

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

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364

THÈSE présentée par
Elodie PANZER

Soutenue le **31 mars 2025**

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

Discipline / Spécialité : **Neurosciences**

**Etude de l'implication des projections
préfrontales vers le thalamus ventro-
médian dans la flexibilité cognitive
spatiale chez le rat**

THÈSE dirigée par :

Pr CASSEL Jean-Christophe

Professeur, Université de Strasbourg

Dr PEREIRA DE VASCONCELOS Anne

Chargée de Recherches, INSERM

RAPPORTEURS :

Dr QUILICHINI Pascale

Chargée de Recherches, Université d'Aix-Marseille

Dr SAVE Etienne

Directeur de Recherches, Université d'Aix-Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr RAVEL Nadine

Directrice de Recherches, Université de Lyon 1

MEMBRE INVITÉE :

Dr STEPHAN Aline

Maîtresse de conférences, Université de Strasbourg

Avertissement au lecteur / Warning to the reader

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

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

Code de la Propriété Intellectuelle

Article L122-4 :

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

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

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

Licence attribuée par l'auteur
Licence attributed by the author



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

Le serment des docteurs relatif à l'intégrité scientifique

“En présence de mes pairs.

Parvenue à l'issue de mon doctorat, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, en adoptant un réflexe éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quels qu'en soient le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats.”

Remerciements

La partie des remerciements peut paraître secondaire, mais en réalité, elle n'est ni la moins importante, ni la plus facile à rédiger... Trouver les mots justes pour exprimer toute ma reconnaissance envers celles et ceux qui m'ont accompagnée tout au long de ce parcours et qui m'ont permis d'en arriver à soutenir une thèse, n'a pas toujours été évident. J'espère que ces quelques lignes sauront transmettre l'immense gratitude que je leur porte.

En tout premier, je souhaite remercier les **149 rats** qui ont donné leur vie pour ce projet de thèse.

Je souhaite ensuite exprimer ma plus grande gratitude aux membres de mon jury, le **Docteur Pascale Quilichini**, le **Professeur Etienne Save**, et le **Professeure Nadine Ravel**, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail. Je vous remercie pour le temps que vous m'avez consacré et pour les discussions enrichissantes que nous pourrons avoir très bientôt.

Je souhaite également remercier l'**ITI NeuroStra** pour le financement qu'il m'a accordé afin de prolonger ma thèse de 6 mois. Sans ce soutien, il m'aurait été impossible de finaliser mes analyses, et je pense, qu'au-delà de ma frustration personnelle, ça aurait été très dommage pour le projet. J'en profite pour remercier également **Laurent Nexon** pour la gestion administrative de cette prolongation, ainsi que **l'ensemble de l'équipe du Collège Doctoral et de l'Ecole Doctorale** pour le soutien financier et administratif dont j'ai bénéficié pendant ma thèse. Le fait d'évoluer avec des personnes bienveillantes et soucieuses d'aider les doctorants facilite grandement ce parcours.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à mes encadrants, pour la confiance que vous m'avez accordée, pour ce projet que vous m'avez confié, pour tout le temps et l'énergie que vous m'avez consacrés. Votre expertise et vos précieux conseils ont été une source précieuse d'apprentissage. Merci pour votre disponibilité, vos encouragements et votre encadrement tout au long de mon parcours, qui m'ont guidée dans ma formation de jeune chercheuse.

Merci à **Jean-Christophe** pour les discussions enrichissantes que nous avons eu tout au long de cette thèse, et même avant. Merci d'avoir été un enseignant aussi passionné, et donc passionnant. Votre imagination sans limite et votre incroyable talent pour manier les concepts et les mots ont été très inspirants. Merci aussi pour toutes les métaphores créatives qui accompagnent vos mails et vos corrections, et forcent le sourire même si les nouvelles ne sont pas toujours bonnes.

Merci à **Anne**, tout d'abord pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant de réaliser un stage alors que j'étais encore en L1. Ce stage a été une véritable révélation, une source de motivation précieuse qui m'a portée tout au long de mes années d'études jusqu'à mon retour au LNCA pour mon stage de M2. Merci pour votre positivité inébranlable, votre bienveillance et vos mots toujours encourageants. Votre porte a toujours été ouverte, que ce soit pour me rassurer un peu sur la vie, ou pour échanger sur des sujets aussi essentiels que le féminisme. Merci également de m'avoir initiée aux conférences dans les collèges et lycées, et de m'avoir toujours

soutenue dans mes projets de vulgarisation scientifique, une expérience que j'ai adorée et qui m'a énormément apporté.

Merci à **Aline**, pour ton encadrement quotidien depuis le premier jour de mon stage de M2 (que je ne suis pas près d'oublier...). Merci de m'avoir formée comme tu l'as fait, de m'avoir poussée à dépasser mes limites mais toujours avec beaucoup de bienveillance et de patience (notamment pour les chirurgies). Merci pour tes conseils très avisés et humains qui ont été d'un grand soutien pour moi, et en particulier merci infiniment de m'avoir conseillé de prendre des vacances l'été dernier, parce que j'aurais jamais osé les prendre sans toi, et qu'elles ont été réellement salvatrices. Merci de m'avoir appris à dire non (même si j'ai encore quelques progrès à faire de ce côté-là) et de m'avoir enseigné qu'il fallait imposer ses propres limites. Merci pour ta spontanéité, pour les sushis post-chirs, pour les remplissages de tableau de SBEA, pour les "viens entre, et ferme la porte ...", et pour les cohortes A, B, C, DM, E, F, G et H. Merci pour ton accompagnement pendant tout mon cheminement, scientifique et personnel. Je te souhaite de t'épanouir avec tes futurs doctorants officiels, ils auront de la chance de t'avoir !

Brigitte, merci pour tout ce que tu as fait pour moi ! Pour ta formation, tes précieux conseils, ton expertise, ta disponibilité, ta gentillesse et pour toutes les chirurgies, perf, coupes et immunos. Sans toi, je serais sûrement encore en train de couper mes cerveaux à l'heure qu'il est... Merci aussi pour ta bienveillance, pour ton altruisme et pour tout ce que tu fais, parfois dans l'ombre, qui permet de faire tourner le labo. Je te souhaite une très belle retraite bien méritée dans ta belle Bretagne (et je suis assez contente de ne plus être là pour voir le LNCA sans toi ...).

Un immense MERCI à **Elouan**, d'avoir sauvé mon disque dur, LE disque dur contenant l'intégralité de mes trois années de thèse, ce mémorable vendredi 12 juillet 2024. Autant dire que ce jour-là, tu n'as pas seulement sauvé quelques fichiers, mais tu as sauvé ma thèse, et je t'en serai éternellement reconnaissante !

Obrigada, **Isabella**, pelo seu bom humor contagiante e pelos seus pequenos passos de dança diários. A sua presença, combinando doçura e energia, iluminava os meus dias. Obrigada pela sua ajuda valiosa no projeto; parto com a certeza de que ele ficará em ótimas mãos. Desejo de todo o coração que cada um dos seus projetos, tanto profissionais quanto pessoais, se concretize exatamente como você espera.

Merci à **Karin** pour ta bonne humeur inébranlable, pour ton dévouement sans faille, ta bienveillance, ta générosité et ta disponibilité. Merci de m'avoir formée au cryostat et au Nanozoomer. Merci aussi pour tout ce que tu fais au quotidien pour le labo. Qu'il s'agisse de t'occuper des médicaments, de faire face aux attaques de Voldemort, ou encore de décorer la cafet les jours de fête, ton engagement ne passe jamais inaperçu. Je te souhaite tout le bonheur du monde pour la suite !

Merci à **Aminé** pour ta gentillesse, ta douceur et ta dévotion. N'oublie pas de prendre des congés et de te reposer un peu quand même.

Merci à **Catherine**, qui a la lourde tâche de faire tourner le labo. Merci de t'occuper des commandes, même si on sait pas trop sur quel budget on doit les mettre, merci de rassembler les 12547 documents à faire signer au/à la directeur/directrice du labo, merci d'ouvrir la porte à tous les kékés qui oublient leurs clés, et de gérer les cagnottes, même quand il y a en a 3 en même temps...

Merci aux animaliers, **Olivier, Daniel, George, Brice et Marion** qui prennent soin des animaux et de leurs hébergements au quotidien.

Merci à **Chantal Mathis** et à **Dominique Massotte** d'avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi individuel durant ces 3,5 années. Merci pour vos précieux conseils, à la fois scientifiques et personnels. Merci également à Dominique pour sa formation sur le Nanozoomer, et surtout pour la gestion des (parfois fréquents) problèmes.

Merci à l'ensemble des **stagiaires** qui ont travaillé sur ce projet (Marie-Sarah, Elias, Charleen, Patricia, Ewa, Thomas, Julie, Samantha, Ludovic, Lisa, Solène, Arthur, Julia, Lilian, Marion, Maria, Emma, Lin, Axelle et Marie), certains pour l'immense aide qu'ils m'ont apportée dans mon projet, d'autres pour l'enseignement que j'ai pu tirer de cette expérience d'encadrement.

Merci à **Geneviève Belleville**, d'avoir écrit le livre "*Assieds-toi et écris ta thèse!*", que je conseille à tous les futurs docteurs, tellement ces mots ont été justes et percutants, motivants et déculpabilisants.

Merci à l'ensemble des membres du LNCA de faire de ce laboratoire un lieu agréable, où il est chouette de travailler dans la bonne humeur et la bienveillance. Merci particulièrement à **Katia, Laurette** et **Romain B** pour leur sympathie, leurs encouragements et leurs conseils.

Merci aux membres de l'ancienne équipe 1 pour les discussions enrichissantes que l'on a pu avoir. Merci particulièrement à Baptiste et Rafael, qui m'ont formée sur QuPath, et à Laurette et Iris avec qui nous avons pu collaborer.

Iris, hvala ti što si mi otkrila ovo prekrasno mjesto, ili bolje rečeno, ovaj "lieu bucolique" koji je *Café de Flore*. To je zaista iskustvo koje nikada ne bih doživjela da te nisam upoznala. Hvala ti i za trenutke provedene u Beču, koji su mi omogućili da otkrijem senzibilitet skriven iza tvoje prirodne elegancije. Na kraju, hvala ti na tvojoj znanstvenoj preciznosti – želim ti sve najbolje za tvoj postdok i daljnju karijeru.

Baptiste, merci d'avoir fait de moi la vice-présidente de Doctoneuro, même si c'était contre mon gré, ce fut une expérience enrichissante.

Merci à **Pascal** pour tes visites quasi quotidiennes, même si je sais qu'elles n'étaient pas pour moi ... Plus sérieusement, merci pour ton humour et ton auto-dérision, derrière lesquels se cachent un fond de sensibilité et de bienveillance.

Merci à **Monique, Céline** et **Alexandra** de m'avoir accompagnée dans l'aventure de l'enseignement au cours de ma thèse, une expérience que j'ai absolument adorée. Votre engagement et votre dévouement envers les étudiants sont admirables.

Merci à l'ensemble des **doctorants** pour la cohésion et le soutien qui ont toujours régné et qui rendent certaines journées plus légères. Cette solidarité m'a été précieuse.

Merci aux anciennes : **Laura**, **Marido** et **Gaëlle**, pour les bons souvenirs que vous avez laissés. Merci à **Amélie**, d'avoir accepté ce simple entretien d'APE quand j'étais en L1, qui a conduit à un stage au LNCA. Et merci à **Etienne** de m'avoir encadrée pendant ce stage, qui a réellement été une révélation pour moi.

Florian, merci pour ton incroyable humour qui nous manque beaucoup depuis ton départ. Par contre je te remercie pas d'avoir perdu les lames de TP :p

Matthieu, merci pour tes explications sur les oscillations, tes petits cours de politique et tes recettes instagramables.

Henry, merci pour la recette du banana bread. Je l'ai pas encore testée, mais bientôt j'aurais un peu plus de temps pour le faire...

Coline M, merci pour tes encouragements pendant la rédaction.

Anaëlle, merci pour ta bonne humeur, ta sensibilité, et ton rire communicatif.

Johanne, merci pour ton cynisme.. Non, je rigole ! Enfin, pas si sûre ...

Jeanne, merci pour ta bonne humeur, ta douceur, ton calme et ta gentillesse (et aussi ta discrétion pendant qu'on rédigeait), j'espère qu'on ne t'a pas fait trop peur avec Cécile ... Je te souhaite une très belle thèse, et plein de bonheur à la présidence de Doctoneuro !

Noémie et Jil, merci pour votre sympathie... Non, je rigole voyons, vous n'êtes pas qu'une seule personne ! Alors **Jil**, merci pour ta gentillesse et ton soutien. Je te souhaite une très belle thèse à travailler sur les marques épigénétiques R6K27...

Noémie, tu es la personne la plus adorable que je connaisse, ton altruisme est sans limite. Merci du fond du cœur pour tout ce que tu as fait pour moi, pour tout ton soutien, pour tes petites attentions (toujours au bon moment) qui m'ont réchauffé le cœur. Et bien sûr pour tes petites visites au bureau... Je te souhaite vraiment tout le meilleur pour la suite. (PS : merci d'avoir accepté de dormir avec moi dans la chambre des ronfleurs, même s'il faisait 52°)

Cécile, quel chemin on a parcouru depuis la fois où on a travaillé ensemble sur un projet d'immuno en L3, pour lequel on a eu 0 parce que le prof avait oublié qu'on lui avait envoyé notre dossier ! Toujours côte à côte, jusque dans la dernière ligne droite. Merci pour tous les bons moments qu'on a partagés, mais aussi pour les doutes qu'on a traversés ensemble ... Merci pour ta force et ta motivation.

Je te souhaite d'identifier ce qui t'épanouira professionnellement, parce que quoi que ça puisse être, je n'ai aucun doute : tu le feras à merveille.

Coline, merci pour ta gentillesse d'une incroyable sincérité et pour ton altruisme. Ton humilité est une qualité précieuse, mais ne doute jamais d'à quel point tu es brillante ! Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée dans la compréhension des oscillations et merci d'avoir relu cette partie du manuscrit ! Je te souhaite une très belle fin de thèse, et que l'étape d'après t'apporte autant d'épanouissement que tu le mérites, où qu'elle te mène. J'espère quand même que ça sera pas trop trop loin, pour qu'on puisse encore aller chercher des myrtilles et faire des tartes flambées ensemble.

J'en profite pour remercier aussi la promo de master 2019-2021, parce que mine de rien, la thèse c'est pas toujours facile, mais le master c'est pas de la tarte non plus. Je suis vraiment contente qu'on ait réussi à créer une telle cohésion entre nous, alors qu'on a vécu le covid de plein fouet. Un merci tout particulier à **Flore** (et plein de courage pour tes derniers mois de thèse !!) et à **Estelle**, qui sont loin des yeux mais près du cœur.

Anne-Soso, tes petites chansons me manquent chaque jour depuis que tu es partie. Merci pour l'accueil que vous m'avez réservé avec Laurine au bureau du 1er, dès mon arrivée. Merci pour tous les moments, les discussions plus ou moins profondes, les blind test et les fous rires que l'on a partagés au bureau. Merci pour ton calme, ta sérénité et ton rire. Merci pour ton soutien, pendant la thèse et pendant les cours d'aqua combat ! J'espère te revoir bientôt et fais un gros bisou à Nikki !!

Laurine, je ne sais pas si tu vas pleurer en lisant ces mots, mais comme je pleure en les écrivant, ça compte quand même ... Depuis notre rencontre pendant un stage en 2016, nous sommes liés par les liens sacrés du Reuniens. Si je suis là aujourd'hui, c'est littéralement grâce à toi. Et je ne parle pas encore de tout ce qu'on a partagé, mais de tes mots qui m'ont convaincue de continuer en thèse, au(x) moment(s) où j'ai douté. Mon Dieu, qu'il a été précieux pour moi qu'il existe une personne au monde qui sache exactement ce que je vivais. Alors merci pour ton incroyable travail, pour ta rigueur et ta sensibilité. Merci pour les moments qu'on a passé à découper tous les joints du Double-H, ceux qu'on a passé à se raconter nos vies en vidant les puits en immuno, ceux qu'on a passés à rire, et ceux qu'on a passé à pleurer (surtout les vendredis soirs devant l'apotome quand on découvrait les trous ...). Cette liste des raisons pour lesquelles je te remercie n'est pas exhaustive parce que sinon je n'aurais plus assez de temps pour finir d'écrire ma thèse ... Alors merci pour ton soutien, pour tes conseils, merci de m'avoir appris à créer une bulle. Merci d'être devenue une véritable amie.

Merci à **Anne-Laure**, ma mentore, qui m'accompagne depuis plus de 2 ans. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré, pour ton écoute attentive, pour ton accompagnement et pour tes précieux conseils. Merci pour ces moments hors du labo qui ont su apporter équilibre et perspective tout au long de ma thèse. Je te suis vraiment reconnaissante de m'avoir aidée à grandir pendant ce chemin.

Merci à **LG**, pour votre écoute précieuse et vos mots d'une justesse incroyable. Vous avez su me guider à travers mes moments de doute, et m'aider à prendre conscience que, même si mon environnement ne me laissait pas toujours le percevoir, j'avais bel et bien le droit à l'erreur. Grâce à vous j'ai appris à mieux me comprendre et à aborder les difficultés avec plus de sérénité.

Merci à mes amis de longue date, **Alithia, Antoine, Arnaud, Aurélie B, Aurélie W, Camille, Caroline, Cécile, Emilie, Florine, Léonie** et **Victor** (pas de jaloux, vous êtes dans l'ordre alphabétique). Je pense que vous n'avez pas été de trop mauvaises fréquentations pendant les années ingrates du lycée... Merci pour votre soutien, pour tous les moments qu'on a passés ensemble et qui m'ont permis de décompresser, pour tous les pré-nouvel an, les après jeux, les week-ends pêche et les petites randos (bon, sauf celle où j'ai failli mourir ...). Ça y est, j'ai fini de rédiger, je vais à nouveau être disponible !!

Une mention spéciale à Léonie et Alithia pour les pauses téléphones et les messages de soutien, et à Victor pour ses petits chocolats de motivation.

Enfin, un immense merci à ma famille. **Maman, Papa, Hugo, MamilouP** et **PapilouP, Mami Colette** et **Papi François, Carine, Sylvie** et **Bertrand, Patrick, Virginie**. Même si vous n'avez pas toujours (jamais) compris exactement ce que je faisais, vous avez toujours été présents pour moi. Merci de m'avoir toujours soutenue dans tous mes choix, et de m'avoir fait confiance. Merci pour votre présence indéfectible, votre soutien moral (et financier !) pendant ces (longues) années d'étude. Merci pour vos encouragements, vos mots doux et toute l'énergie que vous m'avez transmise.

Papa, Maman, merci de m'avoir appris à toujours faire de mon mieux, je crois bien que c'est ce qui m'a permis d'arriver jusqu'ici.

Ebène, merci de ne m'avoir jamais laissée seule et de m'avoir toujours tenu compagnie. Merci pour ta patience quand je devais travailler au lieu de passer la journée à te faire des papouilles. Merci aussi pour l'aide que tu m'as apportée pour la rédaction en marchant sur mon clavier, allant même jusqu'à effacer des paragraphes entiers que tu jugeais inutiles. Ta présence est précieuse. Une pensée aussi pour **Camouille** qui m'a accompagnée depuis le paradis des chats.

Et enfin, un immense merci à toi, **Simon**.

On imagine assez facilement à quel point la rédaction d'une thèse est une épreuve exigeante. Mais ce que peu de personnes réalisent, c'est ce que ça représente de vivre avec moi-qui-écris-ma-thèse. Depuis plus de 10 ans, je peux compter sur toi, sur ton soutien infailible et sur ta patience sans limite. Mais ces derniers mois, plus que jamais, tu as été mon roc, mon refuge, un véritable pilier sans qui je me serais écroulée. Merci d'avoir tout fait pour me comprendre, et de m'avoir toujours respectée, soutenue, accompagnée et supportée même à chaque fois que tu ne me comprenais pas. Je t'aime.

Table des matières

Abréviations	
Avant-propos	
Structure de la thèse	
Contexte Scientifique.....	1
Chapitre 1 : La cognition spatiale.....	3
I. La navigation spatiale.....	3
1. La représentation des informations spatiales.....	4
2. Les stratégies de navigation spatiale	5
3. La carte cognitive	7
4. Les cellules spatiales.....	7
II. La mémoire spatiale	9
1. La persistance d'un souvenir spatial	10
III. Notions de mémoire procédurale	13
Chapitre 2 : La flexibilité cognitive.....	15
I. Définition.....	15
II. La flexibilité cognitive chez l'humain	16
III. La flexibilité cognitive chez l'animal.....	17
IV. Substrats neurobiologiques	22
Chapitre 3 : Le réseau cortico-thalamo-hippocampique	24
I. Le cortex préfrontal médial.....	24
1. Description	24
2. Anatomie et connectivité	26
3. Fonctions principales.....	26
II. Les noyaux reuniens et rhomboïde.....	27
1. Description anatomique et neurochimique	27
2. Connectivité et implications fonctionnelles.....	29
III. L'hippocampe	32
IV. Le réseau cortico-thalamo-hippocampique	34
1. Description anatomique.....	34
2. Les systèmes inhibiteurs	38

3.	Les implications fonctionnelles	40
V.	La projection cortico-thalamique	55
	Objectifs de la thèse	57
	Matériels et Méthodes	59
I.	Animaux et considérations éthiques.....	61
II.	Déconnexion conditionnelle Cre-caspase	62
1.	Approche virale : utilisation de virus adéno-associés	62
2.	Principe du système Cre-lox	63
3.	Déconnexion cortico-thalamique.....	65
4.	Chirurgie stéréotaxique.....	68
5.	Protocole expérimental de la chirurgie.....	70
III.	Evaluations comportementales	71
1.	Le labyrinthe en croix surélevé	72
2.	La piscine de Morris	73
3.	L'object-in-place	76
a.	Principe.....	76
b.	Dispositif.....	76
c.	Protocole	78
4.	Le Double-H.....	80
a.	Principe.....	80
b.	Dispositif.....	80
c.	Protocole	82
IV.	Techniques histologiques et immunohistochimiques.....	85
1.	Mise à mort et prélèvement des cerveaux	85
2.	Coupes coronales au cryostat	86
3.	Immunomarquages	86
a.	Principe.....	86
b.	Protocole	87
c.	Applications.....	89
V.	Acquisition des images	90
VI.	Quantifications	91

1.	Quantification d'aires avec QuPath	92
2.	Quantification automatisée de cellules avec QuPath	92
a.	L'outil <i>Cell Detection</i>	92
b.	L'outil <i>Classifier</i>	94
VII.	Analyses statistiques	94
VIII.	Récapitulatif du plan expérimental.....	95
Partie 1 : Optimisation de la technique de déconnexion cortico-thalamique		99
Contributions expérimentales		103
I.	Expérience 1 : Etude comparative de différents virus exprimant la Cre-recombinase	103
1.	Etude de l'infection des ReRh	103
a.	CAV2-Cre-GFP.....	103
b.	AAVrg-Cre-mCh	104
c.	AAVrg-Cre-GFP	105
2.	Etude des rétroprojections dans le CPFm	106
a.	AAV-Cre-mCh.....	108
b.	AAVrg-Cre-GFP	109
II.	Optimisation des conditions d'injection de l'AAVrg-Cre-GFP	112
1.	Expérience 2 : Neurotoxicité de l'AAVrg-Cre-GFP.....	113
2.	Expérience 3 : Etude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre.....	146
Discussion.....		149
I.	Importance de la mise au point	149
1.	Tropisme du CAV2-Cre-GFP.....	150
2.	Toxicité de l'AAVrg-Cre-GFP.....	150
3.	Contre la toxicité de l'AAV-Cre-GFP.....	155
II.	Importance des conditions contrôles.....	157
Partie 2 : Etude du rôle de la projection préfrontale vers les ReRh dans la flexibilité cognitive		159
Contributions expérimentales		161
I.	Expérience 4 : Etude de l'impact de la déconnexion cortico-thalamique sur la cognition spatiale	161

1.	Contrôle de l'absence de neurotoxicité dans les ReRh.....	198
2.	Analyse des séquences procédurales dans le Double-H.....	199
3.	Analyse fonctionnelle : comptage des neurones c-Fos positifs.....	200
4.	Object-In-Place	202
II.	Expérience 5 : Etude du rôle fonctionnel de la voie CPFm → ReRh	207
	Discussion générale	209
I.	Les différences entre les deux tâches/processus.....	212
1.	L'origine de l'information – Contrôle top-down VS synchronisation bottom-up 212	
2.	Processus <i>online</i> VS <i>offline</i>	213
3.	La navigation spatiale dirigée vers un but.....	217
II.	Une nouvelle vision du réseau cortico-thalamo-hippocampique.....	219
1.	Les ReRh comme relai entre le CPFm et l'Hip	219
2.	Vers une distinction du Re et du Rh ?	220
3.	La prise en considération du TRN.....	222
	Perspectives.....	225
I.	La dissociation des collatérales du CPFm vers le TRN et vers les ReRh	225
II.	L'étude des autres voies de projection du réseau cortico-thalamo-hippocampique 227	
	Conclusion générale	229
	Bibliographie	231

Table des figures

Figure 1. La représentation des informations spatiales	4
Figure 2. Les différentes stratégies de navigation	6
Figure 3. Les cellules spatiales	8
Figure 4. Représentation schématique de la théorie standard de la consolidation systémique	12
Figure 5. Le <i>Wisconsin Card Sorting Task</i>	16
Figure 6. L'apprentissage de l'inversion de consigne	19
Figure 7. Le changement d'orientation attentionnelle	20
Figure 8. Le cortex préfrontal humain	24
Figure 9. Le cortex préfrontal médian du rat	25
Figure 10. Connectivité du CPFm	27
Figure 11. Organisation neuroanatomique des noyaux reuniens et rhomboïde	28
Figure 12. Connectivité des ReRh	30
Figure 13. L'hippocampe	32
Figure 14. Le réseau cortico-thalamo-hippocampique	34
Figure 15. Les systèmes inhibiteurs	38
Figure 16. Rats mâles Long Evans	61
Figure 17. Fonctionnement du système Cre-lox	64
Tableau 1. Récapitulatif des virus utilisés	66
Figure 18. Approche virale de la déconnexion cortico-thalamique	67
Figure 19. Evolution du cadre de chirurgie stéréotaxique	68
Figure 20. Points crâniométriques	70
Figure 21. Labyrinthe en croix surélevé	73
Figure 22. Piscine de Morris	74
Figure 23. Protocole de piscine de Morris	75
Figure 24. <i>Object-in-Place</i>	77
Figure 25. Objets utilisés pour la tâche d' <i>Object-in-Place</i>	78

Figure 26. Protocole d' <i>Object-in-Place</i>	79
Figure 27. Le Double-H	81
Figure 28. Protocole de Double-H	83
Figure 29. Etude de la flexibilité comportementale dans le Double-H	84
Figure 30. Résultats des précédents travaux de l'équipe	85
Tableau 2. Récapitulatif des anticorps utilisés	89
Figure 31. Illustrations des méthodes de quantification avec le logiciel QuPath	93
Tableau 3. Récapitulatif du plan expérimental	97
Figure 32. Profils d'infection des ReRh par le CAV2-Cre-GFP et rétromarquages préfrontaux	104
Figure 33. Profils d'infection des ReRh par l'AAVrg-Cre-mCh	105
Figure 34. Profils d'infection des ReRh par l'AAVrg-Cre-GFP	106
Figure 35. Etude des rétroprojections de l'AAV-Cre-mCh dans le CPFm	109
Figure 36. Etude des rétroprojections de l'AAV-Cre-GFP dans le CPFm	111
Figure 37. Etude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre	147
Figure 38. Design expérimental de l'expérience 4	162
Figure 39. Etude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh	198
Figure 40. Nombre de séquences procédurales lors du deuxième test de rappel en Double-H	200
Figure 41. Analyse fonctionnelle après le deuxième test de rappel en Double-H	201
Figure 42. Contrôles prérequis dans la tâche d' <i>Object-in-Place</i>	203
Figure 43. Performances lors du rappel en <i>Object-in-Place</i>	205
Figure 44. La nouvelle version du réseau cortico-thalamo-hippocampique	223
Figure 45. Schéma de la dissociation des collatérales par inhibition pharmacogénétique	226

Abréviations

A

AAV : Virus Adéno-Associé
ACC : Cortex Cingulaire Antérieur

B

BLA : Noyau Basal de l'Amygdale

C

CA : Corne d'Ammon
calB : Calbindine
calR : Calrétinine
CAR : Récepteur des Adénovirus et des
Coxsackievirus
CAV : Adénovirus Canin
CE : Cortex Entorhinal
CMV : Cytomégalovirus
CNO : N-oxyde de Clozapine
CPF : Cortex Préfrontal
CPFm : Cortex Préfrontal médian

D

DAB : 3,3'-diaminobenzidine
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DCZ : Deschloroclozapine
DREADD : Designer Receptor Exclusively
Activated by Designer Drugs

E

EF1a : Facteur d'élongation 1 α
ER : Récepteur aux Œstrogènes
ETI : Entrées inhibitrices extra-
thalamiques

G

GABA : Acide γ -aminobutyrique
GD : Gyrus Denté
GFAP : Protéine d'Acides Fibrillaires
Gliales
GFP : Protéine Fluorescente Verte

H

Hip : Hippocampe
HM : Henry G. Molaison
HRP : *Horseradish Peroxidase*
hSyn : Synapsine humaine

I

Iba1 : Ionized calcium-binding adaptor
molecule 1
IL : Cortex Infralimbique

L

LTD : Dépression à Long Terme
LTM : Lobe Temporal Médian
LTP : Potentialisation à Long Terme

M

mCh : mCherry
MD : Noyau Médiodorsal du thalamus

N

NeuN : Neuronal Nuclear

O

OD : Objet Déplacé
OND : Objet Non Déplacé
OiP : *Object-in-Place*

P

PAF : Paraformaldéhyde
PBS : Tampon Phosphate Salin
PériRe : Péri-Reuniens
PL : Cortex Prélimbique
PVN : Noyau hypothalamique
Paraventriculaire

R

Re : Noyau Reuniens
ReRh : Noyau Reuniens et Rhomboïde
Rh : Noyau Rhomboïde

S

SWS : Sommeil à ondes lentes

T

TEVp : Protéase du virus de la gravure du
tabac
TRN : Noyau Réticulaire Thalamique

V-W

VTA : Aire Tegmentale Ventrale
WCST : *Wisconsin Card Sorting Task*

“In science, progress is achieved by building on the discoveries and theories of those who have gone before.

“We are like dwarfs sitting on the shoulders of giants. We see more, and things that are more distant, than they did, not because our sight is superior or because we are taller than they, but because they raise us up, and by their great stature add to ours”, John of Salisbury, a 12th Century theologian and author“

Josselyn et al., 2017

Avant-propos

Dans un monde en constante évolution, où l'incertitude et le changement sont la norme, **la capacité à s'adapter est absolument essentielle.**

Que ce soit lorsqu'un trajet quotidien est perturbé par des travaux imprévus, obligeant à trouver un itinéraire alternatif, lorsqu'une discussion nous amène à reconsidérer notre point de vue, ou encore lorsque nous devons apprendre de nouvelles règles après une mise à jour logicielle, notre cerveau est constamment sollicité pour ajuster nos comportements et nos stratégies. Cette capacité, que l'on exerce sans même y penser, repose sur des mécanismes cérébraux complexes, dont le fonctionnement reste encore à élucider.

Mais lorsque cette flexibilité est altérée, ces ajustements, qui nous semblent anodins, deviennent d'immenses défis. Pour une personne souffrant d'un trouble du spectre autistique, un simple changement d'horaires peut générer une détresse considérable. Chez un patient schizophrène, la difficulté à adapter son comportement peut se manifester par une persévération excessive, c'est-à-dire une tendance à s'obstiner à suivre une règle ou une stratégie devenue inadaptée. Dans ces situations, l'incapacité à s'adapter limite non seulement l'autonomie, mais aussi la qualité de vie des personnes concernées.

Comprendre les circuits cérébraux impliqués dans la flexibilité cognitive ne relève donc pas uniquement d'une curiosité scientifique : c'est une nécessité pour mieux appréhender ces troubles et, à terme, explorer des pistes thérapeutiques.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette démarche : explorer les bases neuronales de la flexibilité cognitive, en particulier le rôle des projections préfrontales vers les noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus. À travers cette recherche, j'espère contribuer à la compréhension des mécanismes fondamentaux qui nous permettent, chaque jour, de nous ajuster à un monde en perpétuel mouvement.

Structure de la thèse

La première section de ce manuscrit introduit le contexte scientifique dans lequel s'inscrivent mes travaux de thèse. Le premier chapitre est consacré à la cognition spatiale, avec un accent particulier sur la navigation spatiale. J'y aborde également certains aspects de mémoire spatiale et de mémoire procédurale. Le deuxième chapitre porte sur la flexibilité cognitive et présente les principaux tests comportementaux permettant de l'évaluer chez le rongeur. Enfin, le troisième chapitre propose une description neuroanatomique du réseau cortico-thalamo-hippocampique, reliant le cortex préfrontal, les noyaux reuniens et rhomboïde de la ligne ventro-médiane du thalamus ainsi que l'hippocampe. Je présente également le rôle de ces structures, en particulier dans la flexibilité comportementale, à travers une revue publiée.

Après avoir exposé les objectifs de ma thèse, le manuscrit se poursuit avec une description détaillée des matériels et méthodes employés tout au long du projet de thèse. Les résultats sont présentés en deux parties. La première est consacrée à la mise au point et à l'optimisation du protocole expérimental. Après une brève introduction, j'y expose les résultats obtenus, incluant un article publié, et discute des problèmes techniques rencontrés. La seconde partie porte sur l'étude du rôle de la projection du cortex préfrontal vers le thalamus ventro-médian dans la flexibilité cognitive. J'y présente les résultats histologiques et comportementaux, incluant un manuscrit d'article.

Enfin, le manuscrit s'achève par une discussion générale sur l'implication de la projection du cortex préfrontal vers les noyaux reuniens et rhomboïde, au sein du réseau cortico-thalamo-hippocampique, ainsi que sur les perspectives ouvertes par ces travaux.

Contexte Scientifique

Chapitre 1 : La cognition spatiale

Tous les animaux capables de se mouvoir doivent interagir avec leur environnement spatial pour assurer leur survie. En effet, ils doivent se déplacer pour trouver un partenaire, rejoindre des congénères, localiser des sources de nourriture et d'eau, ou encore se mettre à l'abri. Mais il ne s'agit pas seulement de parcourir de longues distances, il est essentiel de naviguer de manière efficace et flexible. Ainsi, étudier la façon dont les animaux interagissent avec leur environnement spatial revient à étudier un processus fondamental et complexe permettant la survie (Grieves and Jeffery, 2017). Certains auteurs vont même jusqu'à suggérer que seuls les animaux capables de se déplacer ont besoin d'un cerveau (Parra-Barrero et al., 2023). Ainsi, dès le début du XXème siècle, les scientifiques ont cherché à comprendre comment les animaux perçoivent et utilisent l'espace. Par exemple Watson et Lashley (1915) ont étudié la manière dont deux espèces d'oiseaux marins, la sterne fuligineuse et le noddie noir, retrouvent leur nid après leurs déplacements.

Depuis, l'intérêt pour la **cognition spatiale** - définie comme l'ensemble des processus mentaux impliqués dans la perception, la représentation, la mémoire et la manipulation de l'information spatiale – n'a cessé de croître. Ce domaine reste aujourd'hui un sujet d'étude majeur en neurosciences, comme en témoigne l'attribution du Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 2014, attribué à John O'Keefe, May-Britt et Edvard Moser, pour la découverte des cellules de lieu et des cellules de la grille, permettant la représentation de l'espace.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons principalement à la navigation spatiale, aux différentes stratégies employées et à la capacité à en changer. Nous évoquerons également certains aspects de la mémoire spatiale.

I. La navigation spatiale

La navigation spatiale désigne l'ensemble des processus cognitifs et comportementaux permettant à un organisme de se déplacer efficacement dans son environnement afin d'atteindre des objectifs précis. Elle repose sur la représentation et l'intégration des informations spatiales, ainsi que de sa propre position, et se traduit par la mise en œuvre de stratégies de navigation. Plusieurs stratégies co-existent et peuvent coopérer, en fonction de

la disponibilité des repères et de la familiarité avec l'environnement et la trajectoire, offrant ainsi différents degrés de flexibilité et de complexité comportementale (Hok et al., 2016).

1. La représentation des informations spatiales

Pour naviguer efficacement dans l'espace, il est d'abord essentiel de se représenter sa propre position, ainsi que celle d'un éventuel objectif à atteindre. Toutefois, pour assurer une navigation optimale entre ces deux points, il est indispensable de disposer d'une représentation de l'environnement spatial. Ces informations peuvent être de deux types, en fonction du système de référence considéré.

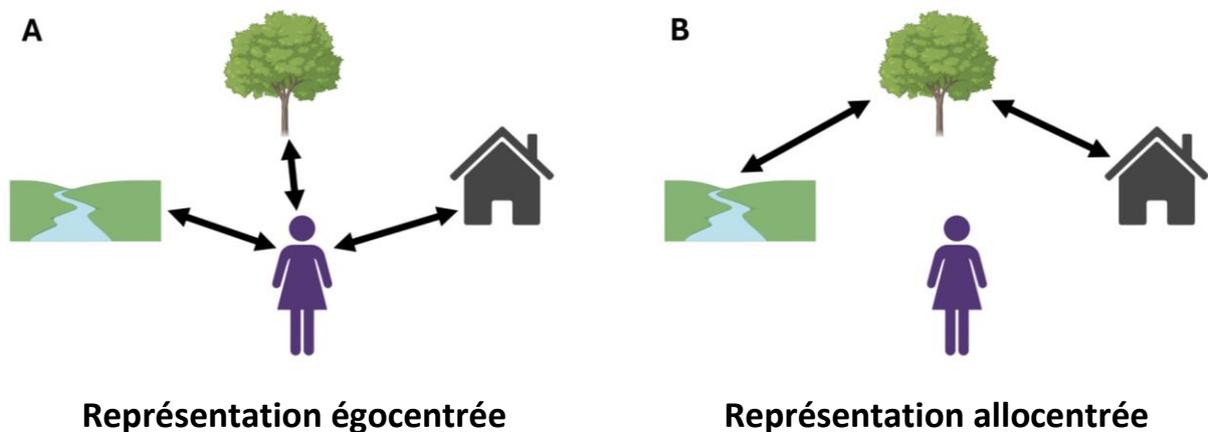


Figure 1. La représentation des informations spatiales

A : Le système égocentré représente les indices spatiaux idiothétiques dans le référentiel de l'individu. La localisation des objets est représentée par rapport au corps de l'individu.

B : Le système allocentré représente les indices spatiaux allothétiques dans le référentiel de l'environnement externe. La localisation des objets est représentée de manière relative à celle des autres objets, ce qui permet d'établir la carte spatiale de notre environnement

D'une part, les indices **idiothétiques**, encore appelés **égocentrés** (Figure 1A), sont centrés sur l'individu, et reposent notamment sur les mouvements intrinsèques du corps. Ils permettent d'estimer la position et l'orientation dans l'espace en intégrant les signaux issus du déplacement, tels que la distance parcourue et les rotations effectuées. Ces indices proviennent principalement des systèmes vestibulaire, kinesthésique et proprioceptif (Arleo and Rondi-Reig, 2007). D'autre part, les indices **allothétiques**, ou **allocentrés** (Figure 1B), proviennent de l'environnement externe, et concernent la configuration des repères perceptibles et leurs relations spatiales. Bien que la modalité visuelle prédomine, notamment

chez les primates, ces indices peuvent également être d'origine tactile, auditive ou olfactive (Hok et al., 2016).

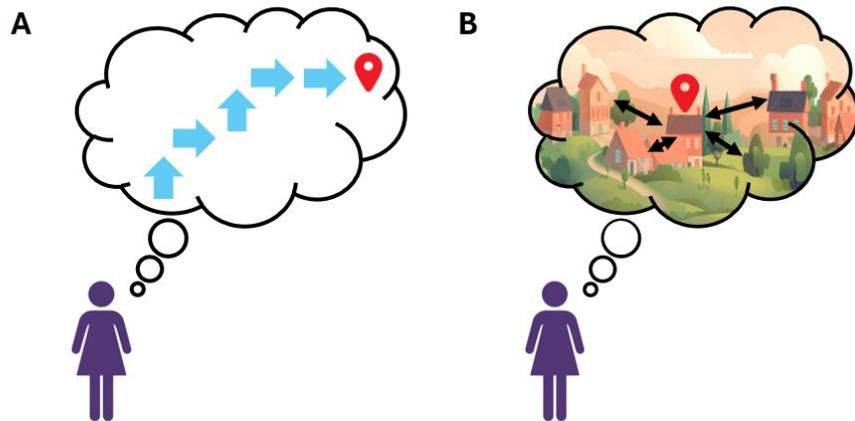
En réalité, lorsque ces deux types d'indices sont disponibles, ils sont traités simultanément et en parallèle grâce à une intégration multisensorielle (Arleo and Rondi-Reig, 2007).

2. Les stratégies de navigation spatiale

Les rongeurs naviguent dans l'environnement en utilisant une combinaison d'indices allothétiques et idiothétiques de façon flexible et opportuniste, ce qui les conduit à adapter leurs stratégies en fonction des conditions de l'environnement (Rondi-Reig et al., 2006 ; Hok et al., 2016).

Lorsque la cible est immédiatement visible ou identifiable, une simple **stratégie de réponse** à ce stimulus suffit pour guider directement la navigation ; elle se fait à vue. En revanche, si la cible n'est pas immédiatement identifiable, une approche plus élaborée est nécessaire.

