence dans le cas de la mémoire spatiale de référence (Loureiro et al., 2012).

La majorité des expériences réalisées dans le cadre de cette thèse avait pour but d'évaluer si ce rôle des noyaux ReRh dans la consolidation est spécifique de la mémoire spatiale ou s'il peut être étendu à d'autres types de mémoire, HP-dépendante ou non. Ainsi, dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'une lésion préapprentissage des noyaux ReRh sur la mémoire récente (testée à 1j) et la mémoire ancienne (25j) des animaux dans une tâche de transmission sociale de préférence alimentaire (TSPA ; tâche HP-dépendante évaluant la mémoire associative olfactive) ainsi que dans un conditionnement de peur au contexte (HP-dépendant) et au son (HP-indépendant).

Pour approfondir les résultats obtenus par l'approche lésionnelle, montrant une altération spécifique de la mémoire ancienne de peur conditionnée au contexte, des approches d'imagerie cellulaire (quantification de l'expression de c-Fos) et d'inactivation pharmacogénétique ont été combinées pour déterminer si les noyaux ReRh sont impliqués dans la consolidation et/ou le rappel actif des informations.

Par ailleurs, l'absence d'implication des noyaux ReRh dans le rappel actif d'une information spatiale n'était pas clairement établie puisque des résultats discordants étaient retrouvés dans la littérature. Afin d'avancer sur cette question, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr M. Wolff (UMR5287, Bordeaux), nous avons évalué l'impact d'une inactivation pharmacogénétique des noyaux ReRh pendant les test de

rappel à 5j et à 25j dans une tâche de mémoire spatiale de référence en piscine de Morris.

Enfin, l'approche d'inactivation pharmacogénétique (DREADD) étant utilisée pour la première fois pour l'étude des noyaux ReRh au laboratoire, il a été nécessaire de vérifier la validité de cette méthode d'inactivation. Pour ce faire, nous avons évalué l'effet de l'inactivation pharmacogénétique sur les performances des animaux dans une tâche de changement de stratégie spatiale dans le labyrinthe en double H, connue pour être dépendante de l'activité des noyaux ReRh (Cholvin et al., 2013).

# **MATÉRIELS & MÉTHODES**

# Matériels & Méthodes

## 1. Animaux

Toutes les études présentées dans cette thèse ont été effectuées sur des rats mâles de souche Long-Evans (provenant du centre d'élevage R. Janvier, France),



âgés de 3 mois et pesant environ 250g à leur arrivée au laboratoire (Figure 14). Dès leur arrivée au laboratoire les rats sont hébergés à 2 ou 3 par cage dans des cages transparentes en Makrolon (dimensions : 60 x 38 x 19,5 cm). Les rats ne sont pas manipulés pendant la première semaine afin qu'ils s'acclimatent à leur animalerie de stabulation. Suite à cela les animaux sont manipulés quotidiennement (1-2 min/jour durant 5 jours) et préalablement à chaque expérience afin de les familiariser à l'expérimentateur et à la manipulation. Les paramètres d'éclairage (cycle lumière/obscurité 12h:12h, période éclairée 7h-19h à l'heure d'hiver et 8h-20h à l'heure d'été), de température ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), d'humidité ( $50\% \pm 10\%$ ) et d'ambiance sonore (radio allumée pendant la phase diurne) sont contrôlés et automatiquement régulés. Les rats disposent d'eau et de nourriture ad libitum (hors procédures expérimentales) ainsi que d'un baton à ronger en bois. Tous les tests ont lieu durant la phase diurne. Les animaleries de stabulations sont distinctes des salles de test.

L'ensemble des procédures expérimentales et des soins aux animaux est en accord avec les directives ministérielles (directive 87/848 du 19 octobre 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale) et internationales (directive 2010/63/UE du 13 février 2013, Communauté européenne). Ce projet a été approuvé par le comité d'éthique local (CREMEAS, Strasbourg - Saisine #5822).



## 2. Interventions chirurgicales

### 2.1. Lésions excitotoxiques

#### 2.1.1 Principe

Les lésions excitotoxiques sont réalisées par une injection intracérébrale de NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) au niveau des noyaux ReRh. Le NMDA est un agoniste spécifique du récepteur NMDA, récepteur ionotropique du glutamate. L'injection de NMDA fortement concentré dans le parenchyme cérébral va provoquer une entrée massive de cations (notamment d'ions calcium) dans les neurones de la région ciblée et ainsi induire la mort de ces neurones, d'où le terme de « lésion excitotoxique ».

#### 2.1.2 Protocole expérimental

Les animaux sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale (IP) de pentobarbital sodique (67 mg/kg). Après quelques minutes, la profondeur de l'anesthésie est vérifiée par l'immobilité générale de l'animal et un pincement de la queue. Le rat subit alors une injection intramusculaire de 0.3 mL de Duphamox (amoxicilline, Zoetis) afin d'assurer une couverture antibiotique. L'animal est ensuite rasé au niveau du crâne, placé dans un cadre stéréotaxique et reçoit une injection sous-cutanée de 0.1 mL de xylovet (xylocaïne, Ceva Santé Animale) au niveau du scalp pour assurer une analgésie locale. Les yeux de l'animal sont protégés de la déshydratation par l'application d'un gel ophtalmique. La peau est ensuite incisée longitudinalement afin de dégager l'os du crâne au niveau du bregma et du lambda. Après avoir vérifié que le crâne est en position « flat skull », une craniotomie est réalisée à l'aide d'une fraise dentaire à l'endroit approprié afin de permettre l'accès au parenchyme cérébral. Une canule d'instillation (diamètre : 0,28 mm) est délicatement descendue au niveau des noyaux ReRh avec un angle de 15°. Trois injections de NMDA (0,12 M dans PBS 0,1 M), ou de PBS pour les rats sham, sont réalisées (volume injecté : 3 x 0,1 µL) aux coordonnées stéréotaxiques (en mm) suivantes (Paxinos et Watson, 2014):

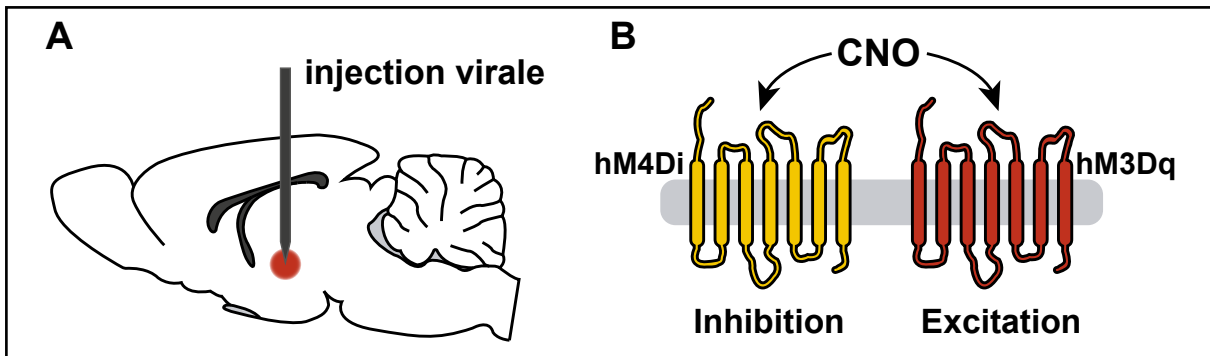
- ML = 1.9 ; AP = 1.5 ; DV = 7
- ML = 1.9 ; AP = 2.1 ; DV = 7.1
- ML = 1.9 ; AP = 2.7 ; DV = 7.2

Les injections sont réalisées avec une canule métallique reliée à une seringue Hamilton de 10  $\mu$ L placée dans un pousse-seringue motorisé qui permet l'injection de 0,1  $\mu$ L à un débit de 0,1  $\mu$ L/min. Suite à chaque injection une attente de 5 min est observée pour les animaux recevant du NMDA et 1 min pour les injections de PBS. A l'issue de la dernière injection, la canule est retirée délicatement et la peau incisée est suturée. Le rat subit alors une injection sous cutanée de 0.3 mL de metacam (meloxicam, Boehringer-Ingelheim) afin de limiter l'inflammation post-opératoire puis est placé sous une lampe chauffante avec ses congénères (opérés au même moment). Suite à la chirurgie, les animaux ne sont pas manipulés pendant au moins une semaine afin qu'ils puissent récupérer et que la lésion des noyaux ReRh s'établisse. Durant cet intervalle de temps les animaux sont observés régulièrement afin de veiller à la bonne récupération post-opératoire et à corriger les éventuels problèmes (points de suture arrachés, signes apparents de douleur, d'infection, etc.).

## **2.2. Inactivation DREADD des noyaux ReRh**

### **2.2.1. Principe**

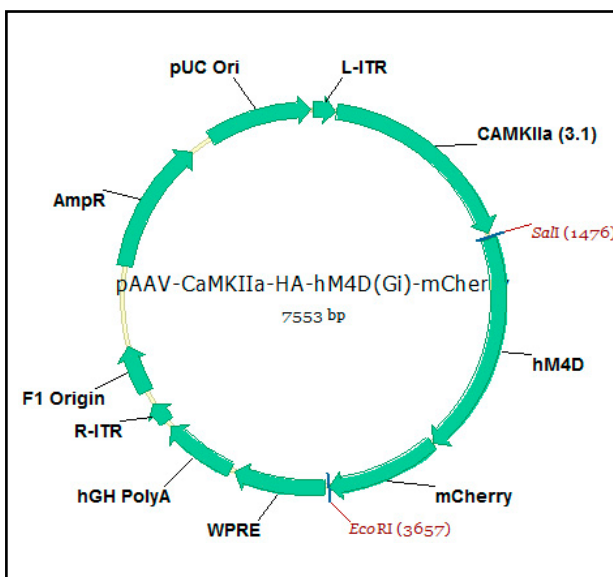
La technologie DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs) repose sur l'expression par des neurones ciblés de récepteurs couplés à des protéines G modifiés afin de n'être activé que par un ligand synthétique (Figure 15). Dans notre cas, l'objectif de cette approche étant d'inactiver les noyaux ReRh, le récepteur hM4Di (couplé à une protéine Gi) a été utilisé afin d'inhiber l'activité neuronale au moment de l'injection du ligand synthétique. Le ligand utilisé est le CNO (Clozapine-N-Oxyde), qui est injecté par voie intra-péritonéale. L'expression du récepteur DREADD est induite par injection d'un vecteur viral contenant l'ADN codant le récepteur hM4Di ainsi qu'un rapporteur fluorescent sous le contrôle d'un promoteur choisi afin de cibler une population neuronale particulière.



**Figure 15: Principe général de la technologie DREADD**

(A) L'injection intra-cérébrale d'un vecteur viral permet l'expression du récepteur DREADD dans la région d'intérêt. (B) Le ligand synthétique (CNO) permet l'inhibition ou l'activation des neurones infectés selon le récepteur DREADD choisi.

Un Virus Adéno-associé (AAV) sérotype 8, classiquement utilisé pour ce type d'approche, a été choisi pour infecter le ReRh. Des essais préliminaires d'infection ont en effet révélé que ce vecteur viral permet d'infecter efficacement les neurones du ReRh. Le promoteur utilisé est celui de la  $CaMK2\alpha$  (chaîne alpha de la protéine kinase Calcium/calmoduline dépendante de type 2) permettant de cibler spécifiquement les neurones excitateurs, et donc notamment les neurones de projection vers l'HP et le CPFm. Le rapporteur fluorescent couplé au récepteur DREADD est la mCherry, un fluorochrome rouge dérivé du DsRed (Figure 16).



**Figure 16: Construction génétique utilisée pour inactiver les noyaux ReRh par la technologie DREADD.**

Le gène codant le récepteur hM4Di couplé à une protéine G inhibitrice est sous le contrôle du promoteur  $CaMKII\alpha$ , permettant son expression spécifiquement dans les neurones excitateurs. Le récepteur hM4Di est couplé à la protéine mCherry, rapporteur fluorescent permettant la visualisation de l'infection virale.

Ref image: [www.addgene.org](http://www.addgene.org)

### 2.2.2 Protocole expérimental

Le protocole de la chirurgie d'injection de virus dans les noyaux ReRh est identique à celui utilisé pour les lésions excitotoxiques hormis pour les points suivants :

L'anesthésique utilisé est un mélange kétamine (98 mg/kg) – xylazine (13 mg/kg) injecté par voie intra-péritonéale. 2 injections de 0.4µl de la solution de virus AAV8-CaMK2 $\alpha$ -hM4Di-mCherry (7,3 x 10<sup>9</sup> copies d'ADN génomique/µL ; Viral Vector Production Unit, Espagne) sont réalisées aux coordonnées suivantes (en mm; avec un angle ML de 15°) :

- ML = 1.9 ; AP = 1.6 ; DV = 7.1

- ML = 1.9 ; AP = 2.6 ; DV = 7.2

Les rats contrôles Sham subissent deux injections de PBS aux mêmes coordonnées. Suite à l'opération, un délai de 3 semaines de récupération est observé avant le début des tests comportementaux, de façon à ce que le virus soit exprimé pendant un mois avant la première injection de CNO.

### 2.2.3. Inactivation pharmacogénétique des noyaux ReRh

L'inactivation DREADD des noyaux ReRh est réalisée par injection intra-péritonéale de CNO (1 mg/kg, Enzo life sciences) 40 minutes avant le début des tests comportementaux. Tous les animaux (ceux exprimant le récepteur hM4Di et les contrôles Sham) reçoivent une injection de CNO afin de neutraliser un effet potentiel du CNO sur le comportement des rats (MacLaren et al., 2016).

### 3. Test comportementaux

#### 3.1. Transmission sociale de préférence alimentaire

Le protocole de transmission sociale de préférence alimentaire (TSPA) qui a été mis en place au laboratoire au cours de cette thèse a été largement inspiré des travaux de l'équipe de Bruno Bontempi (Lesburguères et al., 2011). Cette méthode a depuis fait l'objet d'une description extensive dans la revue « Nature protocols » (Bessières et al., 2017).

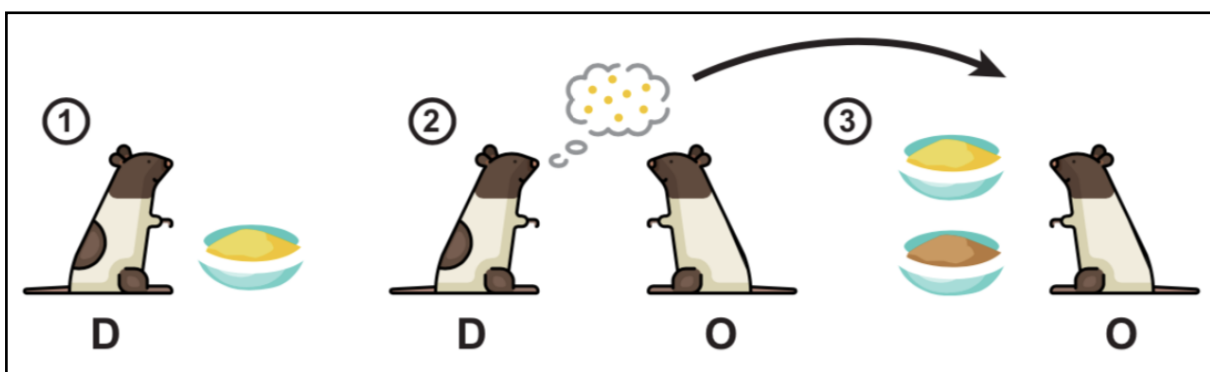
##### 3.1.1. Principe

Le rat a une tendance naturelle à la néophobie face à toute nourriture nouvelle : il a une propension à choisir préférentiellement la nourriture qui lui est familière lorsqu'il doit choisir entre celle-ci et une nourriture inconnue (Posadas-Andrews and Roper, 1983). En milieu sauvage, identifier une nouvelle nourriture comestible passe d'abord par l'expérience personnelle d'un individu (odorat, goût...). L'autre façon d'acquérir des informations sur la comestibilité d'une nouvelle nourriture est par interaction avec les congénères, qui échangent et transmettent des informations concernant la prise alimentaire. En effet, les informations socialement transmises sont cruciales et renseignent les rats sur l'endroit où se trouve la nourriture, le type de nourriture qui peut être consommée et les substances toxiques à éviter.

Les recherches princeps de Galef dans les années 80 ont révélé l'importance de l'interaction sociale pour la transmission de préférence alimentaire entre les membres d'une même colonie (Galef, 1982). Il a montré que les interactions sociales chez les rats conduisent à l'apparition d'une préférence alimentaire pour la nourriture qui a été consommée par les autres congénères. Il est important de noter que la composante « interaction sociale » est indispensable pour qu'une préférence durable soit adoptée par l'animal. En effet, une simple exposition à l'odeur de la nouvelle nourriture ne suffit pas à induire une préférence.

Ces connaissances ont permis le développement d'un paradigme comportemental

permettant d'évaluer la mémoire associative olfactive chez le rongeur (Galef and Whiskin, 2003), appelé test de transmission sociale de préférence alimentaire (TSPA). De façon générale, ce test se décompose en 3 étapes successives, schématisées en figure 17. Dans un premier temps, un rat « démonstrateur » consomme de la nourriture parfumée avant d'être mis en contact avec un rat « observateur » pendant quelques minutes. C'est l'étape critique d'interaction sociale, pendant laquelle les 2 rats vont collecter des informations, notamment issues de leurs haleines respectives. C'est ainsi que le rat observateur va assimiler que la nourriture dont l'odeur est présente dans l'haleine du rat démonstrateur n'est pas dangereuse et peut donc être consommée sans risque. Lorsqu'après plusieurs jours/semaines, le rat observateur est soumis à un test de préférence où il a le choix de consommer la même nourriture que celle du rat démonstrateur ou une nouvelle nourriture inconnue, celui-ci présente une préférence accrue pour la nourriture démontrée, attestant du fait qu'il se souvient de l'association formée lors de l'interaction sociale. Ainsi, ce changement robuste du comportement appétitif dépend du souvenir associatif olfactif de l'odeur de la nourriture parfumée précédemment détecté dans l'haleine du rat démonstrateur.



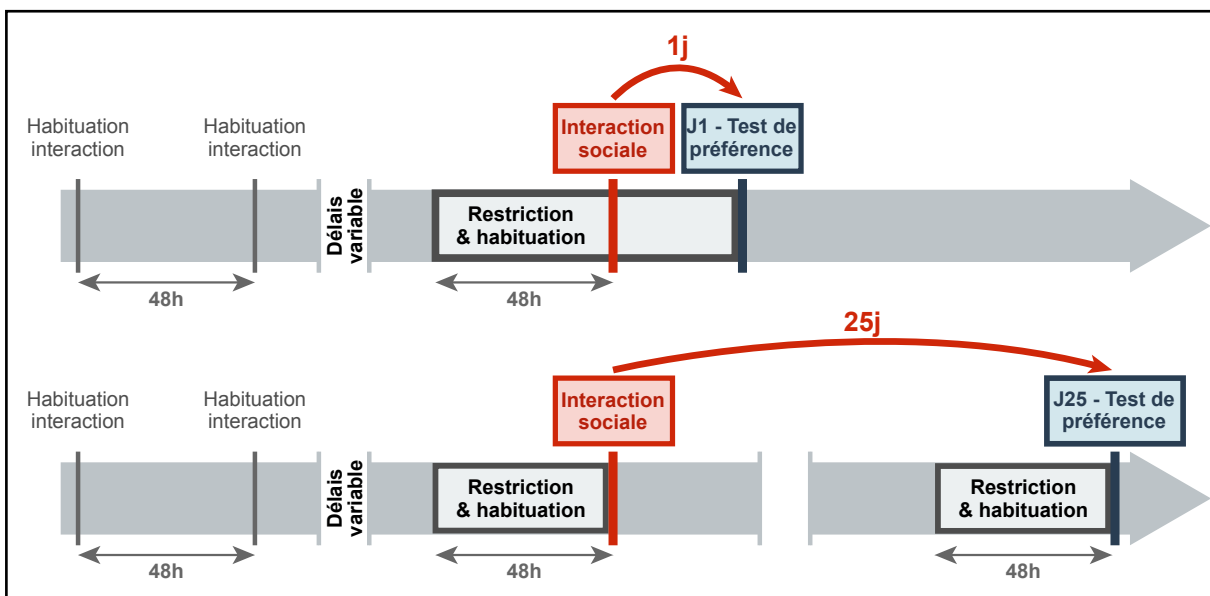
**Figure 17: Paradigme de TSPA**

(1) Le rat démonstrateur (D) consomme de la nourriture parfumée (2) Interaction sociale entre le rat démonstrateur et le rat observateur (O) (3) Test de préférence: le rat observateur choisit de consommer la nourriture démontrée ou une nouvelle nourriture inconnue.

### 3.1.2 Habituation et restriction alimentaire

Le paradigme de TSPA est basé sur un comportement appétitif et nécessite donc que les animaux subissent un protocole de restriction alimentaire et d'habituation afin qu'ils consomment la nourriture en poudre au moment attendu, c'est-à-dire préalablement à l'interaction pour les rats démonstrateurs et au moment du test de préférence pour les rats observateurs (Figure 18).

Avant le début du protocole de transmission sociale, tous les rats observateurs interagissent 2 fois (jours 1 et 3) avec leurs 3 rats démonstrateurs (5 min par interaction) à travers un séparateur en plastique transparent percé. Cela permet d'habituer les rats à la cage d'interaction et à interagir avec des rats étrangers. Après cette pré-habituation démarrent les restrictions alimentaires et l'habituation à la nourriture en poudre. Lors d'une journée de restriction alimentaire, la nourriture est retirée aux rats le soir, 30 min avant l'extinction des lumières (18h30).



**Figure 18: Protocole de TSPA utilisé afin d'évaluer la mémoire récente ou ancienne**

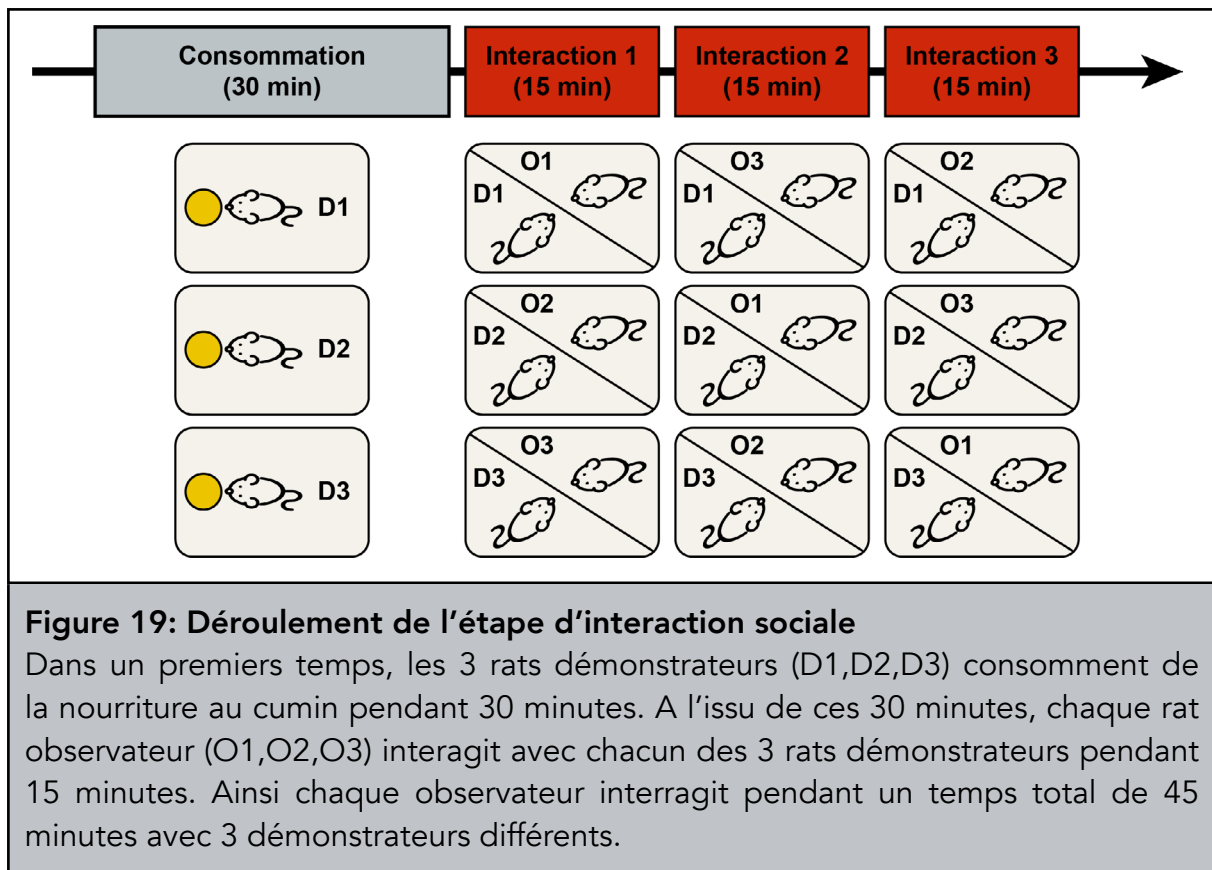
Dans un premier temps les animaux sont habitués à la situation d'interaction sociale puis à la consommation de nourriture en poudre (pendant une période de restriction alimentaire). Celle-ci précède immédiatement l'interaction sociale entre rats observateurs et démonstrateurs. Après 1j (mémoire récente) ou 25j (mémoire ancienne), le souvenir des rats est évalué au cours du test de préférence alimentaire.

Le lendemain, entre 11h et 14h, les animaux sont emmenés en salle de test et sont placés dans des cages individuelles avec fond en copeaux de bois et avec une coupelle de nourriture en poudre placée à une extrémité de la cage. Les animaux peuvent consommer la nourriture en poudre librement pendant 30 min. A l'issue des 30 min, les animaux sont replacés dans leur cage d'élevage dans leur pièce de stabulation. A 18h les animaux ont accès à de la nourriture en croquette ad libitum pendant 30 minutes avant d'être à nouveau privé. Cette procédure d'habituation/restriction permet de familiariser les animaux à manger de la nourriture en poudre dans une coupelle et dans un environnement différent de leur cage d'élevage.

### **3.1.3. Transmission sociale**

La veille de l'interaction sociale, la nourriture est enlevée aux rats à 18h30, après les 30 min de consommation ad libitum. En pratique, chaque expérience d'interaction sociale met en jeu 6 rats: 3 rats observateurs et 3 rats démonstrateurs (figure 19). Ces derniers sont placés en cage individuelle pendant 30 min, durant lesquelles ils vont consommer de la nourriture en poudre parfumée au cumin (0,5% cumin + 99,5% de poudre de croquette). A l'issue de cette étape de consommation, les coupelles de nourriture sont pesées afin de quantifier la consommation du démonstrateur. Les 3 rats démonstrateurs sont placés dans 3 cages d'interaction en compagnie des rats observateurs. La cage d'interaction est une cage standard, dans laquelle 2 compartiments distincts sont créés par la disposition d'un séparateur en diagonale dans la cage. Celui-ci est en plastique transparent et est percé de nombreux orifices assez larges pour que les rats présents de part et d'autre puissent y introduire leur museau. Ce dispositif permet aux rats d'interagir et d'échanger des informations olfactives mais empêche la survenue de comportements agressifs entre les rats. Chaque observateur interagit consécutivement avec chacun des 3 démonstrateurs pendant 15 minutes. Les rats sont ensuite replacés dans leur cage d'élevage en pièce de stabulation.





### 3.1.4 Test de préférence alimentaire

La veille du test de préférence, les rats sont privés de nourriture à 18h30, après les 30 min de consommation ad libitum. Le jour du test, les observateurs sont placés dans des cages individuelles en présence de deux coupelles de nourriture en poudre préalablement pesées. L'une des deux coupelles contient de la nourriture aromatisée au cumin (0,5% - nourriture démontrée) et l'autre de la nourriture aromatisée au thym (0,75% - nourriture nouvelle). Ce test de préférence dure 30 min, à l'issue desquelles les coupelles sont pesées afin de quantifier la consommation de chacune des 2 nourritures. La préférence pour la nourriture démontrée est exprimée en pourcentage:

$$\% \text{ préférence} = \text{conso démo} / (\text{conso démo} + \text{nouvelle})$$

## 3.2. Conditionnement de peur

### 3.2.1. Principe

La mémoire de peur est classiquement étudiée dans des modèles animaux par l'utilisation d'un conditionnement classique (Pavlovien), c'est-à-dire l'apprentissage d'une association entre un environnement ou un changement d'environnement (stimulus conditionnel - SC) et un stimulus effrayant (stimulus inconditionnel - SI, qui est dans la plupart des cas l'administration d'un ou plusieurs chocs électriques non douloureux). Le SI déclenche une réponse comportementale (réponse inconditionnelle - RI) de manière systématique, sans apprentissage nécessaire. La RI classiquement observée lors du conditionnement de peur chez le rongeur par administration de chocs électriques est le comportement de *freezing*, correspondant à l'immobilité totale de l'animal exceptés les mouvements nécessaires à sa respiration.

Lors du conditionnement, la chambre de conditionnement elle-même peut être utilisée comme SC, auquel cas il s'agit d'un conditionnement de peur au contexte. Il est également possible de présenter un indice, le plus souvent sonore, que l'animal va extraire du contexte et associer au SI. Cet indice sonore est alors utilisé comme SC, il s'agit dans ce cas d'un conditionnement de peur au son.