Lorsque la stratégie repose sur une succession stéréotypée de mouvements, elle est nommée **stratégie égocentrique** (ou stratégie de route, **Figure 2A**). Certains auteurs distinguent une stratégie égocentrique simple, nécessitant un seul mouvement comme une simple réponse à un stimulus, d'une stratégie égocentrique séquentielle, impliquant une séquence de mouvements, qui sont enchaînés selon un ordre précis (Hok et al., 2016). Cette stratégie, basée principalement sur les indices idiothétiques, repose sur un itinéraire. C'est le cas, par exemple, lorsque l'on se perd dans une ville inconnue et que l'on demande son chemin à un habitant. Il indique alors de tourner à droite au prochain croisement, puis de continuer tout droit jusqu'au bout de la rue, et enfin de tourner à gauche. Cette stratégie est cognitivement économique puisqu'elle nécessite le traitement et la mémorisation de peu d'informations. Toutefois, elle est peu flexible car elle ne peut pas faire face à des modifications de l'environnement. Dans l'exemple cité, si la rue indiquée est barrée avant l'intersection, il devient difficile de retrouver son chemin. La stratégie égocentrique dépend, entre autres, du striatum (e.g. Packard and McGaugh, 1996) et met en jeu une mémoire procédurale (voir **III. Notions de mémoire procédurale**).



Stratégie	Egocentrique	Allocentrique
Indices	Idiothétiques	Allothétiques
Référentiel	Soi-même	La carte cognitive
Mémoire	Procédurale	Spatiale
Structure clé	Striatum	Hippocampe

Figure 2. Les différentes stratégies de navigation

A. La stratégie de navigation égocentrique repose sur les indices idiothétiques et correspond à une succession de mouvements. Elle met en jeu une mémoire procédurale qui dépend principalement du striatum.

B. La stratégie de navigation allocentrique repose sur les indices allothétiques et la représentation de l'environnement sous la forme d'une carte cognitive. Elle met en jeu une mémoire spatiale qui dépend principalement de l'hippocampe.

A l'inverse, la stratégie reposant sur les indices allothétiques est nommée **stratégie allocentrique** (ou stratégie de place, **Figure 2B**). Elle requiert un niveau de traitement spatial faisant appel à des processus computationnels plus élaborés, permettant la construction d'une représentation globale de l'espace fondée sur les relations entre les repères de l'environnement. Cette représentation, indépendante de la position de l'individu, permet d'inférer une trajectoire vers l'objectif à partir de n'importe quel point de l'environnement. Bien que plus énergivore, en raison du traitement et du stockage d'un grand nombre d'informations spatiales, la stratégie allocentrique offre une flexibilité et une capacité d'adaptations supérieures. Elle peut ainsi être actualisée en temps réel pour intégrer de nouveaux éléments ou pour compenser des modifications de l'environnement. Ainsi, la trajectoire peut être ajustée à tout moment. Dans l'exemple précédent, si une route est

barrée, avec une stratégie allocentrique, l'individu peut rapidement trouver une trajectoire alternative. La stratégie allocentrique dépend, entre autres, de l'hippocampe (**Hip** ; e.g. [Packard and McGaugh, 1996](#)) et met en jeu une mémoire spatiale (voir **II. La mémoire spatiale**), elle s'appuie sur une "carte cognitive" telle que définie par Tolman en 1948.

3. La carte cognitive

Le concept de **carte cognitive** a été proposé par Tolman ([Tolman, 1948](#)), qui remettait en cause l'approche behavioriste de l'époque. Ce courant de pensée soutenait que les animaux interagissent avec leur environnement uniquement par des relations stimulus-réponse orientées vers un but. Selon Tolman, les animaux possèdent une représentation interne de leur environnement, qu'ils peuvent manipuler ([Grieves and Jeffery, 2017](#)), ce qui leur permet, par exemple, de trouver des raccourcis et des détours. Cette capacité a été démontrée en établissant que des rats, confrontés à deux alternatives après le blocage d'un trajet habituel qu'ils ont appris, choisissaient la solution la plus efficace. Ces deux alternatives avaient été identifiées lors de sessions d'exploration libre, avant tout renforcement, indiquant ainsi que la carte cognitive se construit par l'intégration d'informations spatiales, mais indépendamment d'un objectif immédiat ou d'un renforcement explicite. Elle nécessite toutefois l'exploration de l'environnement, mais perdure ensuite à l'état latent.

Par la suite, l'idée de la carte cognitive a été développée par [O'Keefe et Nadel \(1978\)](#), puis par [Thinus-Blanc \(1988\)](#), qui l'ont définie comme une "organisation allocentrique de la représentation des caractéristiques de l'environnement". La carte cognitive correspond donc à une représentation mentale de l'espace et des relations entre ses éléments, de façon indépendante de la localisation actuelle de l'individu ([Hok et al., 2016](#)). Elle permet d'inférer des relations, des distances, et des directions reliant différents points de l'environnement spatial, sans qu'il soit nécessaire d'avoir fait l'expérience directe de chacun d'eux.

Malgré quelques critiques (e.g. [Bennett, 1996](#)), ce modèle demeure aujourd'hui l'un des cadres de référence les plus influents dans l'étude de la cognition spatiale.

4. Les cellules spatiales

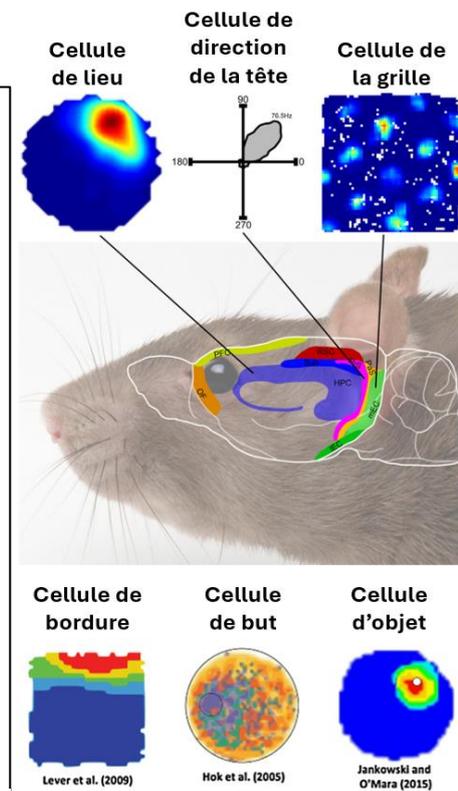
La carte cognitive correspond à une représentation mentale de l'environnement spatial. Les premiers à mettre en évidence un support neuronal de cette représentation ont

été O'Keefe et Dostrovsky (1971), lorsqu'ils publient leurs premiers résultats sur les **cellules de lieu** dans l'Hip de rat. Ces cellules pyramidales déchargent de façon maximale lorsque la tête du rat est dans une zone spécifique de l'environnement, indépendamment de la direction de sa tête, de son corps et de son champ visuel (**Figure 3**). Cette portion de l'espace, dans laquelle une cellule de lieu est active, s'appelle le **champ récepteur** (*place field*). Le champ récepteur des cellules de lieu enregistrées

Figure 3. Les cellules spatiales

Exemples de champs récepteurs de différents types de cellules spatiales, illustrés principalement par les fréquences de décharge d'une cellule lorsque le rat explore librement une enceinte. La **cellule de lieu** décharge de façon maximale lorsque le rat se trouve à un certain emplacement. La **cellule de direction de la tête** décharge de façon maximale lorsque la tête du rat est face au Nord-Est du dispositif. La **cellule de la grille** décharge de façon maximale à plusieurs lieux discrets et régulièrement espacés, formant une représentation en grille. La **cellule de bordure** décharge de façon maximale à proximité d'une frontière du dispositif. La **cellule de but** décharge de façon maximale à proximité de l'objectif. La **cellule d'objet** décharge de façon maximale à l'endroit d'un objet.

Sur la figure, les cellules de lieu, de direction de la tête et de la grille sont reliées à la structure anatomique dans laquelle elles ont été identifiées chez le rat.



Abréviations : HPC : Hippocampe ; Sub : Subiculum ; RSC : Cortex rétrosplénial ; PrS : Présubiculum ; PaS : Parasubiculum ; mEC : Cortex entorhinal médian ; IEC : Cortex entorhinal latéral ; PFC : Cortex préfrontal ; OFC : Cortex orbitofrontal

Figure modifiée issue de Grieve and Jeffery (2017).

simultanément, et donc proches les unes des autres dans le cerveau, est souvent réparti dans différentes zones d'un environnement. Cela suggère que l'ensemble de la population de cellules de lieu encode la surface complète de l'espace exploré (O'Keefe, 1976). Une fois que la représentation d'un environnement est formée, elle est stable au fil des jours et des semaines. Ces cellules de lieu ont ultérieurement été identifiées chez l'humain (Ekstrom et al., 2003).

La famille des supports neuronaux de l'information spatiale s'est ensuite élargie avec la découverte des **cellules de direction de la tête** dans le postsubiculum dorsal (Taube et al., 1990). Ces neurones déchargent de manière préférentielle lorsque la tête de l'animal est

orientée dans une direction donnée sur le plan horizontal (**Figure 3**), indépendamment de sa position ou de son comportement en cours. Les cellules de direction de la tête fonctionnent comme une sorte de boussole interne, mais sans dépendre du champ magnétique terrestre.

Quelques années plus tard, les **cellules de la grille** sont découvertes par l'équipe de May-Britt et Edvard Moser ([Fyhn et al., 2004](#) ; [Hafting et al., 2005](#)). Ces cellules se distinguent par leur activité périodique, déchargeant dans plusieurs lieux discrets et régulièrement espacés, formant une structure en grille (**Figure 3**). Elles codent ainsi l'environnement de manière géométrique. Elles ont été identifiées à la frontière entre le cortex entorhinal médian et le cortex postrhinal, ainsi que dans le pré- et le para-subiculum. Leur activité est partiellement dictée par les indices externes. Cependant, contrairement aux cellules de lieu, leur schéma de décharge demeure coordonné dans un nouvel environnement. La relation entre les cellules de lieu et les cellules de la grille est complexe, mais ces dernières pourraient fournir des informations métriques sur la distance parcourue et la direction prise par l'animal.

Ainsi, les cellules de lieu, les cellules de direction de la tête, et les cellules de la grille constituent les trois premiers types neuronaux identifiés comme support de la représentation spatiale, mais elles ne sont pas les seules. [Grieves et Jeffery \(2017\)](#) recensent d'autres types cellulaires dont l'activité dépend de l'environnement spatial, tels que certains interneurons de l'Hip, les cellules de bordure, les cellules de périmètre, les cellules de but ou encore les cellules d'objet (**Figure 3**). Certaines cellules intègrent plusieurs caractéristiques spatiales simultanément, elles sont appelées cellules conjonctives ou **cellules intégratives**, et sont retrouvées principalement dans le cortex entorhinal médian.

II. La mémoire spatiale

La mémoire spatiale est la fonction cognitive permettant de former, de conserver, et de restituer les informations relatives à l'environnement spatial. Elle est indispensable à la reconnaissance et la différenciation des lieux, jouant ainsi un rôle clé dans la structuration du contexte de nos souvenirs, ainsi que dans la mémorisation des trajectoires. Essentielle à la navigation spatiale allocentrique, elle permet à un individu de s'orienter efficacement et de s'adapter aux changements de l'environnement. Par ailleurs, elle autorise une navigation mentale, permettant d'anticiper des déplacements.

La mémoire spatiale est souvent étudiée chez le rongeur afin de modéliser la mémoire épisodique humaine. Cette dernière correspond à la mémoire des événements autobiographiques, donc personnellement vécus, situés dans leur contexte spatio-temporel. Ainsi, les souvenirs épisodiques répondent aux trois questions fondamentales : Quoi ? Quand ? Où ? Toutefois, la mémoire épisodique implique une reviviscence subjective, une composante qui ne peut être rapportée qu'à travers le langage. De ce fait, elle ne peut pas être étudiée directement chez l'animal. On parle alors de mémoire "épisodique-like", définie comme une réponse comportementale résultant d'une expérience passée et intégrant idéalement les trois dimensions fondamentales (Clayton and Dickinson, 1998). La mémoire spatiale, en codant principalement les dimensions "Quoi ?" et "Où ?", est ainsi couramment utilisée pour explorer les mécanismes sous-jacents à la mémoire épisodique.

S'inscrivant dans le cadre de la mémoire à long terme, la mémoire spatiale repose sur trois processus : l'encodage, la consolidation et le rappel. L'encodage permet la formation d'une représentation mentale de l'espace. Initialement labile, cette représentation est progressivement stabilisée sous forme de trace mnésique au cours de la consolidation, jusqu'à être ancrée à long terme. Enfin, le souvenir peut être rappelé à tout moment, en fonction des besoins. La mémoire spatiale constitue finalement le **support temporel de la carte cognitive**, assurant non seulement son élaboration, mais aussi son stockage et sa réactivation lorsque cela est nécessaire, même après de longues périodes.

L'Hip joue un rôle central, non seulement dans la représentation spatiale, mais aussi dans l'encodage des souvenirs épisodiques (Eichenbaum and Cohen, 2014). Son intégrité est donc cruciale au bon fonctionnement de la mémoire spatiale.

1. La persistance d'un souvenir spatial

Un souvenir spatial peut être conservé de façon très durable, parfois tout au long de la vie, relevant ainsi de la mémoire à long terme. Cette persistance du souvenir spatial repose sur un processus fondamental : la **consolidation**.

La loi de Ribot (1881) postule que les souvenirs deviennent progressivement plus résistants au fil du temps. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude de patients présentant des atteintes du lobe temporal médian (**LTM**), une région incluant l'Hip. Le cas le plus emblématique est celui d'Henry G. Molaison (**HM**), qui a subi une ablation bilatérale du LTM à l'âge de 27 ans pour traiter une épilepsie pharmaco-résistante. A la suite de cette intervention,

HM a souffert d'une amnésie antérograde, l'empêchant de former de nouveaux souvenirs, ainsi qu'une amnésie rétrograde partielle, c'est-à-dire la perte des souvenirs antérieurs à l'opération (Scoville and Milner, 1957). Cette amnésie rétrograde était temporellement graduée : les souvenirs les plus récents étaient plus altérés que les plus anciens, ce qui corrobore la loi de Ribot. Ce phénomène s'explique par la consolidation, un concept introduit en 1900 par Müller et Pilzecker, qui permet le renforcement et la stabilisation de la trace mnésique, de sorte que le souvenir devienne de plus en plus résistant avec le temps.

La consolidation s'opère à plusieurs niveaux, principalement celui d'une consolidation synaptique à l'échelle cellulaire, et celui d'une consolidation systémique à l'échelle des structures cérébrales et de leurs interconnexions.

La **consolidation synaptique** correspond à un renforcement de la communication synaptique entre les neurones qui se sont co-activés lors d'une expérience, et se déroule sur une échelle de temps relativement courte. En effet, dès les premières minutes qui suivent l'expérience en question, des mécanismes de plasticité synaptique entrent en jeu. L'arrivée des signaux à la synapse déclenche une cascade de réactions intracellulaires, activant des facteurs de transcription qui modulent l'expression de certains gènes. Ces régulations génétiques induisent des modifications structurelles et fonctionnelles des synapses, telles qu'une augmentation du nombre de récepteurs disponibles sur la membrane. Les mécanismes impliqués dans la consolidation synaptique sont multiples et sont détaillés dans plusieurs revues (e.g. Korte and Schmitz, 2016). À terme, ces modifications renforcent ou diminuent l'efficacité de la transmission neuronale, un phénomène connu sous le nom de potentialisation à long terme (**LTP** pour *Long Term Potentiation*) ou dépression à long terme (**LTD**). L'intégration de cette plasticité synaptique au sein des circuits neuronaux constitue le socle biologique de la mémoire à long terme.

À une échelle temporelle plus longue (plusieurs semaines à mois), la **consolidation systémique** implique une réorganisation progressive du souvenir, cette fois à l'échelle des circuits cérébraux. Comme évoqué précédemment, l'étude des patients ayant une atteinte des LTM a démontré que la résistance d'un souvenir augmente avec le temps, mais suggère également la réorganisation structurelle de la mémoire au cours du temps. Ces travaux ont confirmé le rôle central du LTM, et en particulier de l'Hip, dans l'encodage de la mémoire épisodique. Le fait que l'amnésie rétrograde soit temporellement graduée, comme en témoigne le cas du patient HM qui conservait ses souvenirs d'enfance, suggère que

l'implication de l'Hip serait limitée dans le temps (Frankland and Bontempi, 2005) et qu'il se désengagerait progressivement. Parallèlement, des études animales ont montré que l'activation de régions néocorticales lors du rappel de la mémoire augmente avec l'ancienneté du souvenir. En particulier, alors que le rappel d'un souvenir spatial récent est associé à l'activation de l'Hip chez la souris, celui d'un souvenir ancien est surtout associé à l'activation de régions corticales, notamment préfrontales (e.g. Bontempi et al., 1999). Cela illustre la réorganisation progressive de la trace mnésique permise par la consolidation systémique. Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer ce processus.

D'abord, la **théorie standard de la consolidation** propose que la trace mnésique est encodée parallèlement dans l'Hip et le néocortex. Puis les réseaux Hip-néocorticaux sont réactivés, notamment pendant le sommeil et le rappel du souvenir, ce qui renforce les connexions néocortico-néocorticales. Le souvenir devient alors progressivement indépendant de l'Hip, et c'est le cortex préfrontal médian (**CPFm**) qui intègre les différentes dimensions du

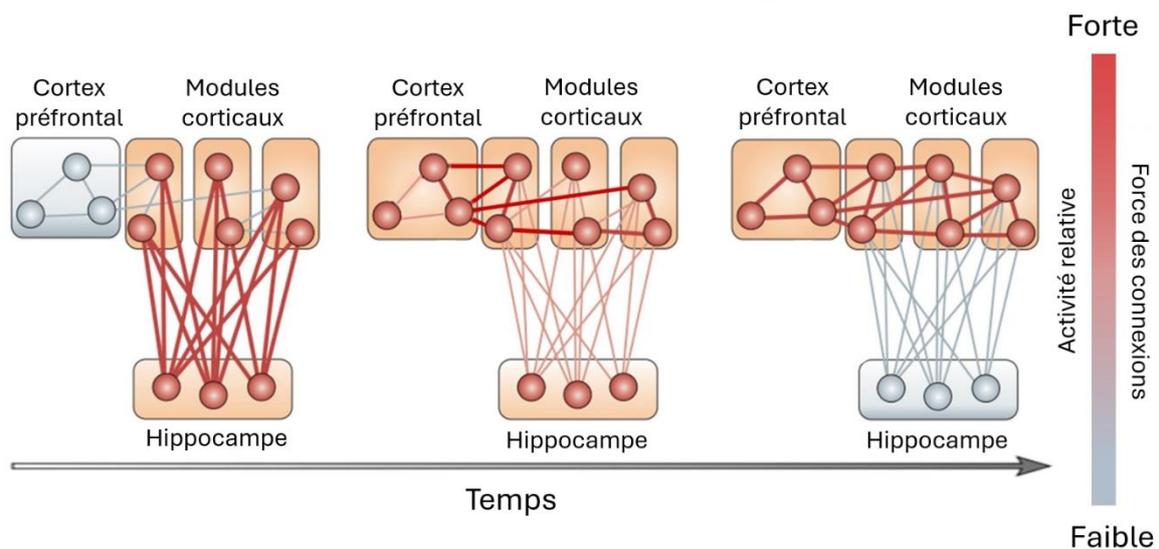


Figure 4. Représentation schématique de la théorie standard de la consolidation systémique

L'encodage d'une trace mnésique se fait dans différents modules corticaux ainsi que dans l'hippocampe. Ce dernier intègre les différentes dimensions encodées dans les modules corticaux afin de créer un souvenir détaillé. Au fil du temps, les réseaux hippocampo-corticaux sont réactivés, en particulier pendant le sommeil et lors du rappel du souvenir. Ces réactivations renforcent les connexions cortico-corticales préexistantes et en établissent de nouvelles. Le souvenir devient alors progressivement indépendant de l'hippocampe, et c'est le cortex préfrontal médian qui a le rôle d'intégration des différentes dimensions du souvenir, stockées dans différents modules corticaux.

Le principe illustré ici vaut pour les trois théories sur la consolidation systémique, qui se distinguent cependant selon le niveau d'engagement cortical et hippocampique.

La couleur grisée correspond à des régions faiblement activées et à des connexions faibles ; la couleur rouge correspond à une forte activation des régions et à une connectivité renforcée.

Figure modifiée issue de Frankland and Bontempi (2005)

souvenir stockées dans les modules néocorticaux correspondants (visuel, auditif, moteur, etc) (Frankland and Bontempi, 2005 ; **Figure 4**).

La **théorie des traces multiples** énonce que l'Hip reste impliqué dans le rappel de souvenirs épisodiques ou spatiaux détaillés, quel que soit leur âge. Chaque rappel entraîne un ré-encodage du souvenir, entraînant la formation de multiples traces au sein de l'Hip, mais aussi des aires néocorticales (Moscovitch et al., 2006). Enfin, la **théorie de la transformation** postule que les souvenirs épisodiques restent dépendants de l'Hip tant qu'ils sont associés à des détails contextuels. Parallèlement, une représentation plus généralisée, appauvrie en détails, se forme dans le néocortex. L'activation de l'une ou l'autre représentation dépendrait du contexte de rappel et du degré de précisions requises (Winocur et al., 2010).

Bien que ces trois modèles diffèrent dans leur conception du rôle de l'Hip à long terme, ils s'accordent sur la nécessité d'une communication soutenue et dynamique entre l'Hip et le néocortex, en particulier le CPFm, au cours de la consolidation systémique.

III. Notions de mémoire procédurale

La **mémoire procédurale** est une forme de mémoire non-déclarative et implicite. Cela signifie qu'elle est difficilement verbalisable et qu'elle se forme et se réactive de manière involontaire et largement inconsciente (Zwart et al., 2019). Elle ne se traduit pas par un souvenir explicite, mais par une amélioration des performances au fil de l'apprentissage et de la pratique (Squire and Zola-Morgan, 2015). Couramment présentée comme la mémoire des habiletés motrices, compétences et savoir-faire, elle permet l'acquisition et l'automatisation de gestes et de processus cognitifs. C'est elle qui sous-tend des apprentissages tels que la pratique d'un instrument de musique ou la capacité à faire du vélo. La mémoire procédurale repose sur la répétition et la consolidation progressive des apprentissages, menant à une exécution de plus en plus fluide et efficace des tâches acquises. L'expression populaire "*C'est comme le vélo, ça ne s'oublie pas*" illustre le caractère très durable de la mémoire procédurale, qui conserve les acquisitions sur le long terme, même en l'absence de pratique.

Sur le plan neurobiologique, le striatum joue un rôle central dans ces apprentissages répétitifs, en participant à l'établissement des automatismes et habitudes (e.g. Packard and Knowlton, 2002).

Chapitre 2 : La flexibilité cognitive

I. Définition

La flexibilité cognitive est la capacité à **adapter son comportement** de façon appropriée **aux changements de l'environnement**, qu'ils soient externes ou internes (Dajani and Uddin, 2015 ; Prado et al., 2017). Dans un monde en constante transformation, cette fonction est essentielle à l'adaptation et, par extension, à la survie. Elle permet notamment de modifier sa stratégie pour trouver de la nourriture lorsqu'une source devient indisponible, d'éviter un danger en réagissant rapidement à une menace, ou encore d'interagir avec des congénères. En améliorant la gestion des imprévus et en optimisant les comportements, la flexibilité cognitive augmente les chances de survie.

Chez l'humain, la flexibilité cognitive ne se limite pas aux comportements adaptatifs ; elle concerne également la capacité mentale à passer efficacement d'une idée, d'une pensée ou d'un concept à un autre, afin de s'adapter à un changement de contexte ou de contrainte dans une situation donnée. Elle permet également de prendre en compte simultanément plusieurs aspects d'un objet ou d'une situation complexe, et d'adapter en conséquence ses stratégies comportementales (Miles et al., 2021).

Cette fonction cognitive complexe repose sur plusieurs processus. Il s'agit d'abord d'identifier une modification dans l'environnement, et de diriger son attention vers cet élément. Une fois la modification perçue, il faut évaluer si la stratégie en cours reste pertinente. Si ce n'est pas le cas, une inhibition comportementale du programme de réponses engagées est nécessaire pour mettre en œuvre une nouvelle stratégie adaptée (Dajani and Uddin, 2015).

La **flexibilité cognitive spatiale** fait référence à la capacité d'adaptation face aux changements de l'environnement spatial. C'est le cas, par exemple, lorsque l'on emprunte un itinéraire familier, et que l'on découvre soudainement que la route est barrée. Il faut modifier son trajet en temps réel et ajuster sa trajectoire à cette nouvelle contrainte. Cela peut nécessiter un changement de stratégie de navigation.

II. La flexibilité cognitive chez l'humain

Le test neuropsychologique de référence pour évaluer la flexibilité cognitive chez l'humain est le Wisconsin Card Sorting Task (**WCST**), conçu par [Grant et Berg \(1948\)](#). Il s'agit d'une tâche d'appariement de cartes, qui se distinguent selon trois caractéristiques : la couleur, le nombre et la forme, chacune présentant quatre modalités (par exemple rouge, bleu, vert et jaune pour la couleur ; [Figure 5](#)).

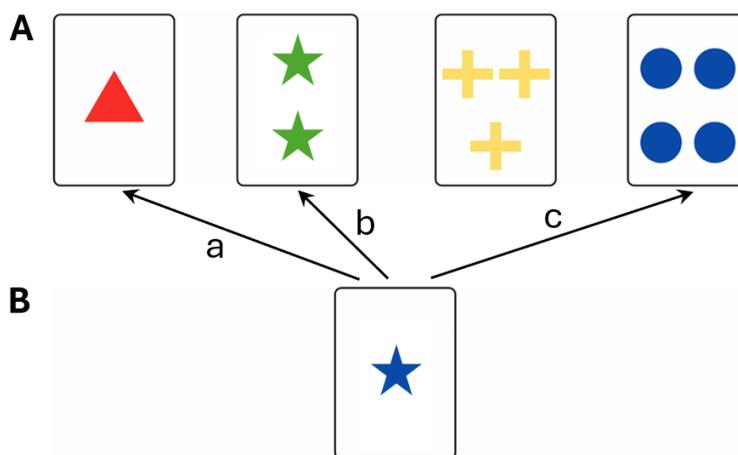


Figure 5. Le Wisconsin Card Sorting Task

Situation initiale du *Wisconsin Card Sorting Task*, test neuropsychologique d'appariement de cartes, utilisé pour évaluer la flexibilité cognitive chez l'humain.

A. Les 4 cartes stimulus sont déposées et représentent au moins une fois chaque modalité de chaque caractéristique (couleur, forme, nombre).

B. La carte réponse, que le sujet doit associer à l'une des cartes stimuli en fonction d'une modalité, afin d'identifier la règle d'association. Il est ainsi possible d'associer la carte par le nombre d'items (a), par la forme (b) ou encore par la couleur (c).

Le sujet doit identifier la règle d'association par un processus d'essais-erreurs grâce au feedback verbal de l'expérimentateur. Une fois que le sujet a identifié la règle d'association, elle est modifiée par l'expérimentateur sans avertir le sujet. La flexibilité cognitive est évaluée par la capacité du sujet à réajuster sa stratégie pour identifier la nouvelle règle.

Figure modifiée issue de [Miles et al., 2021](#)

Au début du test, l'expérimentateur choisit l'une de ces caractéristiques comme règle d'association (par exemple la couleur jaune indépendamment de la forme et du nombre), mais sans en informer le sujet. Il dispose 4 cartes "stimulus", représentant au moins une fois chaque modalité de chaque caractéristique. Le sujet doit identifier la règle d'association par un processus d'essais-erreurs. A chaque essai, il associe une "carte-réponse" à l'une des cartes stimulus et l'expérimentateur lui donne un feedback ("correct" ou "incorrect"). Le sujet doit interpréter ces indications pour identifier progressivement la règle d'association. Une fois que

les choix consécutifs du sujet montrent que la règle d'association a été découverte et est utilisée de manière cohérente, celle-ci est soudainement modifiée par l'expérimentateur, sans qu'il n'en avertisse préalablement le sujet. Le sujet doit alors réajuster sa stratégie afin d'identifier la nouvelle règle, ce qui sollicite fortement sa flexibilité cognitive. Le WCST génère plus de 7 variables, dont les plus couramment utilisées pour évaluer la flexibilité cognitive sont les "réponses de persévération" et les "erreurs de persévération" (Miles et al., 2021). En effet, une difficulté à abandonner l'ancienne règle pour lui substituer la nouvelle est interprétée comme un déficit de flexibilité cognitive.

Le WCST a ainsi permis de démontrer que les patients présentant des lésions du lobe frontal ou souffrant de schizophrénie rencontrent des difficultés marquées pour passer d'une règle à une autre, révélant un déficit de flexibilité cognitive (Waltz, 2017). Des déficits similaires ont également été associés avec des pathologies telles que le trouble du spectre autistique (D'Cruz et al., 2013), la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le trouble de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (Prado et al., 2017), ainsi que la maladie de Huntington (Packard and Knowlton, 2002).

III. La flexibilité cognitive chez l'animal

L'étude de la flexibilité cognitive peut être particulièrement complexe en raison de la diversité des approches utilisées pour la définir, l'évaluer et l'analyser dans la littérature (Prado et al., 2017). Les paradigmes expérimentaux les plus couramment employés chez l'animal seront présentés en fonction des processus cognitifs spécifiques qu'ils interrogent. Toutefois, tous reposent sur une notion centrale : la capacité d'adaptation face aux changements de l'environnement ou des contraintes d'une situation, que l'on peut observer à travers la flexibilité comportementale.

Conditionnement de peur et extinction

Le conditionnement classique ou pavlovien désigne l'apprentissage de l'association entre un stimulus initialement neutre (par exemple un son) et un stimulus inconditionnel aversif (comme un choc électrique). Cette association entraîne l'apparition d'une réponse conditionnée, telle qu'une immobilité comportementale (*freezing*) qui traduit la peur face au stimulus initialement neutre. L'extinction correspond à la disparition progressive de la

réponse conditionnée lorsque le stimulus neutre cesse d'être associé au stimulus aversif. Ce processus repose donc sur la flexibilité cognitive, permettant d'adapter son comportement avec une nouvelle réponse face au stimulus neutre, dans un environnement où l'association préalable n'est plus pertinente. Le raisonnement est identique dans le cas d'un conditionnement appétitif.

Apprentissage de l'inversion de consigne (*reversal learning*, ou changement de contingence)

Le *reversal learning* est la tâche comportementale la plus proche du WCST utilisé chez l'humain. Il consiste d'abord en l'apprentissage d'une certaine règle, suivi d'un changement soudain de celle-ci dès lors qu'elle aura été correctement apprise. Ce paradigme permet ainsi d'évaluer la capacité d'un animal à s'adapter à une modification imprévue des contingences. Cette modification est opérable dans différentes situations comportementales, que l'on peut distinguer selon qu'elles font appel à un comportement d'évitement dans un milieu aquatique ou qu'elles sont réalisées au sec.

Dans sa version 'sèche', le *reversal learning* repose généralement sur une tâche de discrimination entre deux stimuli, impliquant souvent une seule dimension perceptive. Les réponses au stimulus correct sont récompensées, tandis que celles au stimulus incorrect ne le sont pas (**Figure 6A**). Les sessions sont répétées jusqu'à ce que les animaux apprennent la discrimination initiale. Lors de l'inversion de consigne, le stimulus initialement incorrect devient correct, puisqu'il est désormais récompensé, et *vice versa*. Pour réussir la tâche, les animaux doivent apprendre à inhiber leur réponse au stimulus précédemment correct, puis à associer la récompense à la nouvelle règle. La flexibilité cognitive est ainsi évaluée en mesurant le nombre d'essais nécessaires pour apprendre avec succès la nouvelle association ([Prado et al., 2017](#)).

Dans sa version 'aquatique', le *reversal learning* est généralement basé sur un protocole de piscine de Morris lors duquel les animaux doivent apprendre à localiser une plateforme cachée pour s'extraire de l'eau fraîche (**Figure 6B**). Les sessions sont répétées jusqu'à ce que les animaux apprennent à rejoindre la plateforme. Lors de l'inversion de consigne, la position de la plateforme est modifiée. Les animaux doivent alors identifier et mémoriser sa nouvelle localisation. Dans ce cas, la stratégie de navigation utilisée pour

rejoindre la plateforme reste identique, seule la localisation de la plateforme est modifiée.

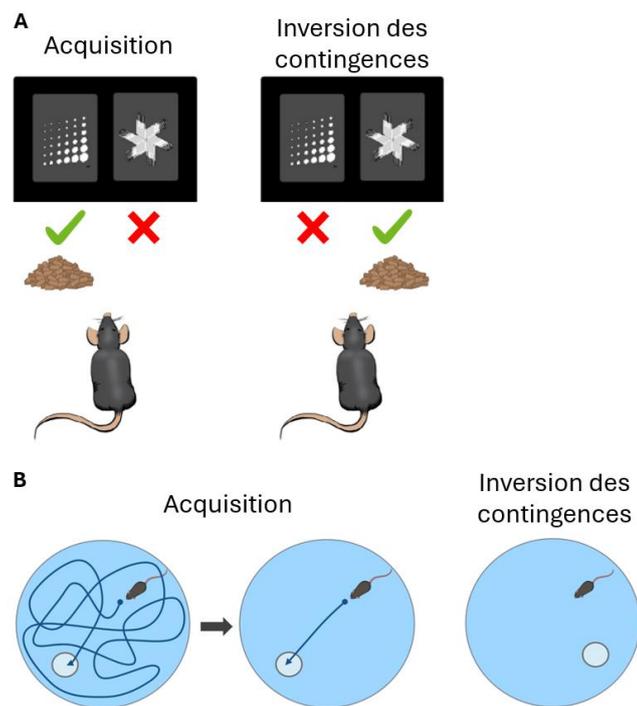


Figure 6. L'apprentissage de l'inversion de consigne

Exemples de protocoles permettant d'évaluer l'apprentissage de l'inversion de consigne. Ces tâches consistent en l'apprentissage d'une certaine règle, suivi d'un changement soudain de cette règle une fois qu'elle a été effectivement apprise. Ce paradigme permet d'évaluer la capacité d'adaptation à une modification imprévue des contingences.

A. Version sèche. Pendant l'acquisition, l'animal est récompensé par de la nourriture lorsqu'il touche la partie gauche de l'écran tactile, correspondant au stimulus correct. Lors de l'inversion des contingences, le stimulus de gauche, préalablement récompensé devient incorrect et c'est le stimulus de droite qui devient correct et est récompensé.

Figure modifiée de [Izquierdo et al., 2017](#)

B. Version aquatique. Pendant l'acquisition, l'animal doit apprendre à localiser la plateforme dans la piscine de Morris au fur et à mesure des essais. Lors de l'inversion des contingences, la plateforme a été déplacée et l'animal doit apprendre cette nouvelle localisation.

Changement d'orientation attentionnelle (ou *set shifting*)

Les tâches de changement d'orientation attentionnelle sont similaires aux tâches de changement de contingences, mais se distinguent par le fait que les stimuli récompensés et non récompensés impliquent plusieurs dimensions perceptives superposées (comme l'odeur (par exemple thym *versus* paprika) contre la texture (par exemple papier grainé *versus* ciré), ([Birrell and Brown, 2000](#)) ; ou la position *versus* la présence d'un signal lumineux ([Prado et al., 2017](#))). Pendant l'acquisition, les animaux apprennent que les stimuli d'une certaine dimension perceptive sont récompensés, tandis que ceux de l'autre dimension ne le sont pas

(Figure 7). Dans le premier exemple cité plus haut, les rats apprennent d'abord que c'est l'odeur de thym qui est récompensée et non celle de paprika, peu importe la texture. Une fois l'apprentissage établi, la règle est inversée et c'est désormais la texture de papier ciré qui est récompensée, et non celle du papier grainé, peu importe l'odeur qui leur est associée. Cette tâche nécessite de réorienter l'attention de l'odorat vers le toucher. Une performance réussie exige à la fois l'inhibition d'une réponse, d'une règle ou d'une stratégie apprise antérieurement et la prise en compte d'une dimension perceptive qui n'était pas pertinente auparavant (Floresco et al., 2009).

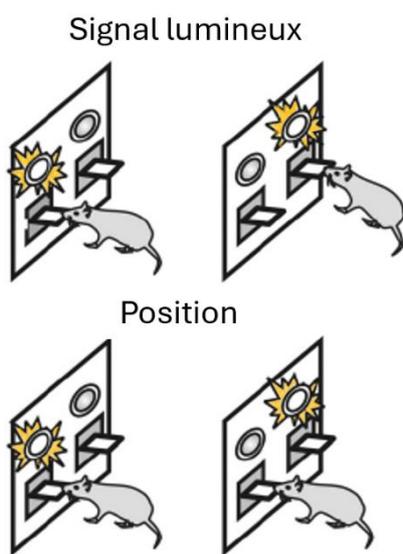


Figure 7. Le changement d'orientation attentionnelle

Exemple de tâche évaluant le changement d'orientation attentionnelle.

Ces tâches consistent en l'apprentissage d'une certaine règle, suivi d'un changement soudain de cette règle, qui nécessite de rediriger son attention vers une autre dimension sensorielle.

Pendant l'acquisition (en haut), l'animal est récompensé lorsqu'il appuie sur le levier correspondant au signal lumineux, indépendamment de sa place. Il réalise donc la tâche grâce à une dimension visuelle.

Après le changement (en bas), l'animal n'est plus récompensé en fonction de la dimension visuelle, mais en fonction de la position du levier. Ici, c'est le levier gauche qui est récompensé, indépendamment du signal lumineux. Pour réussir la tâche, l'animal doit rediriger son attention.

Figure issue de Floresco et al., 2009

Changement de stratégie (ou *strategy shifting*)

Il est possible d'étudier la flexibilité cognitive spatiale grâce à des tâches nécessitant un changement de stratégie de navigation. L'une d'elles s'appuie sur un labyrinthe en croix, comme celui utilisé par Packard et McGaugh (1996). Dans cette étude, les rats apprennent à chercher une récompense dans le bras ouest, alors qu'ils sont lâchés depuis le bras nord lors d'un entraînement itératif pouvant durer jusqu'à 14 jours. Pour évaluer la stratégie de navigation mise en œuvre, les auteurs effectuent un test de rappel en modifiant le point de départ des animaux, qui sont alors lâchés depuis le bras sud. Les résultats montrent qu'après 7 jours d'acquisition, les rats appréhendent la tâche avec une stratégie allocentrique, dépendante de l'hippocampe. Cependant, à mesure que les essais se répètent, un

automatisme se met en place : les rats adoptent une stratégie égocentrique, caractérisée par un simple virage à droite, dépendante du striatum. Toutefois, après 7 jours supplémentaires d'acquisition, si le striatum est inactivé par une injection locale de lidocaïne, les rats sont capables de réutiliser une stratégie allocentrique, au lieu de la stratégie égocentrique utilisée normalement. Les rats sont ainsi capables d'adapter leur comportement, et donc leur stratégie de navigation, à un changement interne.

Dans ce type de test, la motivation des animaux repose sur la récompense alimentaire, nécessitant une restriction alimentaire préalable. Or, cette contrainte peut introduire des biais dans l'interprétation des résultats. Une alternative consiste à utiliser un labyrinthe aquatique, tel que la piscine de Morris. Cependant, la structure circulaire de cette dernière limite les possibilités d'étude et de manipulation des stratégies de navigation. Pour pallier ce problème, Jean-Christophe Cassel a développé le labyrinthe en Double-H, composé de 6 bras placés perpendiculairement à une allée centrale (Pol-Bodetto et al., 2011, Figure 27). En fonction du protocole expérimental, ce dispositif permet de privilégier la stratégie allocentrique ou égocentrique, tout en offrant la possibilité d'étudier la flexibilité cognitive spatiale. Par exemple, après un protocole d'acquisition favorisant la stratégie égocentrique, une modification du point de départ lors du test de rappel incite les rats, à basculer vers une stratégie allocentrique (Cholvin et al., 2013).

La comparaison des versions sèche et aquatique de ces tâches met en évidence l'impact de la modalité motivationnelle sur les stratégies de navigation. Dans le premier cas, les auteurs montrent que la stratégie allocentrique se met en place en premier, puis est progressivement "remplacée" par une stratégie égocentrique à force de répétition (Packard and McGaugh, 1996). En revanche, dans la version aquatique, les auteurs montrent que la stratégie égocentrique s'installe en premier, avant que la carte cognitive, support de la stratégie allocentrique, ne se développe avec le temps (Gasser et al., 2020).

IV. Substrats neurobiologiques

Les principales structures impliquées dans la flexibilité sont le cortex préfrontal (**CPF**), le striatum, et le circuit 'cortex-ganglions de la base-thalamus' associé, dont les éléments interagissent pour moduler la flexibilité cognitive (Prado et al., 2017).

Le rôle du CPF dans la flexibilité cognitive est bien établi. Par exemple, son inactivation par la bupivacaïne au niveau des cortex prélimbique (**PL**) et infralimbique (**IL**) empêche le changement d'orientation de l'attention entre les modalités olfactives et spatiales (dans les deux sens), tout en préservant la capacité à discriminer chacune d'elles (Ragozzino et al., 2003). Aussi, l'inactivation de la partie médiane du CPF au muscimol empêche le passage d'une stratégie de navigation égocentrique à une stratégie allocentrique dans le labyrinthe aquatique en Double-H (Cholvin et al., 2013). Ainsi, il est connu que différentes sous-régions du CPF sont impliquées dans des formes spécifiques de flexibilité cognitive (Floresco et al., 2009).

Concernant le striatum, en plus d'être un site potentiel de stockage des habitudes ou des procédures apprises (dans sa partie dorso-latérale), il est également impliqué dans les changements d'orientation (*set shifting*) en réponse aux modifications de l'environnement (Packard and Knowlton, 2002). Par exemple, les patients atteints de pathologies affectant les circuits des ganglions de la base, comme la maladie de Huntington, présentent des difficultés à déplacer leur attention entre plusieurs dimensions. Ainsi, les capacités de *set shifting* du striatum semblent essentielles aux fonctions exécutives dirigées par le CPF, par l'intermédiaire des boucles cortico-striatales (Packard and Knowlton, 2002).

Le thalamus contribue également à la flexibilité cognitive. En effet, le noyau médio-dorsal (**MD**), par exemple, a des connexions réciproques avec le CPF et projette vers le striatum. Les études d'imagerie fonctionnelle révèlent une activation accrue de cette région chez des sujets sains effectuant le WCST. Toutefois, le rôle du MD dans le *reversal learning* est controversé. Il n'en reste pas moins que son implication dans les changements de stratégie semble essentielle, puisque son inactivation par la bupivacaïne ne perturbe pas l'apprentissage initial d'une stratégie égocentrique ou d'une discrimination visuelle dans un labyrinthe en croix, mais elle empêche la transition d'une stratégie à l'autre (Block et al., 2007).

Ces trois structures interconnectées, le CPF, le striatum et le thalamus, ont donc des contributions distinctes mais complémentaires dans la flexibilité comportementale impliquant des transitions entre différentes stratégies de discrimination (Floresco et al., 2009).

D'un point de vue neurochimique, les systèmes cholinergiques (Prado et al., 2017), dopaminergiques et sérotoninergiques (Waltz, 2017) sont connus pour être impliqués dans la flexibilité cognitive.

Chapitre 3 : Le réseau cortico-thalamo-hippocampique

Dans les précédents chapitres, nous avons souligné le rôle central de l'hippocampe (**Hip**) dans la cognition spatiale, ainsi que l'implication fondamentale du cortex préfrontal (**CPF**) dans la flexibilité cognitive. Cette dernière repose sur un circuit cortico-striato-thalamique impliquant notamment le noyau médiodorsal (**MD**) du thalamus. Bien que le MD ait des connexions bidirectionnelles avec le CPF, il ne projette pas vers l'Hip (e.g. [Varela et al., 2014](#)). Cela soulève l'hypothèse que la dimension spatiale de la flexibilité cognitive pourrait reposer sur un **réseau cortico-thalamo-hippocampique**, impliquant des noyaux thalamiques connectés à l'Hip, tels que les **noyaux reuniens (Re)** et **rhomboïde (Rh)**.

I. Le cortex préfrontal médial

1. Description

Le cortex préfrontal (**CPF**) est la région la plus antérieure du cortex, située dans le lobe frontal chez l'humain (**Figure 8A**). Il est considéré comme l'une des structures les plus controversées en raison de sa complexité fonctionnelle et anatomique ([Chafee and Heilbronner, 2022](#)). Historiquement, le CPF a été défini comme étant l'aire corticale recevant des projections du MD ([Rose and Woolsey, 1948](#)).

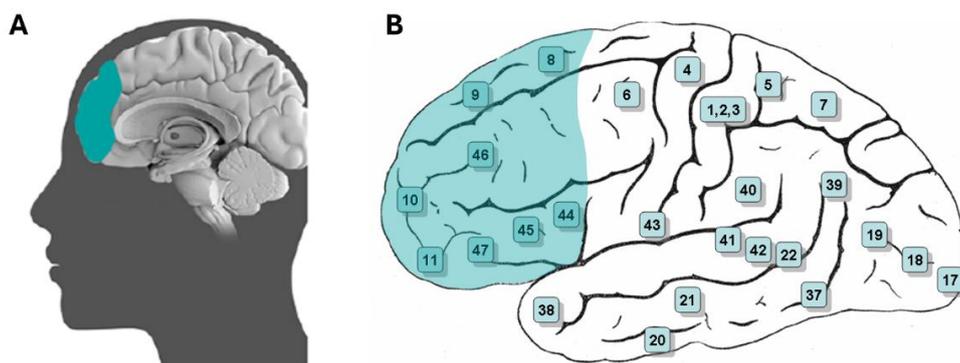


Figure 8. Le cortex préfrontal humain

Représentation schématique du CPF humain en coupe sagittale (**A**) par rapport à l'ensemble de la tête, et en vue latérale (**B**) avec les aires de Brodmann correspondantes. Le CPF est indiqué en bleu.

Figure A issue de la thèse de [Laurine Boch \(2023\)](#). Figure B par [Gray \(1918\)](#).

Chez l'humain, le CPF est divisé en quatre grandes régions : orbitale, dorsolatérale, ventrolatérale et médiane, elles-mêmes différenciées selon les aires de Brodmann (**Figure 8B**). En revanche, chez le rongeur, il n'existe pas de consensus clair quant à la définition exacte du CPF. Selon [Carlen \(2017\)](#), le CPF de la souris correspondrait aux cortex cingulaire antérieur (**ACC**), prélimbique (**PL**), infralimbique (**IL**), orbital, moteur secondaire et insulaire agranulaire. Cependant, les délimitations et les terminologies de ces régions diffèrent entre les auteurs et selon les espèces concernées. Par exemple, [Vogt et Paxinos \(2014\)](#) ont proposé d'adapter la nomenclature humaine basée sur les aires de Brodmann aux rongeurs, afin d'améliorer la comparabilité translationnelle entre espèces. Toutefois, cette nomenclature peine à s'imposer, car toute la littérature antérieure repose sur l'ancienne nomenclature. Cette problématique du manque de consensus à propos de la nomenclature du CPF est soulevée dans la revue de [Laubach et al. \(2018\)](#).

Mes travaux de thèse portent sur le cortex préfrontal médian (**CPFm**) du rat. Nous considérons qu'il correspond à l'ACC, au PL et à l'IL, organisés du plus dorsal au plus ventral, (**Figure 9**). Cette région reflèterait les caractéristiques fonctionnelles et neuroanatomiques du CPF dorsolatéral du primate ([Seamans et al., 2008](#)).

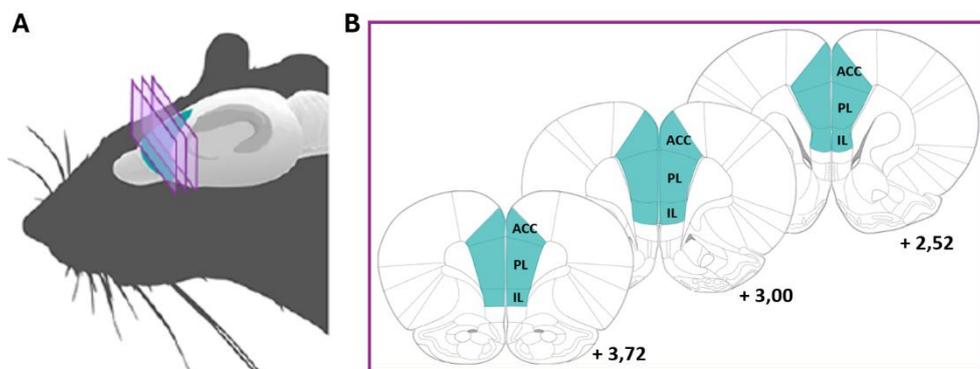


Figure 9. Le cortex préfrontal médian du rat

Représentation schématique du CPFm du rat en coupe sagittale (**A**) par rapport à l'ensemble de la tête, et en coupes frontales (**B**) en fonction de différents niveaux d'antéro-postériorité (en mm par rapport au Bregma). Le CPFm est indiqué en bleu. Les rectangles violets en **A** correspondent à la position des 3 sections illustrées en **B**.

Abréviations : ACC : Cortex cingulaire antérieur ; PL : cortex prélimbique ; IL : cortex infralimbique

Figure modifiée issue de la thèse de [Laurine Boch \(2023\)](#).

2. Anatomie et connectivité

Comme tout néocortex, le CPF présente une organisation laminaire caractéristique, avec des couches superficielles (I, II et III), et des couches profondes (V et VI). Contrairement au CPF humain, dans lequel la couche agranulaire IV est bien définie, celle-ci est absente chez le rongeur (Giustino and Maren, 2015). La couche I contient les dendrites apicales des neurones pyramidaux, ainsi que plusieurs populations d'interneurones inhibiteurs. Les couches II/III regroupent les neurones qui projettent vers d'autres régions corticales. Les couches V et VI sont des couches de sorties principales. La couche V comprend des neurones projetant à la fois vers d'autres régions corticales et sous-corticales, comme le striatum, l'amygdale ou le thalamus, par exemple. La couche VI contient principalement les neurones cortico-thalamiques qui envoient des projections vers les noyaux thalamiques et le noyau réticulaire thalamique (TRN, Anastasiades and Carter, 2021). Les entrées distales ciblent l'ensemble des couches corticales. Les entrées corticales et thalamiques sont distribuées dans toutes les couches, bien que les entrées thalamiques de haut niveau projettent spécifiquement aux couches I et Va. Le CPF contient également une grande diversité d'interneurones répartis dans l'ensemble de ces couches (Anastasiades and Carter, 2021).

Le CPFm reçoit une variété d'entrées excitatrices distales et émet des projections vers de nombreuses structures cérébrales (Figure 10). Ainsi, le CPFm est connecté de manière bidirectionnelle aux cortex sensoriel, moteur et entorhinal, au claustrum, au septum latéral, à l'aire tegmentale ventrale, au noyau basal de l'amygdale (BLA) et au thalamus, notamment les MD et les ReRh (Gabbott et al., 2005 ; Hoover and Vertes, 2007). Le CPFm projette également au striatum (Gabbott et al., 2005) et reçoit des afférences de l'Hip ventral (Hoover and Vertes, 2007). Les sous-régions du CPFm entretiennent de fortes interconnexions entre elles.

3. Fonctions principales

L'hétérogénéité des connexions du CPF avec de multiples régions cérébrales est à l'origine de sa grande diversité fonctionnelle (Chafee and Heilbronner, 2022). En effet, contrairement à d'autres structures plus spécialisées, le CPF ne suit pas un schéma de

spécialisation stéréotypée. Son activité est modulée par une combinaison de multiples paramètres pertinents pour la tâche en cours (Hanganu-Opatz et al., 2023).

L'ensemble des études réalisées chez l'humain, le primate non-humain et le rongeur, converge sur le fait que le CPF joue un rôle essentiel dans les fonctions exécutives, telles que la flexibilité cognitive, la mémoire de travail, le maintien attentionnel, la planification et la prise de décision (Dalley et al., 2004). Ces fonctions semblent suivre un gradient dorso-ventral au sein du CPFm, des parties dorsales impliquées dans la prise de décision et les aspects plus moteurs, en allant vers des fonctions plutôt liées aux émotions et à la motivation vers la partie plus ventrale (Anastasiades and Carter, 2021).

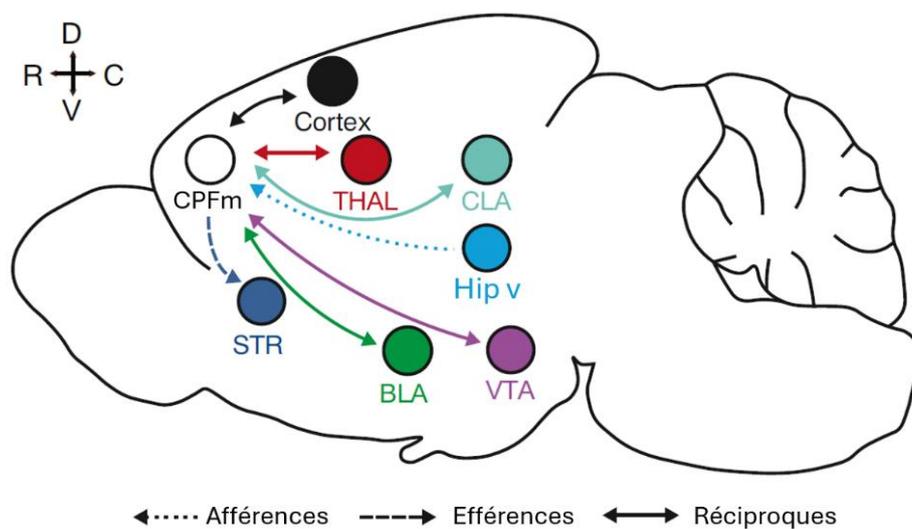


Figure 10. Connectivité du CPFm

Représentation schématique des principales régions avec lesquelles le CPFm communique, via des afférences, des efférences ou des connexions bidirectionnelles, sur une coupe sagittale de cerveau de rat.

Abréviations : BLA : Noyau basal de l'amygdale ; CLA : Claustrum ; CPFm : Cortex préfrontal médian ; Hip v : Hippocampe ventral ; STR : striatum ; THAL : thalamus ; VTA : Aire tegmentale ventrale

Figure modifiée issue d'Anastasiades and Carter (2021).

II. Les noyaux reuniens et rhomboïde

1. Description anatomique et neurochimique

Le thalamus est la plus grande structure du diencephale, et compte plus de 50 noyaux. Parmi eux se trouvent les noyaux reuniens (**Re**) et rhomboïde (**Rh**), situés dans la partie ventrale de la ligne médiane du thalamus (Figure 11). Le noyau reuniens est positionné

dorsalement au 3^{ème} ventricule, et le noyau rhomboïde se situe dorsalement au Re, mais apparaît un peu plus postérieurement (Van Der Werf et al., 2002). Le Re est généralement subdivisé en une partie centrale (ou médiane) et des segments latéraux nommés péri-reuniens (**PériRe**, ou VRe pour *ventral reuniens* dans la littérature). Ces deux noyaux sont proches et relativement petits, aussi il est quasiment impossible de ne cibler que l'un des deux par chirurgie stéréotaxique. C'est pourquoi nous les considérerons ensemble, sous la dénomination **ReRh**, dans la suite de ce manuscrit.

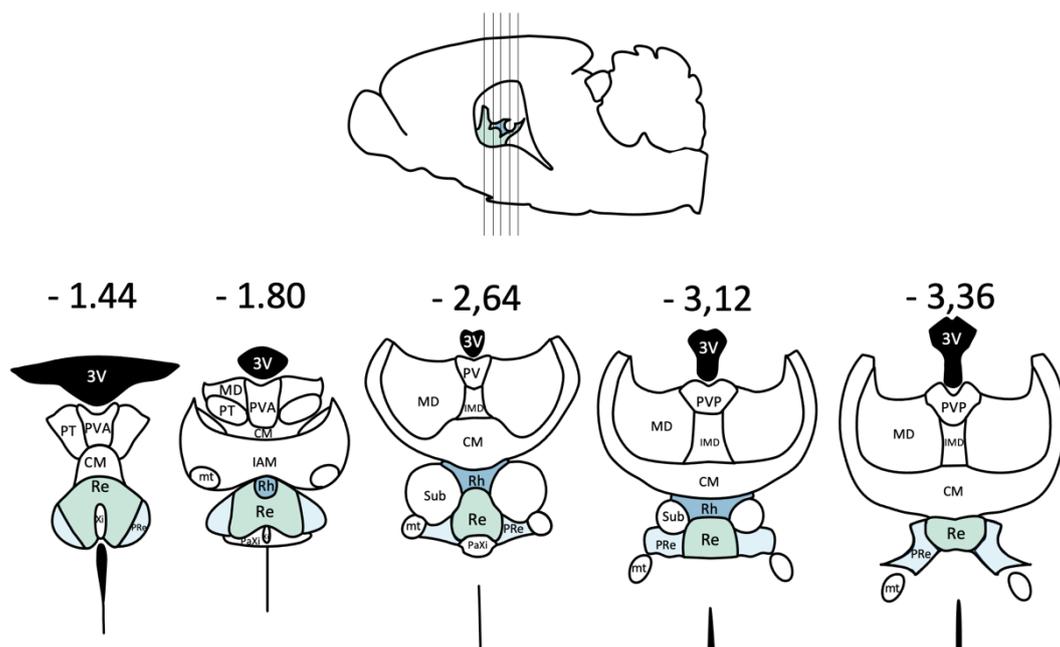


Figure 11. Organisation neuroanatomique des noyaux reuniens et rhomboïde

Les noyaux reuniens et rhomboïde sont situés dans la partie ventrale de la ligne médiane du thalamus. Le reuniens est positionné dorsalement au 3^{ème} ventricule, le rhomboïde se situe dorsalement au reuniens, mais apparaît un peu plus postérieurement. Le reuniens est subdivisé entre une partie centrale et des segments latéraux nommés péri-reuniens.

Les valeurs chiffrées correspondent au niveau d'antéro-postériorité (en mm par rapport au Bregma).

Abréviations : 3V : 3^{ème} ventricule ; CM : noyau central médian ; IAM : noyau interantéromédian ; IMD : noyau interomédiodorsal ; MD : noyau médiodorsal ; PaXi : noyau paraxiphoïde ; pRe : péri-reuniens ; PT : noyau paraténial ; PVA : noyau paraventriculaire antérieur ; PVP : noyau paraventriculaire postérieur ; Re : noyau reuniens ; Rh : noyau rhomboïde ; Sub : noyau submédian ; mt : tract mamillothalamique ; Xi : xiphoïde

Figure issue de la thèse de Laurine Boch (2023).

Les neurones des ReRh sont excitateurs, avec une neurotransmission supposée être principalement glutamatergique ou aspartatergique (Bokor et al., 2002). La présence de neurones dopaminergiques a également été décrite dans le Re de souris (Ogundele et al., 2017). En revanche, aucun (inter)neurone inhibiteur, exprimant l'acide γ -aminobutyrique (GABA) n'a été identifié dans les ReRh chez le rongeur (*résultats personnels non publiés*). Toutefois, des neurones GABAergiques ont été observés dans le Re de macaques rhésus (Joyce et al., 2022), suggérant une possible différence interspécifique.

Concernant les protéines de liaison au calcium, les neurones des ReRh n'expriment pas la parvalbumine, mais présentent une expression de calrétinine (calR) et de calbindine (calB) (Arai et al., 1994 ; Viena et al., 2020). Les neurones exprimant la calB sont globalement situés plus latéralement et plus dorsalement à ceux exprimant la calR. Les neurones exprimant à la fois la calR et la calB sont situés de façon assez centrale (Viena et al., 2020).

Les études des ReRh chez l'humain et le primate non-humain sont rares (e.g. Thielen et al., 2015), compte tenu de leur petite taille et de leur localisation profonde. Cependant, des avancées récentes en neuroimagerie non invasive ont permis de proposer une technique d'identification de ces noyaux chez l'humain (Reeders et al., 2023), mettant en évidence un positionnement anatomique similaire

2. Connectivité et implications fonctionnelles

Les ReRh sont une zone de convergence de fibres en provenance de multiples régions cérébrales, incluant le télencéphale, le diencephale ainsi que le tronc cérébral (McKenna and Vertes, 2004). Ils émettent également des projections vers de nombreuses structures (Vertes et al., 2006). La connectivité des ReRh a été largement documentée (voir Cassel et al., 2013, 2021). Dans cette thèse, seules les principales afférences et efférences des ReRh sont présentées sous forme de schémas récapitulatifs (Figure 12). La connectivité du Re est mieux caractérisée que celle du Rh. Une différence majeure entre ces deux noyaux concerne leur cible hippocampique, puisque le Rh ne projette que sur l'Hip dorsal tandis que le Re projette sur tout l'axe dorso-ventral de l'Hip.

En raison de leurs projections étendues, les ReRh ont longtemps été considérés comme appartenant au thalamus "non-spécifique". Contrairement aux noyaux thalamiques "spécifiques", qui projettent vers une aire corticale bien délimitée, et principalement dans la

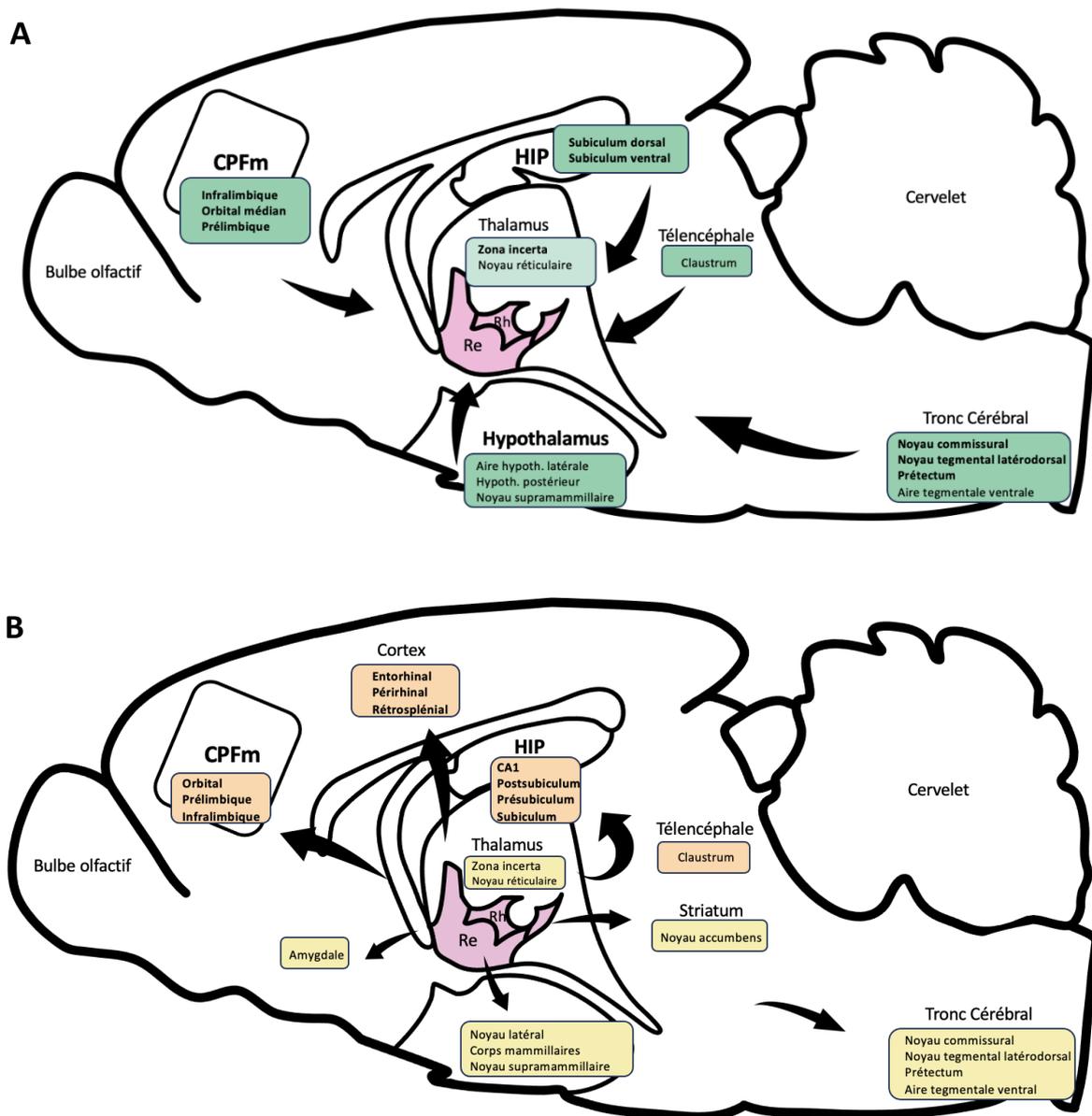


Figure 12. Connectivité des noyaux reuniens et rhomboïde

Représentation des principales structures afférentes (A) et efférentes (B) aux ReRh sur une coupe sagittale de cerveau de rat. Les connectivités les plus denses sont représentées en couleur foncée, les moins denses en couleur claire.

Abréviations : CA1 : Corne d'Ammon 1 ; CPFm : Cortex préfrontal médian ; Hip : Hippocampe ; Re : Reuniens ; Rh : Rhomboïde

Figures issues de la thèse de Laurine Boch (2023), réalisées d'après Vertes, 2002 ; Van der Werf et al., 2002 ; McKenna and Vertes, 2004 ; Vertes et al., 2010 ; Varela et al., 2014

couche IV, les noyaux “non-spécifiques” se distinguent par des projections diversifiées et diffuses, ciblant plusieurs territoires corticaux, avec des terminaisons majoritairement situées dans la couche I (Bentivoglio et al., 1991 ; Pereira De Vasconcelos and Cassel, 2015). Cette organisation a conduit à l’hypothèse selon laquelle le thalamus non spécifique jouerait principalement un rôle de relais du système d’éveil. Dans ce cadre, plusieurs études ont mis en évidence une implication des ReRh dans des fonctions non cognitives, notamment la régulation circadienne (e.g. Giardino et al., 1989), la reproduction (e.g. Iwasaki et al., 2010), la prise alimentaire et la régulation pondérale (e.g. Wilmot et al., 1988), ou encore la nociception (e.g. Bullitt, 1990). Une revue détaillée de ces implications non cognitives est réalisée dans (Cassel et al., 2013).

Cette classification a été remise en question avec l’identification de cibles corticales spécifiques des ReRh, principalement situées dans le CPFm (Vertes et al., 2006). Leur connectivité avec des structures limbiques, telles que le CPFm, l’Hip ou encore l’amygdale, suggère une implication des ReRh dans des fonctions cognitives. Ainsi, les études plus récentes ont mis en évidence leur rôle dans des fonctions exécutives, comme la mémoire de travail et la flexibilité cognitive ; et des fonctions mnésiques, en particulier la consolidation d’un souvenir spatial. La position stratégique des ReRh au sein du réseau cortico-thalamo-hippocampique, ainsi que leurs implications fonctionnelles seront détaillées dans les paragraphes suivants (voir **IV. Le réseau cortico-thalamo-hippocampique**).

III. L'hippocampe

L'hippocampe est une structure bilatérale située dans le lobe temporal médian, chez l'humain (**Figure 13**). La formation hippocampique se compose de la Corne d'Ammon (**CA**, elle-même divisée en 3 sous-régions CA1, CA2 et CA3), du gyrus denté (**GD**) et du subiculum (**Amaral and Witter, 1989**).

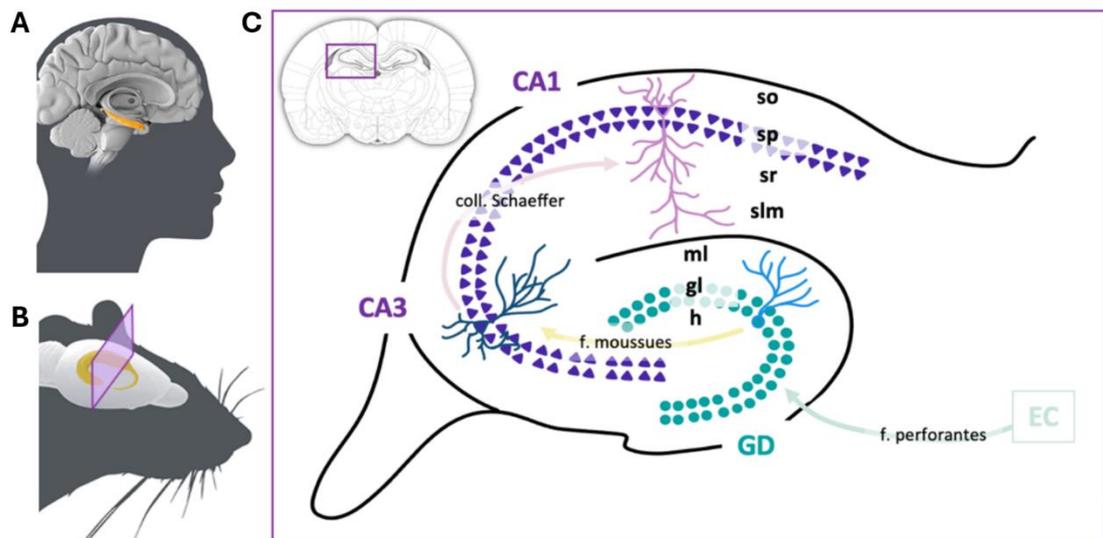


Figure 13. L'Hippocampe

Représentation schématique de l'hippocampe sur des coupes sagittales de cerveau humain (**A**) et de rat (**B**) par rapport à l'ensemble de la tête. L'hippocampe est indiqué en orange. Représentation d'une coupe frontale d'hippocampe de rat (**C**) ainsi que de la communication par la boucle trisynaptique.

Le rectangle violet en **B** correspond à la position de la section illustrée en **C**.

Abréviations : CA : Corne d'Ammon ; EC : Cortex entorhinal ; GD : Gyrus Denté ; coll. Schaeffer : collatérales de Schaeffer ; f. moussues : fibres moussues ; f. perforantes : fibres perforantes ; so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare ; ml : couche moléculaire ; gl : couche granulaire ; h : hile
Figure issue de la thèse de [Laurine Boch \(2023\)](#).

Le GD présente une organisation en trois couches : la couche moléculaire, la couche granulaire et le hile. La couche granulaire contient les cellules granulaires, qui projettent à l'arbre dendritique de la couche moléculaire. Les Cornes d'Ammon ont également une structure laminaire. La couche moléculaire est divisée en *stratum radiatum* et *stratum lacunosum-moleculare*. Au-dessus se trouve la couche pyramidale (*stratum pyramidale*), qui contient les cellules pyramidales, densément compactées et alignées. Leurs dendrites basales s'orientent

vers la *stratum oriens* (couche polymorphe située au-dessus de la couche pyramidale), tandis que leurs dendrites apicales s'étendent vers la *stratum lacunosom-moleculare*.

Au sein de la formation hippocampique, les messages circulent principalement de manière unidirectionnelle (**Figure 13C**). La principale source d'afférences provient du cortex entorhinal (**CE**), qui innerve le GD par la voie perforante. Les cellules granulaires du GD projettent ensuite dans CA3 via les fibres moussues, puis les cellules pyramidales de CA3 projettent à CA1 à travers les collatérales de Schaffer. Par ailleurs, CA1 reçoit également des afférences directes du CE par la voie perforante. Les cellules pyramidales de CA1 projettent ensuite sur le subiculum, qui constitue la principale voie de sortie de la formation hippocampique. Enfin, le subiculum projette en retour vers le Re, bouclant ainsi le circuit. Cette organisation, caractérisée par trois principales synapses successives, est nommée **boucle trisynaptique**.

En dehors du cortex entorhinal, la formation hippocampique reçoit des afférences de l'amygdale, du septum, de l'hypothalamus et du tronc cérébral. Elle reçoit également des afférences thalamiques, principalement des noyaux antérieurs et des ReRh. Le subiculum, étant la principale voie de sortie de la formation hippocampique, projette vers des régions néocorticales, notamment le CPF, vers les corps mamillaires, le septum, et également vers le Re (e.g. [Henke, 2010](#)).

Le chapitre 1 a mis en avant le rôle fondamental de l'Hip dans la représentation de l'environnement spatial sous forme d'une carte cognitive, notamment grâce à la présence des cellules de lieu. L'Hip est également très important dans l'encodage et le rappel récent de souvenirs épisodiques chez l'humain, ou épisodiques-like chez l'animal.

IV. Le réseau cortico-thalamo-hippocampique

1. Description anatomique

Le CPFm, les ReRh et l'Hip sont reliés entre eux sous la forme d'un réseau cortico-thalamo-hippocampique anatomique et fonctionnel (Figure 14).

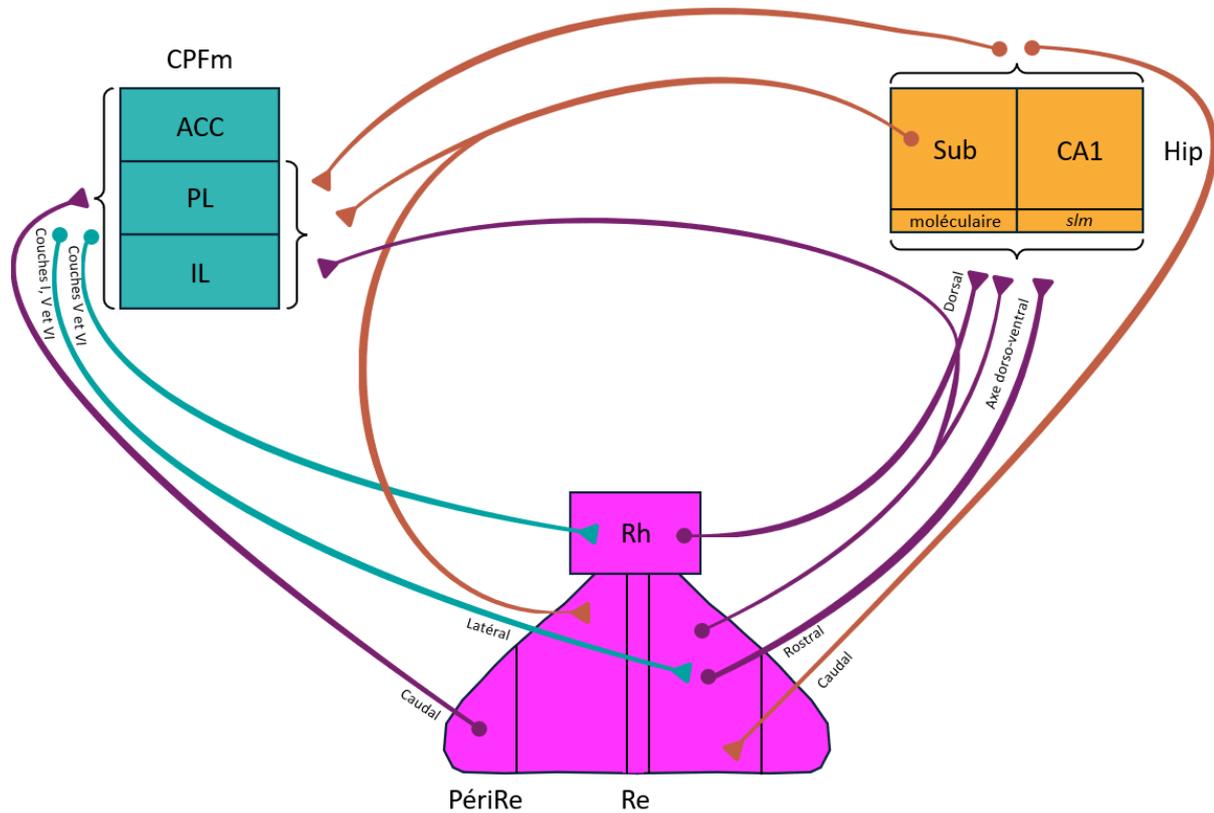


Figure 14. Le réseau cortico-thalamo-hippocampique

Représentation schématique du réseau cortico-thalamo-hippocampique, avec les projections excitatrices afférentes et efférentes du CPFm, de l'Hip et des ReRh.

Abréviations : CPFm : Cortex Préfrontal médian ; ACC : Cortex Cingulaire Antérieur ; PL : Cortex Prélimbique ; IL : Cortex Infralimbique ; Rh : Noyau Rhomboïde ; Re : Noyau Reuniens ; PériRe : péri-reuniens ; Sub : subiculum ; CA1 : Corne d'Ammon 1 ; moléculaire : couche moléculaire du subiculum ; sml : stratum lacunosum-moleculare de CA1 ; Hip : Hippocampe

Le CPFm projette aux ReRh

Les ReRh reçoivent des afférences excitatrices majeures des 3 régions du CPFm (Vertes, 2002 ; McKenna and Vertes, 2004). Ces afférences sont l'objet de ce projet de thèse et seront donc détaillées dans une section ultérieure (voir V. La projection cortico-thalamique). Au sein du Re, ces afférences ciblent spécifiquement la partie médiolatérale du Re où elles établissent

des synapses sur les dendrites proximales des neurones de projection du Re vers l'Hip (Vertes et al., 2007).

Les ReRh projettent à l'Hip

Les ReRh constituent une source majeure d'afférences de l'Hip (Herkenham, 1978 ; Wouterlood et al., 1990 ; Bokor et al., 2002). Plus précisément, c'est principalement la région médiolatérale du Re rostral qui projette vers l'Hip (Hoover and Vertes, 2012 ; Varela et al., 2014), ciblant spécifiquement la *stratum lacunosum moleculare* de CA1 et la couche moléculaire du subiculum (Vertes et al., 2006). Tandis que le Rh ne projette que sur l'Hip dorsal, le Re innerve l'ensemble de l'axe dorso-ventral de l'Hip, avec néanmoins une prédominance de l'innervation vers sa partie ventrale (Vertes et al., 2006 ; Hoover and Vertes, 2012 ; Varela et al., 2014). Les ReRh ne projettent ni vers CA2, ni vers CA3, ni vers le DG (Wouterlood et al., 1990 ; Vertes et al., 2006).

Le Re établit des synapses excitatrices sur les cellules pyramidales et les interneurons de CA1 et du subiculum (Wouterlood et al., 1990 ; Dolleman-van der Weel and Witter, 2000). Les études concernant l'impact fonctionnel de ces projections sont détaillées dans la revue de (Dolleman-van Der Weel et al., 2019). Brièvement, il a été montré que le Re module l'excitabilité des neurones de CA1 via des mécanismes excitateurs directs et inhibiteurs indirects (Dolleman-Van Der Weel et al., 1997). Il est ainsi proposé que le Re exerce une inhibition *feedforward*, conditionnant la décharge des neurones pyramidaux de CA1 uniquement dans certaines circonstances, à savoir lorsque l'inhibition est réduite et/ou lorsque l'excitabilité des dendrites apicales est renforcée par d'autres entrées, telles que celles provenant du CE (Dolleman-Van Der Weel et al., 1997 ; Dolleman-van Der Weel et al., 2017). En effet, les travaux de (Dolleman-van Der Weel et al., 2017) suggèrent que les afférences du Re et du CE convergent sur les mêmes branches dendritiques des cellules pyramidales de CA1.

Cependant, ce modèle a été remis en question par les travaux d'Andrianova et al. (2021), qui suggèrent l'absence d'afférences directes du Re sur les cellules pyramidales de CA1.

L'Hip projette au CPFm

Cette voie de projection a été décrite chez le rat par [Ferino et al. \(1987\)](#). Plus spécifiquement, [Jay and Witter \(1991\)](#) ont mis en évidence des projections des neurones de CA1 (à l'exclusion de sa partie la plus dorsale) ainsi que de la moitié médiane du subiculum vers toutes les couches du PL et du cortex orbital médian, chez le rat. Mais l'Hip projetterait également sur l'IL chez le rat ([Hoover and Vertes, 2007](#)). Plus récemment, [Liu et Carter \(2018\)](#) ont montré que les neurones de l'Hip ventral projettent principalement sur les couches II/III et V de l'IL, mais uniquement sur la couche V du PL, chez la souris. Leurs résultats suggèrent également que ces afférences ciblent préférentiellement les neurones de projection cortico-corticale. De plus, certains neurones du subiculum possèdent des collatérales projetant à la fois vers le Re et le CPFm ([Varela et al., 2014](#)).

Bien que [Rajasethupathy et al. \(2015\)](#) aient mis en évidence une projection monosynaptique de l'ACC vers les régions CA3 et CA1 chez la souris, ce résultat n'a pas été répliqué par les auteurs eux-mêmes. Qui plus est, dans la publication initiale, le rétro-marquage des neurones du cortex cingulaire antérieur projetant vers l'hippocampe est largement confiné à l'aire motrice secondaire. Par conséquent, le fait que de nombreuses autres études n'aient pas réussi à identifier de telles projections préfronto-hippocampiques directes (e.g. [Buchanan et al., 1994](#) chez le lapin ; [Beckstead, 1979](#) ; [Sesack et al., 1989](#) ; [Vertes, 2004](#) chez le rat) contribue à maintenir un consensus selon lequel le **CPFm ne projette pas directement vers l'Hip**.

L'Hip projette au Re

Cette voie de projection est peu étudiée, mais le subiculum et CA1 projettent au Re, principalement sur sa partie caudale ([Herkenham, 1978](#) ; [McKenna and Vertes, 2004](#)). Une projection de l'Hip vers le Re a également été identifiée chez le macaque ([Aggleton et al., 1986](#)).

Les ReRh projettent au CPFm

Ces projections proviennent principalement de la partie caudale du Re, et en particulier des PériRe et de la ligne médiane du Re ([Hoover and Vertes, 2012](#) ; [Varela et al., 2014](#)). Elles ciblent principalement les couches I, V et VI des cortex PL et IL, mais également

l'ACC de façon moins dense (Vertes, 2006). Les afférences les plus antérieures du Re ciblent majoritairement le PL, tandis que les plus postérieures ciblent davantage l'IL (Varela et al., 2014).

Les études concernant l'impact fonctionnel des projections du Re dans le CPFm restent limitées, mais suggèrent que le Re exerce une influence excitatrice directe et une influence inhibitrice indirecte sur cette région (Di Prisco and Vertes, 2006 ; Cruikshank et al., 2012). De manière analogue à ce qui a été décrit dans CA1, il est supposé que le Re forme des synapses excitatrices à la fois sur des cellules pyramidales et des interneurons du CPFm (Dolleman-van Der Weel et al., 2019). Il est alors également proposé que le Re exerce une inhibition *feedforward*, imposant une fenêtre temporelle restreinte pour l'excitation des cellules pyramidales du CPFm via d'autres afférences, comme celles de l'Hip par exemple (Dolleman-van Der Weel et al., 2019). Ce mécanisme contribuerait ainsi à l'optimisation de la synchronisation de la communication entre l'Hip et le CPFm.

Enfin, certains neurones du **Re projettent à la fois au CPFm et à l'Hip** par le biais de collatérales (Hoover and Vertes, 2012 ; Varela et al., 2014). Selon les études, ces neurones représentent entre 3 et 9% des neurones du Re et sont principalement situées dans la partie latérale du Re central (Hoover and Vertes, 2012). Ces neurones se distinguent par l'absence d'expression de la calR et de la calB, mais ils sont contenus dans des "niches" de cellules exprimant l'une ou l'autre de ces protéines de liaison au calcium (Viena et al., 2020). Cette architecture spécifique pourrait former une sorte de microcircuit neuronal, capable d'intégrer des signaux issus de différentes sources et de les synchroniser, afin d'assurer une transmission coordonnée entre le CPFm et l'Hip (Viena et al., 2020).

Ainsi, les ReRh occupent une position stratégique au sein du réseau cortico-thalamo-hippocampique, leur conférant un rôle central dans la synchronisation et la coordination des échanges entre le CPFm et l'Hip.