Le conditionnement de peur au contexte et au son ne sont pas mutuellement exclusifs. En effet lors d'un conditionnement de peur au son, le contexte constitue un SC secondaire. Selon le protocole expérimental utilisé et particulièrement l'intervalle de temps séparant les sons des chocs électriques, la force respective des associations SI-contexte et SI-son peut varier grandement. Dans notre cas par exemple, les chocs électriques sont administrés immédiatement après les sons, formant une association SI-son très forte. Le son est alors considéré comme SC de premier plan et le contexte comme SC d'arrière-plan.

Un avantage considérable du paradigme de conditionnement de peur (contexte ou son) est que celui-ci permet en une session d'apprentissage unique de créer un souvenir très persistant dans le temps.

### 3.2.2. Dispositif

Les descriptions du dispositif et de la procédure de conditionnement de peur présentées ci-après sont adaptées du manuscrit de thèse de Marc-Antoine Muller, ex-doctorant du laboratoire.

Six boîtes de conditionnement identiques (25 x 27 x 18 cm) placées dans des caissons (57 x 38 x 38 cm, Campden Instruments) atténuant la lumière et les bruits ambiants sont utilisées. Chaque caisson est ventilé (bruit de fond à 65 dB), éclairé par une ampoule (10 lux) et équipé d'une caméra noir et blanc (MCT-210 MS, Opto-Vision, Toulouse, France) avec lentille grand angle (2,5 cm). Les boîtes de conditionnement sont constituées de parois en plexiglas transparent, l'une d'entre elles étant pourvue d'une ouverture (1 cm de diamètre), de deux lampes (éteintes) et d'un haut-parleur protégé par un grillage. Le plancher, sous lequel un plateau amovible contenant de la sciure peut être placé, est formé de barreaux parallèles en acier inoxydable (0,3 cm de diamètre, espacés régulièrement tous les 0,8 cm) permettant l'administration de chocs électriques. Les chocs électriques, leur intensité, ainsi que la production de sons par le haut-parleur et l'éclairage au sein de chaque caisson sont contrôlés par une interface Med-PC (Med Associates Inc., St Albans, VT, USA), reliée à un ordinateur équipé d'un logiciel commandant les moments d'apparition des chocs électriques et des sons. Les caméras sont reliées à deux multiplexeurs situés dans une pièce adjacente, eux-mêmes reliés à deux magnétoscopes permettant l'enregistrement vidéo des séances. Le conditionnement et le test d'évaluation de la peur au contexte de conditionnement sont effectués dans les boîtes telles que décrites ci-dessus. Ces mêmes boîtes sont modifiées pour évaluer la peur conditionnée au son. Pour ce faire, une boîte en plastique est introduite dans la chambre de conditionnement, provoquant les modifications d'indices visuels et somesthésiques suivantes: la grille d'administration des chocs est recouverte d'une plaque rugueuse de plastique blanc, l'ensemble des parois latérales sont désormais constituées de plastique bleu foncé avec des motifs blancs et l'une d'entre elle est disposée en biais (un schéma du dispositif est disponible dans la publication présentée en partie 2 des résultats).

### 3.2.3. Conditionnement

#### **Conditionnement de peur au son et au contexte**

Les rats sont transportés de l'animalerie à la salle d'expérimentation (faiblement éclairée, 2,5 lux) dans leur cage d'élevage, qui est posée sur un chariot. 6 animaux sont ainsi simultanément transportés et déposés dans les boîtes de conditionnement pour y être exposés pour une durée de 38 minutes. Cinq sons (15 s, 4kHz, 10dB au-dessus du bruit de fond) appariés à cinq chocs électriques (0,8 s ; 0,6 mA) sont administrés aux animaux : les cinq sons sont immédiatement suivis par la délivrance du choc électrique et présentés avec un intervalle de temps inter-essais variable (452 +/- 96 s). A la fin de la séance de conditionnement les animaux sont replacés dans leur cage d'élevage pour être transportés jusqu'à l'animalerie. Entre deux séries de conditionnement, les boîtes de conditionnement sont nettoyées à l'eau.

#### **Conditionnement de peur au contexte uniquement**

Pour le conditionnement de peur au contexte seul, la procédure est similaire à celle décrite ci-dessus excepté que la session de conditionnement ne dure que 8 minutes, au cours desquelles 3 chocs électriques sont administrés (180, 240 et 360s après le placement dans la boîte). Aucun son n'est présenté dans le cadre de ce protocole de conditionnement.

### 3.2.4. Test de la peur conditionnée au contexte

Passé un délai de 24 heures ou 25 jours selon les groupes, la peur conditionnée au contexte est évaluée par exposition des animaux au contexte de conditionnement pendant 10 minutes. Durant cette séance de test, aucun son ni choc n'est administré et le comportement de *freezing* est quantifié.

### 3.2.5. Test de la peur conditionnée au son

24 heures après le test de peur conditionnée au contexte, les animaux sont exposés pendant 10 minutes au contexte modifié (voir 3.2.2. Dispositif) afin d'éteindre la peur non spécifique au contexte modifié dans lequel aura lieu le test de peur conditionnée au son. Cette séance d'extinction permet de s'assurer que les animaux auront un niveau basal de *freezing* très faible lors du test de peur au son dans le contexte modifié et ainsi d'être dans des conditions optimales pour évaluer uniquement la peur en réponse à la présentation du son.

Le test de peur conditionnée au son est réalisé 24 heures après cette séance d'extinction (3j ou 27j après le conditionnement selon les groupes). Les animaux sont placés dans le contexte modifié et le même son que celui utilisé lors du conditionnement est présenté 5 fois. Le premier son est présenté 2 minutes après le placement des rats dans la chambre puis à un intervalle fixe de 255s.

### 3.2.6. Quantification du *freezing*

Le *freezing* est défini comme l'absence de tout mouvement visible à l'exception de ceux nécessaires à la respiration (Blanchard & Blanchard, 1969). Le *freezing* est quantifié automatiquement par un logiciel mesurant les variations de contraste des images captées (fréquence d'échantillonnage : 1 Hz) par les caméras des boîtes de conditionnement (logiciel Scion Image). Pour ce faire, le logiciel soustrait à ces images celle du fond (contextes sans animaux), préalablement enregistré par les expérimentateurs. Ceci permet de n'évaluer que les variations liées au mouvement des animaux. Les fichiers obtenus correspondent aux variations, seconde par seconde, de l'écart-type de l'intensité des pixels des images recueillies pour chaque animal et sont analysés à l'aide d'une macro-commande écrite sous Excel permettant de choisir un seuil de variation minimal au-delà duquel le comportement de *freezing* est considéré absent. De plus, les données obtenues par le logiciel d'acquisition sont synchronisées au début du protocole expérimental (lancement du programme dans la salle de conditionnement), dans le but d'obtenir une évaluation des réponses en

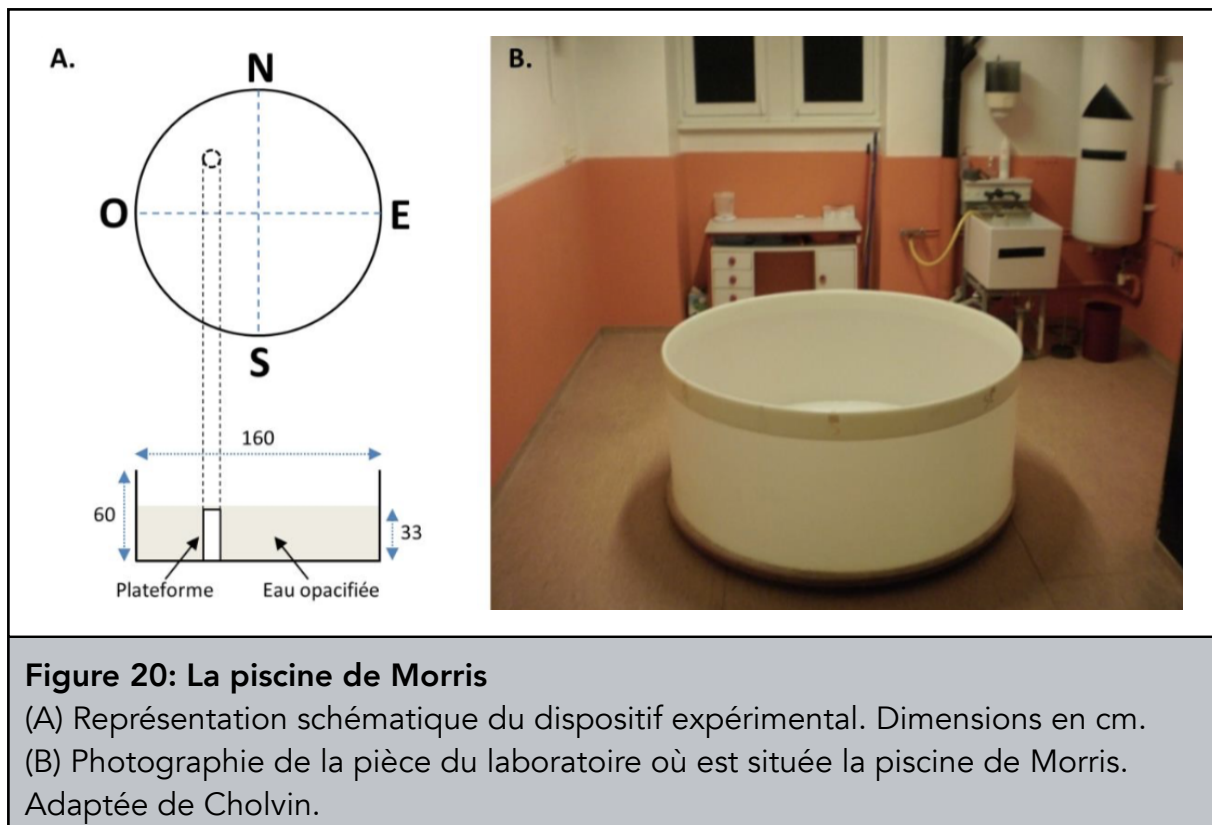
lien avec des stimuli phasiques (par exemple les sons) précise à la seconde près. Cet échantillonnage est traité de manière automatisée par cette même macro-commande pour être ramené à une expression en pourcentage de temps de freezing, l'intervalle temporel sur lequel ce pourcentage est calculé étant défini par l'expérimentateur. Ce protocole de quantification, ainsi que le seuil de variations utilisé, a fait l'objet d'une validation expérimentale préalable et est décrit en détails dans Marchand et al., 2003.

### 3.3. Piscine de Morris

Les descriptions détaillées ainsi que les figures des tâches de Piscine de Morris et du labyrinthe en double H présentes ci-après sont adaptées du manuscrit de Thèse de T. Cholvin, ex-doctorant du laboratoire.

#### 3.3.1. Dispositif

La piscine de Morris est une enceinte circulaire en PVC blanc de 160 cm de diamètre et de 60 cm de haut virtuellement découpée en quatre quadrants égaux. La piscine est remplie d'eau opacifiée à l'aide de lait en poudre sur une hauteur de 33 cm. Une plateforme circulaire (11 cm de diamètre, 31 cm de hauteur) en PVC transparent et percée de trous est disposée au centre de l'un des quatre quadrants et immergée 2 cm sous la surface de l'eau. La couleur de l'eau, blanche et opaque, ainsi que la structure de la plateforme, transparente et percée, permettent de la rendre invisible aux yeux de l'animal nageant en surface. La température de l'eau est de  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , ce qui confère à ce milieu un caractère aversif suffisant pour que l'animal soit motivé à réaliser la tâche consistant à retrouver et monter sur la plateforme, mais sans le mettre en danger (hypothermie). Une caméra placée à la verticale au-dessus de la piscine est reliée à un ordinateur exploitant le logiciel Smart (SD instruments, États-Unis). Cette installation permet de suivre en temps réel le trajet du rat dans la piscine depuis l'écran de l'ordinateur, mais également d'enregistrer ce trajet, le temps de nage, la latence d'arrivée à la plateforme, la distance parcourue, la vitesse de déplacement et de nombreux autres paramètres pour une analyse ultérieure. La salle dans laquelle se trouve ce test a été spécialement conçue à cet égard : de nombreux indices distaux stables sont disposés autour de la piscine (peintures fortement contrastées sur les murs, les équipements électriques, le bureau, l'évier etc.) de manière à faciliter la mise en place d'une mémoire spatiale allocentrique permettant à l'animal de se repérer et de localiser la plateforme (Figure 20, voir aussi Lopez et al. 2012).



### 3.3.2. Tâche comportementale

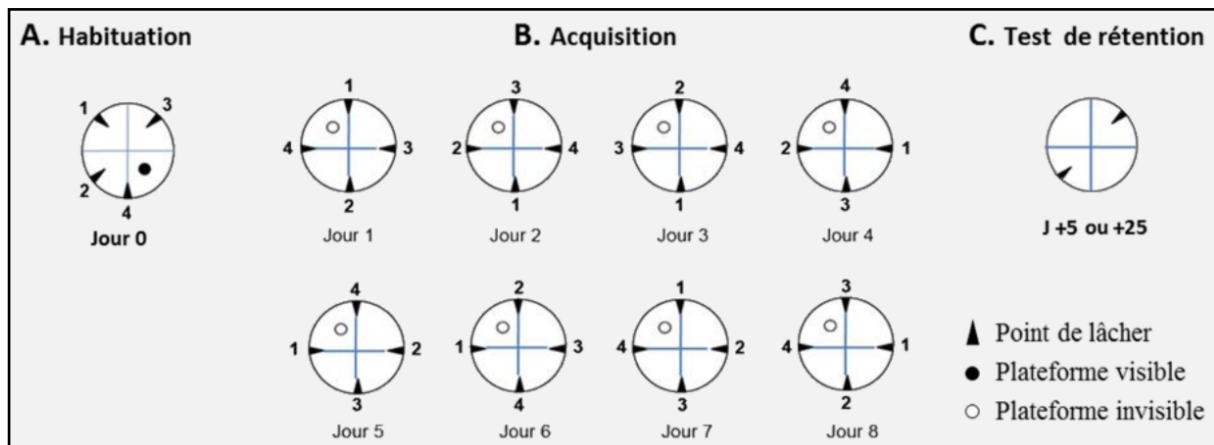
La piscine de Morris est conçue pour évaluer la capacité des rongeurs à utiliser des indices spatiaux et à se construire une représentation allocentrique d'un environnement leur permettant de mémoriser la localisation d'une plateforme cachée sous la surface de l'eau (Morris, 1984). Le terme « allocentrique » fait référence au fait que la source des informations spatiales est purement externe (objets environnants), par opposition à une représentation « égocentrique » basée sur un système de coordonnées intégrant les axes du corps, les modalités somesthésiques et vestibulaires, et permettant de se repérer par rapport au mouvement de son propre corps dans l'espace. Par la répétition des séances d'acquisition au cours desquelles la plateforme cachée est toujours située au même endroit, mais le point de départ de l'animal randomisé, ce test permet d'évaluer la mémoire de référence, c'est-à-dire la mémoire de l'emplacement de cette plateforme au sein d'une représentation allocentrique de l'environnement. La mémoire de référence comprend également les règles et procédures à mettre en œuvre dans une situation donnée pour y répondre de manière adaptée. Dans notre cas, l'apprentissage de la tâche se traduira par une diminution progressive de la



distance et du temps d'accès à la plateforme au fil de la répétition des essais et des séances (ici assimilables aux jours) d'acquisition.

### **3.3.3. Phase d'acquisition**

Le protocole se divise en deux parties : une phase d'habituation avec une plateforme visible et une phase d'acquisition de l'emplacement d'une plateforme cachée. Le premier jour constitue l'unique séance d'habituation à l'aide d'une plateforme visible à emplacement fixe. 4 essais consécutifs permettent à l'animal d'appréhender le dispositif et la tâche consistant à trouver l'unique échappatoire et à y grimper. Au cours de cette phase, la piscine est entourée d'un épais rideau empêchant l'accès aux indices distaux externes. La phase d'acquisition débute le deuxième jour et s'étale sur 8 jours à raison de 4 essais par jour. Il a été validé au laboratoire que dans nos conditions expérimentales, une durée de 8 jours d'acquisition permet une bonne rétention en mémoire ancienne (25 jours) chez des animaux opérés (Lopez et al., 2012). Pour l'acquisition, le rideau est enlevé et la plateforme est cachée sous la surface de l'eau à un emplacement fixe et différent de celui utilisé durant la phase d'habituation. Le rat est introduit dans la piscine face à la paroi à un point de départ différent pour chaque essai quotidien (4 points de départ distincts ; Figure 21). Il dispose alors de 60 secondes pour trouver la plateforme. S'il n'arrive pas à effectuer cette tâche dans le temps imparti, il est délicatement guidé vers la plateforme par l'expérimentateur, de manière à ce qu'il l'atteigne en nageant. Il y est alors laissé 10 secondes, puis récupéré pour débiter l'essai suivant ou pour rejoindre sa cage de stabulation. La latence, la distance d'accès à la plateforme, la vitesse de nage ainsi que le temps passé à proximité des parois du dispositif (thigmotaxie) sont systématiquement enregistrés à l'aide du logiciel Smart. Une diminution progressive de la thigmotaxie, de la latence et du temps d'accès à la plateforme au fil des jours et des essais indique une bonne acquisition de la tâche.



**Figure 21: Protocole expérimental utilisé en piscine de Morris**

(A) Habituation en plateforme visible (B) 8 jours d'acquisition en plateforme invisible (C) Test de rétention après un délai de 5 ou 25 jours au cours duquel 2 points de lâcher différents sont utilisés et la plateforme est retirée de la piscine.

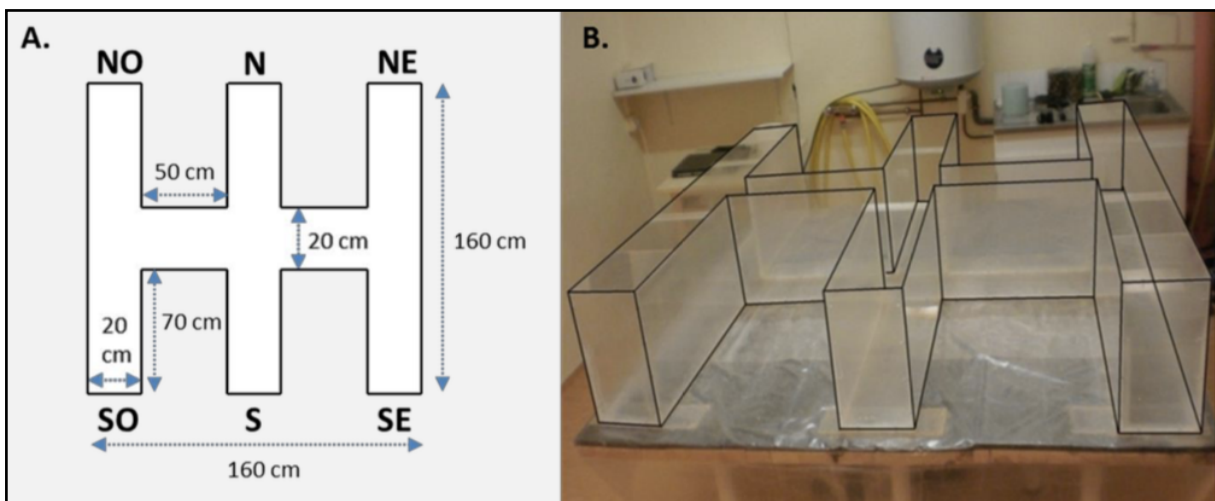
### 3.3.4. Test de rétention

La plateforme est retirée de la piscine, le reste du dispositif et de la pièce étant en tout point identique à la phase d'acquisition. Le test de rétention consiste en un unique essai de 60 secondes. Le rat est introduit dans le dispositif à l'un des deux points de lâcher spécifiques, qui n'ont jamais été utilisés auparavant (Figure 21). Le temps passé dans chaque quadrant est alors enregistré et exprimé sous la forme d'un pourcentage : un temps passé dans le quadrant cible significativement supérieur au hasard (25%) indique le rappel de l'emplacement de la plateforme. A l'inverse, des animaux incapables de rappeler l'emplacement de la plateforme se déplacent de manière aléatoire dans la piscine de Morris au cours du test de rétention, passant environ 25% du temps total de nage dans chacun des quadrants. Le second paramètre enregistré est le nombre de croisements de la zone cible, à savoir un disque virtuel d'un diamètre de 31 cm (10 cm autour d'une plateforme de 11 cm) centré sur la plateforme et appelé annulus. Le nombre de passage de l'animal dans cette zone au cours du test de rétention est utilisé comme indice de la précision de la recherche de la plateforme au sein du quadrant cible (Lopez et al., 2012). Un autre indicateur de la précision de la recherche est la latence pour rejoindre la position virtuelle qu'occupait la plateforme au cours de l'apprentissage.

### 3.4. Le labyrinthe en double-H

#### 3.4.1. Dispositif

Le labyrinthe aquatique du Double-H (DH) comporte une allée principale reliant trois allées parallèles entre elles et perpendiculaires à l'allée principale, ce qui lui donne, vu du dessus, la forme de deux H contigus (Figure 22A). Toutes les allées ont la même longueur (160 cm), la même hauteur (35 cm) et la même largeur (20 cm) ; ce labyrinthe s'inscrit ainsi dans un carré d'une surface totale de 160 x 160 cm. Inventé au laboratoire par Jean-Christophe Cassel, il a été fabriqué en plexiglas transparent. Lors de son utilisation, le DH est rempli sur une hauteur de 17 cm avec environ 170 litres d'eau à 21°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) opacifiée par l'ajout de 250 g de lait en poudre. Une plateforme circulaire de 11 cm de diamètre et de 15 cm de hauteur représente la seule issue et l'emplacement à atteindre pour les animaux. Par convention, les branches centrales sont appelées Sud (S) et Nord (N). Les quatre branches latérales sont désignées par leur emplacement vis-à-vis des deux branches centrales : Nord-Ouest (NO), Nord-Est (NE), Sud-Est (SE) et Sud-Ouest (SO). Le dispositif est installé dans une pièce dédiée comportant des indices distaux fixes (évier, chauffe-eau, formes géométriques aux murs etc. ; Figure 22B).



**Figure 22: La labyrinthe en double H**

(A) Représentation schématique du dispositif expérimental. Dimensions en cm.

(B) Photographie de la pièce du laboratoire où est situé le double H. Pour une meilleure visibilité, les arêtes du labyrinthe ont été redessinées en noir.

### 3.4.2. Tâche comportementale

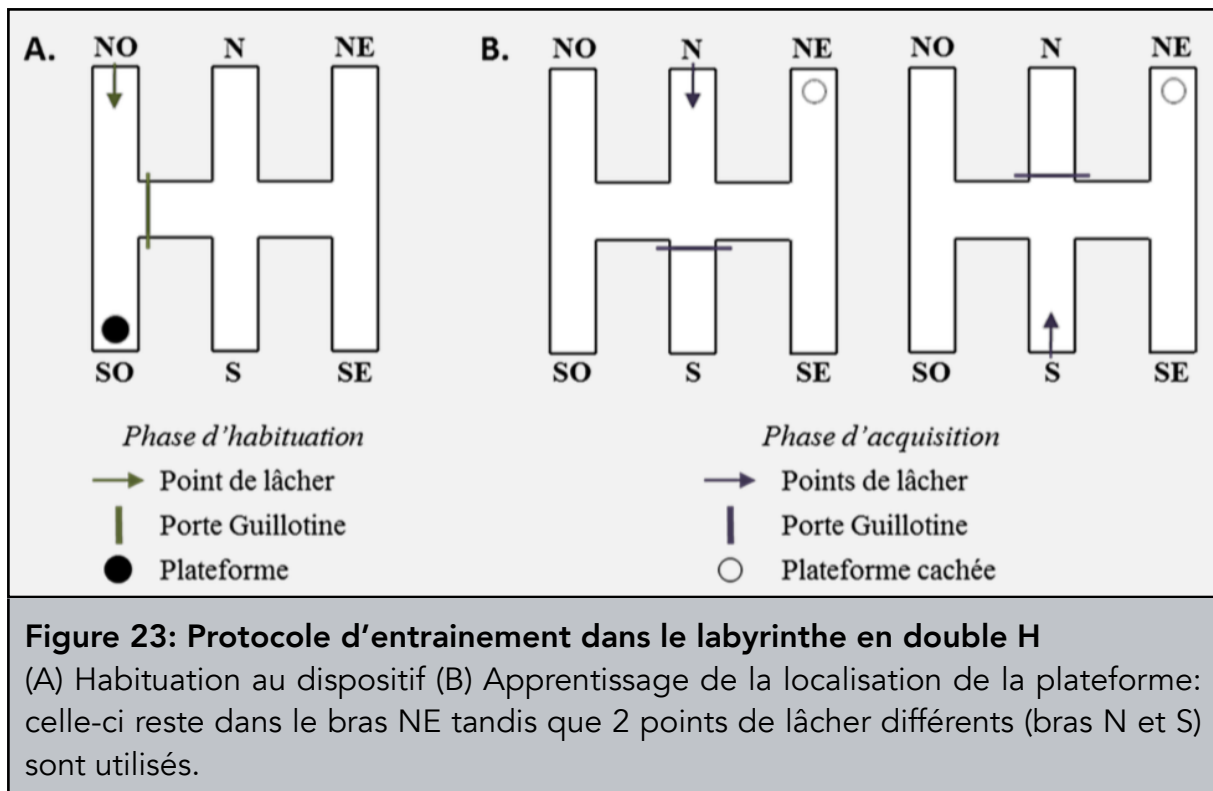
Tout comme la piscine de Morris, le DH est un labyrinthe aquatique plaçant l'animal dans une situation aversive (eau « fraîche ») dont il va chercher à se soustraire. L'intérêt de ce test par rapport à la piscine consiste dans le fait qu'il va permettre, en fonction du protocole d'acquisition utilisé, d'évaluer les capacités des rongeurs en termes de mémoire spatiale et/ou de mémoire procédurale (Pol-Bodetto et al. 2011, Cassel et al. 2012). En effet, la forme spécifique du DH implique la présence d'embranchements qui vont forcer l'animal à faire un choix de trajectoire aux trois intersections, contrairement à la piscine qui, en tant qu'espace circulaire ouvert, est beaucoup moins restrictive en ce qui concerne les options de déplacement. Ce test est également approprié pour évaluer la capacité d'un animal à faire preuve de flexibilité comportementale, i.e. la capacité à adapter son comportement en fonction des changements de l'environnement. Tout comme dans la piscine de Morris, la tâche consiste à apprendre la localisation d'une plateforme immergée sous la surface de l'eau. Mais ce dispositif offre l'avantage de permettre de favoriser la mise en place par l'animal d'une stratégie allocentrique (basée sur l'utilisation des indices visuels externes au dispositif pour se repérer) ou egocentrique (basée sur les informations proprioceptives internes) en fonction du protocole mis en œuvre : si le point d'introduction dans le dispositif change d'un essai à l'autre, mais que l'emplacement de la plateforme est fixe, la stratégie allocentrique est la plus efficace. Si au contraire, l'animal est toujours introduit dans le DH au même endroit (par exemple la branche S), et que la plateforme se situe toujours au même emplacement (par exemple à l'extrémité de la branche NE), la répétition de la tâche favorise rapidement l'utilisation d'une séquence motrice optimale (en l'occurrence, sortir de la branche S, tourner à droite, avancer, tourner à gauche, atteindre la plateforme à l'extrémité de la branche NE), et par là même, la mise en place d'une stratégie egocentrique.