2. Les systèmes inhibiteurs

L'absence d'interneurones inhibiteurs dans les ReRh soulève la question de l'origine de l'inhibition dans ces circuits thalamiques. Celle-ci repose sur deux systèmes inhibiteurs majeurs : le noyau réticulaire thalamique (**TRN**) et les entrées inhibitrices extra-thalamiques (**ETI**, **Figure 15**, Halassa and Acsády, 2016). Ensemble, ces deux systèmes permettent un contrôle progressif de la fréquence de décharge thalamique, offrant une capacité d'adaptation dynamique en fonction des exigences comportementales (Halassa and Acsády, 2016).

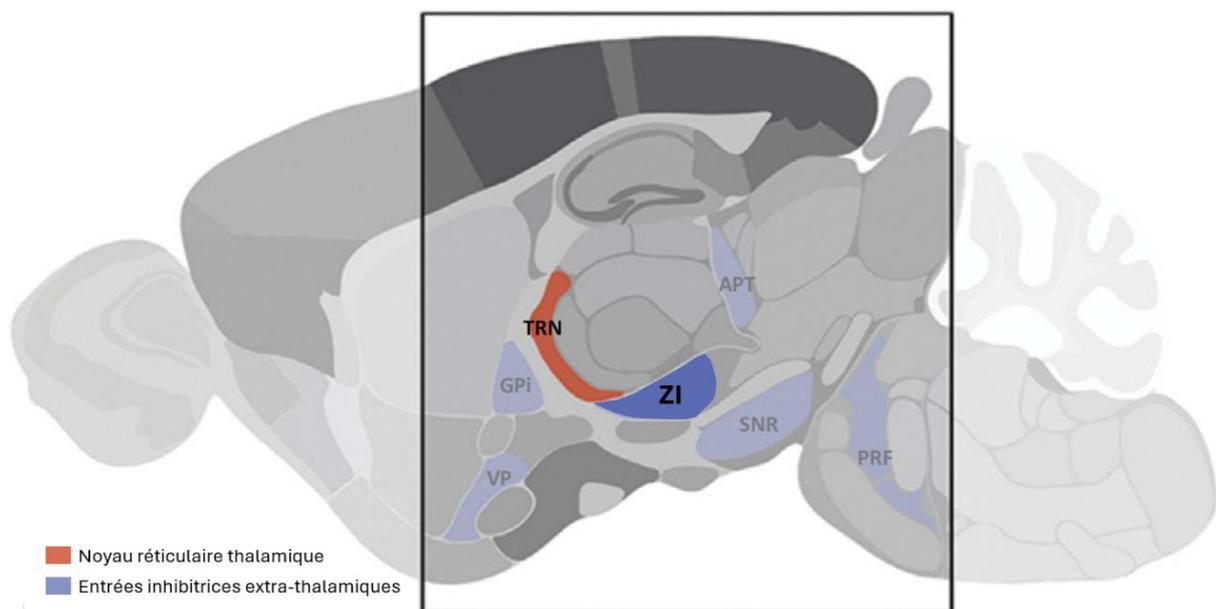


Figure 15. Les systèmes inhibiteurs

Représentation schématique des deux systèmes inhibiteurs majeurs du thalamus sur une coupe sagittale latérale de cerveau de souris. Le noyau réticulaire thalamique est en rouge, les entrées inhibitrices extra-thalamiques sont en bleues. La zona incerta est accentuée car c'est la région principale d'inhibition extra-thalamique sur le Re.

Abréviations : APT : Noyau prétectal antérieur ; GPI : Globus pallidus interne ; PRF : Formation réticulaire pontine ; SNR : Partie compacte de la substance noire ; TRN : Noyau réticulaire thalamique ; VP : Pallidum ventral ; ZI : Zona incerta

Figure issue de Halassa and Acsady (2016)

Dans le Re, les ETI proviennent majoritairement de la *zona incerta* (ZI) et fournissent une inhibition forte, rapide et focalisée, modulant le timing des potentiels d'action individuels et, par conséquent, le contenu des signaux thalamiques (Halassa and Acsády, 2016). Par exemple, la voie incerto-thalamique, ciblant le Re, est impliquée dans la modulation de la généralisation

et l'extinction de la peur dans un protocole de conditionnement aversif (Venkataraman et al., 2021).

A l'inverse, l'inhibition exercée par le TRN est plus lente et de moindre intensité, lui permettant d'être impliqué dans l'amplification du signal et la genèse de rythmes. En effet, le TRN contrôle la magnitude des afférences thalamiques, sans en modifier le contenu (Halassa and Acsády, 2016). Il participe ainsi à la régulation des processus thalamiques à différentes échelles spatiales et temporelles, en fonction du comportement.

Le TRN est une fine couche de neurones GABAergiques recouvrant les parties antérieures et latérales du thalamus et innervant l'ensemble des noyaux thalamiques. Le TRN a une organisation topographique, telle que chaque neurone du TRN innervant un noyau thalamique spécifique reçoit des afférences majeures de ce même noyau thalamique par des collatérales des projections thalamo-corticales, ainsi que de la région corticale associée, par des collatérales des projections cortico-thalamiques. La majorité des neurones du TRN ne projettent donc que sur un seul noyau thalamique (Halassa and Acsády, 2016). Sur le plan anatomique, sept secteurs principaux ont été identifiés dans le TRN : cinq sensoriels (auditif, gustatif, somatosensoriel, viscéral et visuel), un moteur et un limbique (Pinault, 2004). C'est ce dernier qui nous intéresse dans le cadre du réseau cortico-thalamo-hippocampique.

Dans ce réseau, les projections du CPFm vers le Re suivent les mêmes principes d'organisation topographique : les neurones des couches V et VI du CPFm projettent vers le Re (McKenna and Vertes, 2004 ; Varela et al., 2014), les neurones de la couche VI envoient également des collatérales au TRN rostral (Zimmerman and Grace, 2018). Plus précisément, c'est la partie rostromédiane du TRN qui reçoit les projections de l'IL (Cornwall et al., 1990). C'est cette même région rostromédiane qui projette vers le Re, de façon majoritairement ipsilatérale (Kolmac and Mitrofanis, 1997). Enfin, c'est dans cette région rostrale du TRN que convergent les projections de l'Hip et du Re (Çavdar et al., 2008). Les terminaisons des projections de l'IL, de l'Hip et du Re arrivent donc dans la même région du TRN rostro-médian (Çavdar et al., 2008), laquelle envoie des projections inhibitrices vers le Re (Kolmac and Mitrofanis, 1997).

Ainsi, le TRN est un hub de communication, relié au CPFm, à l'Hip et aux ReRh par l'intermédiaire des collatérales des projections cortico-thalamiques et thalamo-corticales.

3. Les implications fonctionnelles

Grâce à leurs projections bidirectionnelles reliant le CFPm et l'Hip, les ReRh occupent une position idéale pour orchestrer les fonctions cognitives nécessitant une interaction entre ces deux structures (Vertes, 2006). Le rôle des ReRh dans ces fonctions, telles que la mémoire de travail ou encore la consolidation systémique d'un souvenir spatial ou d'un conditionnement de peur au contexte, par exemple, est abordé et détaillé dans plusieurs revues (Cassel et al., 2013 ; Dolleman-van Der Weel et al., 2019 ; Cassel et al., 2021 ; Ferraris et al., 2021). Dans le cadre plus spécifique de ce projet de thèse, la revue suivante explore la littérature portant sur le rôle des ReRh, au sein du réseau cortico-thalamo-hippocampique, dans la flexibilité comportementale et les comportements adaptatifs.



In relentless pursuit of the white whale: A role for the ventral midline thalamus in behavioral flexibility and adaption?

Elodie Panzer^{a,b,1}, Isabella Guimares-Olmo^{a,b}, Anne Pereira de Vasconcelos^{a,b},
Aline Stéphan^{a,b}, Jean-Christophe Cassel^{a,b,*}

^a Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, Strasbourg F-67000, France

^b LNCA, UMR 7364 - CNRS, Strasbourg F-67000, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Behavioral flexibility
Extinction
Nucleus reuniens
Prefrontal cortex
Reversal learning
Nucleus rhomboid
Set shifting
Thalamus

ABSTRACT

The reuniens (Re) nucleus is located in the ventral midline thalamus. It has fostered increasing interest, not only for its participation in a variety of cognitive functions (e.g., spatial working memory, systemic consolidation, reconsolidation, extinction of fear or generalization), but also for its neuroanatomical positioning as a bidirectional relay between the prefrontal cortex (PFC) and the hippocampus (HIP). In this review we compile and discuss recent studies having tackled a possible implication of the Re nucleus in behavioral flexibility, a major PFC-dependent executive function controlling goal-directed behaviors. Experiments considered explored a possible role for the Re nucleus in perseveration, reversal learning, fear extinction, and set-shifting. They point to a contribution of this nucleus to behavioral flexibility, mainly by its connections with the PFC, but possibly also by those with the hippocampus, and even with the amygdala, at least for fear-related behavior. As such, the Re nucleus could be a crucial crossroad supporting a PFC-orchestrated ability to cope with new, potentially unpredictable environmental contingencies, and thus behavioral flexibility and adaption.

1. Introduction

When associated with terms like *cognitive* or *behavioral*, the word *flexibility* defines one of the main executive functions (besides e.g., working memory, planning, inhibitory control, self-monitoring), and as such contributes to the control and adaption of goal-directed behaviors. In humans, the concept of cognitive flexibility defines a mental ability to transition efficiently between different ideas, thoughts, or concepts in order to conform to a change of context or constrain during an ongoing situation or task. A typical neuropsychological task to assess cognitive flexibility in humans is the Wisconsin Card Sorting Test described by Grant and Berg (1948). Cards (2 sets of 64) are distinguishable according to three object characteristics (4 colors, 4 numbers, and 4 shapes). The evaluator chooses one of these characteristics as a sorting rule (e.g., yellow color regardless of shape and number) but does not inform the tested subject about this rule. The tested subject must find it out based on the evaluator's feedback (correct, not correct). Once the consecutive choices of the tested subject show that the evaluator's selection rule has been discovered and is now used consistently, the evaluator shifts *in*

petto to another sorting criterion (e.g., number '3' regardless of color and shape), which, again, the tested subject has to find out. Retarded shift to this new sorting rule, or retarded 'set-shifting', may account for perseveration, and thus lack of flexibility.

In the neuroscience literature, the concept of *cognitive flexibility* is often used interchangeably with its nearly twin, *behavioral flexibility*. The latter defines, although preferentially in animal models, an ability to adapt a behavioral response to a modification of environmental contingencies. Most tasks assessing behavioral flexibility in animal models consist of objectifying a perseverative behavior after a change of instruction or demand (e.g., Floresco et al., 2009). For instance, in a spatial context, after having learnt to swim to the location of an escape platform hidden in a water pool, the platform is displaced by the experimenter to a new location, which the tested animal has to search for, find and of course learn. This shift requires abandoning a search behavior based on memory of the previous location of the target. Typically, it is called reversal. In case of behavioral inflexibility, a shift from the former to the new location is significantly retarded (e.g., de Bruin et al., 1994).

One of the brain structures whose involvement in behavioral

* Correspondence to: LNCA – UMR 7364, Faculté de Psychologie, 12 rue Goethe, Strasbourg 67000, France.

E-mail address: jcassel@unistra.fr (J.-C. Cassel).

¹ Equally contributed to this work.

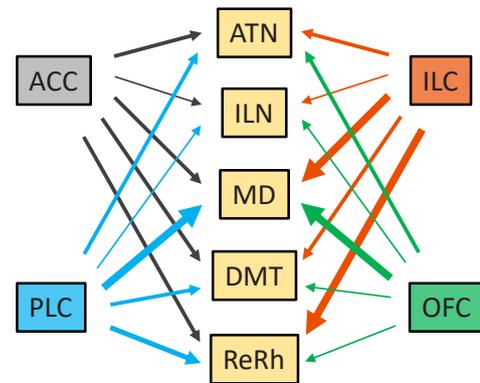
flexibility is crucial is the medial prefrontal cortex (mPFC). Apparently, this holds true across a variety of species, from primates (e.g., Moore et al., 2009) – starting with humans (e.g., Demakis, 2003) – to rodents (e.g., Bissonette and Powell, 2012; Floresco et al., 2009; Moore et al., 2009). In rodents, the mPFC mirrors the functional and neuroanatomical characteristics of the primate dorsolateral PFC, highlighting its significance across species (Seamans et al., 2008). Usually (but see below), the rodent mPFC is anatomically divided into two main regions: the dorsal mPFC, comprising the dorsal prelimbic (PL) and anterior cingulate cortex (ACC), and the ventral mPFC, including the ventral PL and infralimbic cortex (IL), each with distinct connectivity and functions (Howland et al., 2022; van Heukelum et al., 2020). After permanent or reversible lesions of the medial prefrontal cortex (mPFC) in rodents, shifting between strategies or rules (i.e., set-shifting) in a behavioral task is impaired (Birrell and Brown, 2000; Dalley et al., 2004; Floresco et al., 2008; Klune et al., 2021). In monkeys, similar results are obtained when the dorsolateral PFC is altered (Klein-Flügge et al., 2022; Moore et al., 2009). Regarding reversal learning in rodents, impairments are observed following damage to the orbitofrontal cortex, whereas the same damage does not seem to affect set-shifting (McAlonan and Brown, 2003). This could point to a certain degree of regional specialization within the prefrontal cortex as to the latter's contribution to different aspects of behavioral flexibility (e.g., Dalton et al., 2014; Hang-anu-Opatz et al., 2023).

Regions of the mPFC exhibit dense interconnections with cortical association areas, limbic structures, thalamic nuclei, and various midbrain and brainstem nuclei, facilitating complex behaviors shaped by prolonged environmental interaction (Lakshminarasimhan et al., 2024; Klüne et al., 2021; Uddin, 2021; Friedman and Robbins, 2022). The interactions among mPFC regions are thought to mediate various aspects of flexible behavior, particularly through the mPFC-thalamus axis. Indeed, several thalamic nuclei are bidirectionally connected with the mPFC, as illustrated in Fig. 1.

A growing number of reports open the possibility for an implication of the reuniens nucleus (Re), perhaps also the rhomboid nucleus (Rh), in behavioral flexibility. This region of the ventral midline thalamus is bidirectionally connected with the PFC, but also with region CA1 of the hippocampus (HIP; e.g., Cassel et al., 2021), and with the amygdala, among other structures. Interestingly, some experiments indicate that the HIP, in addition to the PFC, may also contribute to flexibility (e.g., Avigan et al., 2020; Cernotova et al., 2021; Lehr et al., 2023; Li et al., 2024; Malá et al., 2015).

Several reviews on the functions of the ReRh nuclei have pointed to a role for them in a variety of cognitive tasks in which success depends upon information exchange between the PFC and the HIP (e.g., Cassel et al., 2021; Dolleman-van der Weel et al., 2019; Ferraris et al., 2021; Pereira de Vasconcelos and Cassel, 2015; Vertes et al., 2022). Behavioral flexibility has received relatively little attention in these reviews. Herein, we compile and discuss the various studies having tackled the question of a possible implication of the ventral midline thalamus, more specifically of its Re nucleus, in behavioral flexibility. To the best of our knowledge, this question has been addressed experimentally only in rodent models so far. Only recently has a map of the Re and Rh nuclei become available in humans (Reeders et al., 2023), what now offers an opportunity for investigating this region in human primates using functional imaging approaches (e.g., fMRI). In the following sections, we will start with anatomical considerations about the ventral midline thalamus, then summarize findings from behavioral studies having tackled behavioral flexibility by focusing on perseveration, alternation, fear extinction, reversal learning, and set-shifting tasks, before concluding.

A. Thalamic afferents (inputs)



B. Thalamic efferents (outputs)

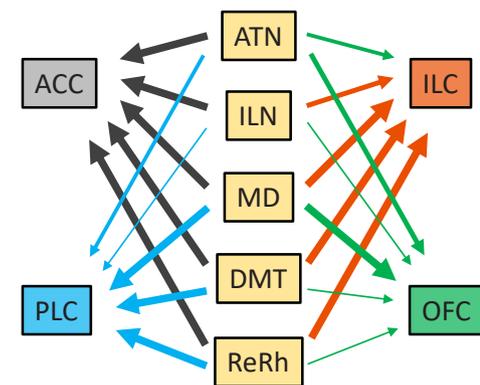


Fig. 1. Synthetic figure illustrating the interconnectivity pattern between different thalamic nuclei and regions of the prefrontal cortex; A: cortical projections to the thalamic nuclei; B: thalamic projections to the cortical nuclei. Thin, intermediate and thick arrows, as indicated in the legend, symbolize the relative densities of the connections. Abbreviations for thalamic nuclei: ATN, anterior thalamic nuclei (i.e., the anterior, anterodorsal, anteroventral, inter-anteroventral nuclei); ILN, intralaminar thalamic nuclei (i.e., the centromedian, parafascicular and reticular nuclei); MD, mediodorsal thalamic nucleus; DMT, dorsal midline nuclei; ReRh, reuniens and rhomboid nuclei (of the ventral midline thalamus). Abbreviations for cortical regions: ACC, anterior cingulate cortex; ILC, infralimbic cortex; PLC, prelimbic cortex; OFC: orbitofrontal cortex. According to Carlén (2017), the secondary motor area and the agranular insular area also belong to the prefrontal cortex. The secondary motor area is bidirectionally connected with the MD, the ILN, as well as the ventral anterior and the ventral lateral nucleus. The agranular area is bidirectionally connected with MD, ATN, PVT and ReRh nuclei. Figure constructed according to Chen and Mitchell (2018), Hoover and Vertes (2007), Philipps et al. (2021), Parnaudeau et al. (2018), Ray and Price (1993), Vertes (2002; 2004), Vertes et al., (2006), Xiao et al. (2009). Caution: this figure is an attempt at synthesis; at no point does it aspire to be a faithful reflection of the anatomical reality. Indeed, the illustrated densities correspond to rough estimations, as they are necessarily relative densities when compared with each other, and as the highest density between a given ensemble of thalamic nuclei and a cortical region (and vice versa) does not necessarily compare with the highest density between another ensemble of thalamic nuclei and another cortical region. Furthermore, a high density of efferents from region 'A' to region 'B' does not necessarily compare with the exactly same high density of afferents to region 'A' from region 'B', among other reasons because afferents and efferents have been assessed in different studies, based on different tracing methods, by different laboratories.

2. Neuroanatomical considerations

2.1. Overall connectivity pattern of the ventral midline thalamus

The thalamus is a diencephalic structure consisting of two ovoid masses made of gray matter and located on each side of the third ventricle. It is divided into not less than 50 nuclei, each with specific functions, and which are grouped in ensembles named according to their location along the medio-lateral, dorso-ventral and antero-posterior orientations of the brain. The main ensembles are formed by the anterior, medial, lateral, intralaminar, midline nuclei (+ the reticular nucleus, the pulvinar, and the lateral and medial geniculate nuclei). As indicated by its name, the midline thalamus is located medially, where it forms a thin strip of cells going from the dorsal to the most ventral limits of the structure. It encompasses the paraventricular, parataenial, intermediodorsal, reuniens and rhomboid nuclei. These nuclei are generally distinguished according to whether their position is dorsal or ventral: the paraventricular, parataenial and intermediodorsal form the dorsal midline thalamus, when the reuniens and rhomboid nuclei form the ventral midline thalamus. The nucleus reuniens is the largest of all midline thalamic nuclei. The rhomboid nucleus, which lays just dorsally to the reuniens nucleus, is relatively small. Another difference between both nuclei is that the reuniens receives inputs only from limbic structures whereas the rhomboid nucleus receives inputs from both limbic and non-limbic (sensori-motor) ones (Vertes et al., 2015). For a dense connection between the Re and the HIP, the connection of the Rh with the HIP is sparser. Furthermore, whereas the Re contains numerous calretinin and calbindin-D28k neurons with a similar distribution for both proteins, there is less of such proteins in the Rh (Vertes et al., 2015). The Re, not the Rh, also contains a small population of dopaminergic neurons projecting contralaterally and to the hypothalamus (Ogundele et al., 2017). Both nuclei, however, share similarities between their respective connection patterns, although differences exist, and not only in afferent and efferent innervation densities to and from the same brain structure, but also in terms of structures with which they are interconnected.

The connectivity of the ventral midline thalamus has been considered over the recent past in several review articles (e.g., Cassel et al., 2021; Dolleman-van der Weel et al., 2019; Pereira de Vasconcelos and Cassel, 2015; Vertes et al., 2022), a reason why we do not reconsider it in detail herein. Briefly, the neurons of the Re nucleus receive more or less dense inputs from over thirty brain regions, including the hippocampal formation (exclusively the CA1 region and the subicular region), other deep or superficial telencephalic structures (including several regions of the cortical mantle), diencephalic structures (including a few other thalamic nuclei), the hypothalamus, and the brainstem. With a significant number of these afferent sources, the connections of the Re nucleus are reciprocal, without there necessarily being a balance between the respective densities of afferent and efferent fibers (e.g., Cassel et al., 2021). The connectivity of the Rh nucleus is lesser known. It receives afferent fibers from a dozen of brain structures, essentially from cortical and brainstem regions, and sends efferent fibers to about 30 brain structures, including the hippocampal formation, several cortical regions, other thalamic nuclei, as well as the nucleus accumbens and the caudate-putamen (e.g., Cassel et al., 2021). We mention *en passant* the connectivity of the Rh nucleus, because this nucleus is both small and closely associated with the Re nucleus, so it seems to us delicate, with classical tools (e.g., lesions, pharmacological inactivation), to functionally manipulate the Re nucleus without affecting all or part of the functioning of the Rh nucleus, and *vice versa*. It is also worth noticing that, at least for the Re nucleus, there is a large overlap of the connectivity pattern between mice and rats, but differences have been described for a significant number of structures, including the amygdala and the lateral entorhinal cortex (Scheel et al., 2020). Therefore, functions of the ventral thalamic midline identified in one model species may not be fully generalized to the other, but from a functional point of view,

both species have never been compared directly in the same experiment.

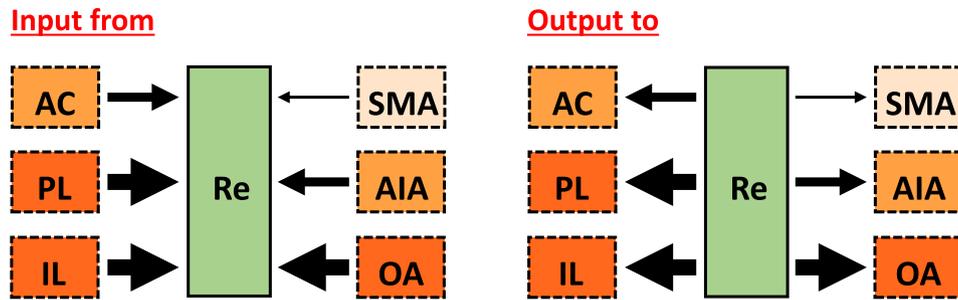
2.2. Focus on the connectivity between the ventral midline thalamus and the prefrontal cortex

Given the topic of the current review, we will focus primarily on the connectivity pattern of the Re nucleus with the PFC. In rodents, there is no consensus about what regions precisely the PFC is made of, most probably because of a still influent, although dated, definition of it. This definition is by Rose and Woolsey (1948): the PFC is the cortical area to which the mediodorsal (MD) thalamus projects. In a more recent critical synthesis, Carlén (2017) considers that, in mice (see Fig. 4 of her article and video S5), the PFC encompasses the anterior cingulate area, the prelimbic area, the infralimbic area, the orbital area, the secondary motor area and the agranular insular area; the latter two areas are not illustrated in Fig. 1 (see caption for their connections). However, delimitations and even denominations of these regions may differ among authors having provided an atlas and/or neuroanatomical descriptions of this cortical region in mice, rats and other species (Carlén, 2017), so that interspecific overlap is all but a rule. This problem has also been the central concern of the critical review by Laubach et al. (2018). It is noteworthy, however, that for the cingulate cortex a homologous nomenclature has been proposed, which does not only permit aligned results between studies in rodents as compared to other species, but also provides a better structural and functional organization of this part of the PFC (van Heukelum et al., 2020).

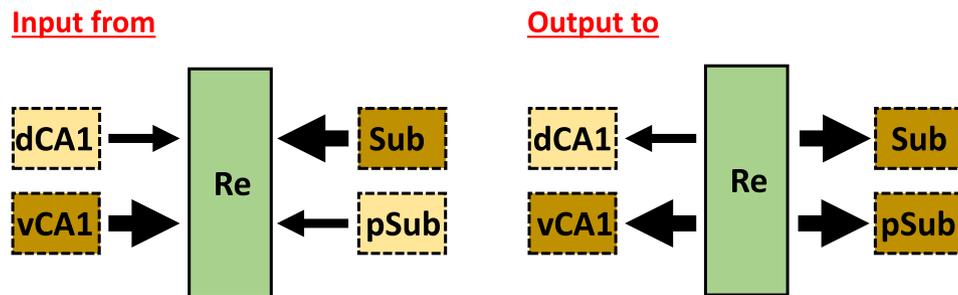
Based on Carlén's subdivisions of the prefrontal cortex, the nucleus Re receives a dense innervation originating in the prelimbic, infralimbic and orbital areas, as illustrated in Fig. 2A. Afferents from the anterior cingulate and the agranular insular areas are less dense. The weakest innervation originates in the secondary motor area. Regarding efferent connections, the Re nucleus has dense projections to the prelimbic, infralimbic and orbital areas. It also projects, although less densely, to the anterior cingulate and the agranular insular area. Finally, it has sparse projections to the secondary motor area. An interesting picture in this connectivity schema is that the areas to which the Re projects most densely are also those from which it receives its densest innervation. This reciprocity in connection density also holds true for regions of the prefrontal cortex less densely interconnected with the Re nucleus. Regarding the topic of the current review, all prefrontal areas that are densely connected with the Re nucleus have been, in a way or another, associated with behavioral flexibility (for a few review articles, see: Barker et al., 2014, Boorman et al., 2021, Dalley et al., 2004, Hang-anu-Opatz et al., 2023, Klein-Flügge et al., 2022, Klüne et al., 2021, Nett and LaLumiere, 2021, Park and Moghaddam, 2017, Parnaudeau et al., 2018, Rich et al., 2018).

As the HIP and amygdala have also been linked to certain behaviors that can be considered reflective of (or at least related to) flexibility (e.g., the extinction of a conditioned fear response), it may be useful to add a few words about the connections of the Re nucleus with these two structures. Regarding the HIP, it is quite simple: the Re nucleus projects exclusively to the CA1 region (Fig. 2B), predominantly in the ventral part, less so in the dorsal one. Although properly speaking this is not the hippocampus, it can be useful to remind that there are dense projections of the Re nucleus to the subiculum, less to the pre- and postsubiculum. As for the afferents to the Re nucleus, they originate from the same regions. Moreover, in a study examining Re nucleus afferents/efferents, a strong convergence of fibers from the mPFC on Re nucleus cells projecting to the HIP has been shown (Vertes et al., 2007), providing anatomic support to an mPFC modulation of Re neurons that project to the hippocampus. Finally, concerning the amygdala (Fig. 2C), although sparse, there are reciprocal connections between the Re nucleus and all amygdala nuclei (basolateral, basomedial, lateral, medial, and posterior, perhaps a bit more with the basolateral than with the others).

A. Prefrontal cortex



B. Hippocampal formation



C. Amygdala

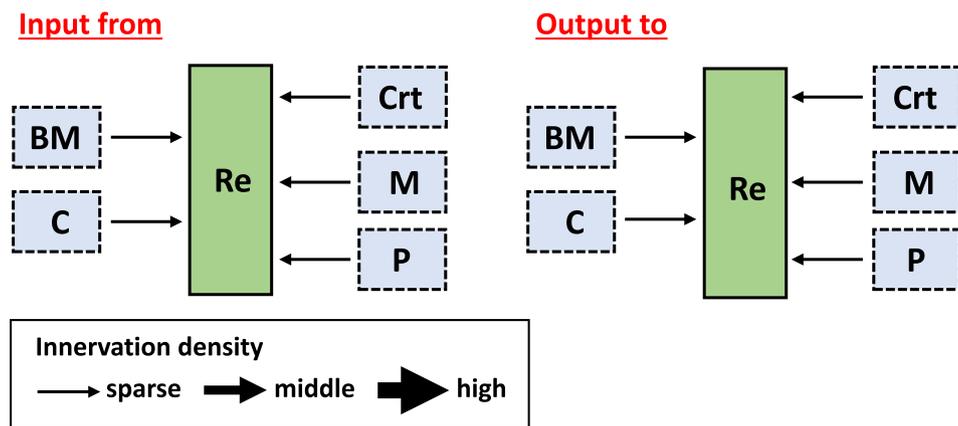


Fig. 2. Synthetic figure illustrating the interconnectivity pattern between the different regions of the prefrontal cortex (A; according to the delimitation proposed by [Carlén, 2017](#)), the hippocampus (B), the amygdala (C) and the reuniens nucleus (Re). Distinction is made between afferent projections (Input from, on the left) and efferent projections (Output to, on the right). Innervation density goes from highest (thick arrows) to sparsest (thin arrow), with in between densities (arrow of intermediate thickness). The arrow density code is strengthened by the fill pattern of the rectangles corresponding to each cortical area (from deep color, densest, to faded color, the least dense). This coloration nicely illustrates the reciprocity in connection densities between the Re nucleus and the cortical areas considered. Abbreviations: AC, anterior cingulate area; PL, prelimbic area; IL, infralimbic area; OA, orbital area; AIA, Agranular insular area; SMA, secondary motor cortex; Re, reuniens nucleus; dCA1: region CA1 in the dorsal hippocampus; vCA1: region CA1 in the ventral hippocampus; Sub: subiculum; pSub: pre- and postsubiculum; BM: basomedial amygdala; C: central amygdala; Crt: cortical amygdala; M: medial amygdala; P: posterior amygdala. For the prefrontal cortex, the denominations are according to [Carlén, 2017](#). Density of connectivity according to [McKenna and Vertes \(2004\)](#), [Vertes \(2002\)](#), [Vertes et al. \(2006\)](#); other references in [Cassel et al. \(2013\)](#); [\(2021\)](#).

3. Behavioral considerations

3.1. Implications of thalamic nuclei other than ReRh in behavioral flexibility

In humans, functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies indicate that the mediodorsal (MD) thalamus provides feedback to the dorsolateral PFC during behavioral strategy switching ([Hummos et al.,](#)

[2022](#)). Similarly, in rodents, projection neurons from the PFC play a role in set-shifting by encoding feedback information to downstream targets such as the MD and ventral medial striatum (VMS) ([Spellman et al., 2021](#)). Furthermore, animal studies suggest an interconnected network involving the MD, PFC, and nucleus accumbens core (NAc), or even more generally striatum, that may collaborate to facilitate certain forms of behavioral flexibility ([Bradfield and Balleine, 2017](#); [Block et al., 2007](#); [Gmaz and van der Meer, 2022](#); [Liu et al., 2020](#); [Rikhye et al., 2018](#);

Wang et al., 2019). This phenomenon may be attributed to the extensive and bidirectional connectivity observed between the MD and most of the mPFC regions, as demonstrated in studies involving both humans and animals (Alcaraz et al., 2016; Groenewegen, 1988; Mengxing et al., 2023; Oyama et al., 2022).

Furthermore, using an NMDA-mediated, fiber-sparing lesion in rats, Ouhaz et al. (2022) reported on extra-dimensional (not intra-dimensional) set-shifting impairments after damage to the medial thalamus. Although this region is strongly connected with the PFC, the study design did not allow concluding whether a disrupted cortico-thalamic or thalamo-cortical connection was implicated in the induced dysfunction. Using optogenetic tools, Marton et al. (2018) demonstrated that projections from PFC to dorsomedial thalamus were important for behavioral flexibility in a decision-making task guided by auditory or visual cues. Rikhye et al. (2018) found that projections from the medial thalamus to the PFC regulated flexibility by acting on cortical interneurons; in this study, mice had to switch between sets of learned cues guiding their attention towards visual or auditory targets. Par-naudeau et al. (2015) showed that DREADD-induced hypofunction of the MD thalamus was accompanied by behavioural inflexibility in an instrumental discrimination task. Some evidence for an implication of intralaminar thalamic nuclei in behavioral flexibility has also been provided (Brown et al., 2010; Kato et al., 2018). While the PFC demonstrates extensive connectivity with various thalamic nuclei (Oyama et al., 2022; Yang et al., 2022), the anterior thalamic nuclei (ATN), known for their importance in cognition and spatial memory, were also investigated for their potential role in behavioral flexibility. Lesions to the ATN produced a temporary impairment in strategy-shift experiments, but the extent of this deficit did not conclusively demonstrate that ATN are involved in modulating flexibility behavior (Kinnavane et al., 2019). Finally, Nakayama et al. (2018) provided experimental arguments implicating projections from the PFC to the midline thalamus (besides cortico-striatal ones) in a behavioral flexibility task assessing a probabilistic reversal in an operant chamber. Interestingly, in this study, the thalamic regions of the cortical projections predominantly encompassed the mediodorsal, parafascicular, but also the ventromedial thalamic nuclei, i.e., the region including the Re and Rh nuclei.

3.2. Early observations

Possibly one of the first papers to point on an implication of the Re nucleus in aspects of behavioral adaptations implicating flexibility is the report by Dolleman-van der Weel et al. (2009). These authors compared in rats the behavioral effects of bilateral neurotoxic lesions (using ibotenate) of the hippocampus, the MD thalamus or the Re nucleus. To this end, they used a water maze task assessing spatial learning and memory. Rats were trained over 3 days (5 trials/day) for a maximum of 2 min/trial, resting on the platform for 30 s when they had reached it. They were tested in a probe trial 24 hours after the last training, for which they were left in the pool for 60 s, the escape platform having been removed. All rats were subsequently retested, on the same day, using a visible platform to evaluate possible biases such as sensorimotor or motivational alterations, or difficulty to shift to a different problem solving strategy. As expectable, Dolleman-van der Weel et al. found impaired learning in rats subjected to hippocampal lesions. In rats with mediodorsal thalamic lesions, there was almost no alteration, whereas rats with Re nucleus lesions and sham-operated ones performed close to each other, and indistinctly from a statistical viewpoint. Interestingly, overall differences in swim strategies were noticed: rats with MD lesions swam more frequently along the pool edge (a behavior called thigmotaxis) and showed less direct swim paths. Rats with hippocampal lesions also displayed a lower number of direct swim paths and their swim patterns appeared disorganized. Finally, rats with Re lesions swam like the sham-operated controls did. In the probe test, only rats with hippocampal lesions showed an impairment that was significant when compared to their sham-operated controls. Most interestingly regarding

the topic of this review, the rats with Re lesions swam directly to the former platform location, but then, they gave up searching at the right place, what clearly contrasted with the insistence displayed by the sham-operated control rats. According to the authors, this difference can be regarded as a behavior accounting for a change in the ability of 'shifting strategy' (dixit), possibly because of the disruption of Re to mPFC connections. In the cued test, only rats with MD lesions tended towards some impairment as they persisted to swim to the location of the hidden platform (what accounts for a clear reversal impairment, and thus reduced behavioral flexibility, an observation all but surprising given the strong connectivity between the MD and PFC). Regarding the Re nucleus, its main lesion effect was reflected in a modification of the strategy used by the rats in the probe trial.

3.3. The Re nucleus and perseveration

Here, we consider only experiments in which perseverative behaviors have been evaluated without manipulations of explicit environmental contingencies informing the animal that the rule has changed. As in the Wisconsin card-sorting test for humans, rats have to find out by themselves that something has become different in the situation that they have been facing so far. Perseverative behaviors are behaviors that continue to be repeated in a particular situation in which contingency changes have rendered this behavior inadequate to achieve the goal it enabled to reach so far (as shown by Captain Ahab in Herman Melville's novel *Moby Dick*, hence the title of the current review). Perseveration corresponds to a form of behavioral inflexibility. Two classical tasks measuring perseveration in rodent models are the spontaneous or reinforced alternation task (e.g., rats do not consistently alternate between the target arms) and an operant conditioning task (e.g., rats do not consistently alternate between target levers on which they have to alternatively press in order to get a reward). Lack of (or delayed) extinction after classical or operant conditioning may also reflect a perseverative tendency (see below).

3.3.1. Alternation tasks

Using a modified T-maze in which rats could return to the start location by their own after having chosen an arm where they had been rewarded (or not in case of an incorrect choice), Viena et al. (2018) examined the effects of reversible Re inactivation on alternation behavior. Delays of 30, 60 or 120 s were interposed between a sampling and an alternation trial. Two doses of the GABA_A receptor agonist muscimol were used, 62.5 ng and 125 ng, and delivered to the Re in a volume of 0.5 μL PBS. When a rat made an incorrect choice on the alternation run (i.e., returned to the arm selected in the sampling trial), it was given up to 10 additional trials to correct this error. The later variable (number of successive uncorrected trials) accounted for perseveration. There was a 30 min gap between the end of muscimol infusion and the start of behavioral testing. At both doses and for all delays, the muscimol infusion disrupted the number of correct trials, what may be regarded as reflecting disruption of working memory. Most interestingly given the topic of this review, inactivation of the Re also resulted in a dramatic increase of the number of errors accounting for perseverative behavior, and thus for impaired behavioral flexibility.

Using a maze similar to the one used by Viena et al. (2018), Stout et al. (2022) examined in rats the implication of the Re nucleus in vicarious trial and error (VTE). VTE refers to a situation in which animals behave as if exploring the possibilities provided at a choice point before properly engaging into the behavior. VTE, which emerges when flexible decision-making is needed, translates deliberation about the correct choice leading to the reward. From a behavioral point of view, at the choice point, it is accompanied by head-sweeping, reduced displacement velocity, and/or even short pausing, which can all be used as markers of VTE as long as they are noticed at the choice point (i.e., in the T-maze, this point is where the three arms cross). In rats previously trained to alternate the arm choices, Stout et al. used muscimol to

reversibly inactivate the Re nucleus. The authors found that, over all choices (correct and incorrect trials collapsed), the inactivation did not affect the frequency of VTEs, although reducing the percentage of correct trials (i.e., trials leading to the reward; from almost 70 % to about 40 %). When, however, only incorrect trials were considered, muscimol increased the frequency of VTE substantially. Interestingly, Stout et al. (2022) also analyzed theta activity synchrony between the mPFC and the hippocampus (HIP) and found that muscimol reduced coherence during VTE on incorrect choices, what suggests disruption of activity coordination in the prefrontal-thalamo-hippocampal circuit when the Re nucleus is inactivated. Overall, the reported results indicate that Re inactivation produces an increase of deliberation in repeated choice errors trials, hence in trials corresponding to a perseverative behavior.

3.3.2. Fear conditioning and extinction of conditioned fear

Perseverative behaviors, and thus lack of flexibility, can also be regarded as persistence of behavioral responses that should be extinguished following removal of an unconditional stimulus associated with an explicit conditioned stimulus (e.g., a tone) or a configuration of multiple stimuli (i.e., a context). As such, it may be interesting to consider experiments that used a conditioning paradigm implicating cooperation between the mPFC and the HIP (or amygdala). Two behavioral paradigms have been used, some with an explicit conditioned stimulus (a tone at a given frequency), others with contextual fear conditioning.

3.3.2.1. Connections between Re nucleus and mPFC. Ramanathan et al. (2018a) used a tone. Their rats were exposed to tone(CS)-shock associations in a given context, and, with a 24-h delay, re-exposed to the CS in a different context to induce extinction (tone was presented, but no electrical shock was delivered). Before this, the Re nucleus was infused with a saline solution (control) or with muscimol. Muscimol disrupted extinction to the point that no extinction at all could be observed. Ramanathan et al. (2018a) also tested extinction retrieval of the extinguished fear by placing their rats back into the extinction context. They found that muscimol infused before this retrieval test disrupted the retrieval of the extinguished fear (rats behaved as if extinction had not taken place). In intact rats, they also found that both encoding and retrieval of extinction resulted in increased c-Fos expression and single unit firing in the Re nucleus. Furthermore, using an inhibitory DREADD (hM4Di) approach, they established that silencing (with Clozapine N-oxide or CNO) the projections from the mPFC to the Re nucleus reduced extinction efficiency, and they obtained similar results when the terminals of these projection neurons were silenced directly within the Re nucleus. Silencing projections from the infralimbic or prelimbic PFC, or from both, yielded very similar results.

Ramanathan and Maren (2019) performed contextual fear conditioning in rats that had been equipped with infusion cannulae targeting the Re nucleus. Among other findings, they observed that Re inactivation disrupted both encoding and extinction. On the one hand, rats conditioned right after muscimol infusion and subjected (after 24 h) to extinction following saline infusion did not extinguish. On the other hand, rats conditioned after saline infusion and subjected to extinction after muscimol infusion also failed to extinguish, indicating perseverating fear. The latter observation is compatible with a Re-mediated suppression of fear memory expression in the on-going extinction trial, and the former with a participation of Re in encoding or consolidation of unpleasant circumstances. These authors also reported that the Re nucleus displayed theta-range rhythms that correlated with freezing during the extinction phase.

In a more recent study from the same group, Totty et al. (2023) recorded LFPs in the mPFC (prelimbic and infralimbic cortices) and in the HIP (in fact in region CA1) while rats extinguished/retrieved an auditory fear conditioning in a context different from the conditioning one. They found that coherence (at theta frequency; 8 Hz) between

mPFC (infralimbic cortex) and HIP activity was increased during extinction retrieval. Interestingly, they also reported that Re nucleus inactivation with muscimol reduced c-Fos expression in both the mPFC and HIP during fear relapse, a treatment that also reduced theta-range spectral coherence between the mPFC and HIP. Finally, optogenetic inhibition of the Re impaired extinction-memory retrieval.

3.3.2.2. Connections between Re nucleus and HIP. Ratigan et al. (2023) used a fear conditioning approach in mice placed into a virtual reality context, in which they could be delivered electrical shocks on the tail. Over three consecutive post-conditioning days, the mice froze significantly more in the shocked as compared to the neutral (no shock delivered) context, with freezing location evenly distributed over the entire virtual context; it did not depend on the mice location in the context. The duration of the average freezing epochs was longer in the freezing than in the neutral context. Ratigan et al. (2023) subsequently used an inhibitory DREADD approach in the projections from the Re nucleus to region CA1 of the hippocampus. The DREADD was activated with deschloroclozapine (DCZ) during the conditioning session; DCZ is more potent than CNO and has a direct action of the DREADD. When tested subsequently, mice treated with DCZ during conditioning froze more in the shocked context, but an increase of freezing behavior was also observed in the neutral context, although with freezing levels lower than in the shock context. In an additional experiment, the acute effects of DCZ were assessed on the first retrieval day. Under this condition, the freezing response under DCZ was increased in the shock as compared to the neutral context, or in comparison with shocked controls bearing no DREADDs that were treated with DCZ in the target context. Interestingly, on day 2, mice given DCZ on the previous day still showed increased freezing in the shocked context (not in the neutral one), what can be regarded as evidence for delayed extinction. When freezing was increased, this was due to a lengthening of the freezing epochs. As the increased freezing response appeared in both the shocked and neutral contexts, it seems that mice showed reduced discrimination capabilities after inhibition of the Re-to-CA1 projections. None of these modifications was due to unspecific DCZ effects as mice did not respond to DCZ in darkness, which prevented perception of contextual cues. An additional step consisted in visualizing Re-to-CA1 activity by 2-photon calcium imaging in the HIP. Re axons ending in the HIP showed an activity that, post-shock, correlated with freezing epochs; it was higher during freezing than during running. Furthermore, when freezing responses decayed as a result of extinction, this firing decayed in parallel with extinction of the fear response. The relationship between post-shock Re-to-CA1 activity and freezing responses was confirmed using a computational encoding model. In this article, Ratigan et al. (2023) rose the possibility that the input driving the activity of Re-to-CA1 projections originates in the mPFC, presumably in the infralimbic cortex given its implication in fear suppression (e.g., Giustino and Maren, 2015). They also mentioned that this system most probably operated within a large coordination dynamic implicating amygdala-dependent mechanisms that support the fear response and its related physiological and behavioral modifications. This is compatible with data showing that muscimol-induced inactivation of the dorsal hippocampus also results in a reduced rate of fear extinction (Corcoran et al., 2005), although in this case an auditory, not a contextual, conditioning was used.

3.3.2.3. Connections between Re nucleus and amygdala. Silva et al. (2021) focused on the connections of the Re nucleus with the basolateral amygdala and, using contextual fear conditioning, they examined their role in fear extinction. Both recent and remote fear could be extinguished by repeated non-shock exposure to the conditioned context. Specifically for extinction of remote fear, not for that of recent fear, Silva et al. (2021) found that Re neurons projecting to the basolateral amygdala were activated, as was also the case for neurons from the

infralimbic cortex projecting to the Re nucleus. Their next step consisted in inhibiting the Re nucleus during extinction (using a DREADD strategy based on expression of hM4Di in Re neurons, and CNO given systemically or infused into the amygdala). They found that under CNO influence, the freezing level remained higher than in the controls. Next, they expressed the hM3Di DREADD in excitatory Re neurons and tested extinction under CNO treatment. Extinction was faster. Using *in vivo* fiber photometry recordings, they could observe that during the extinction trials an activity increase in the Re was time-locked to behavior: it appeared upon freezing cessation. Finally, to demonstrate a causal relationship between extinction and this particular activation of Re neurons, Silva et al. (2021) used an optogenetic approach to investigate the effects of both gain and loss of function. When Re neurons were stimulated, freezing bouts were shorter and extinction was faster. Inversely, when inhibited, the freezing bouts were longer and freezing cessation was delayed. Additional experiments enabled to demonstrate a direct participation of the Re neurons that project to the basolateral amygdala in the extinction of remote fear. Here, it might be worth reminding a series of experiments by Kitamura et al. (2017). These authors also used contextual fear conditioning and followed the systemic consolidation of the memory. At a recent post-conditioning time point (2 days), they found that the re-exposure to the context activated a hippocampal engram which produced the fear response by triggering the emotional engram in the amygdala. At a remote time point (12 days post-training), however, the re-exposure to the context activated an engram that had ‘migrated’ to the PFC, from where the emotional engram in the amygdala was now triggered to produce fear. Although this possibility was not addressed by Kitamura et al. (2017), one cannot exclude that, as in the study by Silva et al. (2021), the PFC-induced activation of the engram in the amygdala was relayed in the Re nucleus in the study by Kitamura et al. (2017).

3.3.2.4. Conclusions about extinction of conditioned fear. If one considers all aforementioned data at a glance, it appears that the Re is likely at the core of a system encompassing the mPFC, the HIP, and the amygdala; the connectivity of the Re nucleus is largely compatible with this idea (Fig. 2). This system regulates fear responses that the animal expresses in reaction to environmental stimuli which it has previously learned to be afraid of, whether these stimuli are explicit (e.g., a tone) or not (e.g., a context). More generally, this system seems to adjust the expression of this emotion to the characteristics of the environment and to changes thereof. While it has been shown that the Re nucleus plays a role in

different phases of associative fear learning (i.e., consolidation, retrieval, reconsolidation, and perhaps even encoding; e.g., (Jhuang, Chang, 2023; Lin et al., 2020; Quet et al., 2020; Ramanathan et al., 2018b; Sierra et al., 2017; Troyner et al., 2018; Troyner, Bertoglio, 2021; Vasudevan et al., 2022; Wu and Chang, 2022)), the articles considered in this section clearly indicate that it also contributes to the extinction of a conditioned fear response. Indeed, consistent data (see Fig. 3 for an attempt at a summary transversal to the different studies mentioned above) show that inactivation of the mPFC or of its prelimbic and/or infralimbic components, of the HIP, or of the Re nucleus have a marked impact on fear extinction. Furthermore, projections from the mPFC to the Re nucleus, or terminations of these projections in the Re nucleus, or even projections from the Re nucleus to CA1, as well as projections from the Re nucleus to the amygdala, all have an impact on the extinction of conditioned fear, and thus behavioral flexibility. Altogether, these observations are highly coherent: the mPFC exercises top-down regulation over the retrieval of memory components associated with fear. Specifically, it influences the hippocampus (HIP) and basolateral amygdala (BLA), key brain regions involved in memory and fear processing, respectively. This regulatory mechanism involves the suppression of fear memory retrieval, with a notable contribution of the Re nucleus; see Plas et al. (2024) for details. It is even possible that elements upstream of this system could be involved, since the mPFC-to-Re pathway is involved in conveying information/details essential for understanding the relevance of sensory stimuli in associative learning contexts (e.g., Xu and Südhof, 2013; Yu et al., 2022).

3.3.3. Radial arm maze

Prasad et al. (2017) have used a particular protocol in a radial maze to evaluate spatial memory (among other functions) in rats subjected to fiber-sparing, NMDA-induced lesions of the Re nucleus. For each test trial, rats were given access to only 4 out of the 8 arms of the apparatus, and only when they had visited these 4 baited arms were they allowed to explore the four remaining ones, either without a delay, or after a 10 or 30 min interruption. For the 10- and 30-min delays, there was no difference between rats with lesions and their sham-operated counterparts. However, when there was no delay, rats with lesions committed more than twice as much perseverative errors (i.e., returns into the first four accessible arms that had been visited before the four last ones became accessible) as their sham-operated counterparts. While the task typically taxes spatial working memory, at least in the no delay condition, as mentioned by the authors, this difference cannot be easily explained by a

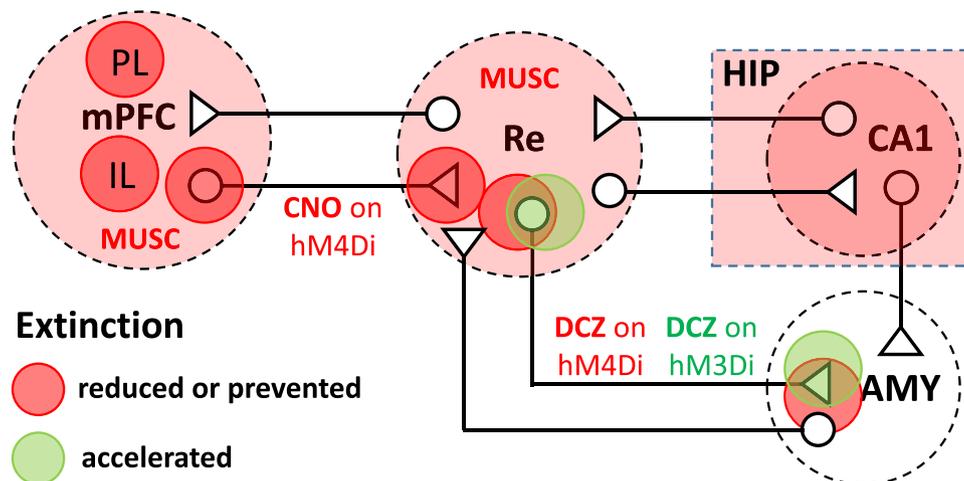


Fig. 3. Synthetic figure showing all manipulations that either reduced or prevented (in red) extinction, or accelerated it (in green). Abbreviations: AMY for amygdala; CNO for Clozapine N-oxide; DCZ for Deschloroclozapine; MUSC for muscimol, HIP for hippocampus; IL for infralimbic cortex; mPFC for medial prefrontal cortex; PL for prelimbic cortex; Re for reuniens nucleus. hM4Di is an inhibitory DREADD and hM3Di an excitatory one. DREADD means Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs. The results considered, which appear highly coherent across articles, are from the following papers: Ratigan et al. (2023), Ramanathan et al. (2018), Ramanathan and Maren (2019), Silva et al. (2021), Totty et al. (2023).

working memory failure, which would suppose that more errors be committed also in the 4 lastly accessible arms. Furthermore, it cannot be due to an alteration of spatial computation capabilities as the same rats performed like controls under the 10- and 30-min delay conditions. Hence, for the authors, this difference is attributable to perseverative behavior, as it resembled consequences on working memory of prefrontal lesions. Because the increasing delays were introduced sequentially (0 s, then 10 min, then 30 min), however, one cannot exclude the possibility that, at the start of the test, the rats were disturbed by the opening of the doors leading to the remaining four baited arms, a potential distractor, and that they then gradually became accustomed to this manipulation. If so, the Re nucleus could be involved in controlling interference phenomena, a hypothesis consistent with studies reporting alterations of working memory in situations with high proactive interference potential (e.g., Layfield et al., 2015; Hallock et al., 2016; Viena et al., 2018) vs. a situation in which such interference is lower (Boch et al., 2022). The perseveration in the radial maze, however, did not reflect a generalized lack of flexibility as the rats performed like controls in the first reversal of a visual discrimination in a touch screen task, and even better than controls on the second reversal.

3.4. The Re nucleus and reversal learning

Reversal learning refers to a situation in which subjects have to learn a new rule following the learning of a previous one that, following modification of contingencies, is no longer efficient (in getting a reward) and must therefore be 'unlearned'. For instance, they first learn to establish a link between a particular stimulus and a particular outcome (e.g., get a reward) vs. another stimulus and an opposite outcome (e.g., no reward or a punishment). Once training has become efficient, the previously rewarded stimulus is associated with the opposite outcome and the previously non-rewarded stimulus now becomes rewarded. Lack of flexibility is reflected in delayed acquisition of the reversal, which, from another perspective, can also be regarded as perseveration.

Linley et al. (2016) used an attentional set-shifting/reversal task previously used by the Brown group (e.g., Birrell and Brown, 2000) to assess the effects of electrolytic lesions of the Re nucleus. The lesions also encroached onto the Rh nucleus. The task was in a rectangular enclosure divided across the entire width of one end in two compartments of equal surface. Each compartment was equipped with a ramekin (i.e., a small circular dish). The ramekins contained discriminative odors (used as olfactory cues) and discriminative digging mediums (used as tactile cues), and the food reward (fruit loops) was buried in the bottom of each ramekin. Rats were trained to associate cues with the location of the hidden food reward. In a first simple discrimination task design, they had to locate the food by discriminating two odors (O1, O2) using the same digging medium in both places. In a compound version of the task, they had to locate the food based on the same odor as before (O1) regardless of the digging medium in which the reward was buried (two medium were used, allowing to define four possible odor-medium pairs: O1-M1, O2-M1, O1-M2, O2-M2). Then intradimensional shift was tested by introducing four novel odor-medium pairs (O3-M3, O4-M3, O3-M4, O4-M4), rats having to choose the odor (O3) regardless of the medium. Finally, extradimensional shift was tested by introducing four unknown odor-medium pairs (O5-M5, O6-M5, O5-M6, O6-M6). For each of these conditions (compound, intradimensional shift and extradimensional shift), a test of reversal was made in order to evaluate perseveration. In the simple discrimination task, be it olfactory or tactile, rats with the lesion showed no deficit. In the reversal version of the compound task, however, rats with the lesion required more trials to complete the task (the results of intra- and extradimensional shifting are reported below, in section 2.4).

Klintsova and her group have developed a model of postnatal alcohol intoxication in rats, which results in the destruction of neurons in the Re nucleus – in a sufficient number to reduce the volume of this structure – without affecting those of the Rh nucleus (Gursky et al., 2019; Gursky

and Klintsova, 2022). Other structures like the HIP and the PFC may also have been affected by early postnatal exposure to ethanol (Miki et al., 2000, 2003; Skorput et al., 2015). Using this postnatal intoxication protocol, Gursky et al. (2021) examined, in adulthood, some cognitive abilities, including executive functions such as working memory, reversal learning, and set-shifting (Gursky et al., 2021). In a plus-maze, the authors trained rats to retrieve a food reward based on either a response strategy (always making the same turn when leaving the starting arm) or a place strategy (always going to the same target arm regardless of which starting arm was used). Once the trained strategy was well integrated (for instance a response strategy), the instruction was modified in two possible ways. Either the opposite arm was now baited (allowing for measurement of reversal), or the alternative strategy had to be engaged (what corresponds to a rule shift: use 'place' instead of 'response') because this strategy now led to a 100 % rewarding rate (allowing for evaluation of set-shifting; see below). In the reversal tasks (reversal was tested thrice), rats exposed to ethanol required more trials to reach criterion, but the difference to their controls was not significant, suggesting weak alteration of reversal. However, this could be the consequence of damage too weak to affect Re nucleus-determined functions significantly. Furthermore, ethanol-induced damage was most probably not restricted to the sole Re nucleus neurons.

3.5. The Re nucleus and set-shifting

Typically, set-shifting refers to the ability to shift attention in order to respond to a modification of environmental circumstances by adopting a new strategy, either *ex nihilo*, or previously learned but not efficient/useful so far.

In the aforementioned task (see above, section 2.3) based on discriminations of olfactory and tactile cues in combination, Linley et al. (2016) also assessed intradimensional (change in one dimension of the task not the other to which attention could be conserved; e.g. the same odor in a novel yet unknown medium) and extradimensional set-shifting (shifting to new dimensions of the task, i.e., a new set of odors and a new set of mediums). In the intradimensional set-shifting task, rats with the Re nucleus lesion required more trials than their controls, but were not impaired in the extradimensional shift task, although the mean number of trials required was also higher, but not significantly.

In the aforementioned study by Gursky et al. (2021), rats trained in a simple navigation task (see above, section 2.3 for detail) had to shift from a response strategy to a place strategy in a plus maze to get a food reward. Rats subjected to postnatal ethanol exposure, and thus showing damage to neurons of the Re nucleus, required more trials to become efficient after a rule shift in this navigation task, indicating a clear impairment in set-shifting.

Cholvin et al. (2013) have assessed set-shifting in the context of a water-escape, spatial navigation task (in the double-H maze) and, in parallel, specifically evaluated spatial memory performance (in a classical water maze) in rats that were subjected to reversible inactivation of the ReRh nuclei. Each rat performed both tasks in a sequential order (water maze test was given first). The effects of this inactivation were systematically compared to those of inactivation of either the mPFC or the dorsal HIP. In all experimental groups and whatever the maze, inactivation was performed with muscimol (two doses) half an hour before a probe trial was performed. Although beyond of the current review's topic, results in the water maze can be briefly reminded as they shed light on the interpretation of the data obtained in the set-shifting test. As expectable, dorsal HIP inactivation disrupted memory retrieval in the probe trial at the highest of both doses (i.e., 0.70 nmol/side). Neither dose affected retrieval when muscimol was infused into the mPFC. Interestingly, when infused into the ReRh nuclei, muscimol did not obliterate retrieval, but rats spent less time in the target quadrant than the controls, an observation reminiscent to a previous report by Dolleman-van der Weel et al. (2009) after Re nucleus lesions

(see Section 2.1).

In the other maze (i.e., the double-H maze), some remarks about the task may be necessary before discussing the results. [Cholvin et al. \(2013\)](#) used a training protocol that randomly alternated between two release points from which two swim paths, always identical for each release point when considered direct, allow the animal to escape from the water on a platform. In one case, the rat had to make two successive left turns (one at each choice point), while in the other, the rat had to make a right turn followed by a left turn (see [Fig. 4](#)). We know from previous studies that such a training protocol allows a rat to learn both routes while quickly constructing a cognitive map in parallel, which can be used would it become necessary and, of course, would the rat show behavioral flexibility ([Cassel et al., 2012](#)). For the probe trial, we removed the platform and changed the release point so that the route consisting of two successive left turns could no longer be used from the start. The other route, however, which consisted in successive right and left turns, was still possible, but it now led to the wrong target arm (the N arm), what more than 80 % rats usually do in first instance ([Cholvin et al., 2013](#)). Rats were then allowed to correct their initial choice. If so, when flexible, what they usually do until the end of the probe trial is spending more time in the correct arm (where the platform was located during training) than in the others, and in any case above chance level. It can therefore be considered that they have shifted from an egocentric response strategy to an allocentric place strategy, what can be observed as evidence for set-shifting, and thus for behavioral flexibility ([Fig. 4](#)).

What we found in this task is that rats subjected to inactivation of the mPFC or the dorsal HIP failed to show the behavior accounting for efficient set-shifting between the two learned strategies. As the inactivation of the mPFC did not affect spatial recall performance in the water maze, the shifting deficit in the double-H maze cannot be explained by a spatial memory impairment. Since inactivation of the dorsal HIP altered recall performance in the water maze, the deficit observed in the set-shifting task could possibly be due to the rats' inability to engage their cognitive map. And what about the ReRh nuclei? At the high dose, inactivation of these nuclei produced the same effect as after mPFC (HIP) inactivation, most probably because the shift signal from the mPFC to the hippocampus could not be relayed in the ReRh nuclei, or because the ReRh nuclei could not activate the mPFC to trigger strategy shifting. This experiment clearly showed that in the absence of normally operating ReRh nuclei, set-shifting (in this case substituting a place strategy for a response one) does not seem possible in a spatial context.

Providing further support to our initial findings, a similar conclusion was made by [Quet et al. \(2020\)](#) following an experiment which used a protocol identical to the one used by [Cholvin et al. \(2013\)](#), although with a DREADD approach for the acute inactivation of ReRh nuclei neurons. Before the probe trial assessing set-shifting, the authors administered CNO (intraperitoneal) to trained rats of which the ReRh nuclei were infected with hM4Di-mCherry-bearing virus. The infection enabled to express the inhibitory DREADD in excitatory neurons of these thalamic nuclei. As was the case with muscimol in the [Cholvin et al. \(2013\)](#) study, CNO disrupted the possibility to shift from an egocentric to an allocentric approach of the task following a contingency modification. This observation, which was fully confirmed using the same DREADD in a more recent and independent experiment ([Boch et al., 2022](#)), also echoes a result obtained by [Gursky et al. \(2021\)](#) in a neonatal alcohol intoxication model based on less specific neuronal alterations of the Re nucleus and a different behavioral task (see above, section 2.3).

4. General conclusions

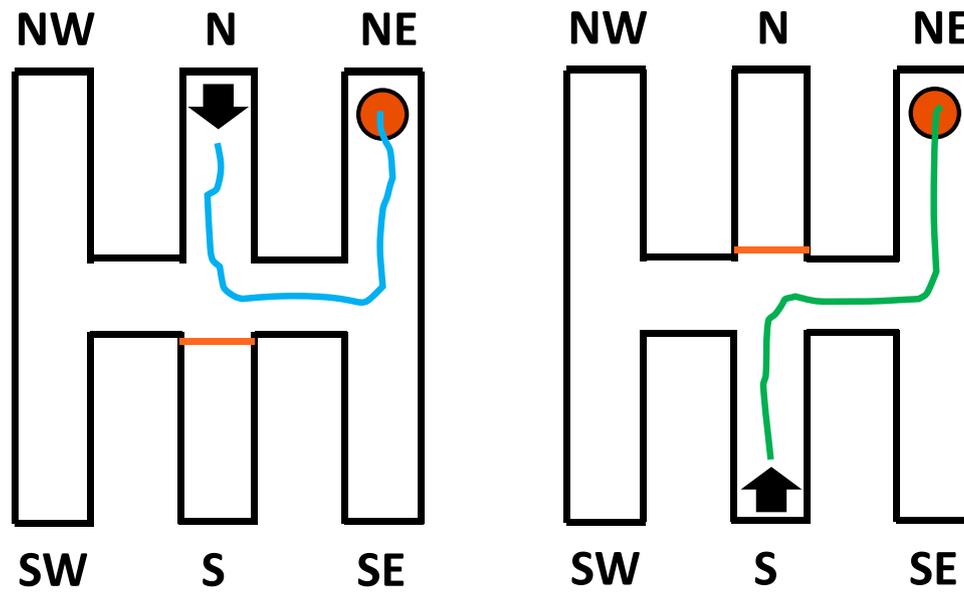
In this review, we have considered several tasks assessing behavioral flexibility in mice and rats. All of them were shown to be sensitive to manipulations of the ventral midline thalamus, and perhaps more particularly of the Re nucleus. Controlling or modulating behavioral flexibility, however, is not the sole contribution of the Re nucleus. Indeed, as documented in several recent and older review articles,

permanent damage to, or reversible inactivation of this thalamic region is known to affect many facets of cognition. These facets encompass spatial working memory, systems-level consolidation of spatial and contextual fear memory, reconsolidation of fear memory, inhibition of inherited defense reactions, memory for sequence of events, influence of internal states on behavioral responses to threats, and a couple of others (e.g., [Cassel et al., 2013; 2021](#); [Dolleman-van der Weel et al., 2019](#); [Ferraris et al., 2021](#); [Saalmann, 2014](#); [Vertes et al., 2022](#)). Moreover, the ventral midline thalamus is not the sole thalamic region to contribute to behavioral flexibility. Other nuclei of the thalamus, also connected with regions of the prefrontal cortex, have been implicated in this type of executive function. The mediodorsal thalamic nucleus is one of them, as largely documented in a recent review article by [Wolff and Halassa \(2024\)](#); see also [Hummos et al., \(2022\)](#). Furthermore, the intralaminar nuclei, which project to the mPFC but not to the HIP, have also a role in shifting behavior ([Brown et al., 2010](#); [Kato et al., 2018](#)), and the reticular thalamic nucleus was shown to contribute to fear extinction ([Lee et al., 2019](#)). These are just a few examples. Therefore, the Re nucleus, perhaps together with its neighbor the Rh nucleus, has not a unique cognitive implication, and clearly, it is not the only thalamic region involved in behavioral flexibility.

The Re and Rh nuclei are separate entities, as shown by their anatomical organization and respective connectivity pattern, although this connectivity is partly overlapping, at least in terms of efferent projections. However, in many studies, it is difficult if not impossible to have acted on one nucleus (e.g., the Re) without encroaching structurally or functionally onto the other, given their size and their proximity to each other. In the current article, we have considered studies having evaluated effects of ventral midline thalamus alterations on reversal, extinction, set-shifting and perseveration, and most of them have attributed the observed effects to manipulations of the Re nucleus, what is perhaps a bit reductionist in several of them. It is difficult a posteriori to discuss about which studies have or have not achieved a high degree of specificity in manipulating the Re nucleus with minimal or no effects on the Rh nucleus. For lesion studies, post-hoc verifications can be very precise and exclusions for lack of specificity easy to apply. For classical reversible inactivation studies (i.e., those using sodium channel blockers or a GABA receptor agonist), a high precision level is not only difficult to verify but also most probably impossible to achieve. Finally, regarding the approaches relying on the use of viral vectors to induce DREADD expression, the diffusion radius around the injection site will be the determinant factor: if too limited, the infection might be insufficient to produce effects; if too large, it will become unspecific. A way to circumvent this drawback would consist in combining an anterograde viral vector delivering a floxed gene (e.g., of a caspase or a DREADD) to neurons of a source region and a retrograde viral vector delivering a cre recombinase to axon terminals in a target region. By this way, only neurons interconnecting the source and target structures will be affected. However, this much more specific approach may have other drawbacks related to possible neurotoxicity of the cre recombinase-bearing construct (e.g., [Panzer et al., 2024](#)).

Moreover, there is nothing to assert that the alterations induced in the Re nucleus stemmed from the functional manipulation of the Re nucleus as a whole. Indeed, it may be that within the very midst of this nucleus, specific groups of neurons rather than the entire nucleus as a whole, were involved in only one of the deficits reported and not in the others. Indeed, within the Re nucleus, there could exist an organization corresponding to a functional topology in which a group of neurons that would be involved in reversal learning would not participate in set-shifting, and *vice versa*. Compatible with this view is the fact that the Re nucleus encompasses different subpopulations of neurons ([Vienna et al., 2021](#)) that are clustered in specific zones. This heterogeneity provides a challenge that future experimental approaches will have to face by aiming to elucidate as finely as possible how different parts of the 'Re->mPFC' system are working in relation with different facets of flexible behavior, and do so not just from the sole overall perspective of

Training



Probe trial

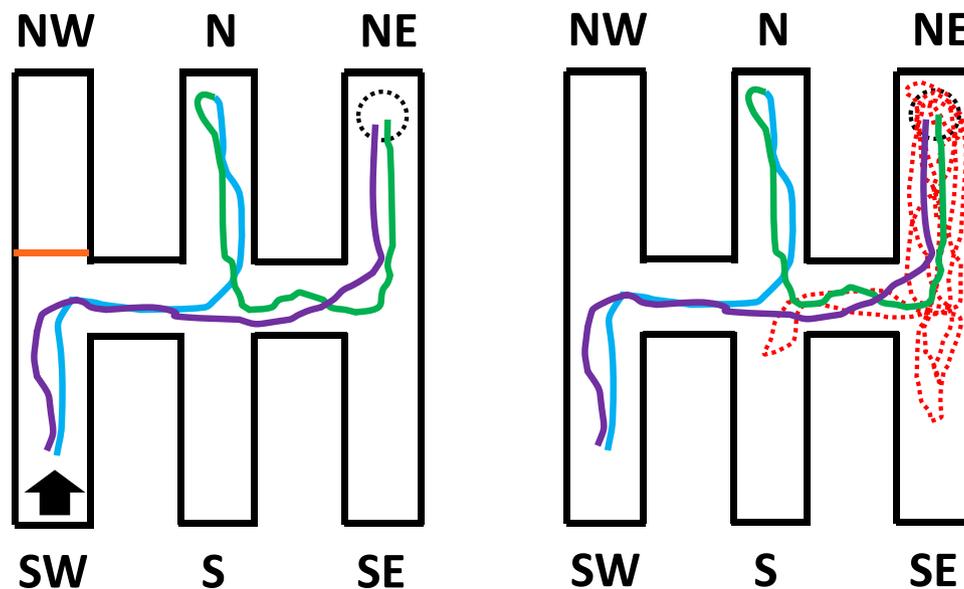


Fig. 4. Navigation task used to assess set-shifting following muscimol-induced inactivation of the ReRh nuclei (Cholvin et al., 2013) or their CNO-induced inactivation after infection of their excitatory neurons with an hM4Di-bearing viral vector (Quet et al., 2020; Boch et al., 2024). Top: two trajectories trained to reach the escape platform located in the NE arm, one consisting in two successive left turns (left panel), the other consisting in a right turn next followed by a left turn (right). When the rat was released from the S arm, the N arm was closed, and when it was released from the N arm, the S arm was closed. Rats were trained on a total of 16 trials (2 trials for each trajectory/day) and, after a delay of 24 hours from the last training trial, they were tested in a probe trial for which i) the escape platform was removed, and ii) the start was shifted to the SW arm (and the NW arm was closed). Only one of both trained trajectories can be repeated in this probe trial (i.e., turn right and then left, shown in blue in the bottom left panel), what usually >80 % of the rats do. This leads them to the N arm, from where they can repeat two left turns (in green) in order to reach the arm in which the platform was located during the training. As such a choice cannot be considered unquestionable evidence for a shift to an approach of the task based on a place memory, we leave the rats for a total of 60 s in the maze and measure the time which they spend swimming within the target arm (corresponding to the swim trajectory shown by the red stippled line). When the rats have shifted from a response memory-based to a place memory-based strategy, this time significantly exceeds chance (i.e., 8.2 s) and accounts for efficient set-shifting. Set-shifting can also occur immediately, rats swimming from the SW arm directly to the NE one (in violet), and then more insist searching for the platform in the latter. Otherwise, their swim pattern appears more random. In all three experiments mentioned, the inactivation of the ReRh nuclei disrupted performance accounting for efficient set-shifting.

executive functions.

From a phenomenological point of view, behavioral flexibility, although defining an adaptive capacity in response to changing circumstances in the environment, nonetheless remains a complex phenomenon, especially in terms of supporting processes. Indeed, this flexibility may be affected by alterations of functions such as planning, working memory, inhibition, and attention, as well as by learning and memory capacities, emotions and the ability to cope with stress (e.g., [Girotti et al., 2018](#)), each of them separately or even in combination. If it is not particularly difficult to phenomenologically objectivate a lack of flexibility in a variety of behavioral tasks, it is more challenging to attribute a possible deficiency to an alteration of one or more of the aforementioned functions. Indeed, the same phenomenological manifestations interpreted as behavioral inflexibility could just as easily be supported by an inability to overcome stress in a given situation or, for instance, by dysfunctions of working memory or an attention disorder. Thus, depending on the task, errors, repetitions, lack of shifting or delayed reversal may be interpreted as reflecting perseverative behavior when in fact corresponding to a genuine disruption of memory processes, and variables accounting for bonafide perseverative behavior may be interpreted as the consequence of memory dysfunctions when in fact perseveration has actually led to task errors. All these functions appear intermingled to some degree. Therefore, future research would probably need to integrate more targeted complementary approaches into studies investigating the involvement of the ventral midline thalamus in behavioral flexibility. As a matter of fact, these approaches might, in addition to more classical tasks taxing behavioral flexibility, also focus on attention, working memory, inhibition abilities, etc, the attempt being to understand more precisely the underlying factors of any potential deficit affecting what is usually attributed to a flexibility dysfunction. The interest of doing so is sketched in the article by [Cholvin et al. \(2013\)](#). These authors paralleled spatial navigation capacities in the water maze and set-shifting in the double-H maze, both tasks relying on comparable motivation leading to a water escape response. Whereas inactivation of the mPFC and the Re nuclei had little effect on spatial navigation performance in the probe trial, inactivation of the HIP unambiguously impaired it. In the set-shifting task, rats were impaired to comparable levels whatever the inactivated region. It could therefore be reasoned that the apparent set-shifting impairment reflected disruption of different processes depending on the region that had been inactivated. The proposal of the authors was that HIP inactivation disrupted spatial navigation, mPFC disruption altered set-shifting, and Re inactivation either hindered information exchange between mPFC and HIP that was crucial to efficient spatial navigation, or prevented an activation of the mPFC for efficient set-shifting. However, set-shifting may have been genuinely altered only after mPFC inactivation.

Finally, it is also possible that the Re nucleus is not necessarily implicated in behavioral flexibility underlying reversal responses, suspension of perseveration and set-shifting. In fact, it could be part of a more general adaptive function by which it would contribute to the integration of new environmental contingencies when a given behavior is going on and contingencies change. Indeed, the Re nucleus could be involved in a more general regulation that would be implemented whenever a behavior needs to integrate changes occurring in the environment, which the subject has to take into consideration in order to revise the behavioral pattern engaged, and adjust it as best as possible to these changes. Understanding the nature of these modifications with regard to the overall context might then involve a circuit encompassing the hippocampus, evaluating and assimilating the emotional dimensions thereof would require the amygdala, and perhaps more generally the limbic system, and making a decision about what needs to be modified in the ongoing behavior would engage decisional commands from the PFC. It is therefore difficult to conceive that an appropriate revision of such ongoing behavior according to new contingencies could take place without a fine functional coordination between these different structures, what could be ensured or actively participated in by the Re

nucleus, and certainly involve other thalamic nuclei. If so, the Re nucleus would appear as a crucial crossroad supporting the ability to cope with new, potentially unpredictable environmental contingencies. For sure, this does not make the Re nucleus the conducting entity of behavioral adaption, but it is difficult to see it any other way than a significant node in it. As such, this thalamic region could become an important point of interest in future studies aiming to explore a potential role for the Re nucleus, maybe also for the Rh one, in animal models of autism spectrum, attention-deficit/hyperactivity, obsessive-compulsive disorders, as well as schizophrenia, for which some literature is already available (e.g., [Dolleman-van der Weel et al., 2019](#); [Dolleman-van der Weel and Witter, 2020](#); [Lisman et al., 2010](#)). Indeed, all these disorders encompass aspects of behavioral inflexibility. To some respect, models of post-traumatic stress disorder, Alzheimer's and Parkinson's disease, and perhaps major depression might also be worth a look to the Re nucleus.

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

The authors declare that no artificial intelligence (AI) or AI-assisted technologies has been used for the preparation of this manuscript, except for the translation of a few expressions (French to English).

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflict of interest to declare

Acknowledgments

The authors are grateful to the PhD and Master students who contributed to their herein-cited experiments carried out between 2013 and 2024 at LNCA, UMR 7364 Unistra-CNRS. They also thank the University of Strasbourg and the CNRS for their support. They finally acknowledge the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) for funds dedicated to their currently running project 'CHARM' (ANR-23-CE37-0012-02) on cognitive functions of the ventral midline thalamus (coord. P. Quilichini).

References

- Alcaraz, F., Marchand, A.R., Courtand, G., Coutureau, E., Wolff, M., 2016. Parallel inputs from the mediadorsal thalamus to the prefrontal cortex in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 44 (3), 1972–1986. <https://doi.org/10.1111/ejn.13316>.
- Avigan, P.D., Cammack, K., Shapiro, M.L., 2020. Flexible spatial learning requires both the dorsal and ventral hippocampus and their functional interactions with the prefrontal cortex. *Hippocampus* 30 (7), 733–744. <https://doi.org/10.1002/hipo.23198>.
- Barker, J.M., Taylor, J.R., Chandler, L.J., 2014. A unifying model of the role of the infralimbic cortex in extinction and habits. *Learn. Mem.* 21 (9), 441–448. <https://doi.org/10.1101/lm.035501.114>.
- Birrell, J.M., Brown, V.J., 2000. Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J. Neurosci.* 20 (11), 4320–4324. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04320.2000>.
- Bissonette, G.B., Powell, E.M., 2012. Reversal learning and attentional set-shifting in mice. *Neuropharmacol* 62 (3), 1168–1174. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.03.011>.
- Block, A.E., Dhanji, H., Thompson-Tardif, S.F., Floresco, S.B., 2007. Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting. *Cereb. Cortex* 17 (7), 1625–1636. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhl073>.
- Boch, L., Morvan, T., Neige, T., Kobakhidze, N., Panzer, E., Cosquer, B., Pereira de Vasconcelos, A., Stephan, A., Cassel, J.-C., 2022. Inhibition of the ventral midline thalamus does not alter encoding, short-term holding or retrieval of spatial information in rats performing a water-escape working memory task. *Behav. Brain Res* 432, 113979. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113979>.
- Boorman, E.D., Witkowski, P.P., Zhang, Y., Park, S.A., 2021. The orbital frontal cortex, task structure, and inference. *Behav. Neurosci.* 135 (2), 291–300. <https://doi.org/10.1037/bne0000465>.
- Bradfield, L.A., Balleine, B.W., 2017. Thalamic control of dorsomedial striatum regulates internal state to guide goal-directed action selection. *J. Neurosci.* 37 (13), 3721–3733. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3860-16.2017>.
- Brown, H.D., Baker, P.M., Ragozzino, M.E., 2010. The parafascicular thalamic nucleus concomitantly influences behavioral flexibility and dorsomedial striatal

- acetylcholine output in rats. *J. Neurosci.* 30 (43), 14390–14398. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2167-10.2010>.
- de Bruin, J.P., Sánchez-Santed, F., Heinsbroek, R.P., Donker, A., Postmes, P., 1994. A behavioral analysis of rats with damage to the medial prefrontal cortex using the Morris water maze: evidence for behavioral flexibility, but not for impaired spatial navigation. *Brain Res* 652 (2), 323–333. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90243-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90243-7).
- Carlén, M., 2017. What constitutes the prefrontal cortex? *Science* 358 (6362), 478–482. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>.
- Cassel, J.-C., Ferraris, M., Quilichini, P., Cholvin, T., Boch, L., Stephan, A., Pereira de Vasconcelos, A., 2021. The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: a crossroads for cognition-relevant information processing? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 126, 338–360. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.023>.
- Cassel, R., Kelche, C., Lecourtier, L., 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. *Behav. Brain Res.* 230 (2), 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.021>.
- Cassel, J.-C., Pereira de Vasconcelos, A., Loureiro, M., Cholvin, T., Dalrymple-Alford, J. C., Vertes, R.P., 2013. The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog. Neurobiol.* 111, 34–52. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.08.006>.
- Cernotova, D., Stuchlik, A., Svoboda, J., 2021. Roles of the ventral hippocampus and medial prefrontal cortex in spatial reversal learning and attentional set-shifting. *Neurobiol. Learn. Mem.* 183, 107477 <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107477>.
- Chen, C., Mitchell, A.S. 2018. The connections of the prefrontal cortex and thalamus and plasticity within this circuitry. In *WM Usrey and SM Sherman (eds), The Cerebral Cortex and Thalamus* (New York, online edn, Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/med/9780197676158.003.0054>.
- Cholvin, T., Loureiro, M., Cassel, R., Cosquer, B., Geiger, K., De Sa Nogueira, D., Raingard, H., Robelin, L., Kelche, C., Pereira de Vasconcelos, A., Cassel, J.-C., 2013. The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. *J. Neurosci.* 33 (20), 8772–8783. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013>.
- Corcoran, K.A., Desmond, T.J., Frey, K.A., Maren, S., 2005. Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J. Neurosci.* 25 (39), 8978–8987. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2246-05.2005>.
- Dalley, J.W., Cardinal, R.N., Robbins, T.W., 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28 (7), 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>.
- Dalton, G.L., Phillips, A.G., Floresco, S.B., 2014. Prefrontal involvement by nucleus accumbens shell in mediating probabilistic learning and reversal shifts. *J. Neurosci.* 34 (13), 4618–4626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5058-13.2014>.
- Demakis, G.J., 2003. A meta-analytic review of the sensitivity of the Wisconsin Card Sorting Test to frontal and lateralized frontal brain damage. *Neuropsychology* 17 (2), 255–264. <https://doi.org/10.1037/0894-4105.17.2.255>.
- Dollemann-van der Weel, M.J., Griffin, A.L., Ito, H.T., Shapiro, M.L., Witter, M.P., Vertes, R.P., Allen, T.A., 2019. The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex enabling memory and behavior. *Learn. Mem.* 26 (7), 191–205. <https://doi.org/10.1101/lm.048389.118>.
- Dollemann-van der Weel, M.J., Morris, R.G., 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 (3), 329–342. <https://doi.org/10.1007/s00429-008-0200-6>.
- Dollemann-van der Weel, M.J., Witter, M.P., 2020. The thalamic midline nucleus reuniens: potential relevance for schizophrenia and epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 119, 422–439. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.033>.
- Ferraris, M., Cassel, J.-C., Pereira de Vasconcelos, A., Stephan, A., Quilichini, P.P., 2021. The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 125, 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.02.025>.
- Floresco, S.B., Block, A.E., Tse, M.T., 2008. Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behav. Brain Res.* 190 (1), 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.008>.
- Floresco, S.B., Zhang, Y., Enomoto, T., 2009. Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 204 (2), 396–409. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.001>.
- Friedman, N.P., Robbins, T.W., 2022. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacol.* 47 (1), 72–89. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01132-0>.
- Giroiti, M., Adler, S.M., Bulin, S.E., Fucich, E.A., Paredes, D., Morilak, D.A., 2018. Prefrontal cortex executive processes affected by stress in health and disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 85, 161–179. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.004>.
- Giustino, T.F., Maren, S., 2015. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 298. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298>.
- Gmaz, J.M., van der Meer, M.A.A., 2022. Context coding in the mouse nucleus accumbens modulates motivationally relevant information. *PLoS Biol.* 20 (4), e3001338 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001338>.
- Grant, D.A., Berg, E., 1948. A behavioral analysis of degree of reinforcement and ease of shifting to new responses in Weigl-type card-sorting problem. *J. Exp. Psychol.* 38, 404–411. <https://doi.org/10.1037/h0059831>.
- Groenewegen, H.J. 1988. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience*. 24(2):379–431. doi: 10.1016/0306-4522(88)90339-9.
- Gursky, Z.H., Klintsova, A.Y., 2022. Rat model of late gestational alcohol exposure produces similar life-long changes in thalamic nucleus reuniens following moderate-versus high-dose insult. *Alcohol Alcohol* 57 (4), 413–420. <https://doi.org/10.1093/alc/alcabgac008>.
- Gursky, Z.H., Savage, L.M., Klintsova, A.Y., 2019. Nucleus reuniens of the midline thalamus of a rat is specifically damaged after early postnatal alcohol exposure. *Neuroreport* 30 (10), 748–752. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001270>.
- Gursky, Z.H., Savage, L.M., Klintsova, A.Y., 2021. Executive functioning-specific behavioral impairments in a rat model of human third trimester binge drinking implicate prefrontal-thalamo-hippocampal circuitry in Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Behav. Brain Res.* 405, 113208 <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113208>.
- Hallock, H.L., Wang, A., Griffin, A.L., 2016. Ventral Midline Thalamus Is Critical for Hippocampal-Prefrontal Synchrony and Spatial Working Memory. *J. Neurosci.* 36 (32), 8372–8389. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0991-16.2016>.
- Hanganu-Opatz, I.L., Klausberger, T., Sigurdsson, T., Nieder, A., Jacob, S.N., Bartos, M., Sauer, J.F., Durstewitz, D., Leibold, C., Diester, I., 2023. Resolving the prefrontal mechanisms of adaptive cognitive behaviors: a cross-species perspective. *Neuron* 111 (7), 1020–1036. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.03.017>.
- van Heukelum, S., Mars, R.B., Guthrie, M., Buitelaar, J.K., Beckmann, C.F., Tiesinga, P.H. E., Vogt, B.A., Glennon, J.C., Havenith, M.N., 2020. Where is Cingulate Cortex? A Cross-Species View. *Trends Neurosci.* 43 (5), 285–299. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.03.007>.
- Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212 (2), 149–179. <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>.
- Howland, J.G., Ito, R., Lapish, C.C., Villaruel, F.R., 2022. The rodent medial prefrontal cortex and associated circuits in orchestrating adaptive behavior under variable demands. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 135, 104569 <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104569>.
- Hummos, A., Wang, B.A., Drammis, S., Halassa, M.M., Pleger, B., 2022. Thalamic regulation of frontal interactions in human cognitive flexibility. *PLoS Comput. Biol.* 18 (9), e1010500 <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010500>.
- Jhuang, Y.C., Chang, C.H., 2023. Differential roles of nucleus reuniens and perirhinal cortex in Pavlovian trace fear conditioning in rats. *Cereb. Cortex* 33 (7), 3498–3510. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhac287>.
- Kato, S., Fukabori, R., Nishizawa, K., Okada, K., Yoshioka, N., Sugawara, M., Maejima, Y., Shimomura, K., Okamoto, M., Eifuku, S., Kobayashi, K., 2018. Action selection and flexible switching controlled by the intralaminar thalamic neurons. *Cell Rep.* 22 (9), 2370–2382. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.016>.
- Kinnavane, L., Amin, E., Aggleton, J.P., Nelson, A.J.D., 2019. Do the rat anterior thalamic nuclei contribute to behavioural flexibility? *Behav. Brain Res.* 359, 536–549. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.012>.
- Kitamura, T., Ogawa, S.K., Roy, D.S., Okuyama, T., Morrissey, M.D., Smith, L.M., Redondo, R.L., Tonegawa, S., 2017. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science* 356 (6333), 73–78. <https://doi.org/10.1126/science.aam6808>.
- Klein-Flügge, M.C., Bongioanni, A., Rushworth, M.F.S., 2022. Medial and orbital frontal cortex in decision-making and flexible behavior. *Neuron* 110 (17), 2743–2770. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.05.022>.
- Klüne, C.B., Jin, B., DeNardo, L.A., 2021. Linking mPFC circuit maturation to the developmental regulation of emotional memory and cognitive flexibility. *Elife* 10, e64567. <https://doi.org/10.7554/eLife.64567>.
- Lakshminarasimhan, K.J., Xie, M., Cohen, J.D., Sauerbrei, B.A., Hantman, A.W., Litwin-Kumar, A., Escola, S., 2024. Specific connectivity optimizes learning in thalamocortical loops. *Cell Rep.* 43 (4), 114059 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114059>.
- Laubach, M., Amarante, L.M., Swanson, K., White, S.R., 2018. What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *ENEURO*.0315-18.2018 *eNeuro* 2018 5 (5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0315-18.2018>.
- Layfield, D.M., Patel, M., Hallock, H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.09.007>.
- Lee, J.H., Latchoumane, C.V., Park, J., Kim, J., Jeong, J., Lee, K.H., Shin, H.S., 2019. The rostroventral part of the thalamic reticular nucleus modulates fear extinction. *Nat. Commun.* 10 (1), 4637. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12496-9>.
- Lehr, A.B., Hitti, F.L., Deibel, S.H., Stöber, T.M., 2023. Silencing hippocampal CA2 reduces behavioral flexibility in spatial learning. *Hippocampus* 33 (6), 759–768. <https://doi.org/10.1002/hipo.23521>.
- Li, H., Tamura, R., Hayashi, D., Asai, H., Koga, J., Ando, S., Yokota, S., Kaneko, J., Sakurai, K., Sumiyoshi, A., Yamamoto, T., Hikishima, K., Tanaka, K.Z., McHugh, T. J., Hisatsune, T., 2024. Silencing dentate newborn neurons alters excitatory/inhibitory balance and impairs behavioral inhibition and flexibility. *Sci. Adv.* 10 (2), eadk4741 <https://doi.org/10.1126/sciadv.adk4741>.
- Lin, Y.J., Chiou, R.J., Chang, C.H., 2020. The reuniens and rhomboid nuclei are required for acquisition of pavlovian trace fear conditioning in rats. *ENEURO*.0106-20.2020 *eNeuro* 7 (3). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0106-20.2020>.
- Linley, S.B., Gallo, M.M., Vertes, R.P., 2016. Lesions of the ventral midline thalamus produce deficits in reversal learning and attention on an odor texture set-shifting task. *Brain Res* 1649 (Pt A), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.022>.
- Lisman, J.E., Pi, H.J., Zhang, Y., Otmakhova, N.A., 2010. A thalamo-hippocampal-ventral tegmental area loop may produce the positive feedback that underlies the psychotic break in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 68 (1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.04.007>.