### 3.4.3. Phase d'acquisition

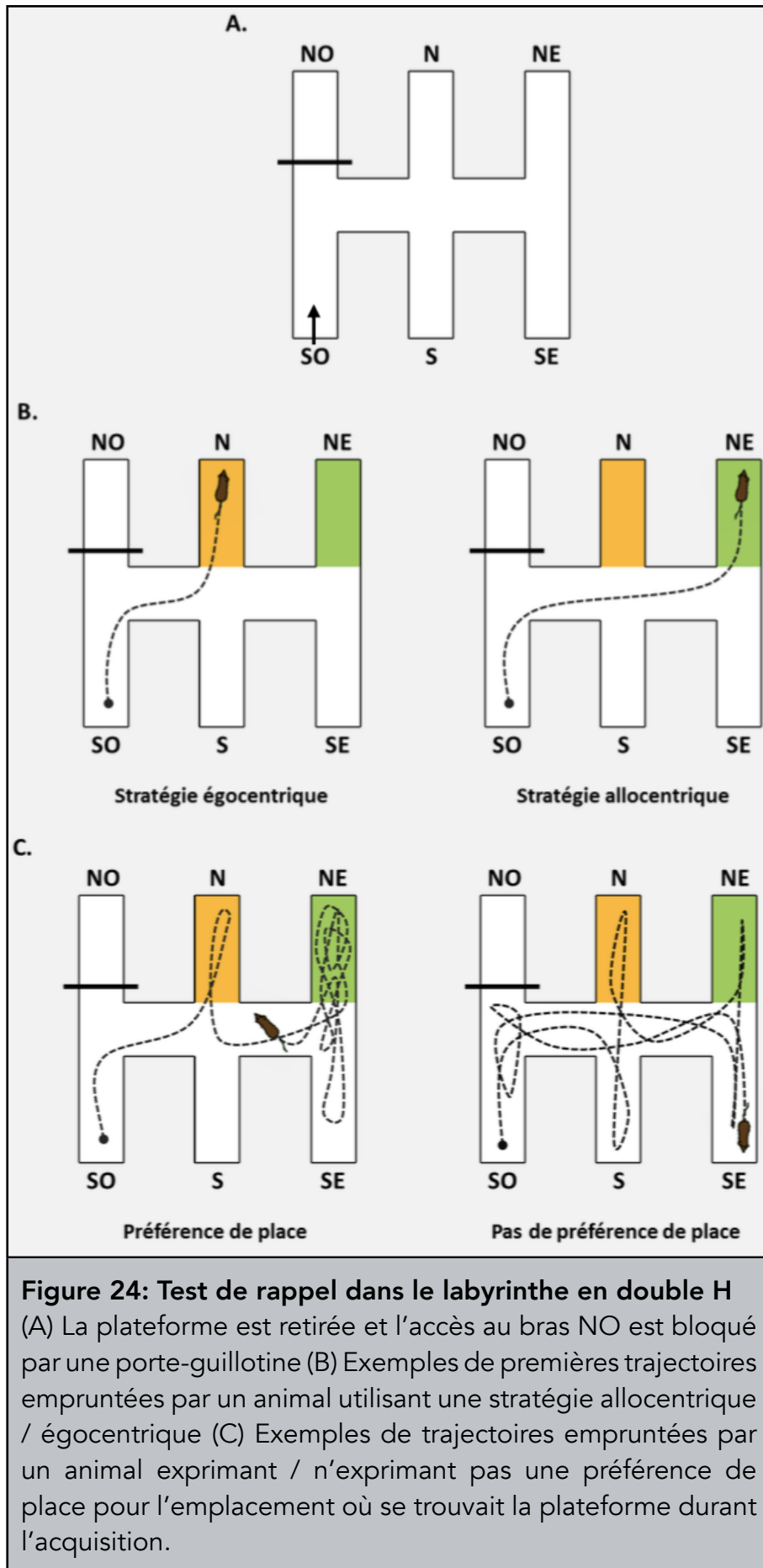
Notre protocole mis en œuvre dans le DH avait pour objectif de favoriser la mise en place d'une stratégie allocentrique. Tout comme dans la piscine de Morris, le premier jour vise à permettre à l'animal de se familiariser avec le dispositif au cours d'une session de 4 essais consécutifs. Au cours de cette phase d'habituation, la plateforme est visible car l'eau n'est pas opacifiée, et seules les branches NO et SO sont accessibles, une porte-guillotine bloquant l'accès au reste du DH. L'animal est alors introduit à l'extrémité de la branche NO et doit rejoindre la plateforme située à l'extrémité de la branche opposée (SO). La phase d'acquisition débute le deuxième jour et s'étale sur 4 jours à raison de 4 essais par jour. L'eau est alors opacifiée à l'aide de lait en poudre pour dissimuler la plateforme placée à l'extrémité de la branche NE. Pour favoriser la mise en place d'une stratégie allocentrique, deux points de départ différents sont utilisés : l'extrémité de la branche S ou celle de la branche N. L'accès à la branche faisant face à la branche de départ de l'animal est condamné à l'aide d'une porte-guillotine (Figure 23). L'ordre des points de départ est pseudo-randomisé d'une session à l'autre (4 sessions : NSSN, SNSN, SNNS, NSNS). Comme dans le test de la piscine de Morris, chaque essai avait une durée maximale de 60 secondes, et le rat est laissé sur la plateforme 10 secondes avant d'être délicatement récupéré pour débiter le prochain essai ou rejoindre sa cage.

### 3.4.4. Test de rappel

Le test de rappel de l'emplacement de la plateforme a été réalisé 24 h après la fin de l'acquisition. La plateforme est retirée et les rats sont introduits dans le dispositif à l'extrémité du bras SO pour un unique essai de 60 sec. Le point de départ subit donc une translation dans l'espace, passant du bras S durant l'acquisition au bras SO durant le test de rappel, et comme au cours de la phase d'acquisition, le bras faisant face au bras de départ est fermé par une porte-guillotine. Le point d'introduction de l'animal différant entre l'acquisition et le test de rétention, c'est l'accès au bras NO qui est condamné durant la session de test (Figure 24).



Cette procédure a pour but de mettre en évidence la stratégie utilisée en première intention par l'animal : un rat se rendant directement dans le bras N lors du test de rétention aura reproduit la séquence motrice le guidant vers la plateforme lors de l'acquisition depuis le bras S (avancer – tourner à droite – avancer – tourner à gauche – avancer jusqu'à la plateforme). La stratégie utilisée est dite égocentrique. Si au contraire, le rat se rend immédiatement dans le bras NE (qui contenait la plateforme durant l'acquisition), il utilise une stratégie allocentrique lui permettant de naviguer dans l'environnement en fonction des indices externes et n'est pas « leurré » par la modification du point de départ qui caractérise le test de rétention (Figure 24). Les variables mesurées dans ce test sont la première et la seconde branche dans lesquelles entre l'animal ; les latences d'accès à l'emplacement où se trouvait la plateforme durant l'acquisition (extrémité du bras NE) et à l'extrémité du bras N ; le temps passé et le nombre d'entrées dans chacun des bras et dans l'espace central.



## 4. Histologie

### 4.1. Prélèvement des cerveaux

Les animaux sont mis à mort par injection d'une dose létale de solution de pentobarbital sodique (CEVA santé animale, France). Après perte de toute réaction à des stimulations nociceptives (pincement de la queue et de la patte), les animaux sont perfusés avec une solution de paraformaldéhyde 4% (PAF) à 4°C dans le but de fixer les tissus. Pour cela, après thoracotomie, l'aorte descendante est clampée afin de ne faire circuler la solution de PAF 4% que dans la partie supérieure du corps de l'animal. Une aiguille de perfusion est ensuite introduite depuis l'apex cardiaque jusque dans l'aorte ascendante et maintenue à l'aide d'un clamp. Enfin, l'oreillette droite est incisée au moment où la pompe péristaltique permettant la mise en circulation de la solution de PAF est mise en marche. Une fois perfusés, les animaux sont décapités et les cerveaux extraits de la boîte crânienne. Les cerveaux sont ensuite immergés dans une solution de D-saccharose à 20% durant deux jours à 4°C afin de les préparer à la congélation. Les cerveaux sont ensuite congelés par immersion dans une solution d'isopentane à -40°C pendant 1 minute et conservés à -80°C en attendant d'être coupés. Des coupes coronales de cerveaux d'une épaisseur de 40µm sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat. Les coupes réalisées sont stockées dans une solution cryoprotectante, en vue de leur conservation à -20°C jusqu'à leur traitement ultérieur.

### 4.2. Evaluation de l'étendue des lésions

#### 4.2.1. Immunohistochimie de la protéine NeuN

La visualisation des lésions des noyaux ReRh, permettant leur quantification, est réalisée par immunohistochimie de la protéine neuronale NeuN. Un quart des coupes coronales localisées au niveau antéro-postérieur correspondant aux noyaux ReRh du thalamus est prélevé pour l'immunohistochimie NeuN. Celles-ci sont placées dans les puits d'une plaque de microtitration avec 250 µL de PBS. Toutes les étapes



suivantes sont réalisées sous agitation lente, à température ambiante et à volume constant (250  $\mu$ L/puits). Les coupes flottantes sont d'abord rincées trois fois au PBS pendant 10 minutes. Puis les sites antigéniques aspécifiques sont saturés durant 1 h à l'aide de sérum d'âne dilué à 5% dans du PBS contenant 0,5% de Triton X-100. Le Triton X-100 est un détergent de synthèse qui perméabilise les membranes et permet donc une meilleure pénétration des réactifs. Les coupes sont ensuite incubées une nuit avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine NeuN (1/2000, ref MAB377; Millipore), dilué au 1/2000ème dans du PBS-Triton. Le lendemain, les coupes sont rincées dans du PBS, puis incubées 1 h avec l'anticorps secondaire (1/500, Vector Laboratories International) dilué au 1/500ème dans du PBST. Les coupes sont ensuite à nouveau rincées trois fois dans du PBS, avant d'être incubées à l'obscurité et durant 45 min avec le complexe avidine-biotine-peroxydase (Kit ABC Vectastain, Vector Laboratories) dilué au 1/500ème. Après deux rinçages au PBS et un rinçage dans du tampon TRIS (0,6%, pH 7.6), le marquage est révélé à l'aide de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, ou DAB (Kit DAB, SK 4100, Vector Laboratories). La réaction est ensuite neutralisée 8 minutes plus tard par le rinçage des coupes dans du PBS. Après trois rinçages de 10 min, les coupes sont prêtes à être montées sur des lames gélatinées avant d'être mises à sécher à l'étuve (37°C) pour 24 h. Le lendemain, la dernière étape du protocole consiste à protéger les coupes en les incluant dans un milieu de montage entre lame et lamelle. Les lames sont rincées dans de l'eau ultra pure, puis déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 95%, 100%), et enfin placées dans le solvant Clearify (ClearifyUS) avant d'être incluses entre lame et lamelle dans un milieu d'inclusion (Diamount). Les coupes sont ensuite observées et photographiées à l'aide d'un microscope optique à lumière transmise.

#### **4.2.2. Quantification de l'étendue des lésions**

Afin d'estimer l'étendue des lésions, les photographies des coupes des noyaux ReRh sont alignées avec les plans numérisés adéquats d'un atlas stéréotaxique (Paxinos et Watson, 2007). Cela permet l'obtention d'une image de microscopie sur

laquelle figurent les contours des différentes structures cérébrales. Cette image est ensuite traitée à l'aide du logiciel FIJI qui permet notamment de quantifier les aires de régions d'intérêt. Ainsi l'aire de la lésion est estimée dans son ensemble, puis pour chaque noyau thalamique, de manière à évaluer le pourcentage de lésion relatif aux noyaux Re, Rh, mais également à tous les noyaux adjacents. Cette méthode permet de rendre compte de la réussite de la lésion : une lésion est considérée comme acceptable si le pourcentage de lésion des noyaux ReRh est supérieur à 50%, avec une atteinte d'au moins 15% de chacun des noyaux (Re, Rh, pRe droit, pRe gauche) et une faible altération des noyaux thalamiques adjacents (Loureiro et al., 2012). Ainsi, il est possible de quantifier l'étendue et la précision des lésions réalisées et de ne prendre en considération que les animaux dont la lésion est à la fois suffisamment étendue et spécifique, et ce sur la base de critères objectifs chiffrés.

### **4.3. Evaluation de l'étendue des infections virales**

Dans le cadre des expériences de DREADD, les infections virales sont visualisées directement grâce à l'expression de la protéine fluorescente mCherry qui est couplée au récepteur hM4Di encodé par le virus DREADD. Pour cela, les coupes coronales comprenant les noyaux ReRh sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS avant d'être incluse entre lame et lamelle dans un milieu de montage adapté à la fluorescence (Mowiol, Sigma-Aldrich). Les coupes sont ensuite visualisées et numérisées grâce à un scanner de lames (Nanozoomer Model S60, Hamamatsu).

La procédure permettant la quantification des infections virales est en tout point similaire à celle utilisée pour la quantification des lésions des noyaux ReRh.

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

Afin d'étudier l'implication des noyaux ReRh dans le rappel d'un souvenir de peur au contexte, une quantification de l'expression de la protéine c-Fos a été réalisée. Cette protéine est codée par le gène immédiat précoce *c-fos*, et est classiquement

utilisée comme indicateur de l'activation neuronale des structures cérébrales. Afin de s'assurer que les éventuelles modifications de l'expression de c-Fos sont liées à une implication dans l'aspect mnésique de la tâche, 3 groupes expérimentaux ont été utilisés. Il y a d'une part le groupe «expérimental», constitué d'animaux qui subissent le conditionnement de peur au contexte, puis réalisent un test de rappel (1j ou 25j plus tard) avant d'être mis à mort 90 min après la fin du test (temps nécessaire à l'expression de la protéine c-Fos, Lopez et al., 2012). Le deuxième groupe est constitué de rats contrôles «non-conditionnés» qui subissent une procédure en tout point similaire, à l'exception qu'aucun choc électrique ne leur est administré pendant le conditionnement. Ainsi au moment du test ils ne rappellent pas l'association contexte-choc. La comparaison entre ce groupe «non-conditionné» et le groupe «expérimental» permet d'évaluer l'implication des noyaux ReRh dans la composante mnésique de la tâche. Un dernier groupe est constitué de rats «*home-cage*», qui restent dans leur cage d'élevage tout au long de la procédure. Ce groupe permet de contrôler l'implication des noyaux ReRh dans les aspects non-mnésiques de la tâche: manipulation par l'expérimentateur, stress, exposition à un nouvel environnement, etc.

Le protocole d'immunohistochimie de la protéine c-Fos est en tout point similaire à celui précédemment décrit pour la protéine NeuN, seuls les anticorps utilisés diffèrent : l'anticorps primaire est un anticorps polyclonal anti-cFos produit chez le lapin (1/4000; Santa Cruz Technology) et le secondaire est un anticorps biotinylé anti-lapin produit chez la chèvre (1/500, Biotin-SP-conjugated affiniPure; Jackson ImmunoResearch).

Une fois les coupes montées sur lame, celles-ci sont visualisées et numérisées grâce à un scanner de lames (Nanozoomer Model S60, Hamamatsu). Le logiciel FIJI est utilisé pour réaliser le comptage semi-automatique des neurones c-Fos positifs par application d'un seuil ne permettant la détection que des neurones marqués. Les régions d'intérêt (noyaux Re et Rh) sont délimitées manuellement.

## 5. Statistiques

L'ensemble des données issues de ces travaux de thèse a été analysée sur le logiciel Graphpad Prism 7 par un test-t de Student (comparaison de 2 moyennes ou d'une moyenne à une valeur de référence) ou une ANOVA à 2 facteurs (à mesure répétée quand cela était approprié). Si besoin, cette analyse de variance a été complétée par des comparaisons multiples grâce au test de Newman-Keuls.

Pour les expériences de transmission sociale de préférence alimentaire, la consommation de nourriture démontrée au cumin pendant le test (après apprentissage) a été comparée à une valeur de référence de 36%, correspondant à la préférence spontanée des animaux pour la nourriture au cumin (sans apprentissage). Cette valeur a été déterminée par une expérience préliminaire qui est présentée dans la partie résultats.

Pour les expériences dans le labyrinthe en double H, le temps passé dans les différents bras au cours du test de rappel a été comparé au niveau du hasard qui est de 8,2 secondes ( $60s * \text{surface d'un bras} / \text{surface accessible totale du labyrinthe}$ ). Un test du  $\chi^2$  a été réalisé pour comparer les variables qualitatives (premier bras visité).

Pour les expériences de piscine de Morris, le temps passé dans le quadrant cible a été comparé au niveau du hasard qui est de 25 secondes ( $60s / 4 \text{ quadrants}$ ).

# RÉSULTATS

# Resultats

Au commencement de ce travail de thèse, l'implication des noyaux ReRh dans les processus de consolidation mnésique, permettant la persistance d'une information en mémoire ancienne, avait seulement été mise en évidence dans le cas spécifique de la mémoire spatiale (Loureiro et al., 2012). La première question à laquelle nous avons souhaité répondre était de savoir si les noyaux ReRh sont également impliqués dans la persistance d'une mémoire non spatiale. Pour tester cette hypothèse, l'implication des noyaux ReRh dans 2 types de mémoire a été étudiée : la mémoire associative olfactive et la mémoire de peur (au contexte et au son).

## **1. Implication des noyaux ReRh dans la mémoire associative olfactive**

La mémoire associative olfactive a été évaluée par le paradigme comportemental de transmission sociale de préférence alimentaire (TSPA). Comme présenté dans les méthodes, ce protocole présente de nombreux avantages : il est basé sur un comportement naturel du rat qui va en une session unique d'interaction former un souvenir très durable dans le temps. N'ayant pas fait l'objet d'un nombre considérable de publications (en comparaison à la mémoire spatiale ou la mémoire de peur par exemple), les substrats neurobiologiques de la TSPA sont encore sujets à controverse dans la littérature. Néanmoins, les travaux de Lesburgères publiés dans Science en 2011 ont établi que cette mémoire est initialement dépendante de l'HPd, avant de devenir progressivement dépendante du néocortex et particulièrement du cortex orbito-frontal (OFC) et indépendante de l'HPd. Ces données suggèrent que ce paradigme est idéal pour étudier les processus de consolidation à l'échelle des systèmes dans le contexte d'un dialogue hippocampo-cortico-thalamique tel que suggéré par Loureiro et al. (2012) et Cassel et al. (2013). Au regard des données suggérant un rôle des noyaux ReRh dans la consolidation systémique et des données

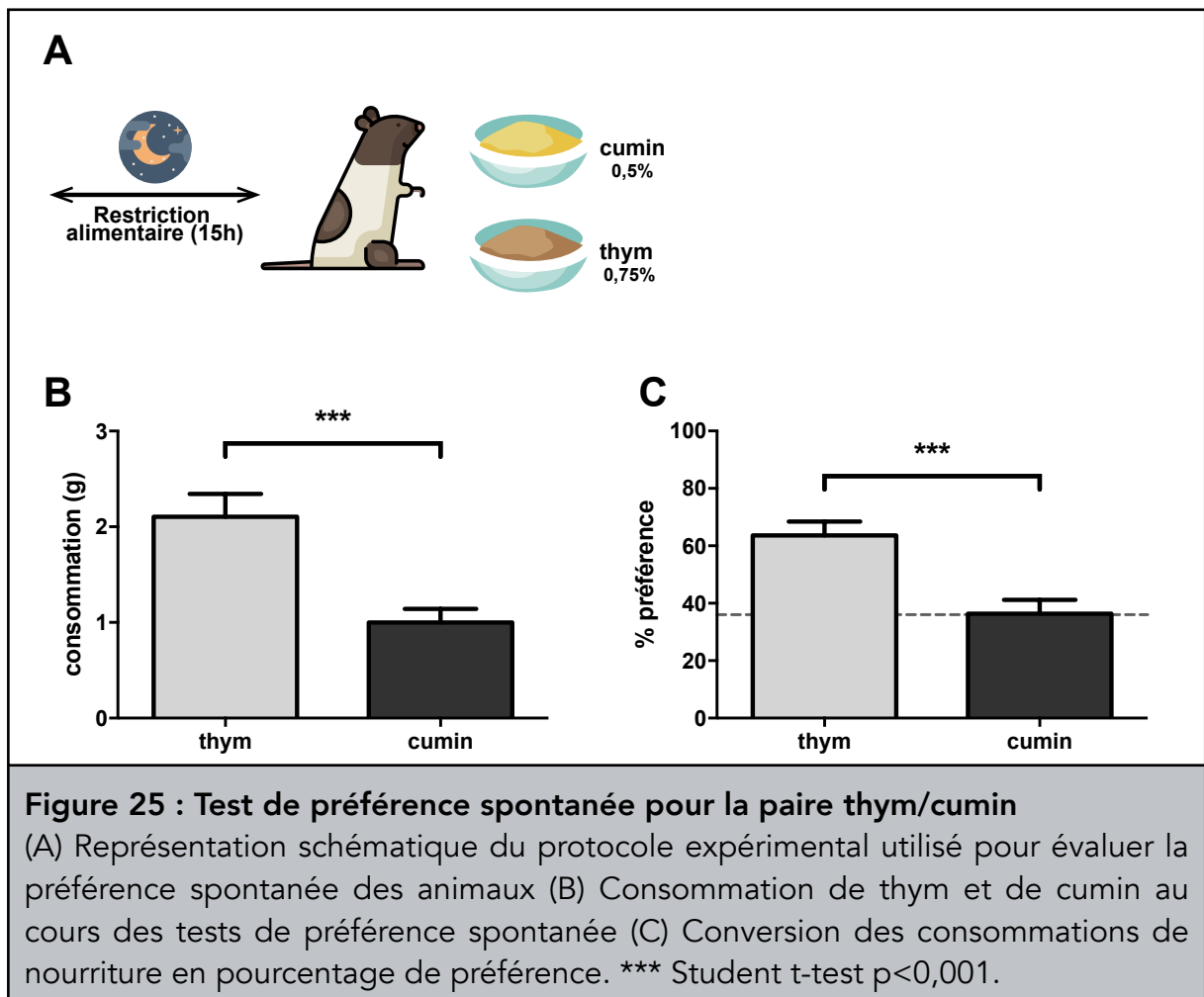
neuroanatomiques indiquant des connexions massives et réciproques des noyaux ReRh avec l'HPd et l'OFC (McKenna and Vertes, 2004 ; Vertes et al., 2006); l'hypothèse de départ de cette première expérience est que les noyaux ReRh pourraient être impliqués dans la consolidation d'une information olfactive socialement transmise. Pour tester cette hypothèse, l'effet d'une lésion préapprentissage des noyaux ReRh sur les performances des animaux en TSPA (mémoire récente et ancienne) a été étudié.

Il est important de noter que le paradigme de TSPA n'avait jamais été utilisé au laboratoire auparavant. Un nombre important d'expériences préliminaires a donc été nécessaire pour adapter, mettre au point et tester le protocole de TSPA. Dans un but de clarté, l'ensemble de ces expériences préalables ne sont pas présentées ici. Après des essais conduits au laboratoire et au vue de la littérature existante, la paire d'épices thym/cumin a été choisie pour réaliser nos expériences. Dans un premier temps il a donc été nécessaire d'évaluer la préférence spontanée des animaux pour l'une ou l'autre de ces épices dans nos conditions expérimentales.

### **1.1. Évaluation de la préférence spontanée des animaux pour le thym ou le cumin**

17 rats Long-Evans ont été privé de nourriture pendant une nuit avant d'être soumis à un test de préférence spontané de 30 minutes au cours duquel 2 coupelles leurs sont présentées : l'une contenant de la nourriture au cumin (0,5%), l'autre de la nourriture au thym (0,75%). La consommation de chacune des 2 nourritures est quantifiée à l'issue des 30 minutes (figure 25A). Ce test de préférence a été reproduit deux fois sur les mêmes rats à 2 jours d'intervalle afin de vérifier la stabilité de la préférence dans le temps et d'augmenter l'effectif pour obtenir la valeur de préférence spontanée la plus représentative possible. La figure 25B représente les résultats obtenus à l'issue de ces 2 tests de préférence spontanée : les animaux consomment significativement plus de nourriture au thym qu'au cumin ( $t(66)=3,97$  ;  $p=0,0002$ ). Cette consommation peut être convertie en pourcentage de préférence :  $\% \text{préférence} = 100 \times (\text{consommation épice A}) / (\text{consommation épice A+B})$ . Ainsi la préférence spontanée des rats est de 63,66%

pour la nourriture au thym, soit 36,34% pour la nourriture au cumin (Figure 25C). Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Lesburguères en 2011 indiquant une préférence innée des rats pour la nourriture au thym à hauteur de 80%. Ainsi au cours des expériences de TSPA, l'objectif est d'inverser cette préférence spontanée pour le thym par la transmission sociale de l'odeur de cumin.



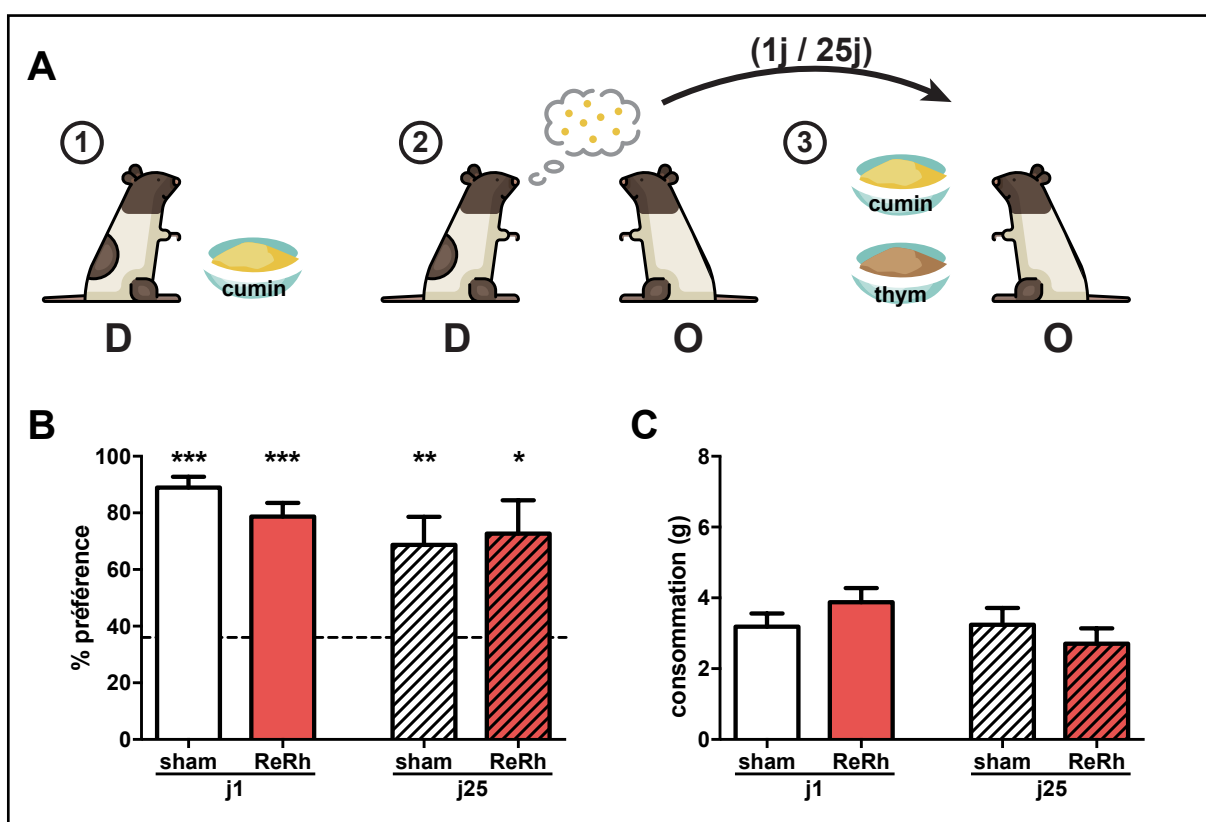
## 1.2. Effet de la lésion des noyaux ReRh sur la transmission sociale de préférence alimentaire

L'hypothèse de travail est que les noyaux ReRh pourraient être impliqués dans la consolidation d'une mémoire non spatiale telle que la mémoire associative olfactive. Pour tester cette hypothèse, des lésions préapprentissage des noyaux ReRh ont été réalisées afin d'en étudier les conséquences sur la TSPA (figure 2A), en mémoire récente (délai de 1 jour) ou ancienne (délai de 25 jours). Il est à noter qu'avant d'être testés en



TSPA, tous les animaux ont subi un protocole de conditionnement de peur qui sera détaillé dans la suite des résultats. Ainsi l'analyse histologique des lésions des noyaux ReRh sera également présenté par la suite. Seuls les résultats comportementaux obtenus en TSPA sont détaillés ici.

La transmission sociale de l'odeur de cumin induit bien une préférence pour cette nourriture au moment du test de rappel (Figure 26B). En effet, les animaux contrôle sham ayant une préférence innée pour le thym consomment 89% de cumin lorsque le test de préférence a lieu le lendemain de l'interaction sociale (one-sample t-test vs 36% :  $t(9)=14,47$  ;  $p<0,0001$ ).



**Figure 26: Une lésion préapprentissage des noyaux ReRh n'altère pas les performances des rats en TSPA**

(A) Représentation schématique du protocole de TSPA : 1- Le rat démonstrateur (D) consomme librement de la nourriture au cumin pendant 30 minutes 2- Le rat démonstrateur interagit avec le rat observateur (O), c'est l'étape de transmission sociale 3- Test de rappel (30 min) : le rat observateur peut choisir de consommer la nourriture démontrée (cumin) ou la nourriture nouvelle (thym). (B) Pourcentage de préférence pour la nourriture au cumin mesurée au cours du test de rappel. La ligne pointillée indique la préférence innée pour le cumin (36%). (C) Consommation totale de nourriture des rats observateurs pendant le test de rappel.

\* One sample t-test  $p<0,05$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\* $p<0,01$  ; \*\*\* $p<0,001$

Cette modification de la préférence est persistante dans le temps puisqu'au délai de 25 jours, les animaux sham consomment 69% de cumin, ce qui correspond toujours à une modification significative de la préférence spontanée ( $t(9)=3,39$  ;  $p=0,008$ ).

La lésion excitotoxique des noyaux ReRh n'altère aucunement les performances mnésiques des animaux en TSPA. Les animaux lésés ne sont pas différents des animaux contrôles ( $F(1,38)=0.15$  ;  $p=0.70$ ), ils présentent également une modification significative de leur préférence pour le cumin, et ce quel que soit le délai (J1 :  $t(11)=9,15$ ;  $p<0,0001$  ; J25 :  $t(9)=3,39$  ;  $p=0,011$ ). Les performances des rats sham et lésés ne diffèrent pas selon le délai  $F(1,38)=2.69$  ;  $p=0.11$ ).

Il a été contrôlé que la lésion des noyaux ReRh n'affectait pas l'appétence des animaux pour la nourriture (Figure 26C). L'analyse ANOVA de la consommation totale de nourriture ne révèle aucune différence entre les groupes ( $F(1,38)=0.035$  ;  $p=0.85$ ) et les délais ( $F(1,38)=1.75$  ;  $p=0.19$ ).

Ainsi, notre hypothèse d'un rôle des noyaux ReRh dans la formation et la persistance d'un souvenir d'une TSPA n'est pas vérifiée.

## **2- Publication : Implication des noyaux ReRh dans la mémoire de peur**

En complément de l'étude de l'implication des noyaux ReRh dans la mémoire associative olfactive, leur rôle dans la persistance de la mémoire de peur a été examiné. Au commencement de ce projet de thèse, seuls les recherches de Xu et Sudhöff publiés dans Science en 2013 avaient montré une implication du noyau Re dans la mémoire de peur conditionnée au contexte. Ces travaux ont mis en évidence l'importance cruciale du noyau Re au moment de l'encodage de l'information contextuelle pour déterminer la spécificité du souvenir. En revanche aucune donnée n'était publiée concernant un potentiel rôle des noyaux ReRh dans la persistance de la mémoire de peur conditionnée au contexte. L'état de la littérature est bien différent au moment de l'écriture de ces lignes, puisque pas moins de 5 études examinant l'implication des noyaux ReRh dans la mémoire de peur sont parues au cours des 2 dernières années. En effet ces recherches utilisant des approches pharmacologiques, pharmacogénétiques et d'imagerie cellulaire ont montré l'implication des noyaux ReRh dans divers processus de la mémoire de peur : encodage/consolidation/reconsolidation/rappel. Ces travaux seront discutés plus en détails par la suite.

Les travaux que nous avons initié préalablement à ces publications visaient à établir une éventuelle implication des noyaux ReRh dans les mécanismes d'encodage, de consolidation et de rappel de la mémoire de peur au contexte et au son. L'ensemble des expériences et résultats de ce projet combinant des approches de lésion, d'inactivation pharmacogénétique et d'imagerie cellulaire sont regroupés dans une publication actuellement en cours de soumission et présentée ci-après.

# The thalamic Reuniens and Rhomboid nuclei contribute to contextual fear memory persistence in rats

*Quet Etienne, Majchrzak Monique, Cosquer Brigitte, Morvan Thomas, Cassel Jean-Christophe, Pereira De Vasconcelos Anne, Stéphan Aline*

## Introduction

Memory persistence requires the initially labile information to be progressively consolidated, whereby it becomes resistant to interference. The term 'consolidation' was first used by Müller and Pilzecker at the turn of the 19th century to name the post-learning processes of memory stabilization (Müller and Pilzecker, 1900; Lechner et al., 1999). This offline mechanism involves changes at the molecular, synaptic and system levels (Dudai, 2004; Poo et al., 2016). System consolidation designates the progressive reorganization of the brain structures that support lasting memory (Squire and Alvarez, 1995; Frankland and Bontempi, 2005). According to the standard theory of system consolidation (Marr, 1971), the initial information encoded with a contribution of the neocortex is integrated by the Hippocampus (HP). After learning, offline hippocampo-cortical reactivations occurring during sleep and quiet wakefulness reinforce cortico-cortical connections (Born and Wilhelm, 2012). Meanwhile, the HP gradually disengages over time and the memory becomes dependent upon cortical networks, with a key role of the medial prefrontal cortex (mPFC). Among the brain structures proposed to be involved in memory persistence are the reuniens and rhomboid nuclei (ReRh) of the ventral midline thalamus. The ReRh have dense and reciprocal anatomical connections with both the HP (CA1 and subiculum) and the mPFC (McKenna and Vertes, 2004; Vertes et al., 2006; Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014). Loureiro et al. (2012) showed that pre-acquisition excitotoxic lesion of the ReRh prevented rats from retrieving the platform location after a 25-day but not a

5-day post-acquisition delay in the Morris water maze; as lidocaine inactivation of the ReRh during the probe test did not alter memory retrieval, whatever the delay, they suggested that ReRh are necessary for persistence of a spatial memory but not for its encoding or retrieval. Sierra et al. (2017) demonstrated the crucial implication of the Re in fear memory reconsolidation and showed that lidocaine infusion into the Re inhibited LTP induction in the CA1-anterior cingulate cortex pathway. Frankland and his colleagues extensively investigated the neuronal networks underlying remote fear memory in mice by combining c-Fos expression analysis and DREADD chemogenetic approaches (Wheeler et al., 2013; Vetere et al., 2017). Their data revealed that the Re is a key hub between the HP and mPFC for remote fear memory formation and/or expression.

Our study aimed to provide a better understanding of the role of the ReRh in systems consolidation, in HP-dependent and HP-independent fear memory. To this end, we assessed in rats the impact of a pre-acquisition excitotoxic lesion of the ReRh on contextual and cued conditioned fear, at recent (1d) or remote (25d) time-points. We then investigated whether the contribution of the ReRh to remote contextual fear memory was online (during information recall) and/or offline (during information consolidation), by combining c-Fos expression analysis and chemogenetic reversible inactivation.

Our findings support a specific implication of the ReRh thalamic nuclei in HP-dependent fear memory persistence by their involvement in offline system consolidation processes.

## Materials and Methods

### Animals

Experimental protocols and animal care were in compliance with the institutional guidelines (council directive 87/848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale) and international laws (directive 2010/63/UE, February 13, 2013, European Community) and policies. Our project has been reviewed and approved by the ethics committee CREMEAS, Strasbourg, France (#5822 and APAFIS#xxxx). All experiments were performed in 145 (experiment 1: 56; exp. 2: 49; exp. 3: 40) male Long–Evans rats aged of 3 months at their arrival at the laboratory (250 – 300 g). Animals were housed 2 or 3 per cage (depending on the experiments) in quiet facilities, under a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 A.M.) with food and water ad libitum, controlled temperature, and a hygrometry of about 55%. Before any experiment (surgery or behavioral training), rats were individually handled for 2 min each day over 5 consecutive days.

### Experiment 1

The first experiment aimed to study the effect of a permanent ReRh lesion on cued and contextual fear memory, at both recent (1d) and remote (25d) time points.

#### ReRh Lesion

For permanent fiber-sparing excitotoxic lesions of the ReRh, subjects were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and secured in a stereotactic frame. As previously described (Loureiro et al., 2012; Cholvin et al., 2013), neurotoxic lesions targeting the ventral midline thalamus (ReRh) were made using slow microinfusions (over 5 min) of 0.12 M NMDA (0.1 µl/site; Sigma), dissolved in saline phosphate buffer, via an infusion needle (0.28 mm in diameter) connected to a motorized infusion pump. After leaving the needle in situ for an additional 5 min to ensure diffusion of NMDA into the target structure, it was slowly retracted. Infusion

sites were as follows (in mm): AP = -1.5; -2.1 and -2.7 (from bregma), DV = -7.0; -7.1 and -7.2 (from skull), ML = -1.9 (from midline of the sagittal sinus), using a ML angle of 15°. (Paxinos and Watson, 2007). The sham-operated controls (Sham) were infused with phosphate-buffered saline instead of NMDA at the same coordinates. All rats that underwent surgery were allowed to recover under a warm lamp for 20 –30 min before being placed back into their home cage. They were given a 2-week rest period before the start of behavioral testing.

## **Cued and contextual fear conditioning**

### ***Apparatus***

A complete description of the testing apparatus and experimental procedure can be found in Majchrzak et al. (2006).

Conditioning and testing took place in 6 identical conditioning chambers (25 x 27 x 18 cm) made of transparent plastic with a transparent ceiling and placed in ventilated (background noise between 65.7 and 70.2 dB) light- and sound-attenuated boxes (57 x 38 x 38 cm, Campden Instruments). An illumination of 6 lux was maintained by a bulb through a frosted plastic plate. A camera (MCT-210 MS, OptoVision, Toulouse, France) was fitted inside each box, above the center of the chamber, and monitored the entire chamber. The grid floor of each chamber consisted of parallel 0.3 cm diameter stainless-steel bars spaced 0.8 cm apart. A sawdust tray was placed under the grid floor. Tone fear test was conducted in the same chambers modified to define a different context by changing tactile, olfactory and visual cues. Tone and shock delivery were controlled by a computerized interface (Med-PC, Med Associates, St Albans, VT). Automatic freezing measurements were performed as described in detail by Marchand et al. (2003). Briefly, video signals were sent to a computer equipped with a Scion LG3 video capture card (Scion Corporation, Frederick, MD) via two Quad-type multiplexers (Computar QSMX-II). Data acquisition was carried out by a script written under the "Scion Image" software, which allowed the monitoring of all chambers at a

sampling rate of 1 Hz. The analysis of freezing behavior was conducted with a set of procedures written under Excel® Visual Basic®, which allowed the computation of the percentage of freezing time over blocks of selected duration.

### ***Fear conditioning procedure***

The conditioning session consisted in 5 tone presentations (15 s, 4000 Hz, 10 dB above background) associated with footshock (0.6 mA before scrambling, 0.8 s) delivered at the offset of the tone. The first tone was presented 3 min after the placement of the rat in the chamber then at variable time interval (452 +/- 96 s). The total session duration was 38 min.

The context test session took place either on the following day (to tax recent memory) or after a 25-day delay (to tax remote memory). Conditioned freezing to the context was assessed by placing rats in the same conditioning chamber for a 10-min test session.

An extinction session of non-specific contextual fear was conducted on the next day by placing the rat for 10 min in the modified chamber (tone test context). The next day (tone test session), conditioned freezing to the tone was assessed by placing rats in the modified chamber. For this session, the same tone as the one used for conditioning was presented 5 times. The first tone was presented 2 min after the placement of the rat in the chamber then at a fixed time interval (255 s)

## **Experiment 2**

The second experiment aimed to study the effect of reversible inactivation of the ReRh during recent (1d) and remote (25d) contextual fear memory retrieval. The DREADD approach was then validated in the double H maze using a cognitive flexibility task known to be dependent upon the ReRh (Cholvin et al., 2013).

### **DREADD inactivation of the ReRh**

For DREADD viral injections in the ReRh, subjects were anesthetized with ketamine (98 mg/kg)–xylazine (13 mg/kg, i.p.). 2 x 0.4µl of 7,3 x 10<sup>9</sup> genomic copies/µl of AAV8-



CaMK2 $\alpha$ -hM4Di-mCherry (Viral Vector Production Unit, Spain) were injected in the ReRh at the following coordinates: AP = -1.6 and -2.6 (from bregma), DV = -7.1 and -7.2 (from skull), ML = -1.9 (from midline of the sagittal sinus), using a ML angle of 15°. (Paxinos and Watson, 2007). The sham-operated controls (Sham) were infused with phosphate-buffered saline instead of virus solution at the same coordinates. Rats were given a 3-week rest period before the start of behavioral testing, allowing at least 1 month of virus expression before the first CNO injection.

Chemogenetic inactivation of the ReRh was performed by intra-peritoneal injection of Clozapine-N-Oxyde (CNO 1 mg/kg, Enzo life sciences) 40 min prior to behavioral testing. For DREADD experiments, all animals (HM4 and Sham) received a CNO injection.

### **Contextual fear conditioning procedure**

The same apparatus as that described for experiment 1 was used for contextual fear conditioning during experiment 2. The conditioning procedure was previously described in Bousiges et al. (2013).

The conditioning session consisted in 3 footshocks (0.6 mA before scrambling, 0.8 s) that were delivered 180, 240, and 360 s after the start of the conditioning session (total session duration, 8 min). The context test session took place either on the following day (recent memory) or after a 25-day delay (remote memory). Conditioned freezing to the context was assessed by placing rats in the same conditioning chamber for a 10-min test session.

### **The double-H maze task**

#### ***Apparatus***

A complete description of the testing apparatus and experimental procedure can be found in the publication by Cholvin et al., 2013 and illustrated in Figure 4A.

Briefly, the double-H maze is made of three parallel run arms, 160 cm long x 20 cm wide, connected to each other at the level of their center by a 160 cm long x 20 cm

wide corridor. By convention, the two opposing arms in the middle are designed as north (N) and south (S), respectively. The extremities of both other pairs of side arms correspond to the four potential target locations. They are termed northwest (NW), northeast (NE), southwest (SW), and southeast (SE) hereafter.

### ***Training protocol***

The double-H was filled with water (21°C) made opaque by addition of powdered milk (1.5 g/L). A platform, 11 cm diameter, was immersed 1 cm beneath the water surface at the extremity of the NE arm. For each rat, the task consisted of learning to swim from the start point—which was changed randomly between S and N—to the escape platform. A first day of pre-training habituated rats to water and to the testing device. Over the 4 following training days, rats were given four daily trials separated from each other by a 10 s interval. They were released in the maze either from the N or the S arm in a randomized order (e.g., S,N,S,N on day 1; S,N,N,S on day 2; N,S,N,S on day 3, and S,N,S,N on day 4). When the rats were released from the N, the S arm was closed by a transparent guillotine door to prevent any entry and vice versa. Each trial, whatever the protocol, lasted for a maximum of 60s. When a rat did not reach the platform within this delay, it was gently guided to the platform by the experimenter. The variables recorded were the distance and latency to reach the target arm as well as the swim velocity.

### ***Probe trial***

Two probe trials were given: one 24 h after the first 2 days of training and another one 24 h after 2 additional days of training. For both probe trials, the platform was removed from the water maze. The probe trial duration was 60 s. All rats were released from the SW arm, with the entry of NW arm closed by a guillotine door. This procedure (1) prevented the behavior displayed during maze habituation to be reproduced (i.e., swim directly from SW to NW), (2) made one of the learned successive turn sequences impossible (i.e., the left–left sequence), (3) did not disable the right–left sequence, and (4) allowed rats to shift from a strategy based on the right–left turn sequence to

a spatial approach of the task (search in target arm), and to do so either directly or as a consequence of negative feedback (corresponding to entering the N arm after successive right and left turns). Whether the shift to a spatial strategy was immediate or not, evidence for searching the platform at the correct place can be interpreted as the result of a strategy shift. The variables recorded and analyzed were the time spent in the former target arm (i.e., NE, termed “place arm” hereafter) and the time spent in the arm to which successive right–left turns were leading (i.e., N, termed “response arm” hereafter).

### **Experiment 3**

The third experiment aimed to study the activation of the ReRh during recent (1d) and remote (25d) contextual fear memory retrieval by quantification of the immediate early gene *c-fos* expression.

- **Experimental groups and contextual fear conditioning**

3 groups of unoperated rats were used during this 3rd experiment: “conditioned” rats underwent the same contextual fear conditioning procedure as in experiment 2; “not conditioned” control rats underwent the same procedure except that no foot-shock was delivered during the conditioning session; and “home cage” control rats remained in their home cage throughout the entire procedure. Within each group, half of the rats were tested after a 1-day delay and the other half after a 25-day delay.

- **c-Fos immunohistochemistry and quantification**

#### ***Brain preparation and section processing***

Ninety minutes after behavioral test completion, rats were killed by an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, i.p.) and then perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were removed and transferred to a 20% sucrose solution for 72 h at 4°C before being snap frozen (isopentane, -40°C) and stored at -80°C. Floating coronal sections (40 µm) were cut using a cryostat (Microm HM560, Thermo Scientific).

### ***Immunohistochemistry protocol***

The protocol was previously described in Lopez et al., 2012. Briefly, sections were rinsed three times during 10 min in PBS before being soaked for 1 h in 5% normal donkey serum in PBS containing 0.5% Triton X-100. The sections were subsequently transferred into the primary anti-Fos rabbit poly-clonal antibody (1:4000; Santa Cruz Technology) solution overnight at room temperature. Then, the sections were soaked in a buffer solution containing biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:500, Biotin-SP-conjugated affiniPure; Jackson ImmunoResearch). Staining was revealed with the avidin-biotin peroxidase method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) coupled to diaminobenzidine.

### ***Imaging and quantification***

The quantitative analyses of c-Fos-positive nuclei were performed in the ventral midline nuclei (Re, Rh) (-1.3 to -3.3 mm from bregma, Paxinos and Watson, 1998) on brain sections along their entire rostro-caudal extent. Stained sections were photographed using XXX microscope (x10 objective lens). The same intensity of light as well as the same parameters for exposure time of the digital camera were used for all sections. Using the Fiji software (Schindelin et al., 2012), the regions of interest were delimited and c-fos-positive neurons counted using a threshold value that kept all immune-labeled positive cells but no background.

### ***Statistical analysis***

Unless otherwise specified and depending on the experiment, data analyses used Student t-tests or two-way ANOVAs, with repeated measures when appropriate. Likewise, when appropriate, these analyses were completed by multiple comparisons using the Newman–Keuls multiple range test. The time spent in the arms during the Double H maze probe trials was also compared to chance using a one-sample t-test. Chance level was 8.2 s in the double-H [(surface of one arm/accessible surface of the maze) / 60 s]. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. A  $\chi^2$  analysis was used to compare categorical variables in the double-H maze.

## **Verification of permanent lesion and viral infection placement/extent (experiments 1 and 2)**

All rats were killed and perfused as for experiment 3 (c-Fos immunohistochemistry) and brain sections were obtained by following the same procedure.

- **NeuN immunostaining**

To complete the histological characterization of the ReRh lesions, immunolabeling of the NeuN protein was performed on brain sections evenly distributed along the entire extent of the ReRh. The protocol was similar to the one used for c-Fos immunohistochemistry, using a mouse NeuN antibody (1:2000, ref MAB377; Millipore) as primary antibody, and a biotinylated anti-mouse horse antibody (1:500; Vector Laboratories) as secondary antibody (see Loureiro et al., 2012).

- **Viral infection visualization**

Brain sections from DREADD-injected rats (ReRh) were rinsed 3 x 10 min in PBS before being mounted using Mowiol mounting medium (Sigma-Aldrich). Direct fluorescence of the AAV encoded mCherry was visualized with a Nanozoomer (Model S60, Hamamatsu).

- **Quantification of the lesion/virus infection**

Serial sections throughout the midline thalamus were visualized to assess the lesion/infection placement and extent. Lesions/infections were drawn using the relevant plates of the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007) and replicated on electronic copies of the atlas. Automated pixel counts of the thalamic nuclei in the target regions were used to estimate lesion/infection extent. Acceptable lesions/infections were defined as having >50% damage to the ventral midline thalamus (Reuniens, Rhomboid and peri-Reuniens nuclei combined) with at least 15% damage to each of the nuclei (Re, Rh, right pRe and left pRe) in order to prevent the inclusion of asymmetric lesion (Loureiro et al., 2012).

## Results

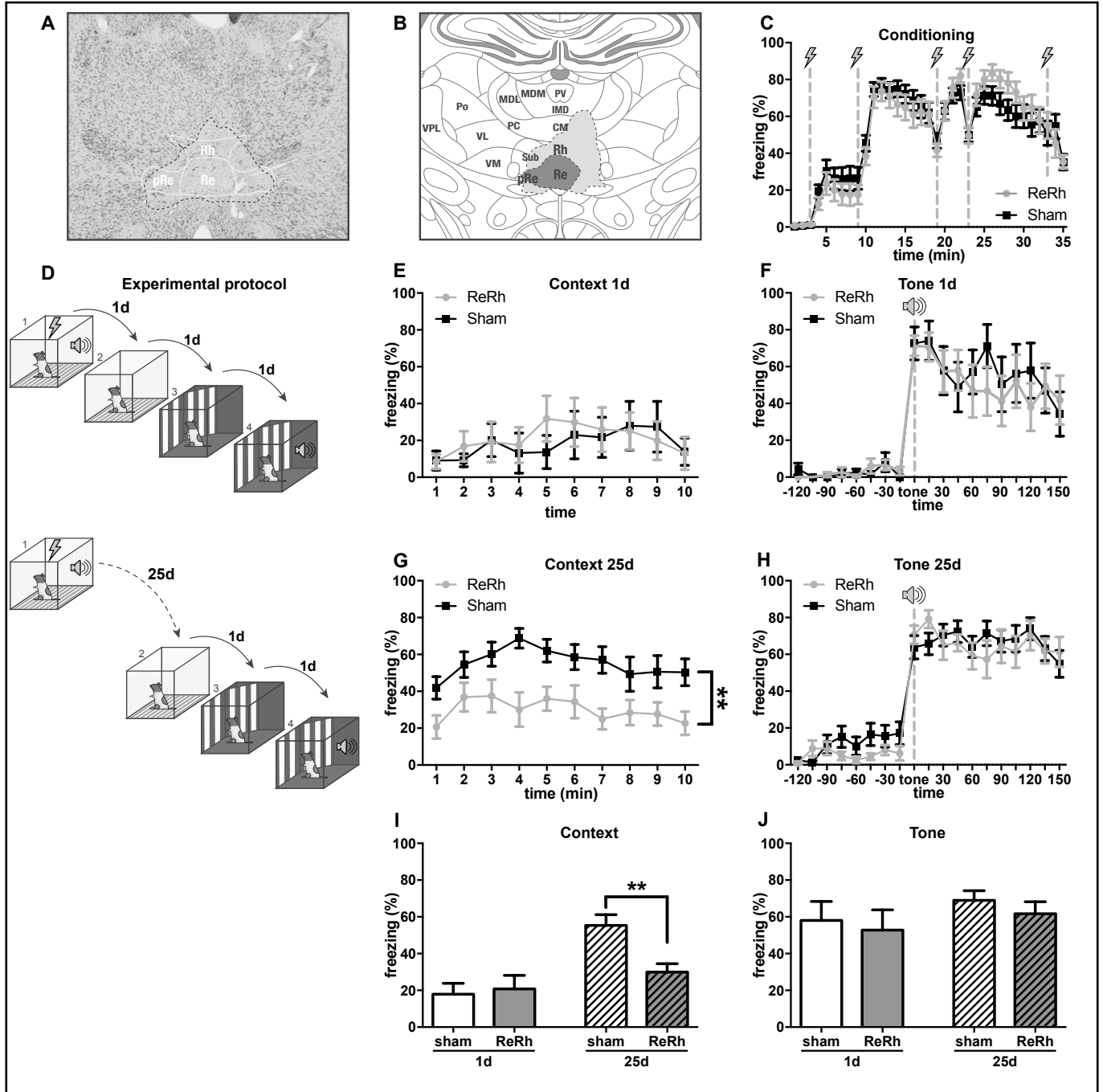
### Experiment 1: ReRh lesion specifically alters expression of remote contextual fear memory

As described in the methods, acceptable lesions were defined as having >50% damage to the ventral midline thalamus (Reuniens, Rhomboid and peri-Reuniens nuclei combined) with at least 15% damage to each of the nuclei (Re, Rh, right pRe and left pRe). Damage to thalamic structures other than ReRh was generally minimal or modest. Figure 1B shows the largest and smallest ReRh lesions observed in rats that were included in the behavioral analyses. Final sample sizes were as follows: 1d groups,  $n_{\text{ReRh}} = 10$ ,  $n_{\text{Sham}} = 9$ , 25d groups,  $n_{\text{ReRh}} = 15$ ,  $n_{\text{Sham}} = 22$ .

No significant differences in the extent of the ReRh lesion were found between the 1d- and 25d delay groups ( $F(1,46)=0.1609$ ,  $p=0.6902$ ). In the 10 ReRh rats of the 1d delay group, there was a median of 91% damage to the Re, 74% to the left pRe, 83% to the right pRe and 79% damage to the Rh region. In the 15 ReRh rats of the 25d delay group, there was a median of 85% damage to the Re, 54% to the left pRe, 66% to the right pRe, and 62% damage to the Rh. Damage to thalamic structures other than ReRh, including midline nuclei, was generally minimal to modest. The median damage was always <10% in both groups for each of the following regions: submedius nucleus, centromedian nucleus, interanteromedian thalamic nucleus, and mediodorsal nucleus (with a maximum value of 17% and 15% for the submedius nucleus in the 1d- and 25d-delay groups, respectively).

To investigate the role of the ventral midline thalamus in fear memory processing, we tested whether a pre-acquisition excitotoxic lesion of the ReRh disrupted the formation and/or expression of contextual- and cued fear memory. In this experiment, lesioned rats were conditioned as described in the methods and tested for contextual

fear memory either 1d (recent memory) or 25d (remote memory) later. An extinction session of non-specific contextual fear was conducted on the next day and a cued fear test (tone test session) the day after (Figure 1D).



**Figure 1: Effect of ReRh lesion on contextual and cued fear memory (Experiment 1).**

(A) Photomicrographs showing a typical example of NeuN immunostained brain section from a rat with ReRh lesion. (B) Schematic representation of the smallest (dark gray) and largest (light gray) lesion of the ventral midline thalamic nuclei (Re and Rh). (C) Freezing behavior across fear conditioning session (grouped 1d and 25d rats). Dotted lines indicate each tone-footshock presentation. (D) Schematic representation of the fear memory protocol: rats underwent one fear conditioning session (1) either 1 or 25 days before contextual fear memory test (2). The extinction session (3) of non-specific contextual fear was conducted on the next day. The tone test (4) took place on the following day. (E) Percentage of freezing during the recent (1d) contextual fear test. (F) Percentage of freezing during the first tone presentation of the recent (3d) cued fear memory test. Dotted line indicates tone presentation. (G) Percentage of freezing during the remote (25d) contextual fear test. (H) Percentage of freezing during the first tone presentation of the remote (27d) cued fear memory test. Dotted line indicates tone presentation. (I) Mean percentage of freezing during recent (1d) and remote (25d) contextual fear memory tests. \*\*  $p < 0.01$ , statistically significant difference (Newman-Keuls). (J) Mean percentage of freezing during the 2-min period following the first 2 tone presentations during recent (3d) and remote (27d) cued fear memory tests.

CM, central medial thalamic nucleus; IMD, intermediodorsal thalamic nucleus; MDL, lateral mediodorsal thalamic nucleus; MDM, medial mediodorsal thalamic nucleus; PC, paracentral thalamic nucleus; Po, posterior thalamic nucleus; pRe, perireuniens thalamic nucleus; PV, paraventricular thalamic nucleus; Sub, submedius thalamic nucleus; VL, ventrolateral thalamic nucleus; VM, ventromedial thalamic nucleus; VPL, ventral posterolateral nucleus.

ReRh lesion had no effect on freezing behavior across the conditioning session (Figure 1C,  $F(1, 54) < 1.0$ ,  $p = 0.98$ ), suggesting that the lesion did not modify stress response and foot-shock sensitivity in rats. This was in line with previous results showing that ReRh lesion or inactivation had no effect on anxiety in the elevated plus maze, on open field activity, and paw pressure threshold (Loureiro et al., 2012; Cholvin et al., unpublished data). Freezing behavior during conditioning was also similar between 1d- and 25d-delay rats within each group (sham and ReRh).

The analysis of the percentage of freezing during the contextual fear memory test (Figure 1I) revealed no significant effect of the Group ( $F(1, 52) = 2.947$ ,  $p = 0.092$ ), but a significant effect of the Delay ( $F(1, 52) = 12.54$ ,  $p = 0.0008$ ), and a significant



interaction between Delay and Group ( $F(1, 52)=4.61, p=0.0365$ ). The Delay effect was due to the significantly higher freezing in the 25d Sham group as compared to the 1d Sham- and 1d ReRh lesion groups ( $p<0.001$ ), as shown by multiple comparisons. This increase of freezing in Sham rats after the long consolidation delay has been previously described by some authors (Poulos et al., 2016) and referred to a phenomenon called incubation (McAllister and McAllister, 1967). The interaction effect was due to a significant difference between the two 25d-delay groups (Sham vs Lesion) ( $p < 0.01$ ). This difference is shown in detail in figure 1G with the percentage of freezing across the 10-min test session.

The absence of difference between the two groups at the 1d-delay ( $F(1, 17)<1.0, p=0.7723$ ) indicates that the lesion had no effect on contextual fear memory encoding and recent memory retrieval. Thus, the significant difference between the two groups at the 25d-delay points to a specific effect of the ReRh lesion on remote contextual fear memory, either on consolidation processes and/or on remote memory recall.