- Liu, J., Shelkar, G.P., Gandhi, P.J., Gawande, D.Y., Hoover, A., Villalba, R.M., Pavuluri, R., Smith, Y., Dravid, S.M., 2020. Striatal glutamate delta-1 receptor regulates behavioral flexibility and thalamostriatal connectivity. *Neurobiol. Dis.* 137, 104746 <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104746>.
- Malá, H., Andersen, L.G., Christensen, R.F., Felbinger, A., Hagstrøm, J., Meder, D., Pearce, H., Mogensen, J., 2015. Prefrontal cortex and hippocampus in behavioral flexibility and posttraumatic functional recovery: reversal learning and set-shifting in rats. *Brain Res Bull.* 116, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.05.006>.
- Marton, T.F., Seifkar, H., Luongo, F.J., Lee, A.T., Sohal, V.S., 2018. Roles of prefrontal cortex and mediodorsal thalamus in task engagement and behavioral flexibility. *J. Neurosci.* 38 (10), 2569–2578. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1728-17.2018>.
- McAlonan, K., Brown, V.J., 2003. Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. *Behav. Brain Res.* 146 (1–2), 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.019>.
- McKenna, J.T., Vertes, R.P., 2004. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 480 (2), 115–142. <https://doi.org/10.1002/cne.20342>.
- Mengxing, L., Lerma-Usabiaga, G., Clascá, F., Paz-Alonso, P.M., 2023. High-resolution tractography protocol to investigate the pathways between human mediodorsal thalamic nucleus and prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 43 (46), 7780–7798. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0721-23.2023>.
- Miki, T., Harris, S.J., Wilce, P., Takeuchi, Y., Bedi, K.S., 2000. Neurons in the hilus region of the rat hippocampus are depleted in number by exposure to alcohol during early postnatal life. *Hippocampus* 10 (3), 284–295. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:3<284::AID-HIPO9>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:3<284::AID-HIPO9>3.0.CO;2-K).
- Miki, T., Harris, S.J., Wilce, P., Takeuchi, Y., Bedi, K.S., 2003. Effects of alcohol exposure during early life on neuron numbers in the rat hippocampus. I. Hilus neurons and granule cells. *Hippocampus* 13 (3), 388–398. <https://doi.org/10.1002/hipo.10072>.
- Moore, T.L., Schettler, S.P., Killiany, R.J., Rosene, D.L., Moss, M.B., 2009. Effects on executive function following damage to the prefrontal cortex in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Behav. Neurosci.* 123 (2), 231–241. <https://doi.org/10.1037/a0014723>.
- Nakayama, H., Ibañez-Tallon, I., Heintz, N., 2018. Cell-type-specific contributions of medial prefrontal neurons to flexible behaviors. *J. Neurosci.* 38 (19), 4490–4504. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3537-17.2018>.
- Nett, K.E., LaLumiere, R.T., 2021. Infralimbic cortex functioning across motivated behaviors: Can the differences be reconciled? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 131, 704–721. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.10.002>.
- Ogundele, O.M., Lee, C.C., Francis, J., 2017. Thalamic dopaminergic neurons projects to the paraventricular nucleus-rostral ventrolateral medulla/C1 neural circuit. *Anat. Rec. (Hoboken)* 300 (7), 1307–1314. <https://doi.org/10.1002/ar.a.23528>.
- Ouhaz, Z., Perry, B.A.L., Nakamura, K., Mitchell, A.S., 2022. Mediodorsal thalamus is critical for updating during extradimensional shifts but not reversals in the attentional set-shifting task. *ENEURO*.0162-21.2022 *eNeuro* 9 (2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0162-21.2022>.
- Oyama, K., Hori, Y., Mimura, K., Nagai, Y., Eldridge, M.A.G., Saunders, R.C., Miyakawa, N., Hirabayashi, T., Hori, Y., Inoue, K.I., Suhara, T., Takada, M., Higuchi, M., Richmond, B.J., Minamimoto, T., 2022. Chemogenetic disconnection between the orbitofrontal cortex and the rostromedial caudate nucleus disrupts motivational control of goal-directed action. *J. Neurosci.* 42 (32), 6267–6275. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0229-22.2022>.
- Panzer, E., Boch, L., Cosquer, B., Grgurina, I., Boutillier, A.L., Pereira de Vasconcelos, A., Stephan, A., Cassel, J.-C., 2024. Disconnecting prefrontal cortical neurons from the ventral midline thalamus: Loss of specificity due to progressive neural toxicity of an AAV-Cre in the rat thalamus. *J. Neurosci. Methods* 405, 110080. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2024.110080>.
- Park, J., Moghaddam, B., 2017. Impact of anxiety on prefrontal cortex encoding of cognitive flexibility. *Neuroscience* 345, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.013>.
- Parnaudeau, S., Bolkan, S.S., Kellendonk, C., 2018. The Mediodorsal Thalamus: an essential partner of the prefrontal cortex for cognition. *Biol. Psychiatry* 83 (8), 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.008>.
- Parnaudeau, S., Taylor, K., Bolkan, S.S., Ward, R.D., Balsam, P.D., Kellendonk, C., 2015. Mediodorsal thalamus hypofunction impairs flexible goal-directed behavior. *Biol. Psychiatry* 77 (5), 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.020>.
- Pereira de Vasconcelos, A., Cassel, J.-C., 2015. The nonspecific thalamus: a place in a wedding bed for making memories last? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54, 175–196. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.021>.
- Phillips, J.M., Kambi, N.A., Redinbaugh, M.J., Mohanta, S., Saalman, Y.B., 2021. Disentangling the influences of multiple thalamic nuclei on prefrontal cortex and cognitive control. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 128, 487–510. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.042>.
- Plas, S.L., Tuna, T., Bayer, H., Juliano, V.A.L., Sweck, S.O., Arellano Perez, A.D., Hassell, J.E., Maren, S., 2024. Neural circuits for the adaptive regulation of fear and extinction memory. *Front Behav. Neurosci.* 18, 1352797. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2024.1352797>.
- Prasad, J.A., Abela, A.R., Chudasama, Y., 2017. Midline thalamic reuniens lesions improve executive behaviors. *Neuroscience* 345, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.071>.
- Quet, E., Majchrzak, M., Cosquer, B., Morvan, T., Wolff, M., Cassel, J.-C., Pereira de Vasconcelos, A., Stéphan, A., 2020. The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats. *Brain Struct. Funct.* 225 (3), 955–968. <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02048-z>.
- Ramanathan, K.R., Jin, J., Giustino, T.F., Payne, M.R., Maren, S., 2018a. Prefrontal projections to the thalamic nucleus reuniens mediate fear extinction. *Nat. Commun.* 9 (1), 4527. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06970-z>.
- Ramanathan, K.R., Maren, S., 2019. Nucleus reuniens mediates the extinction of contextual fear conditioning. *Behav. Brain Res.* 374, 112114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112114>.
- Ramanathan, K.R., Ressler, R.L., Jin, J., Maren, S., 2018b. Nucleus reuniens is required for encoding and retrieving precise, hippocampal-dependent contextual fear memories in rats. *J. Neurosci.* 38 (46), 9925–9933. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1429-18.2018>.
- Ratigan, H.C., Krishnan, S., Smith, S., Sheffield, M.E.J., 2023. A thalamic-hippocampal CA1 signal for contextual fear memory suppression, extinction, and discrimination. *Nat. Commun.* 14 (1), 6758. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42429-6>.
- Ray, J.P., Price, J.L., 1993. The organization of projections from the mediodorsal nucleus of the thalamus to orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J. Comp. Neurol.* 337 (1), 1–31. <https://doi.org/10.1002/cne.903370102>.
- Reeders, P.C., Rivera Núñez, M.V., Vertes, R.P., Mattfeld, A.T., Allen, T.A., 2023. Identifying the midline thalamus in humans in vivo. *Brain Struct. Funct.* 228 (8), 1835–1847. <https://doi.org/10.1007/s00429-022-02607-6>.
- Rich, E.L., Stoll, F.M., Rudebeck, P.H., 2018. Linking dynamic patterns of neural activity in orbitofrontal cortex with decision making. *Curr. Opin. Neurobiol.* 49, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.11.002>.
- Rikhayev, R.V., Gilra, A., Halassa, M.M., 2018. Thalamic regulation of switching between cortical representations enables cognitive flexibility. *Nat. Neurosci.* 21 (12), 1753–1763. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0269-z>.
- Rose, J.E., Woolsey, C.N., 1948. The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 27 (1 vol.), 210–232. PMID: 18106857.
- Saalman, Y.B., 2014. Intralaminar and medial thalamic influence on cortical synchrony, information transmission and cognition. *Front. Syst. Neurosci.* 8, 83. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00083>.
- Scheel, N., Wulff, P., de Mooij-van Malsen, J.G., 2020. Afferent connections of the thalamic nucleus reuniens in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 528 (7), 1189–1202. <https://doi.org/10.1002/cne.24811>.
- Seamans, J.K., Laphin, C.C., Durstewitz, D., 2008. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotox. Res.* 14 (2–3), 249–262. <https://doi.org/10.1007/BF03033814>.
- Sierra, R.O., Pedraza, L.K., Zanona, Q.K., Saltana, F., Boos, F.Z., Crestani, A.P., Haubrich, J., de Oliveira Alvares, L., Calcagnotto, M.E., Quilfeldt, 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 (5), 596–607. <https://doi.org/10.1002/hipo.22715>.
- Silva, B.A., Astori, S., Burns, A.M., Heiser, H., van den Heuvel, L., Santoni, G., Martinez-Reza, M.F., Sandi, C., Gräff, J., 2021. A thalamo-amygdalar circuit underlying the extinction of remote fear memories. *Nat. Neurosci.* 24 (7), 964–974. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00856-y>.
- Skorput, A.G., Gupta, V.P., Yeh, P.W., Yeh, H.H., 2015. Persistent Interneuronopathy in the Prefrontal Cortex of Young Adult Offspring Exposed to Ethanol In Utero. *J. Neurosci.* 35 (31), 10977–10988. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1462-15.2015>.
- Spellman, T., Svei, M., Kaminsky, J., Manzano-Nieves, G., Liston, C., 2021. Prefrontal deep projection neurons enable cognitive flexibility via persistent feedback monitoring. *Cell* 184 (10), 2750–2766.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.047>.
- Stout, J.J., Hallock, H.L., George, A.E., Adiraju, S.S., Griffin, A.L., 2022. The ventral midline thalamus coordinates prefrontal-hippocampal neural synchrony during vicarious trial and error. *Sci. Rep.* 12 (1), 10940 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14707-8>.
- Totty, M.S., Tuna, T., Ramanathan, K.R., Jin, J., Peters, S.E., Maren, S., 2023. Thalamic nucleus reuniens coordinates prefrontal-hippocampal synchrony to suppress extinguished fear. *Nat. Commun.* 14 (1), 6565. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42315-1>.
- Troyner, F., Bertoglio, L.J., 2021. Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory reconsolidation. *Learn. Mem.* 177, 107343 <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107343>.
- Troyner, F., Bicca, M.A., Bertoglio, L.J., 2018. Nucleus reuniens of the thalamus controls fear memory intensity, specificity and long-term maintenance during consolidation. *Hippocampus* 28 (8), 602–616. <https://doi.org/10.1002/hipo.22964>.
- Uddin, L.Q., 2021. Cognitive and behavioural flexibility: neural mechanisms and clinical considerations. *Nat. Rev. Neurosci.* 22 (3), 167–179. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00428-w>.
- Vasudevan, K., Ramanathan, K.R., Vierkant, V., Maren, S., 2022. Nucleus reuniens inactivation does not impair consolidation or reconsolidation of fear extinction. *Learn. Mem.* 29 (8), 216–222. <https://doi.org/10.1101/lm.053611.122>.
- Vertes, R.P., 2002. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J. Comp. Neurol.* 442 (2), 163–187. <https://doi.org/10.1002/cne.10083>.
- Vertes, R.P., 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51 (1), 32–58. <https://doi.org/10.1002/syn.10279>.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Do Valle, A.C., Sherman, A., Rodriguez, J.J., 2006. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 499 (5), 768–796. <https://doi.org/10.1002/cne.21135>.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Szigeti-Buck, K., Leranth, C., 2007. Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus.

- Brain Res. Bull. 71 (6), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.12.002>.
- Vertes, R.P., Linley, S.B., Hoover, W.B., 2015. Limbic circuitry of the midline thalamus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54, 89–107. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.014>.
- Vertes, R.P., Linley, S.B., Rojas, A.K.P., 2022. Structural and functional organization of the midline and intralaminar nuclei of the thalamus. *Front. Behav. Neurosci.* 16, 964644 <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.964644>.
- Viena, T.D., Linley, S.B., Vertes, R.P., 2018. Inactivation of nucleus reuniens impairs spatial working memory and behavioral flexibility in the rat. *Hippocampus* 28 (4), 297–311. <https://doi.org/10.1002/hipo.22831>. Epub 2018 Feb 7.
- Viena, T.D., Rash, G.E., Silva, D., Allen, T.A., 2021. Calretinin and calbindin architecture of the midline thalamus associated with prefrontal-hippocampal circuitry. *Hippocampus* 31 (7), 770–789. <https://doi.org/10.1002/hipo.23271>.
- Wang, X., Qiao, Y., Dai, Z., Sui, N., Shen, F., Zhang, J., Liang, J., 2019. Medium spiny neurons of the anterior dorsomedial striatum mediate reversal learning in a cell-type-dependent manner. *Brain Struct. Funct.* 224 (1), 419–434. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1780-4>.
- Wolff, M., Halassa, M.M., 2024. The mediodorsal thalamus in executive control. *Neuron* 112 (6), 893–908. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2024.01.002>.
- Wu, Y.T., Chang, C.H., 2022. Functional reuniens and rhomboid nuclei are required for proper acquisition and expression of cued and contextual fear in trace fear conditioning. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 25 (4), 319–327. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyab094>.
- Xiao, D., Zikopoulos, B., Barbas, H., 2009. Laminar and modular organization of prefrontal projections to multiple thalamic nuclei. *Neuroscience* 161 (4), 1067–1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.034>.
- Xu, W., Südhof, T.C., 2013. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339 (6125), 1290–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1229534>.
- Yang, C., Hu, Y., Talishinsky, A.D., Potter, C.T., Calva, C.B., Ramsey, L.A., Kesner, A.J., Don, R.F., Junn, S., Tan, A., Pierce, A.F., Nicolas, C., Arima, Y., Lee, S.C., Su, C., Coudriet, J.M., Mejia-Aponte, C.A., Wang, D.V., Lu, H., Yang, Y., Ikemoto, S., 2022. Medial prefrontal cortex and anteromedial thalamus interaction regulates goal-directed behavior and dopaminergic neuron activity. *Nat. Commun.* 13 (1), 1386. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28892-7>.
- Yu, X., Jembere, F., Takehara-Nishiuchi, K., 2022. Prefrontal projections to the nucleus reuniens signal behavioral relevance of stimuli during associative learning. *Sci. Rep.* 12 (1), 11995 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15886-0>.

V. La projection cortico-thalamique

Ce projet de thèse porte sur la voie de projection cortico-thalamique au sein du réseau cortico-thalamo-hippocampique, c'est-à-dire les neurones du CPFm qui projettent sur les ReRh.

D'un point de vue anatomique, ces projections proviennent principalement des couches profondes (V et VI) des trois sous-régions du CPFm (Vertes, 2002 ; McKenna and Vertes, 2004 ; Xu and Südhof, 2013) et sont majoritairement ipsilatérales (Vertes, 2002). Elles atteignent le Rh et la région latérale du Re central, où elles établissent des synapses directement sur les neurones de projection du Re vers l'Hip (Vertes et al., 2007).

L'organisation topographique de ces projections a été précisée par l'injection de traceurs antérogrades dans le CPFm et l'observation des terminaisons dans les ReRh (Vertes, 2002 ; 2004). Il a ainsi été montré que l'IL projette vers le pôle rostral du Re ; la partie la plus rostrale de l'IL ciblant préférentiellement le Re plus latéral et la partie la plus caudale de l'IL ciblant davantage le Re plus médian (Vertes, 2002). C'est principalement la partie caudale du PL qui projette au Re, notamment sur la région ventrolatérale du Re rostral et "moyen" (Vertes, 2004). C'est majoritairement la partie rostrale de l'ACC qui projette vers la partie latérale du Re caudal (Vertes, 2002). Ces axones cortico-thalamiques empruntent le faisceau médian du cerveau antérieur ainsi que la capsule interne (Vertes, 2002 ; 2004).

Enfin, Xu et Südhof (2013) ont montré que ces neurones de projection du CPFm vers le Re n'émettent pas de collatérales vers le noyau médiodorsal du thalamus (MD) ni vers le striatum médiodorsal.

D'un point de vue fonctionnel, Zimmerman et Grace (2018) ont étudié l'influence de la projection du CPFm sur les neurones du Re chez le rat anesthésié, en réalisant des enregistrements extracellulaires unitaires dans le Re après manipulation de l'activité dans l'IL. Leurs résultats montrent qu'alors que la plupart des neurones du Re présentent à la fois une activité tonique et en *burst*, l'inactivation de l'IL par la tétrodontoxine entraîne une diminution des décharges en *burst*. A l'inverse, la stimulation électrique de l'IL augmente ces décharges en *burst* dans le Re, suggérant que l'IL exerce une influence majeure sur le mode de décharge des neurones du Re. Cependant, une inhibition spécifique de la voie de projection de l'IL au Re grâce à une approche pharmacogénétique ciblant spécifiquement les terminaisons entraîne une augmentation des décharges en *burst*. Ces observations suggèrent que les

afférences préfrontales dans le Re modulent son mode de décharge, mais que cet effet dépend également de la projection inhibitrice indirecte via le TRN.

D'un point de vue comportemental, le rôle fonctionnel de cette voie de projection a été mis en évidence dans plusieurs processus grâce à des techniques d'inhibition pharmacogénétique ciblant les terminaisons. Ainsi, cette voie de projection est notamment impliquée dans la mémoire de travail, à la fois dans une tâche de séquences d'évènements (Jayachandran et al., 2019) et dans une tâche opérante non-concordante avec la position, avec un délai entre l'échantillonnage et le test (Ciacciarelli et al., 2025). Par ailleurs, une étude utilisant la photométrie de fibres a révélé une activation progressive de la voie du CPFm vers le Re au fil des sessions de conditionnement de réponse palpébrale, traduisant un affinement de sa sélectivité pour l'association entre le stimulus et la réponse au cours de l'apprentissage (Yu et al., 2022).

Concernant la flexibilité cognitive, Moscarello (2020) a montré que l'inhibition pharmacogénétique de la projection du CPFm vers le Re empêche l'expression d'une réponse de fuite apprise face à une menace, lorsqu'elle est en conflit avec une réponse d'immobilité comportementale. Ces résultats indiquent que cette voie cortico-thalamique est essentielle à l'ajustement flexible des comportements défensifs face à une menace, permettant à l'organisme de moduler sa réponse en fonction de son analyse du contexte.

Objectifs de la thèse

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre général de l'étude du réseau cortico-thalamo-hippocampique, reliant le CPFm, les ReRh et l'Hip. Ces trois structures sont largement impliquées dans de nombreux processus mnésiques et/ou spatiaux. Nous nous intéressons particulièrement à la flexibilité cognitive spatiale, étudiée à travers une tâche de changement de stratégie de navigation spatiale.

Dans cette tâche, le rôle fonctionnel du CPFm, des ReRh et de l'Hip a été mis en évidence par des expériences d'inactivation au muscimol ou d'inhibition pharmacogénétique (DREADD), ciblant principalement les neurones excitateurs de ces structures (Cholvin et al., 2013 ; Quet et al., 2020). Ces approches, en bloquant l'activité neuronale, empêchent toute forme de communication afférente ou efférente.

Nous souhaitons donc approfondir l'étude du réseau en décortiquant chaque voie de projection qui le compose afin d'étudier leur rôle spécifique dans les fonctions cognitives spatiales. En particulier, **mon projet de thèse a pour but de déterminer l'implication de la voie de projection du CPFm vers les ReRh dans le changement de stratégie de navigation spatiale, chez le rat.** Pour cela, nous lésons spécifiquement les neurones du CPFm projetant aux ReRh grâce à une approche virale reposant sur l'expression conditionnelle de la caspase sous dépendance d'une Cre-recombinase (Yang et al., 2013). Cette technique n'ayant jamais été appliquée dans nos conditions expérimentales, une première étape d'optimisation du protocole a d'abord été nécessaire. Celle-ci est détaillée dans la première partie de la thèse.

Enfin, la seconde partie de la thèse est consacrée à l'analyse des conséquences comportementales de la lésion de la voie cortico-thalamique sur la flexibilité cognitive spatiale.

Matériels et Méthodes

I. Animaux et considérations éthiques

L'ensemble des expériences présentées dans ce travail de thèse a nécessité l'utilisation de 149 rats mâles de souche Long-Evans (**Figure 16**, provenant du centre d'élevage R. Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). Cette souche de rats a été choisie pour ses bonnes capacités visuelles et cognitives, la rendant très pertinente comme modèle d'étude de la mémoire spatiale (D'Hooge and De Deyn, 2001).

A leur arrivée au laboratoire, ils sont âgés de 7 semaines et pèsent environ 250g. Ils sont hébergés dans des cages standards transparentes en Makrolon (dimensions : 60x38x19,5cm, REF : 1354 Tecniplast) avec deux autres congénères. Ainsi, nous évitons l'isolement, cause de stress chez le rat, qui est un animal grégaire. Pendant toute la durée de l'expérience, ils sont placés dans une pièce de stabulation dont les conditions de température (22°C +/- 1°C) et d'hygrométrie (30%) sont contrôlées. Ils ont un accès *ad libitum* à l'eau et à de la nourriture



Figure 16. Photographie de trois rats mâles Long Evans âgés de 7 semaines, dans leur cage de stabulation. Collection personnelle.

(régime standard, A04, SAFE®), et leur rythme circadien est cyclé par la présence de lumière et d'un fond sonore provenant d'une radio pendant 12h sur 24h (de 7h à 19h en hiver et de 8h à 20h en été). Après une première semaine d'acclimatation à leur nouvel environnement, les animaux sont manipulés quotidiennement pendant une semaine, deux minutes par rat et par jour ouvrable. Cela permet de les habituer au contact avec l'expérimentateur. Pendant toute la durée de leur présence au laboratoire, ils sont visités quotidiennement afin de vérifier leur bien-être et pesés au minimum une fois par semaine, l'augmentation constante de leur poids étant un indicateur de bonne santé (e.g. Retana-Márquez et al. (2003) montrent une diminution de la prise de poids en cas de stress chronique).

Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives européennes (2010/63/EU) et nationales (décret n°3013-118, 1er février 2013, Département Français de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale) sur l'expérimentation animale. La "règle des 3R" (Remplacement, Raffinement et Réduction des animaux) a été appliquée lors de la planification des expériences. L'ensemble des protocoles

a été approuvé par le Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS, Saisine #13261-2018012918394046 pour les expériences 1, 2, 3 et 4 et Saisine #45564-2023110117317004 pour l'expérience 5) et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. L'établissement utilisateur d'animaux à des fins expérimentales (UMR 7364) porte le numéro d'agrément J-67-482-13 (date d'expiration : 27 octobre 2027).

II. Déconnexion conditionnelle Cre-caspase

La déconnexion de la voie cortico-thalamique est réalisée à l'aide de vecteurs viraux permettant l'expression conditionnelle de la caspase, sous dépendance d'une Cre-recombinase, grâce au système Cre-Lox.

1. Approche virale : utilisation de virus adéno-associés

Des gènes exogènes peuvent être exprimés dans des cellules, *in vivo*, par le biais d'un vecteur. Pour cela, les **virus recombinants** sont des outils très répandus puisqu'ils permettent l'expression de nombreux types de gènes, y compris dans les neurones. Ainsi, l'utilisation de virus adéno-associés (**AAV**), de lentivirus, ou encore du virus modifié de la rage, par exemple, a permis d'élargir le spectre des recherches en neurosciences grâce à l'expression d'une grande variété de gènes de façon antérograde, rétrograde ou même trans-synaptique ([Chen et al., 2019](#)).

Les vecteurs les plus courants sont les **AAV recombinants**. Ces virus de la famille des *Parvoviridae*, découverts dans les années 1960 ([Atchison et al., 1965](#)), sont constitués d'une capsid non enveloppée de forme icosaédrique de 20 nm de diamètre, dans laquelle se situe le génome d'ADN simple brin linéaire. A l'origine, ce génome contient 2 gènes : *rep* et *cap*, codant respectivement pour des protéines de réplication et pour les protéines structurales de la capsid. La réplication de ce virus est totalement dépendante d'un virus auxiliaire, comme les adénovirus par exemple, mais aussi le virus herpès simplex de type 1 ou le papillomavirus ([Geoffroy and Salvetti, 2005](#)). Cette incapacité à se répliquer de façon autonome, associée à sa faible immunogénicité chez le rongeur (e.g. [Zaiss et al., 2002](#) ; [McCaffrey et al., 2008](#)), en font un très bon candidat comme vecteur recombinant. De plus, aucune pathologie n'est associée à une infection par un AAV, ni liée à son intégration dans le génome ([Flotte and Berns,](#)

2005), à plus forte raison parce que le matériel génétique du virus reste majoritairement sous forme épisomale (Schnepp et al., 2003). La relative simplicité de son génome a également été un avantage, rendant possible sa modification : on supprime les gènes *rep* et *cap*, et on les remplace par une séquence contenant un promoteur, afin de cibler un type cellulaire spécifique, ainsi qu'un gène d'intérêt. Cependant, il est important de souligner que l'un des principaux inconvénients de l'utilisation des AAV réside dans la limite de taille du génome, puisqu'en raison de la petite taille de sa capsid, il n'est pas possible d'insérer une cassette de plus de 5.2 kb (Wu et al., 2010).

Actuellement, 13 sérotypes naturels différents d'AAV, en fonction des protéines présentes sur la capsid, ont été découverts (AAV1 à AAV13), et de nombreux autres variants ont été conçus pour la thérapie génique (Issa et al., 2023). Chaque sérotype ayant un tropisme privilégié pour certains types cellulaires, les AAV sont capables d'infecter une grande variété de cellules différentes. Ainsi, Hermonat et Muzyczka (1984) ont été les premiers à utiliser l'AAV comme vecteur de transduction *in vitro*, exprimant ici le gène de résistance à la néomycine. Dix ans plus tard, Kaplitt et al. (1994) sont les premiers à utiliser l'AAV pour faire exprimer un gène d'intérêt dans un cerveau de mammifère, en l'occurrence le gène de la tyrosine hydroxylase humaine dans le striatum de rats.

Depuis, il est largement admis que l'AAV est un vecteur recombinant permettant une expression efficace, forte, non toxique, stable et durable d'un transgène, et ceci sous contrôle spatio-temporel (Peel and Klein, 2000). Ainsi, les AAV sont les vecteurs recombinants les plus utilisés, à la fois dans la recherche en neurosciences, mais aussi dans le développement d'essais cliniques de thérapies géniques (e.g. Naso et al., 2017).

2. Principe du système Cre-lox

Le **système de recombinaison Cre-Lox** est un outil génétique permettant la modification de séquences nucléotidiques avec un contrôle dans l'espace et dans le temps. Originellement développée pour l'édition de génome par Sauer et Henderson (1988), cette technique permet également l'expression conditionnelle de gènes (pour revue, voir Sauer, 1998). Ce système, dérivé du bactériophage P1, repose sur trois éléments : la Cre-recombinase, une enzyme ADN-recombinase site-spécifique, et deux séquences

nucléotidiques LoxP (locus of X-over of P1) de part et d'autre d'une séquence d'intérêt, en général un gène, appelée la **séquence floxée**.

Les séquences LoxP de 34 paires de bases sont reconnues par la Cre-recombinase grâce à leurs deux extrémités symétriques de 13 paires de base chacune. Entre ces deux segments symétriques se trouve une séquence asymétrique de 8 paires de base, donnant une directionnalité au site loxP. Lorsque la Cre-recombinase reconnaît ces sites, elle catalyse la recombinaison réciproque et conservative de l'ADN. Si les deux séquences loxP entourant le gène floxé ont la même orientation, le gène est excisé ; si elles ont une orientation différente, la séquence du gène est recombinaisonnée dans le sens inverse (**Figure 17A et B**).

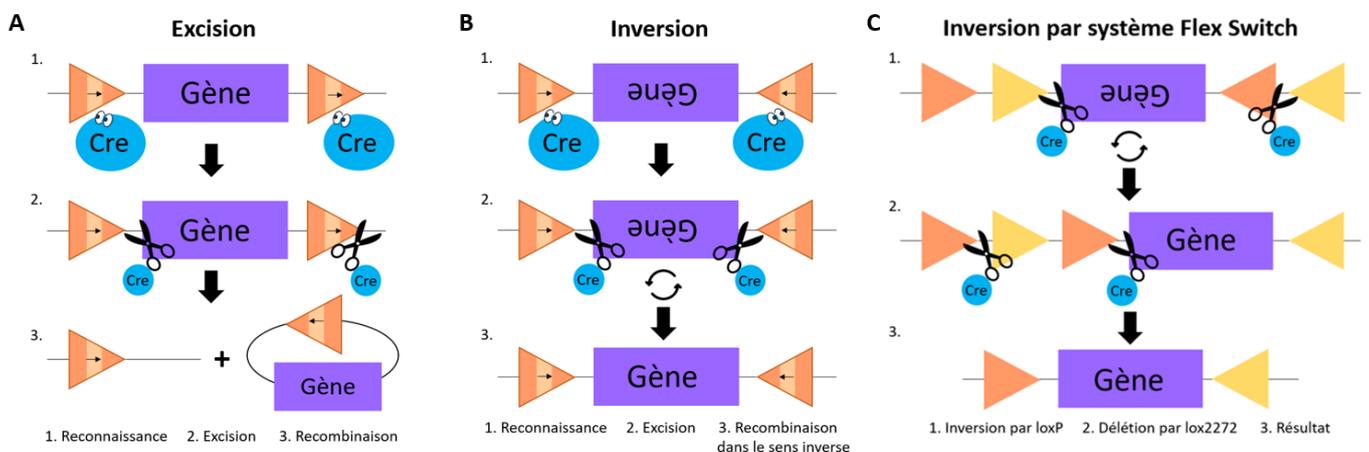
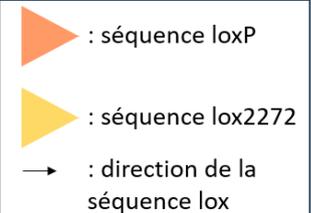


Figure 17 : Fonctionnement du système Cre-lox

- A. Excision : lorsque les deux séquences loxP ont la même orientation, le gène est excisé par la Cre-recombinase
- B. Inversion : lorsque les deux séquences loxP ont une orientation différente, le gène est recombinaisonné dans le sens inverse
- C. Inversion par système Flex Switch : combinaison d'une étape d'inversion et d'une étape d'excision grâce à l'utilisation de deux séquences lox différentes



Ce système permet ainsi l'expression conditionnelle d'un gène, en insérant sa séquence dans le sens inverse au sens de lecture, entre deux séquences LoxP d'orientation opposée. Alors, la recombinaison du gène dans le bon sens de lecture, et donc son expression, n'a lieu qu'en présence de la Cre-recombinase.

Afin que cette inversion de sens de lecture ne se fasse pas de façon perpétuelle, il convient d'utiliser le système FLEx Switch (*Flip Excision switches*) recourant à une deuxième paire de sites, lox2272, dérivée de la séquence loxP, mais présentant une mutation. Bien que la Cre-recombinase reconnaisse les deux types de sites lox, la recombinaison ne peut avoir lieu qu'entre deux paires identiques. Ainsi, en plaçant les sites loxP et lox2272 de façon

alternée et en orientation antiparallèle, la Cre-recombinase inverse la séquence entre deux sites loxP, ce qui place les deux sites lox2272 dans la même orientation. L'enzyme excise alors la séquence entre les sites lox2272, qui contient donc un des sites loxP (**Figure 17C**). Par conséquent, le gène d'intérêt se retrouve dans le bon sens de lecture et entre deux sites lox différents, donc aucun autre événement de recombinaison ne peut avoir lieu. Un vecteur utilisant ce système FLEx Switch est nommé **DIO**, pour *Double-floxed with Inverted Orientation*. C'est celui que nous utilisons pour exprimer la caspase de façon conditionnelle dans les neurones que nous souhaitons léser.

3. Déconnexion cortico-thalamique

Notre projet repose sur la déconnexion de la voie cortico-thalamique, c'est-à-dire les neurones du CPFm projetant aux ReRh du thalamus. Pour que cette lésion soit spécifique, nous utilisons le système Cre-lox afin de faire exprimer la caspase, une enzyme entraînant l'apoptose, sous dépendance de la Cre-recombinase ([Morgan et al., 2014](#)). Nous injectons une caspase floxée dans le CPFm, qui ne peut s'exprimer que grâce à la présence de Cre-recombinase, que l'on administre dans les ReRh et qui est transportée de façon rétrograde.

Ainsi, nous injectons dans le CPFm un premier AAV, antérograde, portant les gènes floxés de la caspase et de la protéase du virus de la gravure du tabac (**TEVp**) sous le promoteur du facteur d'élongation 1 α (**EF1a**), (AAV5.EF1a.FlexDIO-taCasp3-TEVp, UNC Gene Therapy Center-Vector Core, abrégé **AAV5-taCasp** ci-après) (**Tableau 1**). Nous utilisons un deuxième virus, portant le gène de la Cre-recombinase ainsi qu'un gène rapporteur, qui est injecté dans les ReRh. Ce virus est soit un AAV rétrograde portant le gène de la mCherry (**mCh**) non fusionné au gène de la Cre-recombinase, sous le promoteur EF1a (AAVrg.EF1a.mCherry-IRES-Cre, Addgene, MA, USA, abrégé **AAVrg-Cre-mCh** ; expérience 1), soit un AAV rétrograde portant le gène de la protéine fluorescente verte (**GFP** pour *Green Fluorescent Protein*) fusionné au gène de la Cre-recombinase, sous le promoteur de la synapsine humaine (**hSyn**), (AAVrg.hSyn.eGFP-Cre-WPRE-SV40, Addgene, MA, USA, abrégé **AAVrg-Cre-GFP** ; expériences 1, 2 et 4), soit un AAV rétrograde portant le gène de la Cre-recombinase, sans gène rapporteur, sous le promoteur de la synapsine humaine, (AAVrg.hSyn.Cre-WPRE, Addgene, MA, USA, abrégé **AAVrg-Cre** ; expérience 3) (**Tableau 1**).

Expérience	Virus	Sérotype	Promoteur	Référence	Titre (vg/mL)	Structure	Volume	Coordonnées
1	CAV-Cre-GFP	2	CMV	https://plateau-igm.m.pvm.cnrs.fr/?vector=cav-cregfp	2,3 x 10 ¹²	ReRh	2 x 1µL (en AP)	AP : -1,7 et -2,4 mm ML : -1,9 mm DV : -7,1 et -7,2 mm Angle de 15°
	AAV-Cre-mCh	rétrograde	EF1a	https://www.addgene.org/55632/#55632-AAV1g	1,2 x 10 ¹²			AP : -1,8 et -2,3 mm ML : -1,9 mm DV : -7,1 et -7,2 mm Angle de 15°
	AAV-Cre-GFP	rétrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	1,25 x 10 ¹³			Unilatéral : AP : + 3,0 mm ML : + 0,6 mm DV : -5,2 et -4,2 mm Bilatéral : AP : + 3,0 mm ML : +/- 0,5 mm DV : -4,6 et -3,6 mm
2	AAV-taCasp	5	EF1a	https://www.addgene.org/45580/	1,8 x 10 ¹²	CPFm	2 x 0,5µL par côté (en DV)	
Voir Panzer et al., 2024, Table 1								
3	AAV-Cre	rétrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105553/	1,2 x 10 ¹³	ReRh	2 x 0,5µL (en AP)	AP : -1,8 et -2,3 mm ML : -1,9 mm DV : -7,1 et -7,2 mm Angle de 15°
	AAV-DIO-mCh	5	hSyn	https://www.addgene.org/50459/	1,1 x 10 ¹³	CPFm	3 x 0,6 µL (en DV, unilatéral)	AP : + 3,0 mm ML : + 0,5 mm DV : -5,0 ; -3,8 et -2,2 mm
4	AAV-Cre-GFP	rétrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	3,125 x 10 ¹²	ReRh	2 x 0,5µL (en AP)	AP : -1,8 et -2,3 mm ML : -1,9 mm DV : -7,1 et -7,2 mm Angle de 15°
	AAV-GFP			https://www.addgene.org/114213/	3,125 x 10 ¹²			
5	AAV-taCasp	5	EF1a	https://www.addgene.org/45580/	1,8 x 10 ¹²	CPFm	3 x 0,6 µL par côté (en DV)	AP : + 3,0 mm ML : +/- 0,5 mm DV : -5,0 ; -3,8 et -2,2 mm
	AAV-DIO-mCh	5	hSyn	https://www.addgene.org/50459/	1,1 x 10 ¹³	ReRh	2 x 0,5µL (en AP)	AP : -1,8 et -2,3 mm ML : -1,9 mm DV : -7,1 et -7,2 mm Angle de 15°
5	AAV-transCre	1	hSyn	https://www.addgene.org/105553/	6,6 x 10 ¹²	CPFm	3 x 0,6 µL (en DV, unilatéral)	AP : + 3,0 mm ML : + 0,5 mm DV : -5,0 ; -3,8 et -2,2 mm
				https://www.addgene.org/105553/	6,6 x 10 ¹²			

Tableau 1. Récapitulatif des virus utilisés

Abréviations : AAV : Virus Adéno-Associé ; CAV : AdénoVirus Canin ; GFP : Green Fluorescent Protein ; mCh : mCherry ; CMV : Cytomégalovirus ; EF1a : Facteur d'Élongation 1a ; hSyn : synapsine humaine ; ReRh : Reuniens et Rhomboïde ; CPFm : Cortex Préfrontal médian ; AP : Antéro-postérieur ; ML : Médio-latéral ; DV : Dorso-ventral

Ce virus est de sérotype rétrograde (conçu par Tervo et al. (2016) à partir d'un sérotype 2). Il infecte donc les neurones des ReRh par les terminaisons, puis remonte le long de l'axone jusqu'aux corps cellulaires situés dans les régions afférentes aux ReRh (notamment le CPFm), où il s'exprime (Figure 18 Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Puisque les neurones dont les corps cellulaires sont dans le CPFm, ont été infectés par l'AAV5-ta-Casp, lorsque la Cre-recombinase y est produite, elle reconnaît les sites lox entourant le gène de la caspase et inverse le sens de la séquence grâce à son activité ADN-recombinase. La caspase s'exprime alors sous forme de procaspase. Son activation par clivage par la TEVp déclenche l'apoptose dans ces neurones. Comme la caspase s'exprime uniquement dans les neurones doublement infectés, seuls les neurones du CPFm projetant sur les ReRh sont détruits.