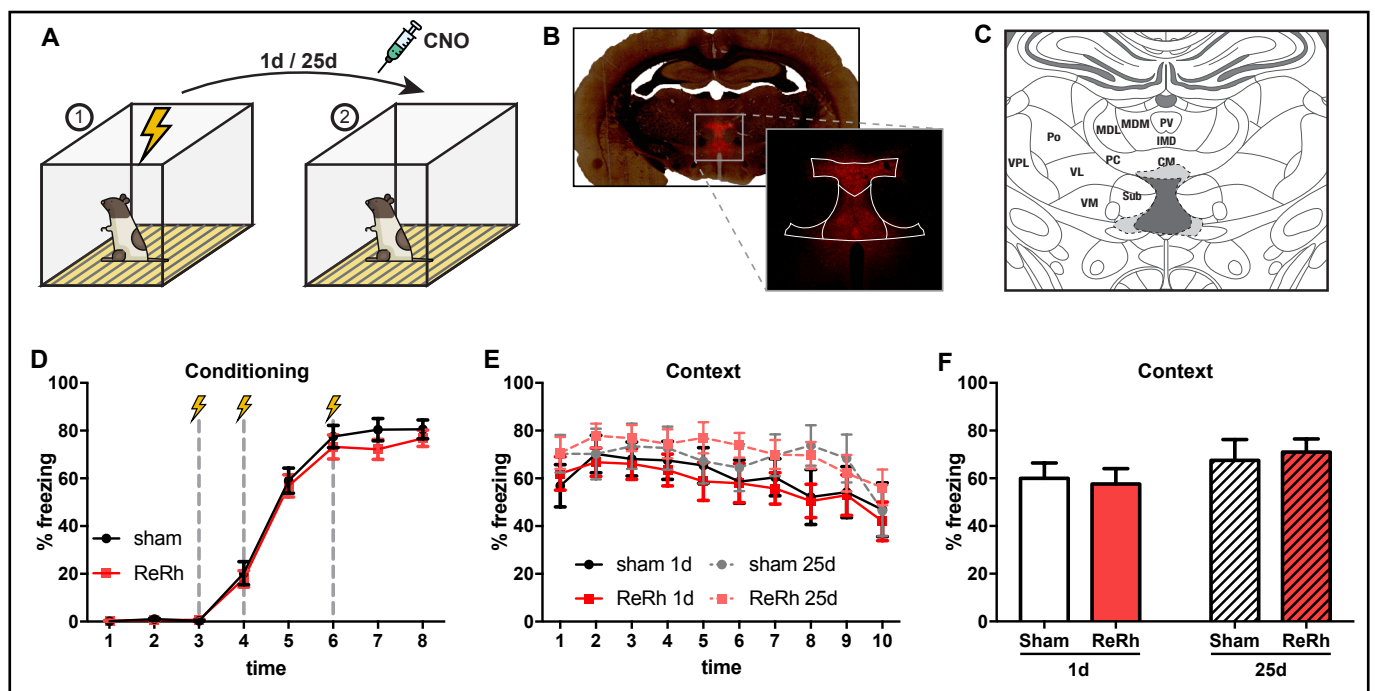
Concerning the percentage of freezing during the cued fear memory test, there was no significant effect of the Group ( $F(1, 52)<1.0, p=0.4315$ ), the Delay ( $F(1, 52)=1.585, p=0.2137$ ), and no interaction between both factors ( $F(1, 52)<1.0, p=0.8977$ ). Freezing behavior was similar across groups and delays (Figure 1J). Responses to the first presentation of the tone at each delay is shown in figures 1F and 1H.

The absence of effect of the ReRh lesion on cued fear regardless of the delay indicates that the ReRh are not necessary for cued fear memory encoding, consolidation and retrieval.

Altogether, our behavioral data obtained after ReRh lesion point to a specific implication of the ReRh in remote contextual fear memory expression, either in memory consolidation and/or remote memory retrieval. Next, the implication of the ReRh in remote contextual fear memory retrieval was further investigated using a DREADD chemogenetic approach.

## Experiment 2: Chemogenetic ReRh inactivation did not affect contextual fear memory retrieval

As for excitotoxic lesions, viral infections were considered acceptable if they included >50% of the ventral midline thalamus (Reuniens, Rhomboid and peri-Reuniens nuclei combined) and at least 15% of each nucleus (Re, Rh, right pRe and left pRe). Figure 2C shows the largest and smallest ReRh infections that were included in the behavioral analyses. Final sample sizes were as follows: 1d group,  $n_{\text{ReRh}} = 17$ ,  $n_{\text{Sham}} = 9$ , 25d group,  $n_{\text{ReRh}} = 14$ ,  $n_{\text{Sham}} = 9$ .



**Figure 2: DREADD inactivation of the ReRh during contextual fear memory retrieval**

(A) Schematic representation of the contextual fear memory protocol. Rats underwent one fear conditioning session (1) 1d or 25d before the contextual fear memory test (2). Rats were injected with CNO 40 min prior to the beginning of the memory test. (B) Photomicrograph showing a typical example of ReRh viral infection, visualized via mCherry fluorescence. (C) Schematic representation of the smallest (dark gray) and largest (light gray) infections of the ventral midline thalamic nuclei. (D) Percentage of freezing behavior across fear conditioning sessions (grouped 1d and 25d rats). Dotted lines indicate the 3 foot shocks. (E) Percentage of freezing behavior during recent (1d) and remote (25d) contextual fear memory tests. (F) Mean percentage of freezing during recent (1d) and remote (25d) contextual fear memory tests. Abbreviations Figure 2C: see legend of Figure 1.

For the 31 ReRh HM4 rats that matched the inclusion criteria, there was a 73% median infection in the Re, 80% in the Rh, 49% in the left pRe and 44% in the right pRe. Interestingly and conveniently, the AAV8 with CaMK2 $\alpha$  promotor did not produce any infection in the submedialis thalamic nucleus. Infections were restricted to the targeted structures, except for some rats where small infections could be found alongside the canulae tract in the centromedian nucleus of the thalamus (median: 13%).

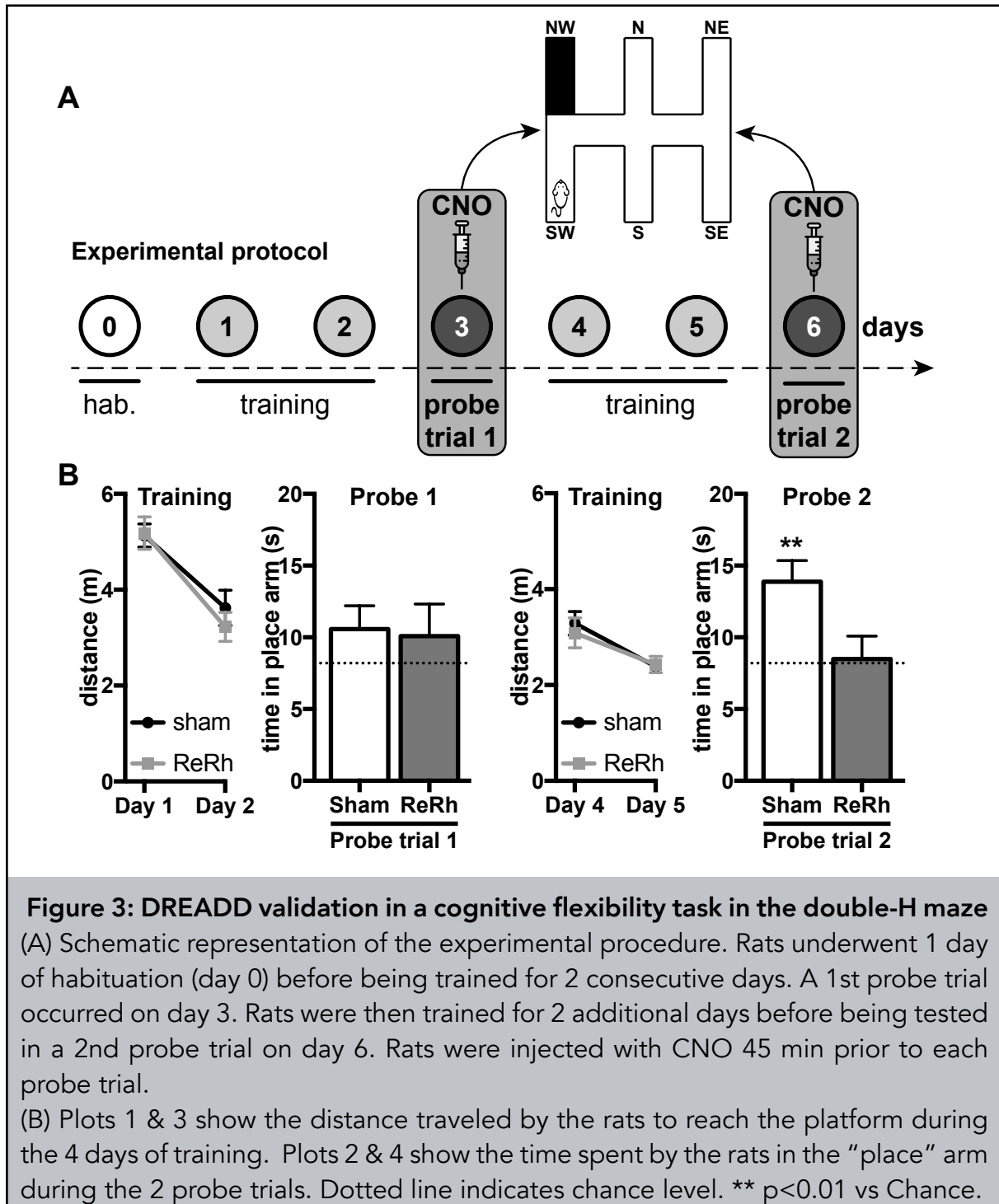
To investigate the role of the ventral midline thalamus in contextual fear memory retrieval, we tested whether a ReRh DREADD inactivation prior to fear memory testing disrupted the expression of contextual fear. In this experiment, rats were conditioned as described in the methods and tested for contextual fear memory either 1d (recent memory) or 25d (remote memory) later (Figure 2A). 40 min before the beginning of the test session, all rats (ReRh & Sham) were injected with CNO (1mg/kg i.p.).

Percentage of freezing were similar between virus-injected and Sham rats across the conditioning session (Figure 2D,  $F(1,47) < 1.0$ ,  $p = 0.4435$ ). Freezing behavior during conditioning was also similar between 1d- and 25d-delay rats within each group (sham and ReRh).

The analysis of the freezing behavior across the 10-min test sessions (Figures 2E, F) revealed no significant effect of the Group ( $F(1, 45) < 1.0$ ,  $p = 0.9385$ ), the Delay ( $F(1,45) = 2.207$ ,  $p = 0.1443$ ), and no interaction between both factors ( $F(1, 45) < 1.0$ ,  $p = 0.6823$ ). ReRh chemogenetic inactivation during the test sessions failed to produce any deficit, indicating that these nuclei are not necessary for contextual fear memory retrieval.

## DREADD validation in a cognitive flexibility task in the double-H maze

To verify the behavioral validity of the DREADD approach, we used a cognitive flexibility task known to be dependent upon the integrity of ReRh (Cholvin et al., 2013). To do so, 8 Sham rats and 9 ReRh (HM4) rats were trained and tested in the double-H maze (see protocol in Figure 3A) 2 weeks after the contextual fear test, before being euthanized for histological verification.



During training, the distances swum before reaching the platform decreased over days ( $F(3, 51)=35.45, p<0.0001$ ), indicating learning (Figure 3B). There was no overall significant difference among the two groups, as attested by the absence of a significant Group effect ( $F(1, 17)<1.0, p=0.5309$ ) and no interaction between the two factors ( $F(3, 51) <1.0, p=0.8230$ ). Final training performance levels (day 5) did not differ among groups. Analysis of latencies yielded similar conclusions (data not shown).

During the first probe trial, the very first swim sequence consisted of a succession of right and left turns, leading 84% of rats to the N arm (response arm), whereas 16% directly swam to the former platform location (i.e., to the NE arm – place arm), with no significant difference among groups ( $\chi^2((1, N=19)=0.5322, p=0.4657$ ). During the second probe trial, the behavioral pattern was significantly different between Sham and ReRh (HM4) rats ( $\chi^2((1, N=19)=5.143, p=0.0233$ ). Forty-four % of Sham rats, but no ReRh (HM4) rat, directly reached the former platform location (i.e., to the NE arm, place arm) while 90% of ReRh (HM4) vs 56% of Sham rats directly reached the N arm (response arm),.

In terms of relative amount of time spent in the NE and N arms, there was no Group difference during the first probe trial (NE arm:  $t(17)<1.0, p=0.8616$ ; N arm:  $t(17)<1.0, p=0.5873$ , Figure 3B Probe 1). However, clear-cut differences emerged during the second probe trial (Figure 3B, Probe 2). In Sham rats, the time spent in the NE arm was significantly above chance (one sample t-test,  $t(8)=3.848, p=0.0049$ ), but it was not the case for ReRh (HM4) rats ( $t(9)<1.0, p=0.8590$ ). Sham rats spent significantly more time than ReRh (HM4) rats in the NE arm ( $t(17)=2.47, p=0.0244$ ).

The analysis of the time spent in the response arm (N) showed no significant effect of inactivation, both Sham and ReRh (HM4) rats performance were not different from chance level (Sham:  $t(8)=1.541, p=0.16$ ; ReRh (HM4) :  $t(9)=0, p>0,999$ ).

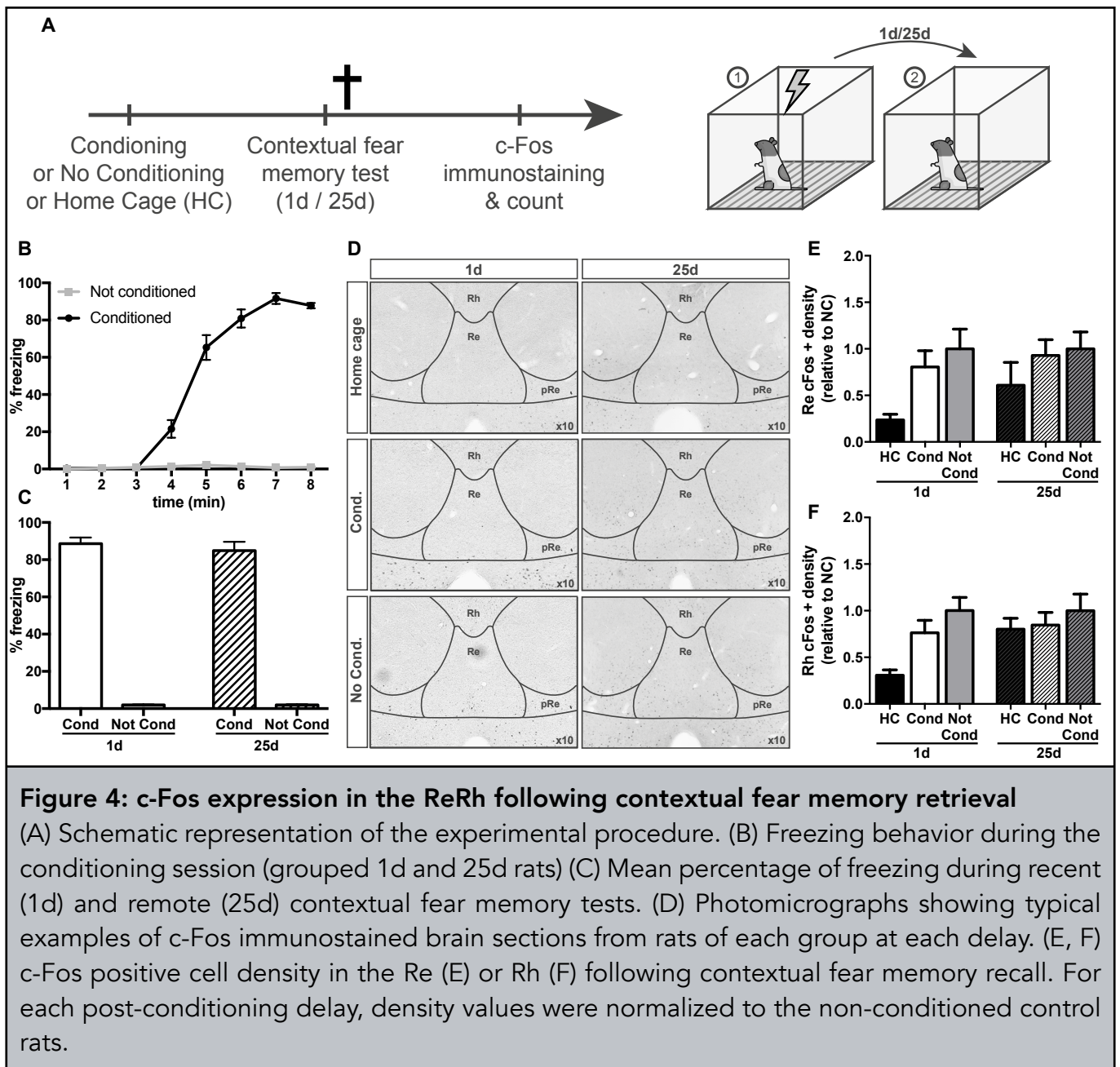
Thus, after four learning days, ReRh inactivated rats failed to search for the platform as accurately as did Sham rats during the second probe trial, clearly showing that the DREADD approach was efficient and triggered behavioral performance deficit in a ReRh-dependent task (Cholvin et al., 2013).

### Experiment 3: c-Fos expression was not increased in the ReRh following contextual fear memory retrieval

To confirm the inactivation data indicating an absence of implication of the ventral midline thalamus in contextual fear memory retrieval, we analyzed the immediate early gene c-fos expression following the probe test. Rats were either conditioned as described in the methods, or not conditioned (no foot-shock during the conditioning session) before being tested either 1d or 25d later and euthanized 90 min after the fear memory test. A separate group of rats remained in their home cage during the entire procedure (HC). Sample sizes were as follows: 1d groups,  $n_{\text{Cond}} = 8$ ,  $n_{\text{NotCond}} = 8$ ,  $n_{\text{HC}} = 4$ , 25d groups,  $n_{\text{Cond}} = 8$ ,  $n_{\text{NotCond}} = 8$ ,  $n_{\text{HC}} = 4$ .

As expected, non-conditioned rats did not exhibit any freezing behavior during the conditioning and test sessions. On the contrary, conditioned rats showed high freezing behavior during the memory tests, regardless of the delay (Figures 4B-C).

ANOVA analysis of normalized c-Fos expression in the Reuniens (Figure 4E) and Rhomboid nuclei (Figure 4F) revealed a significant effect of the Group (Reuniens:  $F(2,33)=3.701$ ,  $p=0.0355$ ; Rhomboid:  $F(2,33)=3,708$ ,  $p=0.0353$ ) but not of the Delay (Reuniens:  $F(1,33)=1.006$ ,  $p=0.323$ ; Rhomboid:  $F(1,33)=2.297$ ,  $p=0.139$ ) and no interaction between both factors (Reuniens:  $F(2,33)<1.0$ ,  $p=0.689$ ; Rhomboid:  $F(2,33)=1.188$ ,  $p=0.318$ ). The Group effect is due to the significantly lower c-fos expression in the home cage (HC) rats, as compared to the non-conditioned rats in each nucleus at the 1-day delay (Newman-Keuls,  $p<0.05$ ). Post-hoc analysis revealed no difference in the number of c-Fos positive cells between conditioned and non-conditioned rats, regardless of the delay and structure. This result indicates an absence of implication of the ReRh in contextual fear memory retrieval, confirming DREADD inactivation data.



## Discussion

The present study aimed to provide a better understanding of the role of the ReRh in memory processes, particularly in fear memory persistence. Excitotoxic ReRh lesions, which prevented neither encoding nor recent memory retrieval, impaired remote memory performance in a contextual fear task. Importantly, the lesions had no effect on cued fear learning and retrieval, whatever the post-acquisition delay. In addition, after drug-free acquisition, functional reversible ReRh inactivation had no impact on contextual fear memory retrieval, and c-Fos expression was not increased in the ReRh during retrieval, be it for recent or remote contextual memory. Our results show a specific implication of the ReRh thalamic nuclei in contextual fear memory persistence in rats, most likely due to their involvement in offline systemic consolidation processes.

### Implication of the ReRh in fear memory processes

Traumatic memories heavily impinge on the quality of life and are extremely persistent, since remembrance of the original traumata commonly occurs after months in rodents and after years in humans suffering from post-traumatic stress disorder. Elaborating effective treatment options for remote traumata requires a good understanding of the neural substrates of fear memory persistence (Tsai and Graff, 2014).

Whereas the respective implications of the hippocampus (HP), amygdala and anterior cingulate cortex in fear memory processes are now well documented, the implication of the thalamic ReRh nuclei has been a subject of great interest only for the past 5 years. Combining various approaches, Xu and Südhof (2013) showed that the Re nucleus is a key member of a brain network controlling fear memory specificity and generalization, alongside with the HP and mPFC. Their results indicate that neuronal activity within the Re nucleus during or shortly after memory encoding determines the specificity of memory attributes for a particular context by processing information from the mPFC to the HP. Recently, Ramanathan et al. (2018a) yielded similar results:



rats that underwent fear conditioning after muscimol injection within the Re nucleus froze significantly more than saline-injected controls when tested in a different context 24h later.

Here, we show a specific implication of the ReRh in contextual fear memory persistence at a remote time-point. The fact that DREADD silencing of the ReRh nuclei during contextual testing did not, in our study, produce any memory deficit shows that these nuclei are not required for retrieval of the context, and thus could be only necessary during offline consolidation processes. Troyner et al. (2018) also described an implication of the Re nucleus in post-learning consolidation processes but surprisingly they found that muscimol injection into the Re nucleus directly after conditioning increased contextual freezing level 21 days later. The Re nucleus is also necessary for online reconsolidation of remote contextual fear (Sierra et al., 2017). Our experiments showed no effect of the ReRh lesion on cued fear memory, whatever the delay between the conditioning session and the tone test. Similarly, Ramanathan et al., (2018a) showed no effect of ReRh inactivation on cued fear acquisition and retrieval at a recent time-point. Cued fear acquisition and retrieval engage the amygdala and do not require the hippocampus (Phillips and LeDoux, 1992; Bergstrom, 2016). Thus, the ReRh do not seem to be involved in hippocampo-independent memory processing.

The mPFC, particularly the IL and PL subregions, plays a crucial role in fear memory extinction learning (Morgan et al., 1993; Giustino and Maren, 2015; Rozeske et al., 2015). Given the strong relationship between these structures and ReRh, the implication of the ReRh in fear extinction has recently been investigated. Silva et al. (2018) used c-fos imaging to generate a brain activation map upon remote fear memory attenuation in mice. They showed that remote fear memory attenuation induced c-fos expression in the Re nucleus, as well as the PL, the basolateral amygdala, and ventral hippocampus (CA1, CA3). The implication of the ReRh in fear memory extinction has been recently confirmed by inactivation approaches (Ramanathan et al., 2018b; Troyner et al., 2018).

## **The ReRh, key actors of systems consolidation of episodic-like memory**

The ReRh are ideally located to be a key relay between the HP and mPFC, allowing a bidirectional information flow, hypothesized to be necessary for system level consolidation (Varela et al., 2014). Here, we show that ReRh lesion alters remote but not recent contextual fear memory, and that inactivating the ReRh during retrieval has no effect on memory performance, suggesting a role in systems consolidation of a memory. Our data extend/reinforce the role of these thalamic nuclei within a hippocampo-cortico-thalamic circuit necessary for memory persistence. Indeed, a prior study from our laboratory, had already pointed to a role of ReRh in consolidation processes, but the concerned memory was spatial. Excitotoxic lesion of the ReRh, which had no effect on task acquisition, prevented rats from retrieving the platform location after a 25- but not a 5-day post-acquisition delay in the Morris water maze (Loureiro et al., 2012). Davoodi et al. (2011) showed that immediately post-training inactivation (5 min, but not 90 and 360 min) of the Re by tetracaine injection impaired consolidation of a recent memory (24h) in a passive avoidance task. Using brain-wide c-fos mapping, Wheeler et al. (2013) extensively investigated the neuronal networks underlying remote fear memory in mice and showed that the Re appears to be a key hub region, likely to influence overall network function during remote memory expression. Among the other regions also proposed to be such hubs are the hippocampus (mainly CA1) and medial prefrontal cortex (mainly the anterior cingulate and prelimbic sub region). In a follow-up study, Vetere et al. (2017) showed that chronic DREADD inactivation of the Re immediately after fear conditioning, by giving mice continuous access to CNO in their drinking water, impaired remote memory performance. This result confirms the crucial implication of the Re in remote fear memory, but did not establish whether its implication concerned (offline) consolidation and/or (online) memory retrieval processes. Our results are in favor of the first possibility and exclude the second one. It has recently been shown that the Re controls hippocampal-prefrontal oscillatory synchrony in the delta and gamma band. During slow wave sleep, a key brain state for memory consolidation (Diekelmann and Born, 2010; Dudai et al., 2015; Rasch and

Born, 2013), synchronized gamma bursts occur within the HP and mPFC, providing a functional substrate for information transfer between these structures. Reversible inactivation of the Re decreased the co-occurrence of gamma bursts between HP and mPFC, and fully abolished HP-mPFC gamma synchronization (Ferraris et al., 2018). Roy et al. (2017) showed that lidocaine injection in the Re nucleus decreased coherence between mPFC and HP specifically in the 2-5Hz (delta) band. This low frequency oscillation is thought to provide a synchronizing signal from the mPFC to the HC via the Re nucleus. It is likely that consolidation impairments caused by ReRh lesion are related to its (Re) implication in hippocampal-prefrontal oscillatory synchrony during post-learning slow wave sleep. Moreover, Sierra et al. (2017) showed that lidocaine infusion into the Re nucleus inhibited LTP induction in the CA1-ACC pathway, indicating that this nucleus is a necessary component of the circuit underlying systems consolidation.

## **Conclusion**

Recent evidence, including the data of the current study, has pointed to a crucial role of the ventral midline thalamus in contextual fear memory specificity, extinction and persistence. Here, we show that ReRh nuclei are necessary for offline consolidation of a contextual fear memory in rats. A similar conclusion has been drawn from our previous study taxing spatial memory (Loureiro et al., 2012), another hippocampus-dependent type of memory. Thus, the present data show that the necessity of the ventral midline thalamus to systems-level consolidation is not limited to a particular type of memory but could be more general.

Altogether, the key implication of the ReRh nuclei in fear memory consolidation and extinction suggest that this structure might be a target of choice for future therapeutic approaches against traumatic memories.

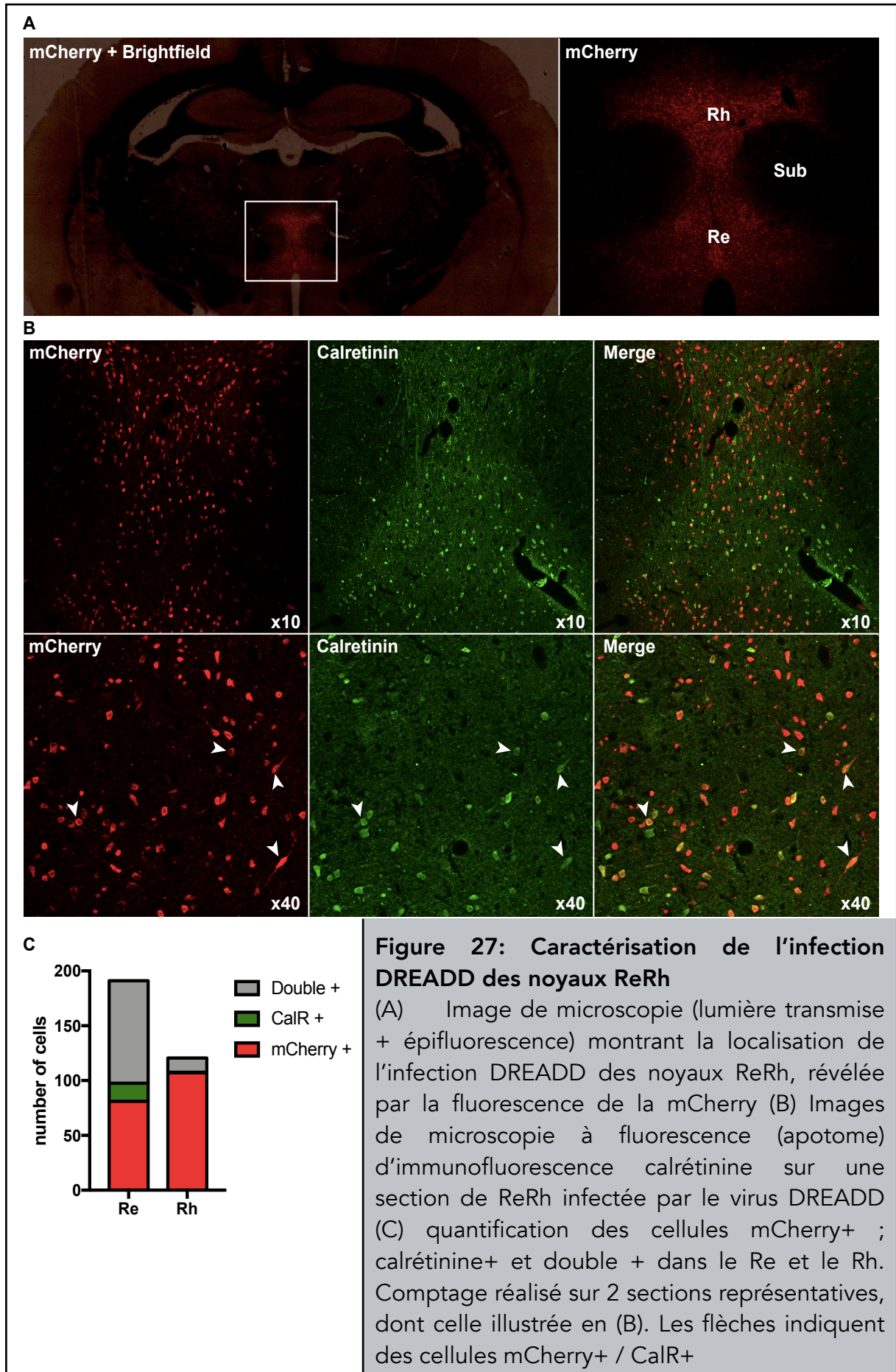
## **Acknowledgements**

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR grant 14-CE13-0029-01), the University of Strasbourg, the CNRS, INSERM, and by the Paul Mandel Fund which provided a fellowship to EQ. The authors acknowledge Olivier Bildstein, Daniel Egesi and George Edomwony for their precious contribution to animal care, as well as Laura Durieux, Elodie Panzer, Thibault Delon, Shirley Ann Lazzara, Laurine Boch and Lomita Louis-Thayanand for providing appreciable technical help.

### **3- Données supplémentaires : caractérisation de l'infection DREADD des noyaux ReRh**

Les techniques récentes basées sur l'utilisation de vecteurs viraux, telles que l'optogénétique et le DREADD présentent l'avantage de pouvoir cibler des populations neuronales précises, à l'inverse des techniques pharmacologiques classiques (muscimol, lidocaïne par exemple). Des stratégies particulières utilisant plusieurs virus, basées sur le système Cre-Lox par exemple, sont fréquemment utilisées pour cibler des voies de projections du système nerveux. Même sans avoir recours à ce type d'approche, un ciblage est possible par l'utilisation d'un sérotype viral et d'un promoteur particulier. En effet les différents sérotypes présentent des capacités d'infection très variables selon les structures cérébrales et l'utilisation d'un promoteur d'intérêt permet de cibler une population cellulaire spécifique (neurones excitateurs, inhibiteurs, cellules gliales par exemple). Dans le cadre de ce type d'approche il est donc nécessaire de valider la capacité des virus utilisés à infecter efficacement et de façon relativement spécifique la population cellulaire ciblée.

Dans notre cas, l'objectif de l'approche DREADD est d'induire une inactivation fonctionnelle des noyaux ReRh, et donc d'empêcher la communication entre ceux-ci et leurs structures cibles, notamment l'HP et le CPFm. Pour cela un virus codant le récepteur hM4Di, un récepteur couplé à une protéine G inhibitrice, a été injecté stéréotaxiquement dans les noyaux ReRh. L'expression de ce récepteur est contrôlée par le promoteur  $CaMK2\alpha$ , exprimé spécifiquement par les neurones thalamiques excitateurs (Cruikshank et al., 2010; Wang et al., 2013). Ce promoteur a été choisi car les projections du noyau Re vers l'HP et le CPFm sont de nature excitatrice (Bokor et al., 2002; Di Prisco and Vertes, 2006). De plus les travaux de Bokor ont montré que la majorité des neurones de projection du noyau Re vers l'HP exprime la calrétinine, une protéine de liaison au calcium.



La figure 27A présente l'image caractéristique d'une infection des noyaux ReRh par le virus DREADD utilisé (AAV8-CaMK2a-hM4Di-mCherry). L'observation de l'expression de la mCherry, synonyme d'infection virale, montre un marquage très dense et spécifique des noyaux ciblés. En effet de façon surprenante et très intéressante aucun neurone infecté n'est retrouvé dans les noyaux submedius, qui bordent les noyaux ReRh de part et d'autre.

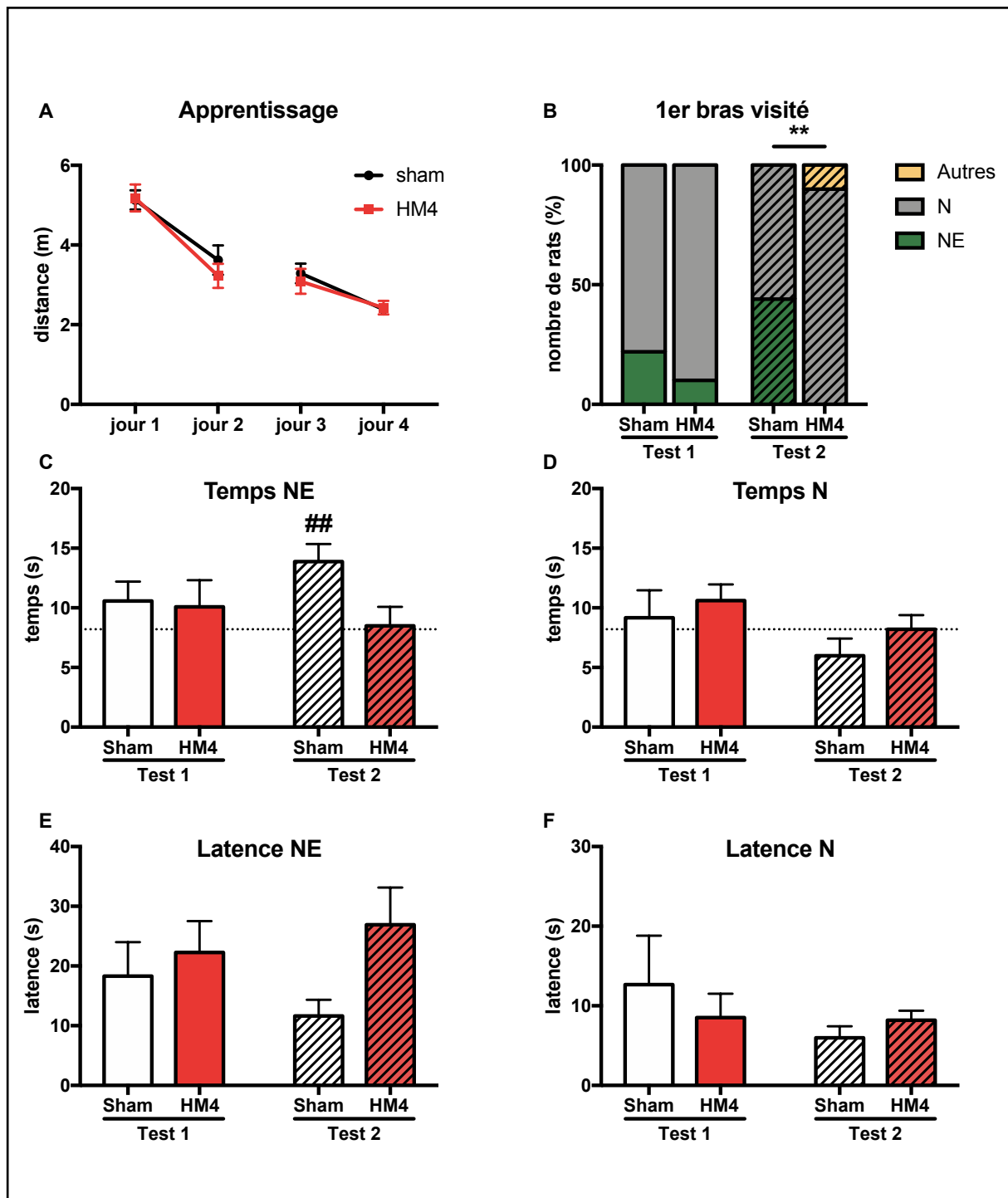
Les immunofluorescences anti-calrétinine (Figure 27B) réalisées sur des sections des noyaux ReRh infectées mettent en évidence 2 populations neuronales majoritaires: les cellules uniquement mCherry positives et les cellules double positives (mCherry/calrétinine). En effet les quantifications réalisées sur 2 sections représentatives (Figure 27C) indiquent que dans le noyau Re, 49% des neurones marqués (93/191) sont doubles positifs ; 42% (81/191) sont seulement mCherry positifs ; et 9% (17/191) sont seulement calrétinine positifs. Dans le noyau Rh, beaucoup moins de neurones exprimant la calrétinine sont présents et il y a donc une majorité de neurones seulement mCherry positifs (89% - 107/120) et quelques neurones double positifs (11% - 13/120). Aucun neurone uniquement calrétinine positif n'est observé dans le noyau Rh. Ces observations nous donnent toutes les raisons de penser que l'approche virale choisie est efficace pour inactiver les neurones de projection excitateurs présents dans les noyaux ReRh, bien que des études complémentaires utilisant des traceurs rétrogrades soient nécessaires pour valider de façon factuelle les différentes voies de projection affectées. Il serait par exemple intéressant d'injecter des traceurs rétrogrades dans l'HP et le CPFm simultanément à l'injection de virus dans les noyaux ReRh, puis après quelques semaines de vérifier la colocalisation entre les traceurs et l'infection dans les noyaux ReRh.

## 4- Données supplémentaires : validation du DREADD dans le labyrinthe en double H

Par soucis de clarté, seules les données concernant l'apprentissage et le temps passé dans le bras spatial au cours des tests ont été illustrées dans le cadre de l'article. Les données supplémentaires concernant le temps passé dans le bras procédural, les latences d'accès aux bras et le premier bras visité sont illustrées en figure 28.

Comme décrit précédemment, la diminution significative de la distance parcourue par les animaux pour atteindre la plateforme au fil des jours indique l'apprentissage (figure 28A). Pour 84% des animaux, la première séquence motrice au cours du premier test de rappel est la succession d'un virage à droite suivi d'un virage à gauche, les conduisant dans le bras N (figure 28B). Les 16% restants nagent directement dans le bras NE, ancienne position de la plateforme. Aucune différence n'est observée entre les groupes concernant le premier bras visité pendant le premier test ( $\chi^2(1, N=19)=0,53$  ;  $p=0,47$ ). Au cours du second test en revanche, le comportement des animaux sham et HM4 est significativement différent ( $\chi^2(1, N=19)=5,14$  ;  $p=0,023$ ) : 44% des rats sham, mais aucun rat HM4, vont directement dans le bras NE, ancien emplacement de la plateforme. 90% des rats HM4 visitent le bras N en première intention, contre 56% des rats sham. Aucune différence n'est observée entre les rats sham et HM4 concernant le temps passé dans les bras NE (figure 28C) et N (figure 28D) au cours du premier test (NE:  $t(17)=0,18$  ;  $p=0,86$ ; N:  $t(17)=0,55$  ;  $p=0,59$ ). En revanche pendant le deuxième test, des différences marquantes émergent entre les groupes : les rats sham passent significativement plus de temps que le hasard dans le bras NE ( $t(8)=3,85$  ;  $p=0,0049$ ), contrairement au rats HM4 ( $t(9)=0,18$  ;  $p=0,86$ ). Les rats sham passent d'ailleurs significativement plus de temps que les HM4 dans le bras NE ( $t(17)=2,47$  ;  $p=0,02$ ). En revanche l'analyse du temps passé dans le bras N ne montre aucun effet de l'inactivation, ni les rats sham ni les HM4 ne passe plus de temps que le hasard dans ce bras (sham:  $t(8)=1,54$  ;  $p=0,16$ ; HM4:  $t(9)=0$  ;  $p>0,99$ ).





**Figure 28: Implication du ReRh dans le changement de stratégie en double H**

(A) Distances parcourues par les rats pour atteindre la plateforme au cours des 4 sessions d'entraînement (B) Premier bras visité au cours des tests de rappel (C) temps passé dans le bras NE/spatial (D) temps passé dans le bras N/procédural (E) latence d'entrée dans le bras NE (F) latence d'entrée dans le bras N. Les lignes pointillées indiquent le niveau du hasard. **\*\*** $\chi^2$   $p < 0,01$  ; **##**t-test vs hasard  $p < 0,01$

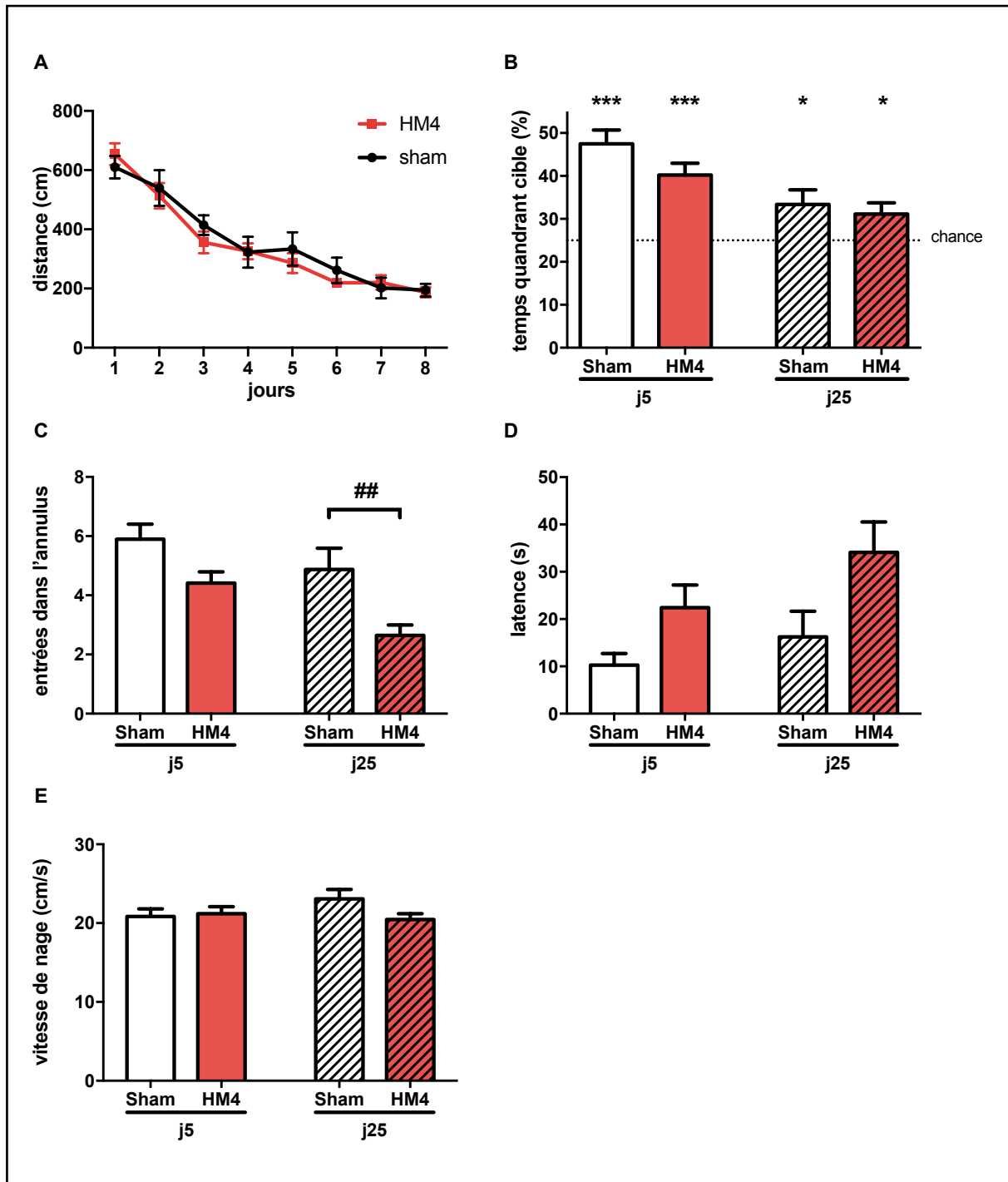
L'analyse des latences d'entrée dans le bras N (figure 28F) ne révèle aucun effet de l'inactivation, indifféremment du test considéré ( $F(1,17)= 0,098$  ;  $p=0,76$ ). Conformément aux observations concernant le premier bras visité par les rats, l'analyse ANOVA de la latence d'entrée dans le bras NE (figure 28E) révèle une tendance à l'augmentation de la latence chez les rats HM4 ( $F(1,17)=3,94$  ;  $p=0,064$ ). Cette tendance à l'augmentation est principalement due à l'augmentation de latence au cours du 2ème test de rappel (+15,3 secondes chez les rats HM4 en comparaison au rats sham), bien que cette différence ne se révèle pas significative lors de la comparaison statistique post-hoc.

Ainsi, après 4 jours d'apprentissage, l'inactivation des noyaux ReRh affecte la capacité des rats à chercher la plateforme efficacement dans le bras spatial. En effet les rats sham sont capables de passer d'une stratégie procédurale à une stratégie spatiale pendant le test de rappel, capacité qui est altérée par l'inactivation des noyaux ReRh chez les rats HM4. Cette expérience a permis de confirmer l'implication des noyaux ReRh dans les processus de changement de stratégie, ce qui avait mis en évidence par Cholvin et al. en 2013, par des approches pharmacologiques classiques. Par ailleurs ces résultats confirment l'efficacité de l'approche DREADD pour inactiver les noyaux ReRh et produire des effets comportementaux significatifs chez le rat. Ainsi les résultats négatifs obtenus dans les expériences de conditionnement de peur peuvent être interprétés comme tels.

## 5- Implication des noyaux ReRh dans le rappel d'une mémoire spatiale

L'implication des noyaux de la ligne ventrale médiane du thalamus dans les processus de mémoire spatiale a précédemment été mise en évidence par des approches lésionnelles et d'inactivation réversible (Davoodi et al., 2009 ; Loureiro et al., 2012 ; Cholvin et al., 2013). En effet ces 3 études, bien qu'aillant des résultats partiellement discordants, indiquent toutes une implication des noyaux ReRh dans la tâche de piscine de Morris. Les travaux de Loureiro réalisés au sein du laboratoire ont mis en évidence l'implication des noyaux ReRh dans la persistance du souvenir spatial en mémoire ancienne. En effet une lésion préapprentissage des noyaux ReRh n'a pas d'effet sur les performances des rats lors de l'acquisition et du test de rappel au délai de 5 jours mais empêche le rappel de l'information spatiale à 25 jours. Dans cette étude, l'inactivation réversible des noyaux ReRh par injection de lidocaïne préalablement au test de rappel ne modifie pas les performances des animaux, à J5 comme à J25. Ces résultats indiquent donc une implication spécifique des noyaux ReRh dans les processus « *offline* » de consolidation à long terme de la mémoire spatiale. Dans les études de Davoodi et de Cholvin en revanche, l'inactivation des noyaux ReRh pendant le test de rappel (à un délai de 24h dans les 2 cas) altère les performances mnésiques des rats. En effet les animaux inactivés passent significativement moins de temps que les contrôles dans le quadrant cible. Ces résultats indiquent une implication des noyaux ReRh dans le processus « *online* » de rappel de l'information spatiale.

Bien que l'implication des noyaux ReRh dans la mémoire spatiale de référence soit désormais bien établie, la nature exacte de cette implication reste donc à déterminer. L'objectif de cette expérience est donc d'utiliser la technologie DREADD pour élucider le rôle « *online* » et/ou « *offline* » des noyaux ReRh en piscine de Morris. Pour cela, des rats ont subit une injection soit de virus DREADD (AAV8-CaMK2a-hM4Di-mCherry) soit de PBS (rats sham) dans les noyaux ReRh environ 2 semaines avant de commencer les 8 jours d'entraînement en piscine de Morris.



**Figure 29 : Inactivation DREADD des noyaux ReRh pendant le test de rappel en piscine de Morris**

(A) distance parcourue pour rejoindre la PF au cours des 8 jours d'apprentissage (B) Temps passé dans le cadran cible lors des tests de rappel en mémoire récente (5j) ou ancienne (25j) (C) nombre d'entrées dans l'annulus, cercle virtuel de 10 cm autour de la position de la plateforme (D) latence pour rejoindre la position virtuelle de la plateforme (E) vitesse de nage. t-test vs chance : \* p<0,05 ; \*\*\* p<0,001; Newman-Keuls : ## p<0,01

Ces animaux ont ensuite été testés soit après un délai de 5 jours (mémoire récente) soit de 25 jours (mémoire ancienne). Tous les animaux ont reçu une injection de CNO 45 minutes avant le test de rappel. Cette approche vise à étudier l'effet d'une inactivation réversible des noyaux ReRh sur le rappel « *online* » de l'information spatiale.

Tous les animaux apprennent la localisation de la plateforme au cours des 8 jours d'entraînement (Figure 29A), ce qui se traduit par une diminution significative de la distance parcourue pour atteindre la plateforme (Effet temps :  $F(7,329)=42,19$  ;  $p<0,0001$ ). L'analyse ANOVA ne révèle aucune différence entre les animaux sham et HM4 au cours de l'apprentissage (Effet groupe  $F(1,47)=0,30$  ;  $p=0,59$  – Interaction temps x groupe :  $F(7,329)=0,54$  ;  $p=0,80$ ). L'expression du virus DREADD dans les noyaux ReRh en l'absence de CNO n'altère donc pas les capacités d'apprentissage spatial en piscine de Morris.

Au cours du test de rappel, à J5 comme à J25, les rats sham et HM4 passent significativement plus de temps que le hasard (25%) dans le quadrant cible (Sham J5 :  $t(9)=7,09$  ;  $p<0,0001$  - HM4 J5 :  $t(16)=5,60$  ;  $p<0,0001$  – Sham J25 :  $t(7)=2,45$  ;  $p=0,044$  – HM4 J25  $t(13)=2,36$  ;  $p=0,034$ ). L'inactivation du ReRh au cours du test de rappel ne semble donc pas altérer la capacité des rats à rappeler la localisation de la plateforme, en mémoire récente comme en mémoire ancienne (Figure 29B).

En revanche, en mémoire récente comme en mémoire ancienne, les rats HM4 passent significativement moins souvent dans l'annulus, zone virtuelle de 31 cm de diamètre centrée sur la plateforme, que les rats sham (Effet inactivation  $F(1,45)=15,23$  ;  $p=0,0003$ ). La latence pour rejoindre la position virtuelle de la plateforme est supérieure pour les rats HM4 que pour les rats sham à J5 comme à J25 (Effet inactivation  $F(1,45)=7,20$ .  $p=0,010$ ). Cette augmentation de la latence et du nombre d'entrée dans l'annulus chez les rats dont les noyaux ReRh sont inactivés pendant le rappel semble indiquer une diminution de la précision du souvenir spatial. Ces altérations ne sont en rien dues à un effet de l'inactivation sur la motricité des rats, en effet la vitesse de nage est identique entre les groupes et aux différents délais (Effet

inactivation  $F(1,45)=1.36$  ;  $p=0.2481$  – Effet délai  $F(1,45)=0.58$  ;  $p=0.45$ ).

Ces résultats expérimentaux indiquent que quel que soit le délai (5j/25j), les noyaux ReRh ne sont pas indispensables pour le rappel de la localisation de la plateforme (pas de diminution du temps passé dans le quadrant cible) mais qu'ils semblent en revanche impliqués dans la précision de ce rappel (diminution du nombre d'entrées dans l'annulus et augmentation de la latence). Ces observations ne sont en accord avec aucun des travaux comparables préexistants, qui ne rapportaient soit pas d'effet de l'inactivation, soit au contraire un déficit de rappel. En revanche ces résultats s'inscrivent dans la continuité des travaux de Xu et Sudh f (2013), qui décrivent le noyau Re comme la structure centrale du réseau neuronal impliqué dans la spécificité de la mémoire et des processus de généralisation. Bien que leur étude ait été réalisé dans un paradigme comportemental très diff rent (conditionnement de peur au contexte) et soit focalisée principalement sur le rôle du noyau Re pendant l'encodage de l'information, il est tout à fait envisageable que les noyaux ReRh modulent également la précision du souvenir spatial au moment du rappel.

# **DISCUSSION & CONCLUSION**

# Discussion & conclusion

## Récapitulatif des résultats obtenus

Au cours d'une première série d'expériences, il a été mis en évidence qu'une lésion des noyaux ReRh n'affecte pas les performances des rats dans la tâche de transmission sociale de préférence alimentaire, et ce quel que soit le délai entre l'apprentissage et le test de rappel. Les noyaux ReRh ne semblent donc pas indispensables à l'encodage, la consolidation et le rappel d'une mémoire associative olfactive.

Une deuxième série d'expériences, qui fait l'objet d'un article en cours de soumission, a révélé qu'une lésion des noyaux ReRh affecte le niveau de *freezing* des rats lors d'un test de rappel d'une mémoire de peur conditionnée au contexte, spécifiquement au délai de 25 jours (mémoire ancienne) et non à 1 jour (mémoire récente). Dans des conditions similaires, la mémoire de peur au son n'est pas affectée par la lésion, quel que soit le délai. De plus, une inactivation pharmacogénétique des noyaux ReRh immédiatement avant le test rappel de peur au contexte ne modifie pas le comportement de *freezing* des animaux pendant celui-ci. En outre, le rappel de l'information de peur au contexte n'induit pas d'augmentation du nombre de neurones c-Fos positifs dans les noyaux ReRh. Ainsi, les noyaux ReRh semblent spécifiquement nécessaires à la persistance d'un souvenir contextuel en mémoire ancienne, et seraient donc impliqués dans les processus *offline* de consolidation systémique.

Une troisième série d'expériences, consistant en l'inactivation pharmacogénétique des noyaux ReRh préalablement aux tests de rappel (5j/25j) d'une mémoire spatiale en piscine de Morris, a révélé que les noyaux ReRh ne sont pas indispensables pour le rappel de la localisation de la plateforme (pas de diminution du temps passé dans le quadrant cible) mais qu'ils semblent en revanche impliqués dans la précision de ce rappel (diminution du nombre d'entrées dans l'annulus et augmentation de la latence d'accès à la position de la plateforme).



Une dernière expérience visant à valider l'approche pharmacogénétique DREADD comme méthode d'inactivation des noyaux ReRh dans une tâche spatiale de «*strategy shifting*» dans le labyrinthe en double H a permis, d'une part, de confirmer la validité de l'approche DREADD, puisque des résultats obtenus préalablement avec des méthodes d'inactivation pharmacologique « classique » ont été reproduits. D'autre part, cette expérience a confirmé l'importance cruciale des noyaux ReRh dans le processus cognitif de changement de stratégie spatiale (Cholvin et al 2013).

## **De la difficulté d'étudier la consolidation systémique**

### **L'approche lésionnelle**

Comme cela a été évoqué précédemment, la consolidation à l'échelle des systèmes correspond à la réorganisation progressive de la trace mnésique au sein des structures cérébrales sous-tendant le rappel à long terme d'un souvenir. Il s'agit d'un processus *offline*, considéré comme étalé dans le temps, puisqu'il survient potentiellement à tout moment entre la fin de l'encodage et le rappel de l'information. Cette nature «diffuse» de la consolidation systémique limite considérablement le nombre d'approches qui peuvent être utilisées pour étudier l'implication des structures cérébrales dans ce processus. Les deux approches les plus classiquement utilisées dans ce but sont l'inactivation réversible post-apprentissage et l'approche lésionnelle, le plus souvent réalisée avant l'apprentissage.

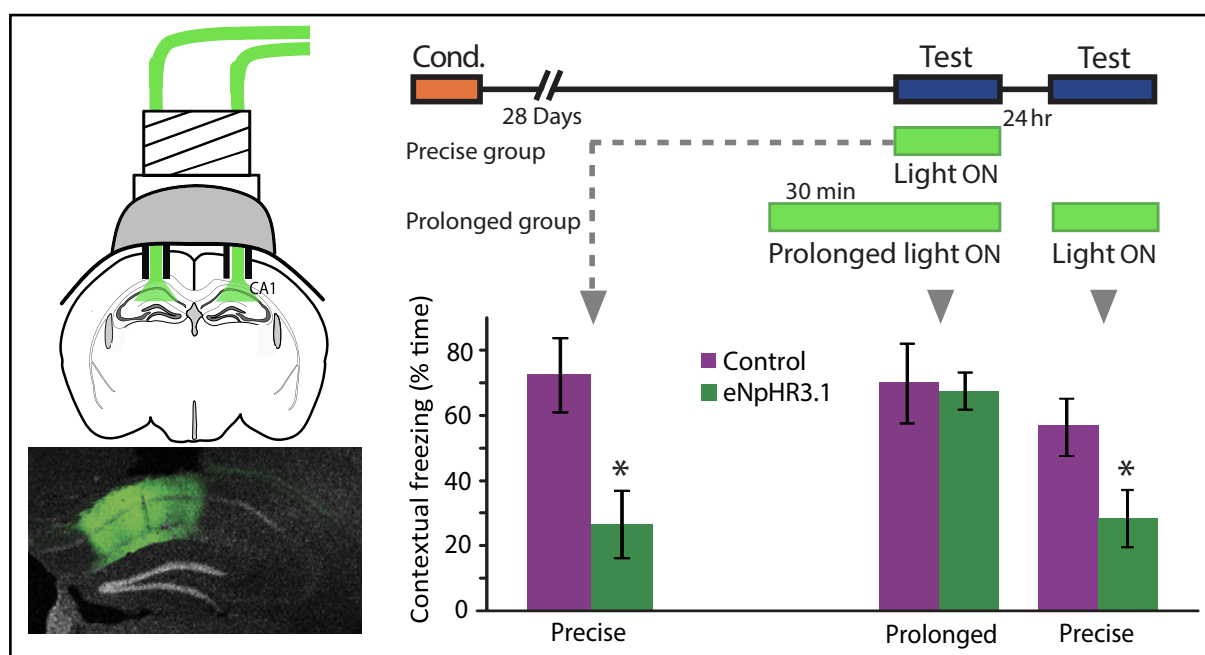
Les méthodes d'inactivation réversible présentent l'inconvénient évident d'être limitées dans le temps. En effet, les approches pharmacologiques « classiques » (muscimol, lidocaïne, CNQX, etc.) permettent des inactivations de quelques dizaines de minutes à quelques heures, mais ne couvrent ainsi qu'une fraction de la fenêtre de consolidation.