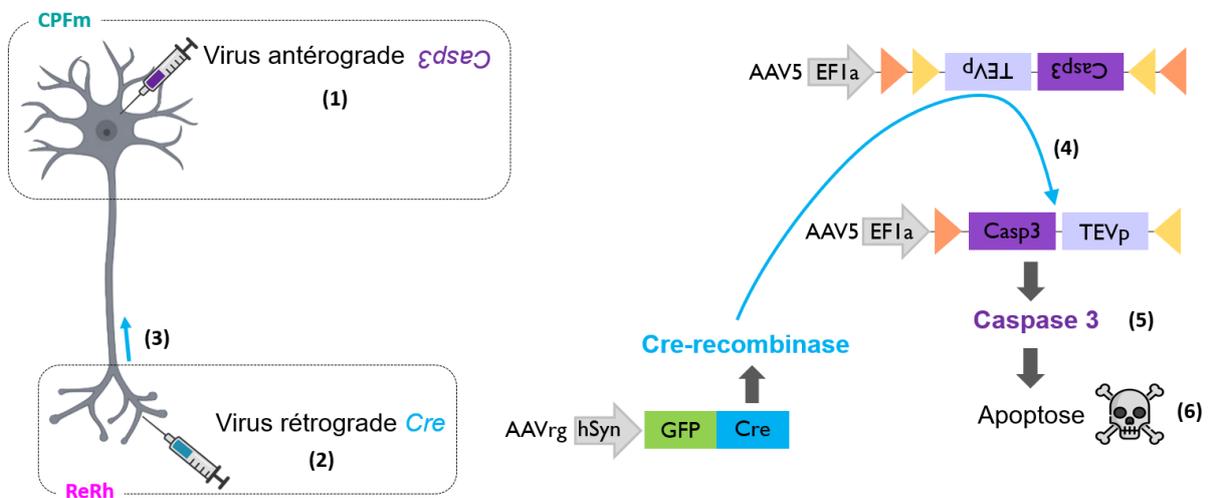


Figure 18 : Approche virale de la déconnexion cortico-thalamique

Le virus portant le gène floxé de la caspase est injecté dans le CPFm (1) Le virus rétrograde portant le gène de la Cre-recombinase est injecté dans les ReRh (2), il remonte le long de l'axone jusqu'au CPFm (3). Lorsque la Cre-recombinase s'exprime, elle inverse le sens de lecture du gène de la caspase (4). Celui-ci peut alors s'exprimer (5), ce qui déclenche l'apoptose du neurone (6). Seuls les neurones ayant reçu les deux virus, donc ceux qui projettent du CPFm aux ReRh sont tués.

- : séquence loxP
- : séquence lox2272
- : promoteur
- : gène

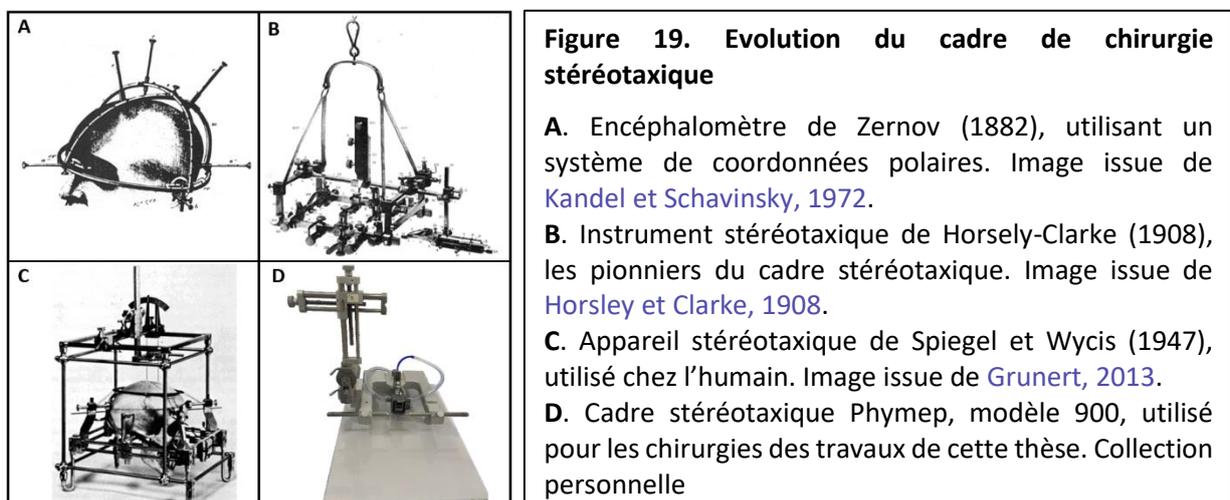
Dans l'expérience 1, un adénovirus canin (CAV) portant le gène de la GFP couplé au gène de la Cre-recombinase, sous le promoteur du cytomégalovirus (CMV), (CAV2.CMV.Cre-GFP-SV40, plateforme de vectorologie de Montpellier, abrégé CAV2-Cre-GFP) a également été utilisé.

Afin que la déconnexion soit spécifique, il faut que les virus soient injectés dans nos régions d'intérêt de façon précise. Pour cela, nous utilisons un système de chirurgie stéréotaxique intracérébrale.

4. Chirurgie stéréotaxique

La chirurgie stéréotaxique est une technique permettant de cibler une région cérébrale de façon très précise grâce à un système de coordonnées cartésiennes en trois dimensions.

Les études établissant les liens entre les structures cérébrales et des repères externes, notamment crâniens, ont émergé au XIXe siècle. Des travaux précurseurs ont ainsi conduit à des modèles, dont les plus fameux sont le "craniographe" de Paul Broca, ou encore "l'encéphalomètre" (Zernov, 1882). Ce dernier est composé d'un anneau en aluminium fixé au crâne dans un plan horizontal ainsi que d'un méridien sagittal vertical (Kandel and Schavinsky, 1972, Figure 19A). Utilisant un système de coordonnées polaires et non cartésiennes, il ne peut cependant pas être considéré comme stéréotaxique (Jensen et al., 1996). Sir Victor Horsley et Robert H. Clarke seront les premiers à utiliser le terme de "stéréotaxie". C'était en 1908, lorsqu'ils ont présenté leur "stereotaxic instrument" (Figure 19B). Né de leurs travaux en collaboration sur l'étude du cervelet chez le singe, et de leur conscience de la nécessité de pouvoir stimuler ou détruire des régions cérébrales profondes sans interférer sur le reste du cerveau, cet instrument est décrit comme un cadre fixé au crâne de l'animal par des barres insérées dans les conduits auditifs externes, ainsi que sur les arcades orbitaires, la racine du nez et la voûte du palais. Le crâne est alors un référentiel fixe et rigide, dans lequel on peut définir un système cartésien constitué d'un point d'origine et d'axes en



trois dimensions. Ainsi, l'électrode montée sur l'appareil est guidée de façon très précise dans ce système orthonormé, afin de cibler une région dont les coordonnées ont été identifiées grâce à un atlas cartographiant le cerveau. Malgré plusieurs tentatives d'adaptation de ce dispositif à l'humain (Mussen en 1918, Kirschner en 1933), ce n'est que dans la fin des années 1940' que la neurochirurgie stéréotaxique humaine se développe grâce à Spiegel et Wycis (1947). Ces auteurs utilisent la ventriculographie afin de pallier la grande variabilité interspécifique qui existe entre les singes et les humains (Jensen et al., 1996). Grâce à cet appareil, qui ressemble beaucoup à celui de Horsley-Clarke (Figure 19C), Spiegel et Wycis ont pu réaliser une lésion thérapeutique de la partie médiane du globus pallidus chez un patient atteint de la maladie de Huntington (Spiegel and Wycis, 1950). Depuis, la neurochirurgie stéréotaxique est largement démocratisée et totalement personnalisée puisque l'atlas est réalisé de manière spécifique pour chaque patient grâce aux techniques d'imagerie, ce qui permet de s'affranchir de la variabilité inter-individuelle.

La chirurgie stéréotaxique repose donc sur trois éléments fondamentaux :

- Un cadre stéréotaxique fixe permettant de maintenir la tête, et donc le crâne, totalement immobiles
- Un système de coordonnées cartésiennes, dont les trois dimensions sont l'axe médio-latéral, l'axe antéro-postérieur et l'axe dorso-ventral, et dont le point d'origine est généralement le Bregma, point d'intersection des sutures sagittale et coronale du crâne (Figure 20A et B)
- Un atlas stéréotaxique correspondant à la carte du cerveau en fonction de ce système de coordonnées, établi grâce à des coupes cérébrales en série.

Chez le petit rongeur, nous utilisons un cadre (Phymep®, Modèle 900, Figure 19D), dont le principe d'utilisation n'est pas si différent de celui de Horsley-Clarke en réalité, puisque la tête du rat est fixée grâce à des barres d'oreilles insérées dans le conduit auditif, et que son museau est maintenu par une barre de nez sur le dessus, et par une barre de gueule placée derrière les incisives supérieures (Figure 20C). La seringue contenant le virus est fixée à un micromanipulateur doté d'une micropompe, et est déplacée jusqu'aux coordonnées d'intérêt grâce à des échelles de Vernier coulissantes dans les trois axes, permettant une précision de 0,1 mm.

Dans notre étude, nous utilisons donc la chirurgie stéréotaxique pour injecter nos vecteurs viraux en intracérébral de façon spécifique.

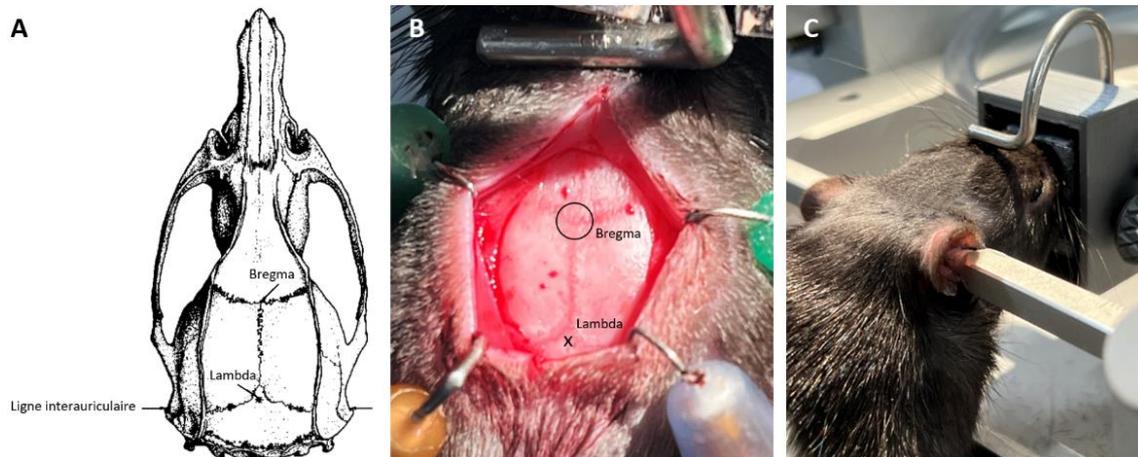


Figure 20. Points crâniométriques

A. Schéma du crâne de rat en vue supérieure avec illustration des points crâniométriques Bregma et Lambda à l'aide des sutures crâniennes. Figure issue de [Paxinos et al., 1985](#).

B. Photographie du crâne de rat en vue supérieure après incision du scalp et écartement de la peau, illustration des points Bregma et Lambda. Collection personnelle.

C. Photographie du rat placé sur le cadre stéréotaxique, maintenu par les barres d'oreilles, et la barre de nez sur le dessus du museau. Photographie issue de la thèse de [Laurine Boch \(2023\)](#).

5. Protocole expérimental de la chirurgie

Nos animaux sont opérés deux semaines après leur arrivée (une semaine d'acclimatation et une semaine d'habituation à la manipulation). Le rat est endormi par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (Isoflu-Vet[®], Dechra, anesthésiant, induction de l'anesthésie à 4% puis maintien de l'anesthésie au cours de la chirurgie à 1.5%). Le dessus de sa tête est tondu autour de la future incision, pour éviter les contaminations par les poils.

Le rat est placé dans le cadre stéréotaxique sur un tapis chauffant pour éviter une chute de sa température corporelle. Les barres d'oreilles, préalablement recouvertes d'un anesthésique local (Anesderm[®] Gé, Pierre Fabre, 5%), sont insérées dans les conduits auditifs, la barre de gueule est placée derrière les incisives, la barre de nez est serrée sur le museau ([Figure 20C](#)). Une fois la tête du rat correctement fixée, un gel ophtalmique (Lubrithal[®], Dechra) est appliqué sur ses cornées afin de protéger ses yeux du dessèchement. Le scalp est désinfecté (alcool 70% - Vétédine Solution[®] (antiseptique, Vetoquinol) - alcool 70% - NaCl), puis une solution anesthésique locale (mélange de Lidor[®], Axience, 2 mg/kg et de Bupivacaïne, Mylan, 2 mg/kg) est administrée en sous-cutané au niveau du site de l'incision. Un anti-inflammatoire

non stéroïdien (Métacam®, Boehriner Ingelheim, 2 mg/kg) est aussi injecté en sous-cutané dans la nuque. Le scalp est ensuite incisé avec un scalpel et les bords de la plaie sont écartés. La microseringue (Hamilton® série 800, 10 µL) est fixée sur le micromanipulateur.

Afin que le système de coordonnées soit orthonormé, il est indispensable que le crâne soit strictement à l'horizontale. Pour s'en assurer, l'alignement des points crâniométriques Bregma et Lambda (**Figure 20A et B**) est contrôlé en vérifiant que leurs coordonnées dorso-ventrales sont identiques. Ensuite, la pointe de l'aiguille d'instillation (aiguille 30G, fibre de silice, Phymep®, Paris) est placée sur le Bregma pour définir le point d'origine (0 ; 0 ; 0) du système cartésien. L'aiguille est ensuite déplacée aux coordonnées antéro-postérieure et médio-latérale correspondant au point d'injection, déterminées grâce à un atlas stéréotaxique (**Paxinos and Watson, 7^{ème} édition, 2014**). Après avoir marqué ce point au crayon, le crâne est perforé à l'aide d'une fraise dentaire. L'aiguille d'instillation est alors descendue jusqu'aux coordonnées dorso-ventrales de la région ciblée. Après 1 minute d'attente, la solution virale est injectée lentement grâce à une micropompe. Après un délai de 5 minutes pour permettre la diffusion de la solution virale, l'aiguille est remontée doucement. Les précédentes étapes sont répétées pour les différents points d'injection, dont les coordonnées et volumes sont décrits dans le **Tableau 1**. Il y a systématiquement deux sites d'injection dans la partie médiane des ReRh : une dans la partie antérieure et une dans la partie postérieure. Concernant le CPFm, il y a deux ou trois sites d'injection par hémisphère, dans l'axe dorso-ventral. Après l'opération, la peau du crâne est suturée et le rat est sorti du cadre stéréotaxique pour être placé sous une lampe chauffante. Il y est surveillé jusqu'à ce qu'il soit totalement réveillé. Le rat est ensuite replacé dans sa cage de stabulation avec de la nourriture ramollie et observé quotidiennement pour le suivi post-opératoire. Cette stabulation se maintient ensuite pendant 4 à 5 semaines pour permettre l'infection, le transport et l'expression des virus injectés, ainsi que la mort cellulaire par apoptose, le cas échéant.

III. Evaluations comportementales

L'étude des fonctions cognitives est différente entre l'humain et l'animal, principalement en raison de l'absence de langage verbal chez les animaux. Il est donc impossible d'utiliser des méthodes déclaratives pour évaluer leurs capacités cognitives. Pour contourner cette limite, il est nécessaire de modéliser ces fonctions à travers des tâches

comportementales spécifiques, qui permettent d'inférer des processus cognitifs en observant et analysant les réponses des animaux dans diverses situations expérimentales.

Afin de limiter l'impact des variations circadiennes des performances cognitives, l'ensemble des tâches comportementales est réalisé le matin (entre 8h et 14h). Le début des expériences a toujours lieu 1 heure après l'allumage de la lumière, afin que l'heure subjective de passage soit la même entre les cohortes, bien qu'elles n'aient pas été réalisées à la même saison. L'ordre de passage est contrebalancé au sein des groupes expérimentaux, mais reste constant d'un jour à l'autre. Ainsi, chaque rat a une heure de passage fixe, afin que le moment circadien ne devienne pas une variable influençant l'évaluation comportementale. Les variations circadiennes des performances sont cependant réparties de manière équilibrée entre les groupes.

1. Le labyrinthe en croix surélevé

Le labyrinthe en croix surélevé (ou *Elevated Plus Maze*) est utilisé pour évaluer le comportement de type anxieux d'un rongeur (Pellow et al., 1985). Il repose sur le conflit entre le caractère exploratoire des rongeurs, qui les incite à explorer les nouveaux environnements, et le côté anxiogène des espaces ouverts, dans lesquels ils sont plus vulnérables car plus exposés aux prédateurs.

Ce paradigme a été mis en œuvre par Laurine Boch. Ainsi, le dispositif et le protocole sont détaillés dans son manuscrit de thèse (2023). Brièvement, il s'agit d'un dispositif en plexiglas noir en forme de croix, placé à 73 cm du sol (Figure 21). Parmi les 4 bras, deux sont qualifiés de fermés car délimités par des parois opaques de 40 cm de hauteur, tandis que 2 autres sont qualifiés d'ouverts car leur rebord n'est que de 1,5 cm, pour éviter les risques de chute du rat.

Le protocole débute par une phase d'habituation, pendant laquelle le rat est transporté, seul, dans une cage sans litière, puis placé dans la salle de test pendant 5 minutes pour qu'il s'habitue à cette nouvelle pièce. Ensuite, lors de la phase de test, le rat est placé dans la zone centrale du dispositif, et peut l'explorer librement pendant 5 min. L'objectif est de pouvoir comparer son comportement entre les bras fermés, qui sont beaucoup plus sécurisants, et les bras ouverts, qui sont plus anxiogènes du fait de la hauteur et de la

vulnérabilité de l'animal vis-à-vis de potentiels prédateurs, mais qui ont un plus fort potentiel exploratoire. Ainsi, un rat passant moins de temps dans les bras ouverts, ou y faisant moins d'entrées, sera considéré comme ayant un comportement plus anxieux qu'un rat passant plus de temps et faisant plus d'entrées dans ces mêmes bras.

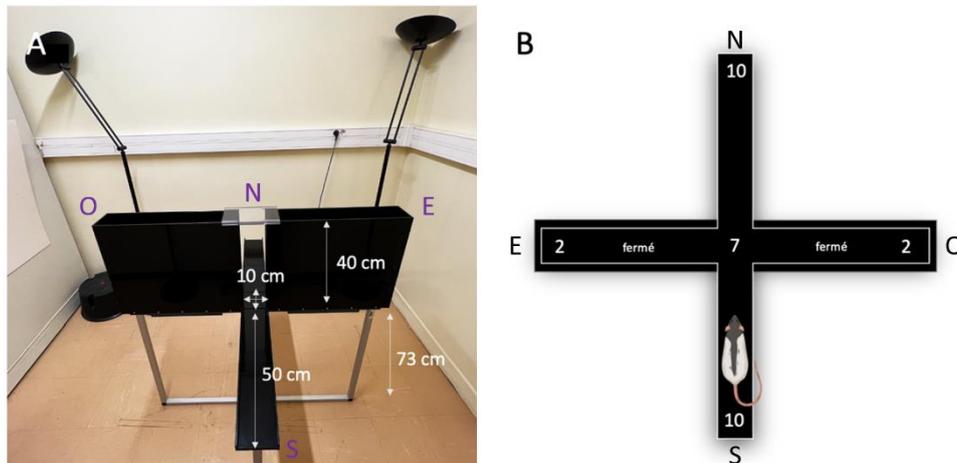


Figure 21. Labyrinthe en croix surélevé

A. Photographie du dispositif de labyrinthe en croix surélevé dans la salle de test. Les dimensions sont ajoutées en blanc ; les points cardinaux représentant les noms des bras sont ajoutés en violet.

B. Schéma du labyrinthe en croix surélevé en vue supérieure. Les valeurs indiquées dans chaque bras correspondent à la luminosité mesurée en Lux. Figure modifiée de la thèse de [Laurine Boch \(2023\)](#).

2. La piscine de Morris

La piscine de Morris (ou *Morris Water Maze*) est un labyrinthe aquatique conçu en 1981 par Richard Morris ([Morris, 1984](#)) pour étudier la mémoire spatiale chez le rat. Cette tâche exploite l'aversion des rats pour l'eau fraîche, les motivant ainsi à rejoindre une plateforme immergée et invisible, leur seule échappatoire. La tâche repose donc sur un apprentissage itératif, lors duquel les rats apprennent à rejoindre cette plateforme de plus en plus efficacement en utilisant les indices spatiaux présents dans la pièce. Le test de rappel évalue ensuite leurs performances, c'est-à-dire leur capacité à utiliser leur carte cognitive pour retrouver la localisation de la plateforme préalablement apprise.

Ce paradigme a été mis en œuvre par Laurine Boch pour étudier la mémoire spatiale de référence. Ainsi, le dispositif et le protocole sont détaillés dans son manuscrit de thèse ([2023](#)). Brièvement, la piscine de Morris est une enceinte ronde en PVC blanc, découpée

virtuellement en quatre quadrants identiques, nommés en fonction des points cardinaux (NO, NE, SO et SE) (**Figure 22A**). La piscine, de 160 cm de diamètre et 60 cm de haut, est placée au sol, dans une pièce dédiée dans laquelle se trouvent des indices distaux fixes (**Figure 22B**). Le dispositif est rempli d'eau fraîche (20 +/- 1°C) jusqu'à mi-hauteur (environ 34 cm), opacifiée par 185g de Blanc de Meudon (Bostik®) pour que la plateforme ne soit plus distinguable par transparence. Les rats peuvent se soustraire à la fraîcheur de l'eau grâce à une plateforme circulaire de 11 cm de diamètre et 32 cm de hauteur.

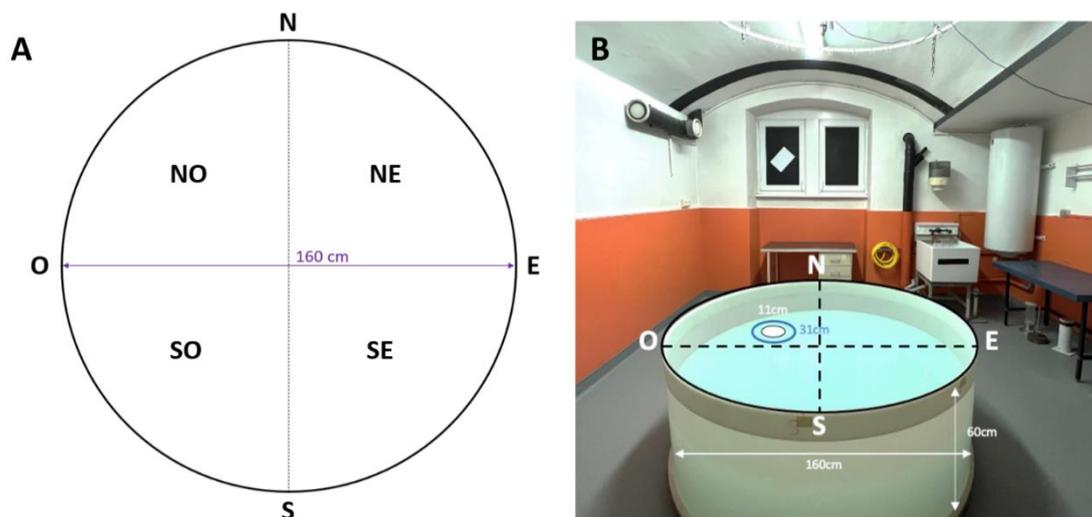


Figure 22. Piscine de Morris

A. Schéma de la piscine de Morris en vue supérieure. Les quadrants virtuels sont nommés en fonction des points cardinaux. Le diamètre de la piscine est de 160 cm.

B. Photographie du dispositif de piscine de Morris dans la salle de test. Les dimensions sont indiquées en blanc, la zone bleue de 31 cm de diamètre correspond à l'annulus, c'est la zone de plateforme élargie. Photographie issue de la thèse de [Laurine Boch \(2023\)](#).

Le protocole utilisé permet d'étudier la consolidation d'un souvenir spatial grâce à un test de rétention réalisé 25 jours après l'acquisition (**Figure 23**). Il est très similaire à celui utilisé dans notre laboratoire par [Loureiro et al. \(2012\)](#), par exemple. Il débute par un premier jour d'habituation de 4 essais (départ en NO, SO, NE, S) successifs d'une durée de 60 secondes maximum. La plateforme est située dans le quadrant SE, elle émerge environ 2 cm au-dessus du niveau de l'eau et sa visibilité est accentuée par un disque noir. Cette première phase permet de familiariser les animaux au dispositif et au fait d'être placés dans l'eau, ainsi que de leur faire comprendre qu'il existe une échappatoire. Cette étape permet également de

s'assurer qu'il n'y a pas de déficit visuel, locomoteur ou sensori-moteur, ni motivationnel qui pourraient biaiser nos conclusions à propos de la mémoire spatiale.

La phase d'**acquisition** a lieu pendant les huit jours suivants (**Figure 23**), à raison de 4 essais par jour, d'une durée maximale de 60 secondes. Cette fois-ci la plateforme est systématiquement placée dans le quadrant NO, immergée 2 cm sous la surface de l'eau, la rendant invisible (le disque noir est retiré). Les points de lâcher sont différents entre chaque essai, et leur ordre change aléatoirement chaque jour, mais il y a le même nombre d'essais au départ de chaque point (N, S, E, O ; S, O, N, E ; ...). Cette variabilité du point de départ, associée à la constance de la position de la plateforme, favorisent l'apprentissage spatial.

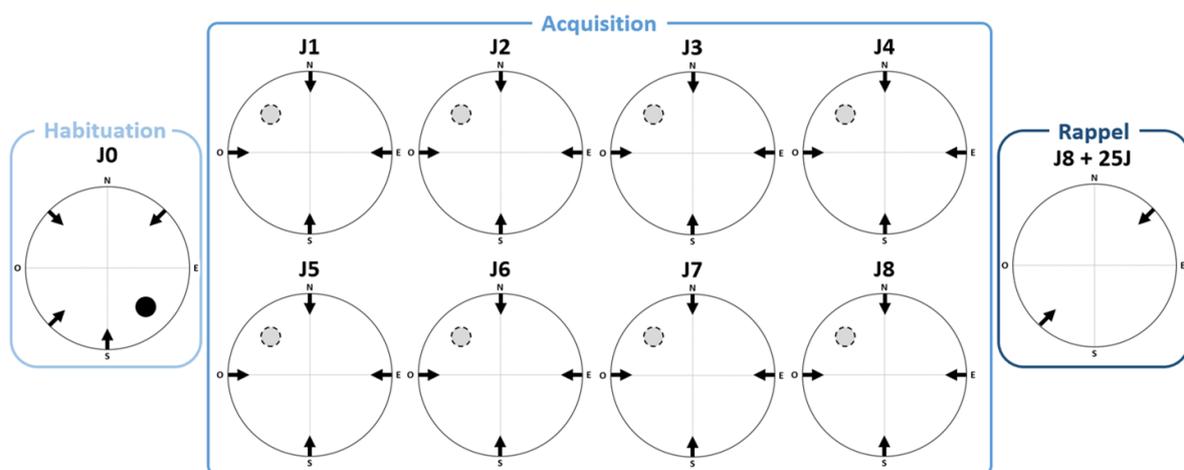


Figure 23. Protocole de piscine de Morris

Habituation : 4 essais, plateforme visible

Acquisition : 4 essais par jour pendant 8 jours, plateforme dans quadrant NO, immergée et rendue invisible par l'opacification de l'eau.

Rappel : 25 jours après la fin de l'acquisition, 1 seul essai, pas de plateforme, départ du NE ou du SO

→ : point de départ

● : plateforme visible

● (gris) : plateforme invisible

La phase de **rappel** a lieu 25 jours plus tard (**Figure 23**). Elle est constituée d'un unique essai de 60 secondes, dont le point de départ est le NE ou le SO, en fonction des rats. La plateforme est retirée du dispositif. Le but est d'évaluer la capacité des rats à rappeler la localisation de la plateforme après un long délai pour étudier leur mémoire spatiale à long terme ancienne. Le principal paramètre mesuré pendant le rappel est le temps passé dans chaque quadrant, ce qui nous permet d'inférer sur la capacité du rat à se rappeler de la localisation de la plateforme. En effet, si l'animal passe significativement plus de temps que le hasard (donc plus de 15 secondes, 25% du temps total) dans le quadrant où se trouvait effectivement la plateforme pendant l'acquisition (NO, nommé quadrant-cible), il est jugé comme étant

capable de rappeler la localisation de la plateforme. Si ce n'est pas le cas, le rat est considéré comme nageant aléatoirement dans la piscine, révélant qu'il ne se souvient pas de la position de la plateforme.

3. L'Object-in-place

a. Principe

La tâche d'*Object-In-Place* (**OIP**), décrite pour la première fois par [Dix et Aggleton \(1999\)](#), est utilisée pour évaluer la mémoire d'association entre l'identité d'un objet et sa position dans l'espace, et repose sur la propension des rongeurs à explorer la nouveauté. Étant basée sur cette tendance naturelle, cette tâche ne requiert pas de motivateurs externes susceptibles de générer du stress, tels que la restriction alimentaire ou hydrique, ou encore l'exposition à l'eau fraîche comme c'est le cas dans nos labyrinthes aquatiques. C'est donc une tâche évaluant la mémoire de façon beaucoup plus écologique pour le rat. Dans ce cadre, les animaux commencent par explorer spontanément quatre objets disposés à quatre emplacements. Ensuite, après un délai variable, deux des quatre objets sont échangés de place. Dans ce cas, les quatre objets sont connus et les quatre emplacements aussi. La nouveauté réside dans l'association de certains objets avec leur nouvelle position. Si les rats se souviennent de l'association objet-place précédente, ils devraient identifier quels objets ont changé de place. Compte tenu de leur propension à explorer la nouveauté, ils devraient donc explorer davantage les objets ayant changé de place que les deux autres.

b. Dispositif

La tâche d'*Object-in-Place* a lieu dans un champ ouvert carré de 64 x 64 cm, au sein duquel pourront être disposés les objets. L'enceinte est entourée de quatre parois verticales en bois de 43,5 cm de hauteur, sur lesquelles sont disposés 3 indices visuels proximaux de forme et de couleur différentes (**Figure 24**). Le champ ouvert est divisé en quatre quadrants nommés A, B, C, D. La luminosité est de 90 lux au centre du dispositif.

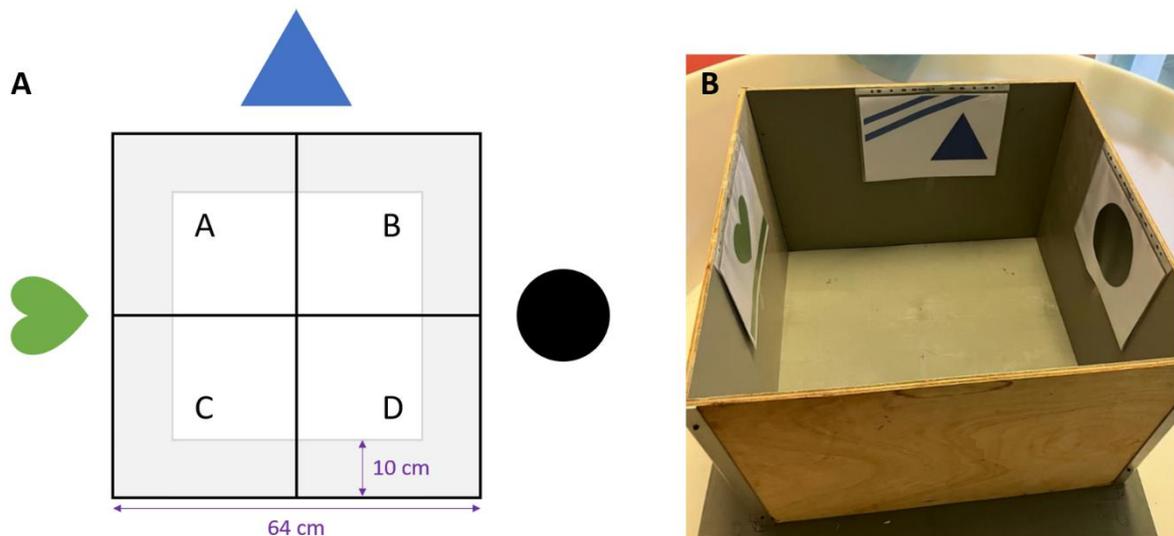


Figure 24. Object-in-Place

A. Schéma du champ ouvert utilisé pour la tâche d'*Object-in-Place* en vue supérieure. Les quadrants virtuels sont nommés A, B, C et D, et identifiés grâce aux indices. La zone grisée correspond à la zone de thigmotaxie. Les dimensions sont ajoutées en violet.

B. Photographie du champ ouvert utilisé pour la tâche d'*Object-in-Place* avec les formes géométriques utilisées comme indices. Collection personnelle

Les quatre objets utilisés sont disponibles en deux exemplaires, afin de ne pas prendre les mêmes objets pour la phase d'échantillonnage et la phase de test. Il s'agit (1) d'une boîte en plastique jaune de 16 cm de hauteur, remplie de sable fin ; (2) d'un vase en céramique vert d'eau en forme de sablier avec un couvercle blanc, le tout d'une hauteur de 20 cm et rempli de sable fin ; (3) d'un grand bocal "Le Parfait®" en verre de 17 cm de haut et rempli de cailloux gris ; (4) d'une tasse en verre transparente avec un couvercle vert, le tout d'une hauteur de 12 cm et rempli de gravillons blancs (**Figure 25**).

Une caméra (Webcam 1080P Full HD, Anvaskeu) est installée directement au-dessus du centre du champ ouvert. Elle est connectée à un ordinateur équipé du logiciel ANY-maze® (Stoelting, Dublin) permettant de mesurer de nombreux paramètres tels que le temps passé dans les différentes zones ou la vitesse de déplacement. Le temps passé à explorer chaque objet, défini par la proximité du museau avec l'objet et le mouvement des vibrisses, est scoré à la main par l'expérimentateur.

Les parois et le sol du champ ouvert, ainsi que les objets sont nettoyés à l'éthanol 70% avant et après le protocole entier.

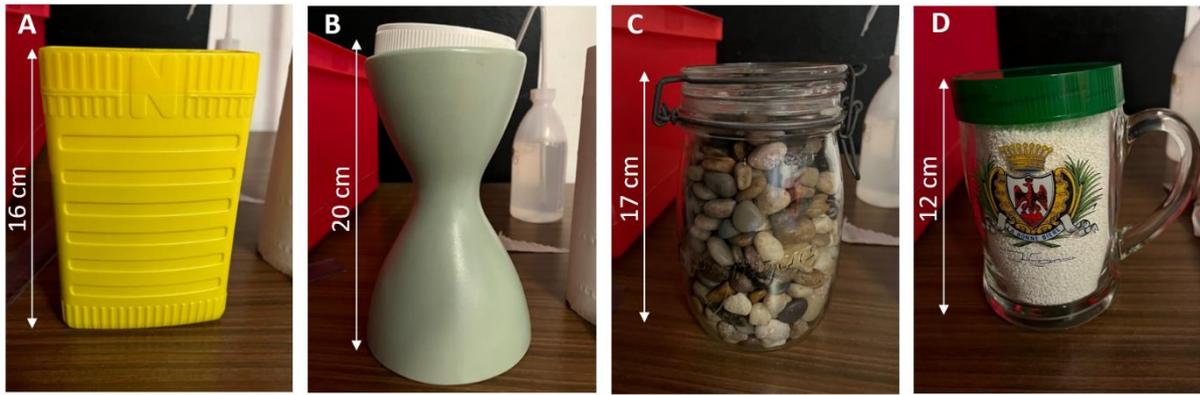


Figure 25. Objets utilisés pour la tâche d'Object-in-Place

Photographies illustrant les quatre objets utilisés pour la tâche d'Object-in-Place. Les dimensions sont inscrites en blanc. Collection personnelle

- A. Boîte de Nesquik® en plastique jaune, remplie de sable fin
- B. Vase en céramique vert d'eau en forme de sablier avec couvercle blanc, rempli de sable fin
- C. Grand Bocal « Le Parfait® » en verre, rempli de cailloux gris
- D. Tasse en verre transparente avec un couvercle vert, remplie de gravillons blancs.

c. Protocole

La tâche d'Object-in-Place peut être réalisée de plusieurs manières. Le protocole décrit ci-dessous est le même que celui de [Barker et Warburton \(2018\)](#) avec un délai de 3 heures, car c'est avec ce protocole qu'a été montrée l'implication des ReRh dans cette tâche.

Pendant toute la durée de l'expérience, les rats sont stabulés dans leur pièce habituelle et sont déplacés dans la salle expérimentale 15 minutes avant le début du protocole, chaque matin.

Les trois premiers jours correspondent à la phase d'**habituat**ion ([Figure 26](#)) pendant lesquels chaque rat est placé dans le champ ouvert vide (sans objet) pendant 10 minutes. Il est placé au centre de l'enceinte, l'orientation de son museau vers une des parois est aléatoire. Cette première phase permet aux animaux de s'habituer au dispositif et de l'explorer, ainsi que de mémoriser les indices spatiaux. Cette étape permet également de s'assurer qu'il n'y a pas de déficit locomoteur, ni de biais de préférence pour l'un des quadrants, qui pourrait biaiser nos conclusions à propos de l'exploration des objets.

Le temps passé dans chaque quadrant ainsi que la thigmotaxie, le fait de se déplacer à moins de 10 cm du bord du dispositif, sont mesurés. Ce dernier paramètre est un indicateur de comportement de type anxieux, sa diminution au cours des essais d'habituat

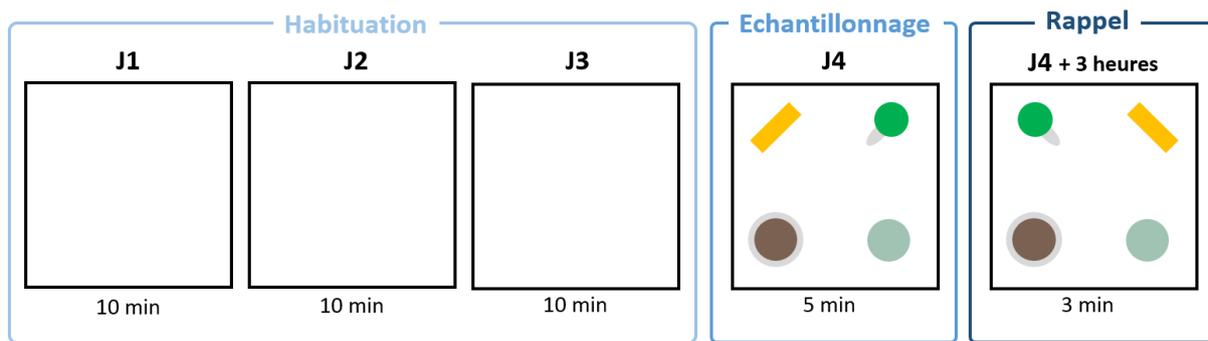


Figure 26. Protocole d'Object in Place

Habituation : 1 session de 10 minutes par jour pendant 3 jours dans le champ ouvert vide

Echantillonnage : 1 session de 5 minutes pendant lesquelles l'animal peut explorer les quatre objets placés dans le champ ouvert.

Rappel : 3 heures après la fin de l'échantillonnage, 1 session de 3 minutes pendant lesquelles l'animal peut explorer les objets placés dans le champ ouvert (deux des quatre objets ont été échangés)

-  : Boîte en plastique jaune
-  : Tasse en verre avec couvercle vert
-  : Bocal en verre rempli de cailloux
-  : Vase en céramique rempli de sable

Le quatrième jour débute la phase d'**échantillonnage** (Figure 26). Les quatre objets sont disposés à 14 cm des coins du champ ouvert. La position des objets dans les différents quadrants est déterminée de façon aléatoire entre les rats. L'animal est déposé au centre de l'enceinte, l'orientation de son museau vers une des parois est également aléatoire. Le rat explore librement les objets pendant 5 minutes. Le temps d'exploration de chaque objet est le principal paramètre mesuré pendant cette phase.