C'est notamment pour pallier à cette limite que l'approche lésionnelle est utilisée pour étudier la consolidation systémique depuis plusieurs années au laboratoire. La nature permanente de la lésion constitue à la fois un avantage, mais également un inconvénient majeur, de par l'absence de spécificité temporelle. C'est particulièrement vrai quand, comme dans notre cas, les lésions sont réalisées avant la phase d'apprentissage, puisqu'il est alors impossible d'identifier avec certitude les processus (encodage, consolidation ou rappel) affectés par la lésion. En effet, dans le cadre de nos expériences de conditionnement de peur au contexte, nous avons observé que la lésion des noyaux ReRh altère spécifiquement les performances en mémoire ancienne, suggérant un impact sur les processus de consolidation. Néanmoins, il ne peut être exclu que les déficits observés soient dus à une altération lors de l'encodage de l'information, ne se répercutant qu'après un délai important. Cette hypothèse est d'autant plus crédible qu'il a été montré que des mécanismes « d'étiquetage » précoces des réseaux corticaux surviennent pendant l'encodage de l'information et sont nécessaires à la formation d'une trace mnésique persistante (Bero et al., 2014 ; Lesburguères et al., 2011). En effet, il a par exemple été mis en évidence qu'un blocage de la neurotransmission glutamatergique dans le cortex orbito-frontal au moment de l'encodage dans une tâche de transmission sociale de préférence alimentaire provoque un déficit de rappel en mémoire ancienne (30 jours) mais pas en mémoire récente (7 jours). (Lesburguères et al., 2011)

De plus, la nature extrêmement « plastique » du cerveau n'est plus à prouver et il est fort probable que d'importants mécanismes de compensation et/ou récupération se mettent en place pour pallier à la lésion (Hyllin et al., 2017). Il a par exemple été montré que des conditions d'hébergement enrichies permettent d'atténuer significativement les déficits de mémoire spatiale normalement observés chez les rats avec une lésion des noyaux ReRh (Ali et al., 2017), attestant d'une récupération fonctionnelle influencée par des facteurs environnementaux. De plus, une inactivation réversible (optogénétique) de quelques dizaines de minutes telle qu'observée avec des substances pharmacologiques comme le muscimol par exemple, est suffisante

pour la mise en place de mécanismes de compensation fonctionnelle (Goshen et al., Figure 30).

Il semble donc fort probable que des lésions permanentes induisent des phénomènes de compensation au moins aussi importants. Ces processus de récupération et compensation sont néanmoins très difficilement quantifiables. Il est donc essentiel de garder cette hypothèse à l'esprit, notamment lors de l'interprétation de résultats négatifs, comme c'est le cas pour notre expérience de TSPA. L'absence d'effet de la lésion des noyaux ReRh pourrait s'expliquer par des mécanismes de compensation et/ou de récupération, d'autant plus que nos animaux sont hébergés à trois par cage et très fréquemment manipulés, ce qui correspond à une forme d'enrichissement.



**Figure 30: Influence du *timing* d'inactivation sur les résultats comportementaux**

Goshen et al. (2011) ont évalué l'effet d'une inactivation optogénétique précise ou prolongée sur les performances de rappel d'une mémoire de peur conditionnée au contexte ancienne (28j). La discordance des résultats entre les animaux «précis» et «prolongés», indiquant la mise en place rapide de mécanismes de compensation chez les animaux «prolongés», pointe clairement une limite considérable des approches pharmacologique et pharmacogénétique, qui ne permettent pas un contrôle précis du *timing* d'inactivation.

Par ailleurs, ce résultat indique que l'HP reste impliqué dans le rappel d'une mémoire de peur conditionnée au contexte ancienne, au contraire d'autres études (e.g., Restivo et al., 2009 ; Frankland et al., 2004, Science)

Adapté de Goshen et al. 2011

Les lésions réalisées par injection de NMDA, contrairement à certaines approches pharmacologiques, présentent l'avantage d'épargner les fibres de passage, pour n'affecter que les neurones dont le corps cellulaire est situé dans la région injectée. Néanmoins, il est techniquement difficile de cibler des régions spécifiques, particulièrement quand celles-ci sont profondes et de petites tailles comme c'est le cas des noyaux ReRh. C'est pourquoi il est nécessaire d'établir des critères d'exclusion restrictifs, afin de garantir des lésions à la fois suffisamment importantes et suffisamment spécifiques. Malgré cela, il ne peut être exclu qu'une partie des effets observés ne soit pas spécifique à la lésion du ReRh mais provoqué par des dommages aux structures adjacentes, notamment lié au passage de la canule. En effet, d'autres noyaux à proximité des noyaux ReRh, tels que les noyaux centromédian, submedius, péri-ventriculaire et médiodorsaux sont également connus pour leur implication dans les fonctions cognitives (Van der Werf et al., 2000; Vertes et al., 2015; Wolff et al., 2015).

Bien qu'elles présentent un nombre important de limitations, tant techniques que conceptuelles, les lésions restent une approche de choix pour l'étude des réseaux cérébraux impliqués dans les processus de consolidation. Néanmoins, l'avènement de l'optogénétique et de la pharmacogénétique pourrait rendre les approches lésionnelles obsolètes dans les années futures. Pour cela, il sera notamment nécessaire d'adapter des outils préexistants afin de manipuler l'activité de populations neuronales sur des durées longues. L'équipe de Frankland (Vetere et al., 2017), par exemple, a réussi à inactiver différentes structures cérébrales par l'approche DREADD pendant 10 jours consécutifs en plaçant le CNO dans l'eau de boisson des animaux.

## **Avantages et limites de l'approche DREADD**

L'outil pharmacogénétique DREADD, utilisé dans le cadre de nos expériences pour inhiber l'activité des neurones excitateurs des noyaux ReRh de façon réversible, présente de nombreux d'avantages en regard des méthodes pharmacologiques « classiques ».

La spécificité d'action constitue le premier avantage. En effet, comme cela a été évoqué précédemment, l'utilisation d'un vecteur AAV8 pour infecter les noyaux ReRh permet une spécificité spatiale importante puisque ce virus n'infecte pas les noyaux submedius, adjacents aux noyaux ReRh. De façon plus générale, l'utilisation d'un promoteur spécifique dans la construction génétique permet de cibler un type cellulaire particulier, en plus d'une région cérébrale. Dans notre cas, le promoteur *CaMKII $\alpha$*  permet de cibler l'ensemble des neurones excitateurs. Il est également possible de combiner plusieurs vecteurs viraux dans le but de cibler une ou plusieurs voies de projection spécifiques. Ce type d'approche constitue un développement évident pour des expériences futures visant à caractériser plus en détails l'implication du circuit hippocampo-cortico-thalamique dans les processus cognitifs. De plus, la présence d'un rapporteur fluorescent dans les constructions génétiques DREADD permet la visualisation des neurones « manipulés » et donc un meilleur contrôle de la spécificité et de l'efficacité qu'avec les approches pharmacologiques classiques.

D'un point de vue pratique, l'utilisation du DREADD limite grandement le stress infligé aux animaux préalablement aux tests comportementaux. En effet, suite à la chirurgie stéréotaxique d'injection du virus, qui est elle-même moins traumatisante que l'implantation de guide-canules, l'inactivation est réalisée par une injection intrapéritonéale de CNO qui ne nécessite pas de contention particulière juste avant le test comportemental et induit donc un stress moindre.

A l'heure actuelle, la limite principale de l'approche DREADD est liée à sa relative récence et donc au manque de recul global vis-à-vis de cette technologie. Un aspect précis qui a été source de vifs débats dans la communauté neuroscientifique concerne l'utilisation du CNO. C'est un ligand synthétique supposé inactif en l'absence des récepteurs DREADD, qui sont eux-mêmes des récepteurs muscariniques modifiés. Cependant, des études ont mis en évidence que le CNO en tant que tel ne passe pas la barrière hémato-encéphalique mais est en partie métabolisé dans le foie en clozapine qui agirait sur les récepteurs DREADD (Gomez et al., 2017). La clozapine étant un antipsychotique atypique, il n'est pas surprenant que certains auteurs

aient mis en évidence des effets comportementaux suite à des administrations de CNO (MacLaren et al., 2016), principalement quand celui-ci est utilisé à des doses importantes (>3mg/kg chez le rat). Ces résultats ont souligné l'importance primordiale d'intégrer un groupe d'animaux contrôle recevant également du CNO lors de toutes les expériences utilisant le DREADD. Dans notre cas, nous avons choisi de n'utiliser que ce groupe contrôle que nous avons jugé être le plus pertinent et le seul essentiel, afin de limiter les effectifs expérimentaux utilisés. Ainsi, il est important de noter que nous n'avons ni contrôlé l'impact potentiel de l'expression du virus ni celui de l'injection de CNO sur le comportement des animaux.

Une autre limite importante de notre approche pharmacogénétique est que nous n'avons pas encore contrôlé l'efficacité de l'inactivation induite par l'injection de CNO. Pour cela, il sera nécessaire de réaliser des enregistrements électrophysiologiques de neurones infectés, idéalement *in vitro* et *in vivo*, afin d'évaluer l'impact de l'administration de CNO sur l'activité et l'excitabilité neuronale. A l'heure actuelle, nous avons uniquement validé l'utilisation du DREADD en reproduisant des résultats comportementaux obtenus par une inactivation au muscimol dans une tâche de strategy shifting dans le labyrinthe en double H (Cholvin et al 2013).

## **Absence d'implication des noyaux ReRh dans la TSPA, une affaire de circuiterie neuronale ?**

Le paradigme de transmission sociale de préférence alimentaire permet d'étudier un comportement naturel des animaux sans avoir recours à un stimulus aversif, comme c'est le cas en conditionnement de peur (choc électrique) ou en piscine de Morris (eau fraîche). La TSPA constitue ainsi un test de mémoire particulièrement éthologique qui permet en une session d'apprentissage unique la formation d'un souvenir très durable. Ross et Eichenbaum (2006) ainsi que Lesburguères et al. (2011) ont étudié les structures cérébrales impliquées dans cette mémoire associative olfactive récente et ancienne, par des approches d'inactivations pharmacologiques et de quantification de l'expression de c-Fos. Ils ont mis en évidence que l'HP est indispensable au rappel

récent (1j) de l'information olfactive socialement transmise et non au rappel ancien (30j). A l'inverse, le cortex orbito-frontal (OFC) est nécessaire au rappel ancien et non au rappel récent. Ces données indiquent que la TSPA constitue un modèle de choix pour l'étude de la consolidation à l'échelle des systèmes puisqu'il s'agit d'une mémoire initialement HP-dépendante qui est progressivement consolidée au niveau néocortical (OFC) avec un désengagement de l'HP.

L'HP et l'OFC ne sont pas reliés par des connexions anatomiques directes (Murphy and Deutch, 2018; Sesack et al., 1989). En revanche, les noyaux ReRh sont connectés de façon dense et réciproque avec à la fois l'HP et l'OFC (McKenna and Vertes, 2004; Murphy and Deutch, 2018; Sesack et al., 1989; Vertes et al., 2006). Sur la base de ces données neuroanatomiques, nous avons émis l'hypothèse que les noyaux ReRh pourraient être impliqués dans les interactions entre l'HP et l'OFC, support des processus de consolidation systémique, et seraient donc nécessaires à la persistance de la mémoire associative olfactive.

Au cours de nos expériences, aucun effet de la lésion pré-acquisition des noyaux ReRh n'a été observé sur les performances de animaux en TSPA, en mémoire récente (1 jour) comme en mémoire ancienne (25 jours). Il semblerait donc que les noyaux ReRh n'interviennent pas dans la consolidation systémique de la mémoire associative olfactive comme c'est le cas pour une mémoire spatiale (Loureiro et al., 2012) et une mémoire de peur au contexte (Vetere et al., 2017). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette différence, reposant sur les limites de notre approche expérimentale ou sur la circuiterie neuronale impliquée dans la TSPA.

Les limites inhérentes à l'approche lésionnelle ayant déjà été discutées, elles ne seront pas davantage détaillées ici. Néanmoins, il ne peut être exclu que les noyaux ReRh soient impliqués dans la persistance de la mémoire associative olfactive mais que nos conditions expérimentales n'aient pas permis de le mettre en évidence, de par la survenue de mécanismes de compensation et ou de récupération fonctionnelle suite à la lésion. Pour explorer cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier l'implication des noyaux ReRh dans cette tâche en mémoire récente et ancienne, par exemple en

étudiant l'expression de c-Fos sur des animaux naïfs suite aux tests de rappel (comme cela a été fait en piscine de Morris dans Loureiro et al., 2012).

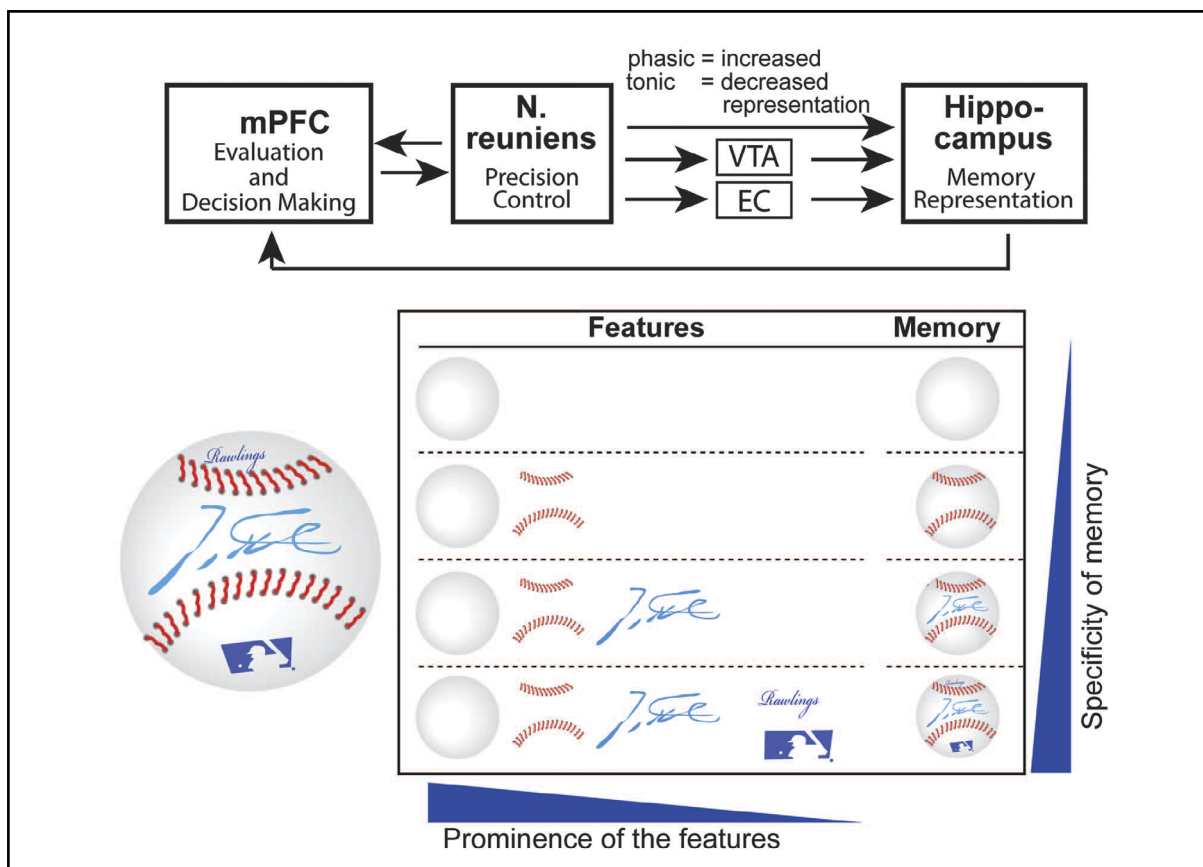
Si l'on considère à présent que l'absence d'effet de la lésion soit effectivement due à une absence totale d'implication des noyaux ReRh dans cette tâche, la première hypothèse serait alors que les réseaux neuronaux sous-tendant la consolidation de la mémoire associative olfactive sont simplement différents de ceux de la mémoire spatiale et de peur au contexte. En effet, bien que ces trois types de mémoire soit d'abord dépendants de l'HP puis progressivement du néocortex (OFC ou CPFm), il est envisageable que les structures relais impliquées dans la consolidation soit différentes. Malheureusement, à l'heure actuelle, les structures cérébrales impliquées dans la TSPA ne sont pas aussi bien décrites que celles impliquées dans la mémoire spatiale et de peur et sont encore sujettes à controverses. En effet, contrairement aux données obtenues par le groupe de Bontempi (Lesburguères et al., 2011), certains travaux montrent qu'une lésion post-apprentissage extensive de l'HP n'affecte pas le rappel récent (Thapa et al., 2014) et qu'une lésion préapprentissage de l'OFC n'affecte ni l'encodage ni le rappel à 10 jours en TSPA (Smith et al., 2010). Néanmoins le délai de 10 jours utilisé dans cette étude laisse planer le doute sur le fait qu'à un délai plus long les auteurs auraient pu observer un effet de la lésion. D'autres travaux indiquent une implication de la neurotransmission cholinergique dans le CPFm, l'HPv et l'amygdale baso-latérale dans la TSPA ( Boix-Trelis et al., 2007; Carballo-Márquez et al., 2009a, 2009b).

En résumé, la faible connaissance actuelle des mécanismes cérébraux de la TSPA limite cruellement les interprétations qui peuvent être faites à partir de nos résultats expérimentaux. Une meilleure compréhension de la circuiterie neuronale sous-tendant la mémoire associative olfactive sera nécessaire pour pouvoir proposer une hypothèse plus précise justifiant l'absence d'implication des noyaux ReRh dans ce type précis de mémoire.



## **Noyaux ReRh et précision du souvenir**

En 2013, Xu et Südhof ont publié une étude majeure décryptant le circuit neuronal modulant la spécificité des souvenirs. En combinant le paradigme de conditionnement de peur au contexte avec des approches pharmacogénétiques et optogénétiques spécifiques de voies de projection anatomiques, ils ont mis en évidence de façon très élégante l'existence d'un circuit neuronal constitué du CPFm, du noyau Re et de l'HP, qui contrôle la généralisation des souvenirs. Le phénomène de généralisation est normalement observé après un certain délai et correspond à l'atténuation du souvenir de par l'oubli partiel de ses éléments contextuels (Dymond et al., 2015; Poulos et al., 2016). Pour évaluer la spécificité des souvenirs, les auteurs ont comparé le niveau de freezing des animaux dans le contexte de conditionnement (délai 1 jour) et dans un contexte altéré (délai 2 jours), dans lequel un souvenir récent de peur associé au contexte de conditionnement ne provoque pas de freezing, contrairement à un souvenir dit généralisé. Ils ont ainsi démontré que la suppression de la transmission synaptique entre le CPFm et le noyau Re au moment du conditionnement (encodage) provoque une généralisation rapide du souvenir contextuel testé 2 jours post-conditionnement. De façon intéressante, ils ont ensuite mis en évidence que des stimulations optogénétiques phasiques ou toniques du noyau Re au cours du conditionnement induisent respectivement une diminution et une augmentation de la spécificité du contexte associé au souvenir de peur. Ces résultats concernant l'implication du noyau Re dans la généralisation des souvenirs ont été confirmés et enrichis très récemment par Troyner et al., (2018). Ces derniers ont montré que la modulation de la spécificité du souvenir par le noyau Reuniens ne se limite pas au moment du conditionnement mais intervient également pendant les phases précoces de la consolidation. En effet, une inactivation du noyau Re par injection de muscimol immédiatement après le conditionnement altère la spécificité du souvenir, évaluée par le niveau de freezing dans un contexte altéré, en mémoire récente (1 jour) comme en mémoire ancienne (21 jours). En revanche, lorsque l'inactivation est plus tardive (6h post-conditionnement), celle-ci n'induit plus de généralisation.



**Figure 31: Implication du noyau Re dans la généralisation des souvenirs: modèle de Xu et Südhof, 2013.**

Le noyau Re, de par ses interactions avec l'HP et le CPFm mais également l'aire tegmentale ventrale (VTA) et le cortex entorhinal (EC) constitue une structure centrale dans la régulation de la spécificité des souvenirs.

Un souvenir est considéré comme spécifique lorsqu'il est riche en détails, y compris peu saillants. Les auteurs proposent que le noyau Re contrôle la généralisation des souvenirs, en régulant le nombre de détails incorporés dans la trace mnésique.

Ces travaux ont établi un rôle du noyau Re dans la spécificité des souvenirs mais seulement dans le cas précis de l'encodage et de la phase très précoce de la consolidation d'un souvenir de peur au contexte. De façon très intéressante, nous avons également obtenus des résultats qui suggèrent une implication des noyaux ReRh dans la précision du souvenir mais dans le cadre du rappel d'une mémoire spatiale de référence. En effet, au cours de nos expériences d'inactivation DREADD des noyaux ReRh pendant le test de rappel (à 5j et à 25j) en piscine de Morris, nous avons observé une diminution significative de nombre d'entrées dans l'annulus (zone virtuelle de 31 cm de diamètre centrée sur la plateforme) ainsi qu'une augmentation de la latence

pour rejoindre la position virtuelle de la plateforme. En revanche, le temps passé dans le quadrant cible n'était pas différent entre les animaux inactivés et contrôles. Ces données indiquent que les animaux inactivés sont capables de rappeler la localisation de la plateforme mais pas de façon aussi précise que les animaux contrôles, ce qui suggère que les noyaux ReRh modulent « *online* » la précision du rappel d'un souvenir spatial.

Cependant, un tel effet n'a pas été observé lors des expériences comparables d'inactivation pharmacologique par injection de lidocaïne, réalisé par Loureiro et al. (2012). Effectivement, aucun effet de l'inactivation n'a été observé sur les performances de rappel (à J5 comme à J25) en Piscine de Morris.

De façon intéressante, dans le même test, Cholvin et al. (2013) avaient quant à eux observé que l'inactivation par injection de muscimol des noyaux ReRh pendant le test de rappel à 24 heures provoquait une diminution significative du temps passé dans le quadrant cible et du nombre d'entrées dans l'annulus. Néanmoins, les animaux inactivés passaient significativement plus de temps que le hasard dans le quadrant cible, suggérant tout comme nos résultats, qu'ils sont capables de rappeler l'emplacement de la plateforme mais pas de façon aussi précise que les animaux contrôles.

Ces résultats concernant l'implication des noyaux ReRh dans la spécificité ou la précision d'un souvenir suscitent immédiatement de nouveaux questionnements :

- l'inactivation des noyaux ReRh pendant un test de rappel d'un souvenir de peur (récent ou ancien) dans un contexte altéré induit-elle le rappel d'un souvenir moins spécifique, associé à une augmentation du niveau de freezing ?

- l'inactivation des noyaux ReRh pendant les phases d'acquisition ou de consolidation précoce d'un souvenir spatial en piscine de Morris induit-elle l'encodage d'une information spatiale moins précise ou la formation d'une trace plus faible qui pourrait se généraliser plus rapidement, avec désengagement précoce de l'hippocampe (Lopez et al 2012)?

- une stimulation de l'activité des noyaux ReRh pendant l'acquisition (ou le test) de piscine de Morris peut-elle, à l'inverse, augmenter la précision du souvenir formé (ou rappelé) ?

Au vu de l'intérêt grandissant de la communauté scientifique pour l'implication des noyaux ReRh dans les processus cognitifs, ces questionnements seront, à n'en pas douter, sources de nouvelles études dans les années à venir.

## **Implication des noyaux ReRh dans la consolidation systémique**

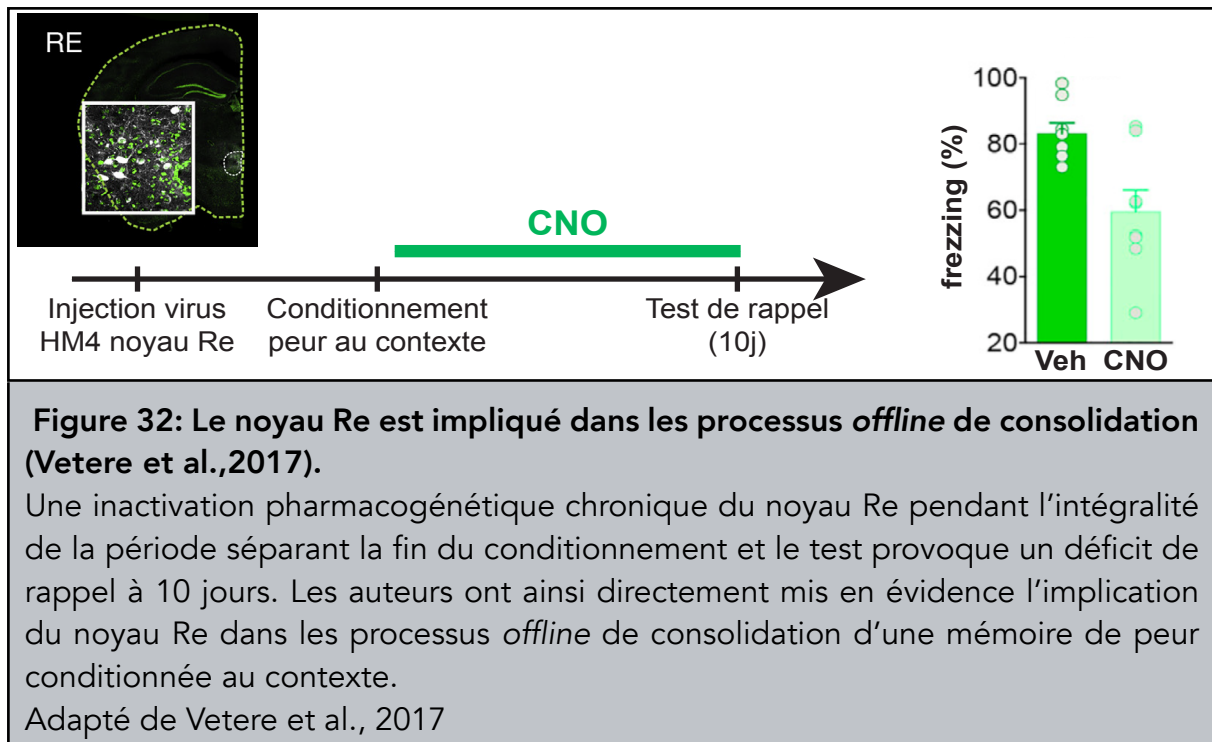
Les noyaux ReRh possèdent des connexions denses et réciproques avec l'HP et le CPFm (Hoover and Vertes, 2012; McKenna and Vertes, 2004; Varela et al., 2014; Vertes et al., 2006, 2007), qui sont deux structures clés dans les processus de consolidation systémique (Dudai et al., 2015; Frankland and Bontempi, 2005).

Ce sont ces données anatomiques qui ont poussé l'équipe à étudier l'implication des noyaux ReRh dans la persistance des souvenirs dans une tâche de mémoire spatiale de référence en piscine de Morris. Ainsi dès 2012, Loureiro et al. ont mis en évidence qu'une lésion préapprentissage des noyaux ReRh empêche les rats de rappeler la localisation de la plateforme après un délai de 25 jours (mémoire ancienne), mais pas après un délai de 5 jours (mémoire récente). De plus, une inactivation réversible des noyaux ReRh par injection de lidocaïne avant le test de rappel n'altère pas les performances des animaux quel que soit le délai, montrant que ces noyaux sont impliqués dans la persistance du souvenir spatial, mais pas dans l'encodage ni le rappel de l'information, suggérant un rôle spécifique dans les processus de consolidation.

Notre étude avait notamment pour objectif de déterminer si l'implication des noyaux ReRh dans les processus de consolidation peut être étendue à d'autres types de mémoire que la mémoire spatiale. Similairement aux travaux préalablement menés au laboratoire par Loureiro et al., nous avons évalué l'impact d'une lésion des noyaux ReRh sur les performances des animaux dans des tâches de mémoire d différentes natures : le conditionnement de peur au contexte et au son, ainsi que la transmission sociale de préférence alimentaire. Comme détaillé précédemment, la lésion n'affecte pas les capacités mnésiques des animaux dans le conditionnement de peur au son et la transmission sociale de préférence alimentaire et ce, quel que soit le délai entre

l'apprentissage et le test. En revanche, la lésion altère les performances des animaux spécifiquement en mémoire ancienne (25 jours) lors d'un conditionnement de peur au contexte, sans affecter la mémoire récente (1 jour). De plus, une inactivation réversible DREADD des noyaux ReRh pendant le test de rappel n'altère pas les performances des animaux quel que soit le délai, montrant que ces noyaux sont impliqués dans la persistance du souvenir contextuel, mais pas dans l'encodage ni le rappel de l'information, suggérant un rôle spécifique dans les processus *offline* de consolidation et confirmant ainsi les données obtenues précédemment dans des tâches de mémoire spatiale.

Pendant l'avancement de nos travaux, de nombreux résultats ont été publiés, confirmant l'implication des noyaux de la ligne médiane ventrale du thalamus dans les processus de consolidation mnésique. Des études majeures ont notamment été menées par le groupe de Frankland, qui a étudié de façon extensive les réseaux neuronaux sous-tendant la mémoire de peur ancienne. Ils ont dans un premier temps réalisé une analyse à grande échelle de l'expression de c-Fos lors du rappel d'une mémoire de peur au contexte récente et ancienne (Wheeler et al., 2013). Ils ont ainsi mis en évidence que le noyau Re, tout comme l'HP et le CPFm, constitue un relai clé (« *hub* ») à même d'influencer l'activité de l'ensemble du réseau impliqué dans l'expression de la mémoire de peur ancienne. Afin de confirmer ces observations, ils ont par la suite réalisé des inactivations DREADD chroniques des différents « *hub* » identifiés, en plaçant du CNO dans l'eau de boisson des animaux de la fin du conditionnement jusqu'au test de rappel à 10 jours (Figure 32). Une telle inactivation du noyau Reuniens provoque une diminution du comportement de *freezing* lors du test de rappel en mémoire ancienne, attestant d'un rôle dans les processus post-apprentissage de consolidation et/ou de rappel de l'information. Ces résultats sont parfaitement en accord avec nos données obtenues chez des rats lésés et sont complémentaires de nos données d'inactivations et de c-Fos, qui excluent un rôle dans le rappel actif de l'information contextuelle.



En effet, prises toutes ensemble, ces données indiquent très clairement une implication spécifique des noyaux ReRh dans le processus *offline* de consolidation de la mémoire de peur au contexte.

En 2017, Sierra et al. ont démontré l'implication du noyau Re dans la reconsolidation (Haubrich and Nader, 2018 ; Nader, 2015) des souvenirs de peur au contexte. Une inactivation du cortex cingulaire antérieur pendant le conditionnement altère la persistance de la mémoire de peur au contexte (testée après 40 jours) mais cette altération peut être rétablie/compensée par une réexposition au contexte de conditionnement pendant 4 minutes, 48h après le conditionnement. Une inactivation réversible (muscimol) du noyau Re pendant cette séance de réexposition au contexte provoque une diminution du niveau de freezing lors du test de mémoire ancienne, attestant de son implication dans le processus de reconsolidation du souvenir contextuel.

En plus de l'ensemble de ces travaux confirmant le rôle prépondérant des noyaux ReRh dans la persistance des souvenirs, des études récentes utilisant des approches électrophysiologiques ont commencé à élucider les mécanismes par lesquels ces noyaux sont impliqués dans les interactions entre l'HP et le CPFm.

En 2017, Roy et al. ont montré sur des rats anesthésiés à l'uréthane qu'une injection de lidocaïne dans le noyau Re diminue la cohérence des oscillations entre l'HP et le CPFm spécifiquement dans la bande de fréquence delta 2-5Hz. Cette oscillation lente, qui ne correspond pas à l'oscillation delta observée pendant le sommeil à ondes lentes, a été décrite récemment (Fujisawa and Buzsáki, 2011) et pourrait constituer un moyen de communication robuste entre le CPFm et l'HP, relayé par le noyau Re.

Il a également été mis en évidence que l'inactivation du noyau Re (lidocaïne) inhibe l'induction de la LTP dans la voie CA1 – cortex cingulaire antérieur (Sierra et al., 2017), confortant le caractère clé de cette structure dans le circuit neuronal sous-tendant la consolidation à l'échelle des systèmes.

Plus récemment, il a été montré que le noyau Re contrôle la synchronisation HP-CPFm dans la bande de fréquence gamma. Pendant le sommeil à ondes lentes, des « *bursts* » d'oscillations gamma sont observés simultanément dans l'HP et le CPFm, constituant un substrat neurobiologique potentiel pour le transfert d'informations entre ces deux structures. Ferraris et al. (2018) ont mis en évidence sur des animaux anesthésiés qu'une inactivation du noyau Re provoque une diminution drastique de la cooccurrence de ces « *bursts* » de gamma et abolit la synchronisation ces oscillation gamma entre l'HP et le CPFm.

Ces données électrophysiologiques récentes ne sont malheureusement pas directement corrélées avec des déficits de consolidation observable d'un point de vue comportemental. Ainsi, aucun lien de cause à effet entre les altérations de l'activité oscillatoire et les altérations des processus mnésiques provoquées par l'inactivation du noyau Re n'est établi à ce jour. La compréhension des mécanismes par lesquels les noyaux ReRh modulent les interactions entre l'HP et le CPFm nécessitera encore de nombreux travaux au cours des prochaines années. Un point de départ intéressant serait par exemple d'étudier comment l'inactivation des noyaux ReRh affecte les oscillations au sein du réseau HP-CPFm après à un apprentissage, notamment pendant le sommeil. En effet, il est clairement établi que les *sharp-waves ripples* de l'HP et les *spindles* thalamo-corticaux pendant le sommeil à ondes lentes ou

encore le thêta pendant le sommeil paradoxal sont des oscillations clés, impliquées dans les processus de consolidation mnésique (Diekelmann and Born, 2010). Ainsi, il serait nécessaire d'étudier si une inactivation des noyaux ReRh, particulièrement des neurones projetant à l'HP et/ou au CPFm, altère les caractéristiques et/ou la synchronisation de ces activités oscillatoires.

Au cours des 20 dernières années, un nombre important de données anatomiques, électrophysiologiques et plus récemment, comportementales, parmi lesquelles figurent les travaux menés au cours de cette thèse, indiquant un rôle des noyaux ReRh dans les processus de consolidation s'est accumulé, à tel point qu'il semble aujourd'hui avéré que ces noyaux sont des partenaires essentiels d'un réseau hippocampo-cortico-thalamique responsable de la persistance des souvenirs.



# **BIBLIOGRAPHIE**

# Bibliographie

Ackermann, S., and Rasch, B. (2014). Differential effects of non-REM and REM sleep on memory consolidation? *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 430.

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.

Andersen, N., Krauth, N., and Nabavi, S. (2017). Hebbian plasticity in vivo: relevance and induction. *Curr. Opin. Neurobiol.* 45, 188–192.

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.

Atkinson, R.C., and Shiffrin, R.M. (1968). Human Memory: A Proposed System and its Control Processes. *Psychology of Learning and Motivation*, K.W. Spence, and J.T. Spence, eds. (Academic Press), pp. 89–195.

Bailey, C.H., Kandel, E.R., and Harris, K.M. (2015). Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021758.

Bergstrom, H.C. (2016). The neurocircuitry of remote cued fear memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 71, 409–417.

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.

Bessières, B., Nicole, O., and Bontempi, B. (2017). Assessing recent and remote as-sociative olfactory memory in rats using the social transmission of food preference paradigm. *Nat Protoc* 12, 1415–1436.

Blanchard, R.J., and Blanchard, D.C. (1969). Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* 67, 370–375.

Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* 232, 331–356.

Boix-Trelis, N., Vale-Martínez, A., Guillazo-Blanch, G., and Martí-Nicolovius, M. (2007). Muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat prelimbic cortex impairs the social transmission of food preference. *Neurobiol Learn Mem* 87, 659–668.

Bokor, H., Csáki, Á., 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. *European Journal of Neuroscience* 16, 1227–1239.

Born, J., and Wilhelm, I. (2012). System consolidation of memory during sleep. *Psychological Research* 76, 192–203.

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.

Boyce, R., Glasgow, S.D., Williams, S., and Adamantidis, A. (2016). Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* 352, 812–816.

Carballo-Márquez, A., Vale-Martínez, A., Guillazo-Blanch, G., and Martí-Nicolovius, M. (2009a). Muscarinic receptor blockade in ventral hippocampus and prelimbic cortex impairs memory for socially transmitted food preference. *Hippocampus* 19, 446–455.

Carballo-Márquez, A., Vale-Martínez, A., Guillazo-Blanch, G., and Martí-Nicolovius, M. (2009b). Muscarinic transmission in the basolateral amygdala is necessary for the acquisition of socially transmitted food preferences in rats. *Neurobiol Learn Mem* 91, 98–101.

Cassel, J.-C., Pereira de Vasconcelos, A., Loureiro, M., Cholvin, T., Dalrymple-Alford, J.C., and Vertes, R.P. (2013). The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog. Neurobiol.* 111, 34–52.

Cassel, R., Kelche, C., Lecourtier, L., and Cassel, J.-C. (2012). The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats. *Behavioural Brain Research* 230, 333–342.

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.* 33, 8772–8783.

Cholvin, T., Hok, V., Giorgi, L., Chaillan, F.A., and Poucet, B. (2018). Ventral Midline Thalamus Is Necessary for Hippocampal Place Field Stability and Cell Firing Modulation. *J. Neurosci.* 38, 158–172.

Clayton, N.S., and Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395, 272–274.

Clayton, N.S., Yu, K.S., and Dickinson, A. (2001). Scrub jays (*Aphelocoma coerulescens*) form integrated memories of the multiple features of caching episodes. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 27, 17–29.

Clemens, Z., Fabó, D., and Halász, P. (2005). Overnight verbal memory retention cor-relates with the number of sleep spindles. *Neuroscience* 132, 529–535.

Clopath, C. (2012). Synaptic consolidation: an approach to long-term learning. *Cogn Neurodyn* 6, 251–257.

Colgin, L.L. (2011). Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 467–474.

Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 153–160.

Cruikshank, S.J., Urabe, H., Nurmikko, A.V., and Connors, B.W. (2010). Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. *Neuron* 65, 230–245.

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. *Behavioural Brain Research* 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.

Deschênes, M., Veinante, P., and Zhang, Z.W. (1998). The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 28, 286–308.

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. *Synapse* 60, 45–55.

Diekelmann, S., and Born, J. (2010). The memory function of sleep. *Nature Reviews Neuroscience* 11, 114–126.

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.* 17, 5640–5650.

Dolleman-van der Weel, M.J., Morris, R.G.M., and Witter, M.P. (2009). Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Struct Funct* 213, 329–342.

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.

Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology* 55, 51–86.

Dudai, Y., Karni, A., and Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron* 88, 20–32.

Dymond, S., Dunsmoor, J.E., Vervliet, B., Roche, B., and Hermans, D. (2015). Fear Generalization in Humans: Systematic Review and Implications for Anxiety Disorder Research. *Behavior Therapy* 46, 561–582.

E. McAllister, D., and R. McAllister, W. (1967). Incubation of fear: An examination of the concept. *Journal of Experimental Research in Personality* 2, 180–190.

Ebbinghaus, H. (1885). *Über das Gedächtnis. Untersuchungen zur experimentellen Psychologie* (Leipzig: Duncker & Humblot).

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 CA1 area in associative learning. *PLoS ONE* 6, e23538.

Fama, R., Pitel, A.-L., and Sullivan, E.V. (2012). Anterograde episodic memory in Korsakoff syndrome. *Neuropsychol Rev* 22, 93–104.

Ferraris, M., Ghestem, A., Vicente, A.F., Nallet-Khosrofiyan, L., Bernard, C., and Quilichini, P.P. (2018). The nucleus reuniens controls long-range hippocampoprefrontal gamma synchronization during slow oscillations. *The Journal of Neuroscience* 3058–17.

Fogel, S.M., Smith, C.T., and Beninger, R.J. (2009). Evidence for 2-stage models of sleep and memory: learning-dependent changes in spindles and theta in rats. *Brain Res. Bull.* 79, 445–451.

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.

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

Fujisawa, S., and Buzsáki, G. (2011). A 4 Hz Oscillation Adaptively Synchronizes Pre-frontal, VTA, and Hippocampal Activities. *Neuron* 72, 153–165.

Gais, S., Mölle, M., Helms, K., and Born, J. (2002). Learning-dependent increases in sleep spindle density. *J. Neurosci.* 22, 6830–6834.

Galef, B.G. (1982). Studies of social learning in norway rats: A brief review. *Developmental Psychobiology* 15, 279–295.

Galef, B.G., and Whiskin, E.E. (2003). Socially transmitted food preferences can be used to study long-term memory in rats. *Learn Behav* 31, 160–164.

Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsáki, G., and Zugaro, M.B. (2009). Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat. Neurosci.* 12, 1222–1223.

Giustino, T.F., and Maren, S. (2015). The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front Behav Neurosci* 9.

Gomez, J.L., Bonaventura, J., Lesniak, W., Mathews, W.B., Sysa-Shah, P., Rodriguez, L.A., Ellis, R.J., Richie, C.T., Harvey, B.K., Dannals, R.F., et al. (2017). Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science* 357, 503–507.

Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., and Deisseroth, K. (2011). Dynamics of Retrieval Strategies for Remote Memories. *Cell* 147, 678–689.

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.* 36, 8372–8389.

Hardt, O., and Nadel, L. (2018). Systems consolidation revisited, but not revised: The promise and limits of optogenetics in the study of memory. *Neuroscience Letters* 680, 54–59.

Haubrich, J., and Nader, K. (2018). Memory Reconsolidation. *Curr Top Behav Neurosci* 37, 151–176.

Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior; a neuropsychological theory* (Oxford, England: Wiley).

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, K. (2010). A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 523–532.

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.

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.

Huber, R., Ghilardi, M.F., Massimini, M., and Tononi, G. (2004). Local sleep and learning. *Nature* 430, 78–81.

Hylin, M.J., Kerr, A.L., and Holden, R. (2017). Understanding the Mechanisms of Re-recovery and/or Compensation following Injury. *Neural Plast* 2017.

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.

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

Jenkins, J.G., and Dallenbach, K.M. (1924). Obliviscence during Sleep and Waking. *The American Journal of Psychology* 35, 605–612.

Josselyn, S.A., Köhler, S., and Frankland, P.W. (2015). Finding the engram. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 521–534.

Josselyn, S.A., Köhler, S., and Frankland, P.W. (2017). Heroes of the Engram. *J. Neurosci.* 37, 4647–4657.

Kafetzopoulos, V., Kokras, N., Sotiropoulos, I., Oliveira, J.F., Leite-Almeida, H., Vasalou, A., Sardinha, V.M., Papadopoulou-Daifoti, Z., Almeida, O.F.X., Antoniou, K., et al. (2017). The nucleus reuniens: a key node in the neurocircuitry of stress and depression. *Mol. Psychiatry*.

Krout, K.E., and Loewy, A.D. (2000). Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 428, 475–494.

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.

Lara-Vásquez, A., Espinosa, N., Durán, E., Stockle, M., and Fuentealba, P. (2016). Mid-line thalamic neurons are differentially engaged during hippocampus network oscillations. *Sci Rep* 6, 29807.

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.

Lechner, H.A., Squire, L.R., and Byrne, J.H. (1999). 100 Years of Consolidation—Remembering Müller and Pilzecker. *Learn. Mem.* 6, 77–87.

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.

Lopez, J., Herbeaux, K., Cosquer, B., Engeln, M., Muller, C., Lazarus, C., Kelche, C., Bontempi, B., Cassel, J.-C., and Vasconcelos, A.P. de (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 mid-line thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J. Neurosci.* 32, 9947–9959.

MacLaren, D.A.A., Browne, R.W., Shaw, J.K., Krishnan Radhakrishnan, S., Khare, P., España, R.A., and Clark, S.D. (2016). Clozapine N-Oxide Administration Produces Behavioral Effects in Long-Evans Rats: Implications for Designing DREADD Experiments. *ENeuro* 3.

Maisson, D.J.-N., Gemzik, Z.M., and Griffin, A.L. (2018). Optogenetic suppression of the nucleus reuniens selectively impairs encoding during spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem* 155, 78–85.

Majchrzak, M., Ferry, B., Marchand, A.R., Herbeaux, K., Seillier, A., and Barbelivien, A. (2006). Entorhinal cortex lesions disrupt fear conditioning to background context but spare fear conditioning to a tone in the rat. *Hippocampus* 16, 114–124.

Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78, 535–538.

Malenka, R.C., and Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5–21.

Marchand, A.R., Luck, D., and DiScala, G. (2003). Evaluation of an improved automated analysis of freezing behaviour in rats and its use in trace fear conditioning. *Journal of Neuroscience Methods* 126, 145–153.

Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 262, 23–81.



Marshall, L., and Born, J. (2007). The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.)* 11, 442–450.

Marshuetz, C., and Smith, E.E. (2006). Working memory for order information: multiple cognitive and neural mechanisms. *Neuroscience* 139, 195–200.

McKenna, J.T., and Vertes, R.P. (2004). Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 480, 115–142.

Mölle, M., Marshall, L., Gais, S., and Born, J. (2002). Grouping of spindle activity during slow oscillations in human non-rapid eye movement sleep. *J. Neurosci.* 22, 10941–10947.

Mölle, M., Yeshenko, O., Marshall, L., Sara, S.J., and Born, J. (2006). Hippocampal sharp wave-ripples linked to slow oscillations in rat slow-wave sleep. *J. Neurophysiol.* 96, 62–70.

Morales, G.J., Ramcharan, E.J., Sundararaman, N., Morgera, S.D., and Vertes, R.P. (2007). Analysis of the actions of nucleus reuniens and the entorhinal cortex on EEG and evoked population behavior of the hippocampus. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2007*, 2480–2484.

Morgan, M.A., Romanski, L.M., and LeDoux, J.E. (1993). Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. *Neuroscience Letters* 163, 109–113.

Morin, A., Doyon, J., Dostie, V., Barakat, M., Hadj Tahar, A., Korman, M., Benali, H., Karni, A., Ungerleider, L.G., and Carrier, J. (2008). Motor sequence learning increases sleep spindles and fast frequencies in post-training sleep. *Sleep* 31, 1149–1156.

Moscovitch, M., Rosenbaum, R.S., Gilboa, A., Addis, D.R., Westmacott, R., Grady, C., McAndrews, M.P., Levine, B., Black, S., Winocur, G., et al. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *J Anat* 207, 35–66.

Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2011). Crystals of the brain. *EMBO Mol Med* 3, 69–71.

Müller, G.E., and Pilzecker, A. (1900). *Experimentelle beiträge zur lehre vom gedächtniss.* (Leipzig: J.A. Barth).

Murphy, M.J.M., and Deutch, A.Y. (2018). Organization of afferents to the orbitofrontal cortex in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 526, 1498–1526.

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

Nader, K. (2015). Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021782.

Nishida, M., and Walker, M.P. (2007). Daytime naps, motor memory consolidation and regionally specific sleep spindles. *PLoS ONE* 2, e341.

Paxinos, G., and Watson, C. (2014). *Paxino's and Watson's The rat brain in stereotaxic coordinates* (Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier).

Pereira de Vasconcelos, A., and Cassel, J.-C. (2015). The nonspecific thalamus: A place in a wedding bed for making memories last? *Neurosci Biobehav Rev* 54, 175–196.

Phillips, R.G., and LeDoux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 106, 274–285.

Pol-Bodetto, S., Jeltsch-David, H., Lecourtier, L., Rusnac, N., Mam-Lam-Fook, C., Cosquer, B., Geiger, K., and Cassel, J.-C. (2011). The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: Acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behavioural Brain Research* 218, 138–151.

Poo, M.-M., Pignatelli, M., Ryan, T.J., Tonegawa, S., Bonhoeffer, T., Martin, K.C., Rudenko, A., Tsai, L.-H., Tsien, R.W., Fishell, G., et al. (2016). What is memory? The pre-sent state of the engram. *BMC Biol.* 14, 40.

Popa, D., Duvarci, S., Popescu, A.T., Léna, C., and Paré, D. (2010). Coherent amygdala-cortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6516–6519.

Poulos, A.M., Mehta, N., Lu, B., Amir, D., Livingston, B., Santarelli, A., Zhuravka, I., and Fanselow, M.S. (2016). Conditioning- and time-dependent increases in context fear and generalization. *Learn. Mem.* 23, 379–385.

Ramanathan, K.R., Ressler, R.L., Jin, J., and Maren, S. (2018a). Nucleus reuniens is required for encoding and retrieving precise, hippocampal-dependent contextual fear memories in rats. *The Journal of Neuroscience* 1429–18.

Ramanathan, K.R., Jin, J., Giustino, T.F., Payne, M.R., and Maren, S. (2018b). Prefrontal projections to the thalamic nucleus reuniens mediate fear extinction. *Nat Commun* 9.

Rasch, B., and Born, J. (2013). About Sleep's Role in Memory. *Physiological Reviews* 93, 681–766.

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.* 29, 8206–8214.

Rosanova, M., and Ulrich, D. (2005). Pattern-specific associative long-term potentiation induced by a sleep spindle-related spike train. *J. Neurosci.* 25, 9398–9405.

Ross, R.S., and Eichenbaum, H. (2006). Dynamics of hippocampal and cortical activation during consolidation of a nonspatial memory. *J. Neurosci.* 26, 4852–4859.

Roy, A., Svensson, F.P., Mazeh, A., and Kocsis, B. (2017). Prefrontal-hippocampal coupling by theta rhythm and by 2-5 Hz oscillation in the delta band: The role of the nucleus reuniens of the thalamus. *Brain Struct Funct* 222, 2819–2830.

Rozeske, R.R., Valerio, S., Chaudun, F., and Herry, C. (2015). Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. *Genes, Brain and Behavior* 14, 22–36.

Schabus, M., Gruber, G., Parapatics, S., Sauter, C., Klösch, G., Anderer, P., Klimesch, W., Saletu, B., and Zeitlhofer, J. (2004). Sleep spindles and their significance for declarative memory consolidation. *Sleep* 27, 1479–1485.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat Methods* 9.

Semon, R. (1923). *Mnemic Psychology* (George Allen And Unwin Limited).

Sesack, S.R., Deutch, A.Y., Roth, R.H., and Bunney, B.S. (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *The Journal of Comparative Neurology* 290, 213–242.

Sierra, R.O., Pedraza, L.K., Zanona, Q.K., Santana, F., Boos, F.Z., Crestani, A.P., Hau-brich, J., de Oliveira Alvares, L., Calcagnotto, M.E., and Quillfeldt, J.A. (2017). Reconsolidation-induced rescue of a remote fear memory blocked by an early cortical inhibition: Involvement of the anterior cingulate cortex and the mediation by the thalamic nucleus reuniens. *Hippocampus* 27, 596–607.

Silva, B.A., Burns, A.M., and Gräff, J. (2018). A cFos activation map of remote fear memory attenuation. *Psychopharmacology*.

Sirota, A., Csicsvari, J., Buhl, D., and Buzsáki, G. (2003). Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2065–2069.

Smith, C., and Lapp, L. (1991). Increases in number of REMS and REM density in humans following an intensive learning period. *Sleep* 14, 325–330.

Smith, C., Kitahama, K., Valatx, J.L., and Jouvet, M. (1974). Increased paradoxical sleep in mice during acquisition of a shock avoidance task. *Brain Res.* 77, 221–230.

Smith, C.A., East, B.S., and Colombo, P.J. (2010). The orbitofrontal cortex is not necessary for acquisition or remote recall of socially transmitted food preferences. *Behav. Brain Res.* 208, 243–249.

Spellman, T., Rigotti, M., Ahmari, S.E., Fusi, S., Gogos, J.A., and Gordon, J.A. (2015). Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature* 522, 309–314.

Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82, 171–177.

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

Squire, L.R., and Zola-Morgan, S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science* 253, 1380–1386.

Squire, L.R., Knowlton, B., and Musen, G. (1993). The structure and organization of memory. *Annu Rev Psychol* 44, 453–495.

Squire, L.R., Genzel, L., Wixted, J.T., and Morris, R.G. (2015). Memory Consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021766.

Takashima, A., Petersson, K.M., Rutters, F., Tendolkar, I., Jensen, O., Zwarts, M.J., McNaughton, B.L., and Fernández, G. (2006). Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 756–761.

Thapa, R., Sparks, F.T., Hanif, W., Gulbrandsen, T., and Sutherland, R.J. (2014). Recent memory for socially transmitted food preferences in rats does not depend on the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 114, 113–116.

Thielen, J.-W., Takashima, A., Rutters, F., Tendolkar, I., and Fernández, G. (2015). Transient relay function of midline thalamic nuclei during long-term memory consolidation in humans. *Learn. Mem.* 22, 527–531.

Troyner, F., Bicca, M.A., and Bertoglio, L.J. (2018). Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. *Hippocampus* 28, 602–616.

Tsai, L.-H., and Graff, J. (2014). On the resilience of remote traumatic memories against exposure therapy-mediated attenuation. *EMBO Reports* 15, 853–861.

Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. In *Organization of Memory*, (Oxford, England: Academic Press), pp. xiii, 423–xiii, 423.

Tulving, E. (1983). *Elements of episodic memory* (Oxford [Oxfordshire] : New York: Clarendon Press ; Oxford University Press).

Van der Werf, Y.D., Witter, M.P., Uylings, H.B., and Jolles, J. (2000). Neuropsychology of infarctions in the thalamus: a review. *Neuropsychologia* 38, 613–627.

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.

Van der Werf, Y.D., Scheltens, P., Lindeboom, J., Witter, M.P., Uylings, H.B.M., and Jolles, J. (2003). Deficits of memory, executive functioning and attention following infarction in the thalamus; a study of 22 cases with localised lesions. *Neuropsychologia* 41, 1330–1344.

Van der werf, Y., Jolles, J., Witter, M., and Uylings, H. (2003). Contributions of Thalam-ic Nuclei to Declarative Memory Functioning. *Cortex* 39, 1047–1062.

Vann, S.D., Brown, M.W., and Aggleton, J.P. (2000). Fos expression in the rostral thal-amic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests. *Neuroscience* 101, 983–991.

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.

Vertes, R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 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 hippo-campus. *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.

Vertes, R.P., Linley, S.B., and Hoover, W.B. (2015). Limbic circuitry of the midline thalamus. *Neurosci Biobehav Rev* 54, 89–107.

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.

Veyrac, A., Allerborn, M., Gros, A., Michon, F., Raguét, L., Kenney, J., Godinot, F., Thevenet, M., Garcia, S., Messaoudi, B., et al. (2015). Memory of occasional events in rats: individual episodic memory profiles, flexibility, and neural substrate. *J. Neu-rosci.* 35, 7575–7586.

Wang, X., Zhang, C., Szábo, G., and Sun, Q.-Q. (2013). Distribution of CaMKII $\alpha$  expression in the brain in vivo, studied by CaMKII $\alpha$ -GFP mice. *Brain Res* 1518, 9–25.

Wheeler, A.L., Teixeira, C.M., Wang, A.H., Xiong, X., Kovacevic, N., Lerch, J.P., McIntosh, A.R., Parkinson, J., and Frankland, P.W. (2013). Identification of a functional connectome for long-term fear memory in mice. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1002853.

Wilson, M.A., and McNaughton, B.L. (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265, 676–679.

Winocur, G., and Moscovitch, M. (2011). Memory Transformation and Systems Con-solidation. *Journal of the International Neuropsychological Society* 17, 766–780.

Winocur, G., Moscovitch, M., and Sekeres, M. (2007). Memory consolidation or trans-formation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nat. Neurosci.* 10, 555–557.

Winocur, G., Moscovitch, M., and Bontempi, B. (2010a). Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation ac-count of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48, 2339–2356.

Winocur, G., Moscovitch, M., Rosenbaum, R.S., and Sekeres, M. (2010b). An investi-gation of the effects of hippocampal lesions in rats on pre- and postoperatively ac-quired spatial memory in a complex environment. *Hippocampus* 20, 1350–1365.

Winsky, L., Montpied, P., Arai, R., Martin, B.M., and Jacobowitz, D.M. (1992). Calreti-nin distribution in the thalamus of the rat: Immunohistochemical and in situ hybridi-zation histochemical analyses. *Neuroscience* 50, 181–196.

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.

Wolff, M., Alcaraz, F., Marchand, A.R., and Coutureau, E. (2015). Functional hetero-geneity of the limbic thalamus: From hippocampal to cortical functions. *Neurosci Biobehav Rev* 54, 120–130.

Xu, W., and Südhof, T.C. (2013). A neural circuit for memory specificity and generali-zation. *Science* 339, 1290–1295.

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 con-solidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain* 4, 4.

**Etienne QUET**

# **Noyaux Reuniens et Rhomboïde du thalamus et persistance d'un souvenir chez le rat**

## **Résumé**

Les noyaux Reuniens et Rhomboïde (ReRh) du thalamus, par leurs connexions denses et réciproques avec l'hippocampe (HP) et le cortex préfrontal médian (CPFm), constituent un relais clé entre ces deux structures et semblent impliqués dans les interactions HP-CPFm, support de la persistance des souvenirs.

Par des approches de lésion, d'inactivation pharmacogénétique et d'imagerie cellulaire appliquées à différents paradigmes comportementaux, l'implication des noyaux ReRh dans les processus mnésiques, particulièrement de consolidation, a été évaluée.

Nos travaux ont notamment mis en évidence que les noyaux ReRh, par leur implication spécifique dans les processus *offline* de consolidation, sont nécessaires pour la persistance à long terme d'un souvenir de peur conditionnée au contexte chez le rat. Ainsi l'implication du noyau Reuniens dans les processus de consolidation, initialement mise en évidence dans le cas de la mémoire spatiale, peut être étendue à d'autres types de mémoire HP-dépendants.

Mots-clés: noyaux Reuniens et Rhomboïde du thalamus, mémoire, consolidation systémique, conditionnement de peur

## **Summary**

Neuroanatomical and electrophysiological data place the thalamic Reuniens and Rhomboid nuclei as a key relay between the hippocampus (HP) and the medial prefrontal cortex (mPFC), two brain structures essential for memory. As such, the ReRh nuclei are thought to be involved in HP-mPFC interactions, supporting consolidation processes, and thus memory persistence.

Using excitotoxic lesion, chemogenetic inactivation and cellular imaging approaches in various behavioral paradigms, we assessed the implication of the ReRh nuclei in memory processes, particularly consolidation.

Our results show that the ReRh nuclei are necessary for offline consolidation of contextual fear memory in rats. A similar conclusion has been drawn from a previous study taxing spatial memory, another HP-dependent type of memory. Thus, the present data show that the necessity of the ventral midline thalamus to systems-level consolidation is not limited to a particular type of memory but could be more general.

Keywords : Reuniens and Rhomboid thalamic nuclei, memory, systems consolidation, fear conditioning