La phase de **rappel** a lieu 3 heures plus tard (Figure 26). La réplique des quatre objets utilisés lors de l'échantillonnage est placée dans le dispositif, mais cette fois-ci, la position de deux des quatre objets a été échangée. Dans notre cas, c'est toujours les deux mêmes objets qui ont été déplacés (la boîte et la tasse) puisqu'une expérience pilote précédente a montré un biais de préférence pour le vase et le bocal. Le rat explore librement les objets pendant 3 minutes. Le temps d'exploration de chaque objet est le principal paramètre mesuré pendant cette phase. C'est la différence de temps d'exploration entre les objets déplacés et les objets non déplacés qui est révélatrice de la mémoire d'association objet-place. C'est pourquoi nous calculons un indice de discrimination grâce à la formule suivante :

$$\frac{\text{temps } (OD) - \text{temps } (OND)}{\text{temps total}}$$

A la fin de chaque session, le rat est cherché par l'expérimentateur et replacé dans sa cage de stabulation. Le dispositif et les objets sont nettoyés à l'eau déminéralisée entre chaque essai afin d'uniformiser au mieux les informations olfactives avant le passage du rat

suivant. L'expérimentateur touche la totalité de la surface des objets afin que son odeur y soit répartie de façon homogène.

4. Le Double-H

a. Principe

Le labyrinthe en Double-H est un labyrinthe aquatique conçu dans notre équipe (Pol-Bodetto et al., 2011) qui exploite l'aversion des rats pour l'eau fraîche, les motivant ainsi à rejoindre une plateforme immergée et invisible, leur seule échappatoire. Ainsi, cette tâche repose sur un apprentissage itératif lors duquel les rats vont apprendre à rejoindre cette plateforme de plus en plus efficacement, puis sur la réalisation d'un test de rappel permettant d'évaluer leurs performances.

La particularité de ce labyrinthe repose sur la présence d'intersections, ce qui permet à l'expérimentateur d'étudier plus facilement les décisions prises lors de ces points d'intérêt, en comparaison à la piscine de Morris, par exemple. Il est également possible de manipuler le protocole (points de départ et d'arrivée fixes ou variables) pour favoriser la mise en œuvre par l'animal d'une certaine stratégie de navigation, permettant ainsi d'étudier des processus cognitifs différents.

Dans cette étude, nous utilisons ce labyrinthe pour évaluer la flexibilité comportementale dans un contexte spatial. Nous commençons par entraîner les rats à naviguer dans ce labyrinthe en utilisant leur propre corps comme repère ; leur stratégie est dite égocentrique. Une fois habitués à cette stratégie, une modification de la tâche leur impose de se repérer grâce aux indices spatiaux présents dans la pièce, donc d'utiliser une stratégie allocentrique. Cette capacité à changer de stratégie révèle la flexibilité cognitive.

b. Dispositif

Le labyrinthe en Double-H est un dispositif en plexiglas ressemblant à deux lettres "H" adjacentes (Figure 27A). En effet, il est composé d'une allée centrale horizontale, de laquelle partent 6 bras perpendiculaires, 3 vers le haut et 3 vers le bas. Ces bras sont nommés en fonction des points cardinaux, le bras du milieu partant vers le haut étant appelé "N" pour

Nord, et le bras du milieu partant vers le bas étant appelé "S" pour Sud. Les deux bras à gauche, correspondant donc à l'ouest du dispositif sont appelés respectivement "NO" et "SO".

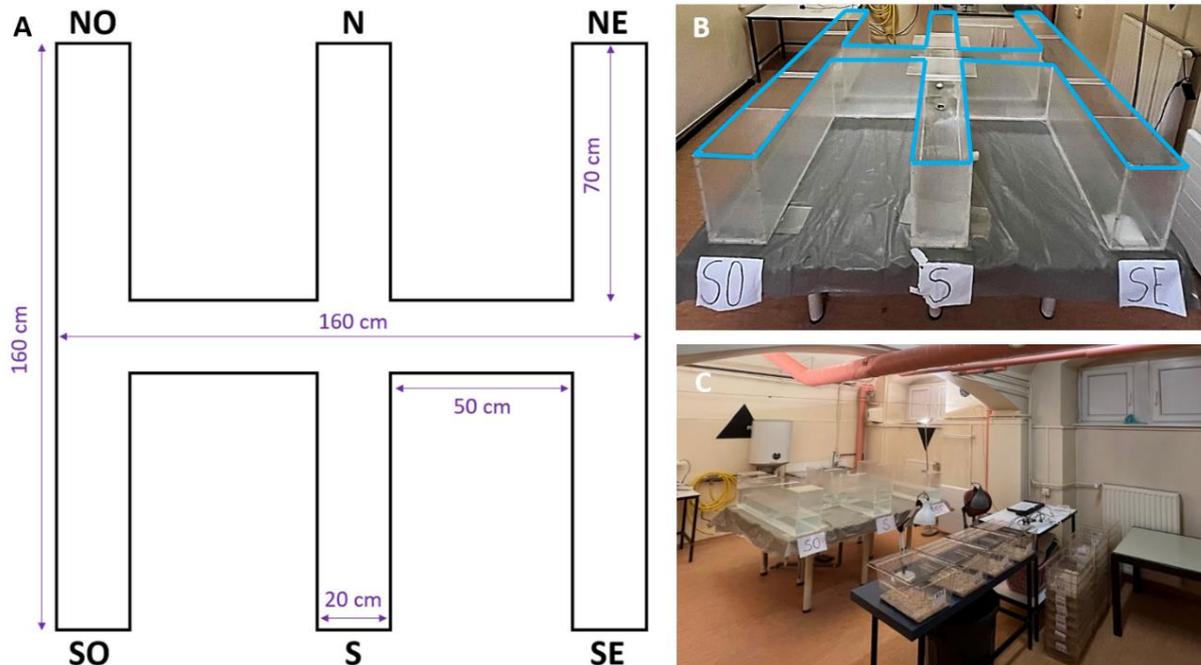


Figure 27. Le Double-H

A. Schéma du labyrinthe en Double-H en vue supérieure. Les bras sont nommés en fonction des points cardinaux. Les dimensions sont ajoutées en violet.

B. Photographie du labyrinthe en Double-H en vue supérieure. Les arêtes supérieures ont été redessinées en bleu pour plus de visibilité. Collection personnelle.

C. Photographie du dispositif dans la salle de test, avec des indices distaux sur les murs. Collection personnelle.

Les deux bras à droite, donc à l'est, sont appelés "NE" et "SE". L'allée centrale mesure 160 cm de long et 20 cm de large, tandis que chacun des bras mesure 70 cm de long et 20 cm de large. La hauteur des parois est de 35 cm. Le dispositif est placé sur une table à 78 cm du sol, dans une pièce dédiée comprenant de nombreux indices distaux fixes (formes géométriques contrastées sur les murs, évier, fenêtres, sources de lumières et de bruit, ...), visibles depuis l'intérieur du labyrinthe puisque les parois sont en plexiglas transparent (**Figure 27B et C**). La luminosité est de 200 lux au centre du Double-H et est homogène à 180 lux à chaque extrémité (N, S, O, E). Lors des tâches comportementales, le labyrinthe est rempli d'eau fraîche ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) sur une hauteur de 17 cm, qui est opacifiée pendant les phases d'acquisition et de rappel par 180g de Blanc de Meudon (Bostik®) pour que la plateforme ne soit plus distinguable par transparence. Les rats peuvent se soustraire à la fraîcheur de l'eau grâce à une plateforme circulaire de 10 cm de diamètre et 15 cm de hauteur.

Une caméra (Webcam 1080P Full HD, Anvaskeu) est installée directement au-dessus du centre de la piscine. Elle est connectée à un ordinateur équipé du logiciel ANY-maze® (Stoelting, Dublin) permettant de mesurer de nombreux paramètres tels que la distance parcourue, la latence d'atteinte de la plateforme, la vitesse de nage, le temps passé dans les différentes zones.

c. Protocole

Le labyrinthe en Double-H peut être utilisé pour évaluer plusieurs fonctions, mais le protocole décrit ci-dessous est celui de [Cholvin et al. \(2013\)](#) permettant d'étudier la flexibilité comportementale-

Les rats sont stabulés dans la pièce de Double-H dès la veille du début de l'expérience afin qu'ils s'acclimatent à ce nouvel environnement.

Le premier jour est le jour d'**habituat**ion (**Figure 28**), pendant lequel les rats effectuent 4 essais successifs espacés de 15 secondes et d'une durée de 60 secondes maximum. Le départ a lieu dans le bras NO (le rat est toujours lâché face à la paroi) et la plateforme est située dans le bras SO. Seuls ces deux bras sont accessibles puisque le reste du labyrinthe est fermé à l'aide d'une porte. Cette première phase permet d'habituer les animaux au dispositif et au fait d'être placés dans l'eau, ainsi que de leur faire comprendre qu'il existe une échappatoire pour sortir. Pour cela, pendant ces essais, l'eau n'est pas opacifiée, la plateforme émerge environ 2 cm au-dessus de l'eau et sa visibilité est accentuée par un disque noir. Cette étape permet également de s'assurer qu'il n'y a pas de déficit visuel, locomoteur ou sensori-moteur, ni motivationnel, qui pourraient biaiser nos conclusions à propos de la flexibilité cognitive. L'essai se termine lorsque le rat trouve la plateforme, il est cherché par l'expérimentateur quelques secondes plus tard. S'il ne la trouve pas, il y est guidé par l'expérimentateur. La latence d'atteinte de la plateforme ainsi que la distance parcourue sont les principaux paramètres mesurés.

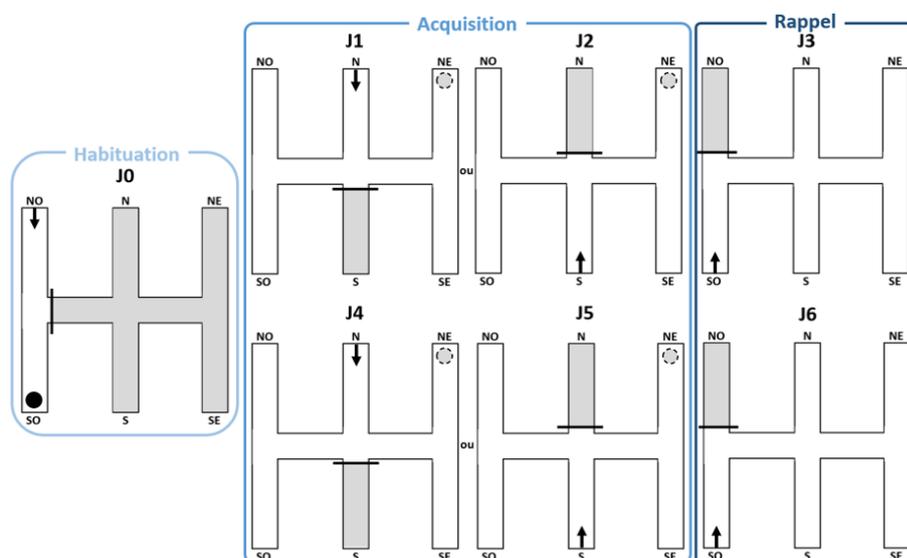


Figure 28. Protocole de Double H

Habituation : 4 essais, plateforme visible

Acquisition : 4 essais par jour pendant 2 jours, plateforme dans bras NE, immergée et rendue invisible par l'opacification de l'eau, départ du N ou du S.

Rappel : 24h après la fin de l'acquisition, 1 seul essai, pas de plateforme, départ du SO

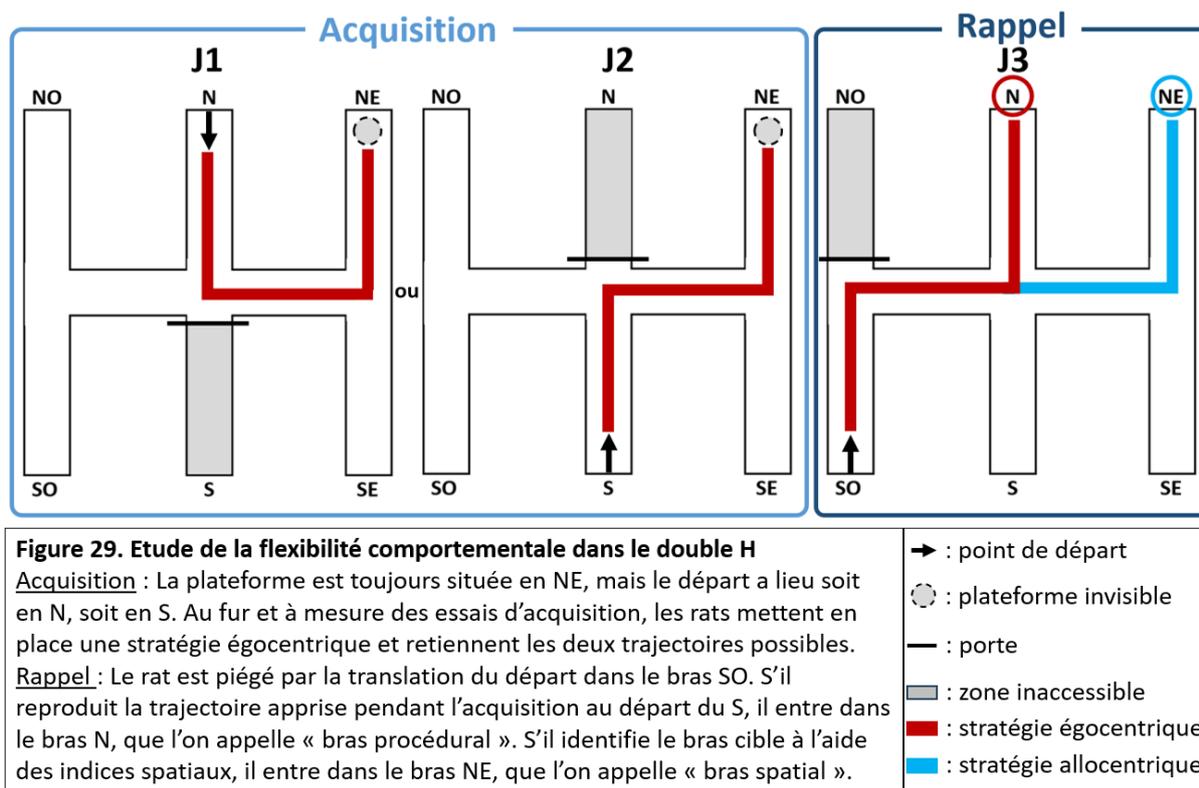
Puis le protocole se poursuit avec 2 jours d'acquisition et 1 deuxième test de rappel

- ➔ : point de départ
- : plateforme visible
- ⊙ : plateforme invisible
- : porte
- : zone inaccessible

La phase d'**acquisition** a lieu pendant les deux jours suivants (**Figure 28**). Elle est également constituée de 4 essais par jour d'une durée de 60 secondes maximum. Cette fois-ci l'eau est opacifiée par l'ajout de Blanc de Meudon (Bostik®) et la plateforme est immergée 2 cm sous la surface de l'eau, la rendant invisible (le disque noir est retiré). Cette phase ayant pour but d'apprendre la localisation de la plateforme aux rats, celle-ci se trouve toujours dans le même bras, à savoir le bras NE. Il n'y a que deux bras de départ différents, N et S, en alternance, ce qui favorise l'apprentissage égocentrique puisque les rats ne suivent que deux trajectoires différentes : gauche-gauche au départ du N et droite-gauche au départ du S. Le bras face au bras de départ est fermé par une porte, rendant ainsi impossible l'entrée dans le bras N lorsque le départ se fait en S, et réciproquement. Afin de ne pas introduire de biais, il est important qu'il y ait autant de départs du N que du S, et que l'ordre soit pseudo-randomisé entre les sessions (dans notre cas, l'ordre de départ au cours des 4 sessions d'apprentissage est le suivant : NSSN, SNSN, SNNS, NSNS). Tout comme pour l'habituation, l'essai se termine lorsque le rat trouve la plateforme, il est cherché par l'expérimentateur quelques secondes plus tard. S'il ne la trouve pas, il y est guidé par la main de l'expérimentateur.

La latence d'atteinte de la plateforme ainsi que la distance parcourue sont les principaux paramètres mesurés.

La phase de **rappel** a lieu 24h plus tard (**Figure 28**). Elle est constituée d'un unique essai de 60 secondes. Le but étant d'évaluer la capacité des rats à changer de stratégie, l'eau est opacifiée mais il n'y a pas de plateforme dans le dispositif. Pendant cet essai, le départ a lieu dans le bras SO (le bras NO est donc condamné), ce qui correspond à une translation de 70 cm par rapport au bras S, qui était un des points de lâcher lors de l'acquisition (**Figure 29**). Cette modification du point de départ permet de mettre en évidence la stratégie adoptée en première intention par le rat.



Ainsi, **Cholvin et al. (2013)** ont montré que la majorité des rats sont piégés par cette translation et qu'ils reproduisent la trajectoire apprise pendant les essais d'acquisition au départ du S, c'est-à-dire droite-gauche. Ils arrivent alors dans le bras N, que l'on nomme "bras procédural". C'est à ce moment que nous pouvons faire la distinction entre les rats capables de faire preuve de flexibilité cognitive, qui vont passer de la stratégie égocentrique à la stratégie allocentrique et ainsi identifier le bras cible en utilisant les indices spatiaux. Si tel est le cas, ils sont capables de rejoindre le bras NE, que l'on nomme "bras spatial", et d'insister sur la recherche de la plateforme dans ce bras (**Figure 30A**). Si ce n'est pas le cas, ils naviguent dans le labyrinthe de façon aléatoire (**Figure 30B**). C'est pour cette raison que les principaux paramètres mesurés

pendant le rappel sont les temps passés dans chacun des bras du dispositif, ainsi que la succession des zones visitées.

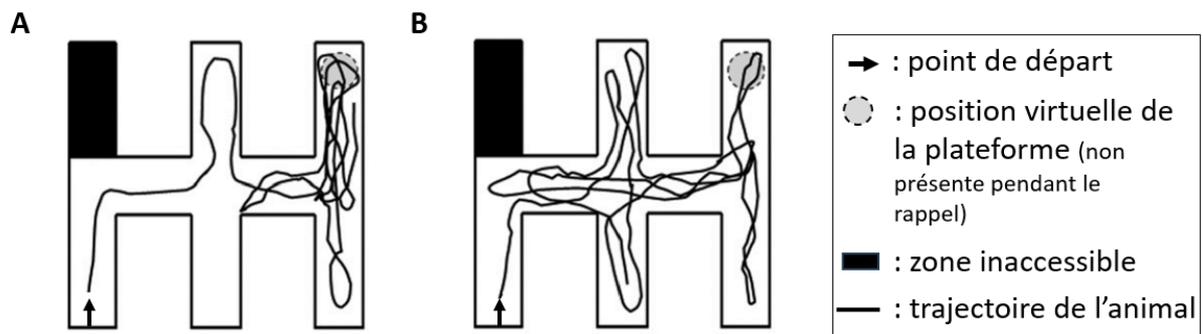


Figure 30. Résultats des précédents travaux de l'équipe

Figures issues de l'article de Cholvin et al., 2013, représentant les trajectoires de deux rats lors du test de rappel en Double H au jour 9. Dans cet article, les auteurs montrent que la translation du point de départ piège la majorité des rats et commencent par mettre en œuvre une stratégie égocentrique et entrent en premier lieu dans le bras N. Il est ensuite possible de faire la distinction entre :

- A. Les rats capables de flexibilité comportementale : bien qu'ils entrent en premier dans le bras N, ils passent ensuite d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique, ce qui leur permet d'identifier le bras cible NE et d'y insister plus longtemps.
- B. Les rats incapables de flexibilité comportementale : ils entrent en premier dans le bras N, puis n'arrivent pas à changer de stratégie, ils n'identifient pas le bras NE comme étant le bras cible, mais naviguent dans l'ensemble du labyrinthe au hasard.

Le protocole se poursuit par deux nouveaux jours d'entraînement, puis par une deuxième phase de rappel 24h plus tard, dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 28).

Tout au long du protocole, après chaque passage, le rat est d'abord frictionné dans une serviette puis placé dans une cage individuelle sous une lampe chauffante jusqu'à ce qu'il soit sec (environ 30 minutes), avant d'être replacé dans sa cage de stabulation.

IV. Techniques histologiques et immunohistochimiques

1. Mise à mort et prélèvement des cerveaux

Lorsque des tests comportementaux ont été réalisés (expériences 4 et 5), la mise à mort a lieu 90 minutes après le test de rappel, afin d'être compatible avec une étude de l'activité neuronale par immunomarquage de la protéine c-Fos. Autrement (expériences 1 à

3), elle a lieu 4 à 5 semaines après les injections chirurgicales des virus, afin de permettre leur transport et l'expression de leur matériel génétique. La mise à mort est réalisée par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (**PAF**), permettant ainsi de fixer les tissus. Pour cela, les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de Kétamine (Kétamine™ 1000, Virbac France, 200 mg/kg, anesthésiant) et Xylazine (Rompun™ 2%, Elanco, 30 mg/kg, analgésique). Après avoir vérifié la profondeur de l'anesthésie par absence totale du réflexe de retrait de la patte lors d'une stimulation nociceptive de pincement, la cage thoracique des animaux est ouverte par thoracotomie. L'aiguille est insérée à l'apex du ventricule gauche et l'oreillette droite est incisée. L'aorte descendante est clampée afin d'empêcher la circulation des solutions dans la partie inférieure du corps de l'animal. Une solution de NaCl (0,9%) est alors perfusée grâce à une pompe péristaltique pendant 5 min (débit de 10 mL/min) afin de nettoyer les vaisseaux, suivie d'une solution de PAF (4%) à 4°C pendant 15 min, pour fixer les tissus. Les rats sont ensuite décapités, leur cerveau est extrait de la boîte crânienne, puis placé dans du PAF à 4% pendant 2 heures pour une post-fixation. Il est ensuite immergé dans une solution de D-saccharose à 30% pendant 48h, à 4°C, pour être cryoprotégé. Enfin, les cerveaux sont congelés par immersion dans l'isopentane à -35°C pendant 1 min et conservés au congélateur à -80°C jusqu'à ce qu'ils soient coupés.

2. Coupes coronales au cryostat

Le cerveau congelé est coupé au cryostat (Leica® CM3050 S). Les coupes coronales de 40 µm d'épaisseur sont réalisées du CPFm jusqu'à l'hippocampe ventral, en passant par le striatum, les ReRh et l'hippocampe dorsal. Pour chaque structure, les coupes sont récupérées en série et réparties dans 8 puits, conservées sous forme flottante dans un milieu cryoprotecteur (composé d'une solution tampon, d'éthylène glycol et de glycérol). Elles sont ensuite placées au congélateur à -20°C dans l'attente d'être utilisées pour des immunomarquages.

3. Immunomarquages

a. Principe

Les techniques d'immunomarquage permettent la détection, la visualisation et la localisation d'une protéine. Elles reposent sur les propriétés naturelles des anticorps,

initialement produits par le système immunitaire adaptatif, et en particulier sur leur affinité, à la fois très forte et très spécifique, pour leur antigène. Ainsi, il est possible d'induire artificiellement la production d'anticorps ciblant une protéine d'intérêt. Lorsque cet anticorps entre en contact avec l'antigène-cible, il le reconnaît et s'y fixe de façon stable et spécifique. Comme l'anticorps peut être modifié afin d'être visualisable, cette technique permet de localiser l'antigène avec une bonne résolution spatiale.

Lorsque ce procédé est appliqué sur des tissus comme des coupes de cerveau par exemple, il s'agit d'immunohistomarquages, en opposition aux immunocytomarquages qui se font à l'échelle cellulaire.

Afin de visualiser l'anticorps, et donc l'antigène, il est possible de le coupler à un fluorochrome, on parle alors d'immunohistofluorescence ; ou encore à une enzyme catalysant ensuite une réaction chimique dont le produit est un précipité coloré, on parle d'immunohistochimie. Il est également possible de ne pas coupler le marqueur directement sur l'anticorps reconnaissant l'antigène d'intérêt, qui est alors appelé **anticorps primaire**, mais de le coupler à un deuxième anticorps qui reconnaît spécifiquement l'anticorps primaire et que l'on appelle donc **anticorps secondaire**. On parle dans ce cas d'un immunomarquage indirect, ce qui entraîne également une amplification du signal.

Dans notre cas, nous avons réalisé des marquages immunohistofluorescents ou immunohistochimiques sur les coupes de cerveau de rat mentionnées précédemment (voir **2. Coupes coronales au cryostat**).

b. Protocole

Deux des huit puits prélevés lors de la coupe de la structure sont récupérés, offrant plus d'une dizaine de coupes par rat, réparties de façon uniforme le long de l'axe antéro-postérieur de la structure. Ces sections sont ensuite distribuées dans quatre nouveaux puits, afin de limiter leur densité lors des différents bains.

Les coupes sont lavées par 3 bains successifs de tampon phosphate salin (**PBS** pour *Phosphate Buffer Saline*) de 10 min chacun, afin d'éliminer le milieu cryoprotectant. Elles sont ensuite incubées pendant 1 heure dans une solution de sérum (sérum de cheval, 5% dans le diluant, une solution de PBS supplémentée de Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) perméabilisant les membranes). Le sérum étant très riche en protéines, cette étape permet de bloquer les sites aspécifiques favorisant la spécificité de la liaison de l'anticorps à son antigène. Les coupes

sont ensuite incubées dans la solution d'anticorps primaires (dont la concentration varie, **Tableau 2**) jusqu'au lendemain matin. Puis les coupes sont à nouveau rincées par 3 bains successifs de PBS afin d'éliminer tout résidu d'anticorps primaires qui ne serait pas lié à un antigène. La suite du protocole dépend de la technique de visualisation des anticorps.

Dans le cas d'immunofluorescence, les coupes sont ensuite incubées pendant 2h et à l'obscurité dans la solution d'anticorps secondaires, dirigés contre les hôtes des anticorps primaires correspondants, et couplés à un fluorochrome (**Tableau 2**). Le protocole se termine avec 3 nouveaux bains de PBS afin d'éliminer les résidus d'anticorps secondaires. Du **DAPI** (4',6-diamidino-2-phénylindole), une molécule fluorescente liant spécifiquement l'ADN, est ajoutée dans le deuxième rinçage de PBS (à une concentration de 1/2000) afin de mettre en évidence les noyaux des cellules. Les coupes sont alors montées sur des lames gélatinées, séchées, rincées à l'eau ultrapure et incluses sous une lamelle dans un milieu de montage (Mowiol®, Sigma Aldrich) adapté à l'observation de la fluorescence. Les lames sont conservées à l'obscurité et au réfrigérateur à 4°C afin de limiter le photoblanchiment.

Dans le cas d'une immunohistochimie, les coupes sont incubées dans la solution d'anticorps secondaires, qui sont biotinylés (**Tableau 2**), pendant seulement 1h. Le protocole se poursuit par 3 rinçages au PBS afin d'éliminer les résidus d'anticorps secondaires. Les coupes sont ensuite incubées pendant 45 min et à l'obscurité dans le réactif ABC (ABC Peroxidase Staining kit, Thermo Scientific™), contenant d'une part la peroxydase de raifort (**HRP** pour *horseradish peroxidase*) biotinylée, et d'autre part l'avidine, une protéine présente dans le blanc d'œuf et qui a une très forte affinité avec la biotine. L'avidine va alors se lier à la fois à la biotine présente sur l'anticorps et à la biotine présente sur la peroxydase, rendant l'anticorps secondaire "couplé" indirectement à la peroxydase. Les coupes sont ensuite rincées 2 fois dans du PBS. Les ions phosphate du PBS peuvent interagir de façon inappropriée dans la réaction de révélation. Pour empêcher cela, le protocole se poursuit par un lavage dans du tampon TRIS, dépourvu d'ion phosphate, permettant ainsi de réduire le bruit de fond du marquage. Les coupes sont ensuite mises en présence de la solution de révélation (DAB substrate kit, peroxidase, Vector laboratories), contenant 25% de tampon, 25% de peroxyde d'hydrogène et 50% de **DAB** (3,3'-diaminobenzidine), jusqu'à apparition et stabilisation d'une coloration (environ 14 min dans notre cas). Ce précipité marron est le produit de la réaction de la DAB avec l'HRP, cette dernière étant liée à l'anticorps secondaire, la coloration permet de visualiser la localisation de l'anticorps et donc de la protéine d'intérêt. Après 3 derniers

lavages au PBS, les coupes sont montées sur lames gélatinées, séchées, progressivement déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante puis plongées dans du solvant (Diasolv, DiaPath®) et enfin incluses sous une lamelle dans un milieu de montage (Diamount, DiaPath®). Les lames doivent sécher au moins 48h avant d'être observées.

Pour l'ensemble de ce protocole, les incubations sont faites à température ambiante et sous agitation.

Tableau 2. Récapitulatif des anticorps utilisés pour les immunomarquages

Antigène ciblé	Espèce hôte	Expérience concernée	Source	Référence	Conjugaison	Dilution
Calrétinine	Souris	1, 5	Swant	6B3	Aucune	1/8000 (Exp 1) ou 1/1000 (Exp 5)
GFP	Lapin	1, 4	Invitrogen	A21311	Alexa Fluor 488	1/500
DsRed	Lapin	1, 5	Takara	632496	Aucune	1/1000
NeuN	Souris	1, 3, 4	Millipore	ABN78	Aucune	1/1000
	Lapin	1	Millipore	MAB377	Aucune	1/1000
cFos	Lapin	4	Synaptic Systems	226003	Aucune	1/2000
	Cochon d'inde	5	Synaptic Systems	226308	Aucune	1/1000
Lapin	Ane	1, 5	Invitrogen	A21207	Alexa Fluor 594	1/1000
	Ane	1	Invitrogen	A21206	Alexa Fluor 488	1/1000
	Chèvre	4	Vector Laboratories	BA-1000	Biotine	1/500
Souris	Ane	1, 3, 4	Invitrogen	A21203	Alexa Fluor 594	1/1000
	Chèvre	1	Invitrogen	A32723	Alexa Fluor 488	1/1000
	Chèvre	5	Invitrogen	A11045	Alexa Fluor 350	1/500
Cochon d'inde	Chèvre	5	Abcam	AB150185	Alexa Fluor 488	1/1000

Les anticorps utilisés dans l'expérience 2 sont indiqués dans l'article (Panzer et al., 2024).

c. Applications

Le protocole d'immunohistomarquage a été appliqué à de multiples reprises dans ce travail de thèse, afin de révéler différentes protéines, en fonction de divers objectifs.

Les anticorps dirigés contre la GFP ou encore la DsRed (protéine naturelle à partir de laquelle son variant, la mCherry, a été développé, tout en conservant des épitopes similaires), sont utilisés pour l'amplification des virus utilisant la GFP ou la mCherry comme gènes rapporteurs. Bien que ces protéines soient constitutivement fluorescentes,

l'immunomarquage permet d'intensifier leur signal afin de les visualiser même si elles sont présentes en faible quantité. La visualisation des protéines rapportrices des virus est indispensable pour étudier les régions ou cellules infectées.

Les anticorps dirigés contre la protéine **NeuN** (Neuronal Nuclear), la calrétinine (**calR**), la calbindine (**calB**) ou encore la β -tubuline-III sont utilisés pour marquer spécifiquement les neurones. En effet, la protéine NeuN est spécifique du noyau des neurones (Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015), la calR et la calB sont des protéines cytoplasmiques liant le calcium, particulièrement présentes dans les neurones de la ligne médiane du thalamus (Arai et al., 1994), et la β -tubuline-III est un composant des microtubules, exclusivement présent dans les neurones (Sullivan, 1988). Ces différents immunomarquages servent, par exemple, à identifier les structures cérébrales par des différences de densités neuronales observées grâce au NeuN. La localisation de la calR et/ou de la calB facilite la délimitation précise de nos noyaux thalamiques d'intérêt, à savoir les ReRh. Enfin, ces marquages ont été réalisés pour évaluer l'intégrité de la densité neuronale ou, à l'inverse, détecter une éventuelle perte de neurones causée par la toxicité d'un virus (expériences 2 et 3).

Les anticorps dirigés contre **Iba1** (pour *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1*) et contre la **GFAP** (Protéine d'acides fibrillaires gliales) sont utilisés comme marqueurs de cellules gliales, respectivement les microglies (Ahmed et al., 2007) et les astrocytes (McLendon and Bigner, 1994). Cela permet de mettre en évidence une neuroinflammation ou encore une cicatrice gliale par exemple.

Les anticorps dirigés contre la protéine c-Fos sont utilisés pour mettre en évidence l'activité neuronale (Bullitt, 1990). En effet, cette protéine étant codée par un gène de réponse précoce, elle est l'un des premiers facteurs de transcription à être exprimé lors de l'activation de la cellule. Le marquage de cette protéine permet donc d'identifier les neurones activés 90 min avant la fixation du cerveau, le moment du deuxième test de rappel de Double-H dans notre cas.

V. Acquisition des images

Les lames obtenues après les immunomarquages sont observées une fois sèches, puis photographiées, car il est préférable de travailler à partir d'images plutôt que directement sur les lames, notamment pour l'observation de la fluorescence. Pour une même quantification,

l'intensité lumineuse et le temps d'exposition de chacun des fluorochromes sont déterminés en fonction de l'image présentant le signal le plus intense, afin d'éviter toute surexposition. Ces paramètres sont identiques pour tous les animaux et donc pour tous les groupes, sauf lorsque les conditions l'empêchent, par exemple lors de l'utilisation de virus différents, entraînant une variation de l'intensité de fluorescence.

Certaines images ont été prises au microscope optique à épifluorescence Axio Imager (Zeiss®), à différents grossissements (x2.5, x10, x20, x40) et avec les filtres correspondant aux fluorochromes utilisés. Ce microscope est équipé d'un contrôle motorisé x-y-z et d'un module ApoTome, qui permet d'atteindre une précision proche de celle d'un microscope confocal, en utilisant le principe de l'illumination structurée. Les images sont alors réalisées avec le logiciel Zen (Zeiss®), grâce auquel on peut faire des mosaïques, si besoin, par exemple pour photographier une coupe entière mais avec un grossissement qui ne le permet pas en une seule image.

D'autres images ont été prises avec un Nanozoomer (Hamamatsu®) et le logiciel NDP Scan, un scanner de lames à épifluorescence, au grossissement x20 et en fond clair pour les marquages c-Fos, ou x40 et avec les filtres adaptés au fluorochromes utilisés pour les immunohistofluorescences. La mise au point est faite de façon automatique sur l'image de lame en fond clair.

VI. Quantifications

L'ensemble des quantifications a été réalisé à l'aveugle, sauf lorsque cela était impossible, comme dans le cas de l'utilisation de virus différents facilement distinguables visuellement.

Chaque quantification est effectuée sur plusieurs coupes d'un même rat. Afin de pouvoir comparer les rats, et les groupes, entre eux, il est essentiel d'utiliser des coupes comparables. C'est pourquoi la première étape consiste à identifier le niveau d'antéro-postériorité de chaque coupe par rapport au point Bregma, à l'aide d'un atlas (Paxinos and Watson, 7^{ème} édition, 2014). Ensuite, nous sélectionnons un nombre équivalent de coupes avec des niveaux d'antéro-postériorité homogènes pour chaque rat. Ce n'est qu'après cette sélection que la quantification est réalisée, avec le logiciel QuPath (e.g. Bankhead et al., 2017 ; Humphries et al., 2021). Sauf mention contraire, nous avons d'abord calculé la moyenne pour

toutes les coupes d'un même rat, puis nous avons calculé la moyenne des valeurs des différents rats d'un même groupe.

1. Quantification d'aires avec QuPath

Certaines expériences (2, 3 et 4) ont nécessité la quantification de surfaces de zones, telles que l'étendue de l'infection virale, l'aire de la neurotoxicité ou de l'activation gliale. Dans ce cas, seul le canal correspondant au fluorochrome à étudier est affiché, et le contour de la zone positive pour le marqueur d'intérêt est dessiné manuellement grâce à l'outil Polygone de QuPath (**Figure 31A**).

Afin de ne pas introduire de biais dans l'évaluation de l'étendue de la zone positive, il est important de veiller à ce que les paramètres d'affichage des fluorochromes soient identiques pour chaque coupe et chaque rat. Le logiciel indique ensuite la surface en μm^2 des zones dessinées.

2. Quantification automatisée de cellules avec QuPath

Afin d'étudier des densités cellulaires, il est nécessaire de quantifier le nombre de cellules présentes dans une surface donnée. La première étape consiste à définir précisément la zone d'intérêt dans laquelle cette quantification sera effectuée. Ces régions sont délimitées manuellement en utilisant l'outil Polygone de QuPath, et en s'aidant des indices histologiques tels que les immunomarquages du NeuN, de la calrétinine ou de la calbindine, ou encore la présence de fluorescence de la GFP.

La quantification des cellules est ensuite effectuée de façon automatisée sur QuPath, à l'aide de deux outils différents, en fonction du profil du marquage.

a. L'outil *Cell Detection*

Pour les marquages de types nucléaires, comme ceux du NeuN, du c-Fos ou encore de l'AAVrg-Cre-GFP, le signal apparaît sous une forme bien ronde. L'outil *Cell Detection* de QuPath est alors suffisamment performant pour identifier les cellules (**Figure 31B**). Il s'agit alors de déterminer les paramètres optimaux, tels que le seuil d'intensité, la différence par rapport au bruit de fond, ou encore la taille de la cellule, par essais successifs. L'objectif est de

définir des réglages qui détectent les cellules de manière équivalente à une sélection manuelle, non automatique.

Une fois les paramètres ajustés, il est essentiel de les tester sur plusieurs coupes provenant de différents rats, choisis aléatoirement mais devant représenter tous les groupes expérimentaux, afin de garantir l'applicabilité de ces mêmes paramètres sur l'ensemble de l'étude.

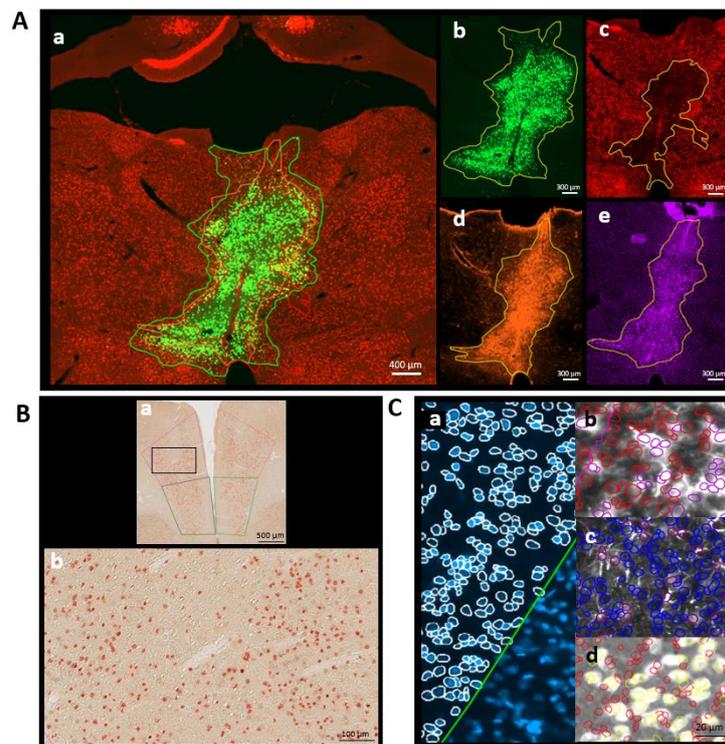


Figure 31. Illustrations des méthodes de quantification avec le logiciel QuPath

A. Délimitation des aires avec l'outil Polygone. (a) Exemple de la délimitation de l'infection de l'AAV-Cre-GFP (b), de la perte neuronale (c) et de la cicatrice gliale (d) sur une seule coupe de thalamus. (a) correspond à la superposition des marquages de GFP et de NeuN et des aires correspondantes. (e) Exemple de la délimitation de l'activation microgliale. Image issue de Panzer et al., 2024

B. Quantification de cellules avec l'outil Cell Detection. Exemple de la quantification de neurones c-Fos positifs dans le CPFm avec la délimitation des sous-régions du CPFm (a) et un zoom sur les cellules détectées (b).

C. Quantification de cellules avec les outils StarDist et Classifier. (a) Détection des noyaux marqués au DAPI grâce à l'extension StarDist. Tri de ces cellules grâce à l'outil Classifier, comme étant des microglies si elles sont Iba1-positives (entourées en violet sur (b)), des astrocytes si elles sont GFAP-positives (entourées en violet sur (c)), ou des neurones si elles sont NeuN-positives (entourées en jaune sur (d)). Image issue de Panzer et al., 2024

b. L'outil *Classifier*

Pour les marquages un peu plus complexes à différencier, comme les astrocytes, les microglies, ou l'AAVrg-GFP (pour lequel la GFP est cytoplasmique), il faut utiliser l'outil *Classifier* de QuPath, un modèle de *machine learning* supervisé.

La première étape consiste à exécuter un script utilisant un programme basé sur le *deep learning*, le StarDist (Weigert et al., 2020), capable de reconnaître spécifiquement les noyaux des cellules lorsqu'ils sont marqués au DAPI (Figure 31C.a). Une fois que toutes les cellules sont détectées, l'étape suivante est celle de l'apprentissage supervisé. Il s'agit de l'entraînement du classifieur par l'utilisateur, lors duquel il indique manuellement quelles cellules il considère comme étant positives (par exemple DAPI+/Iba1+ pour les microglies) et quelles cellules sont négatives (DAPI+/Iba1- pour l'exemple) (Figure 31C). Cet entraînement doit impérativement être réalisé sur plusieurs coupes provenant de différents rats, choisis aléatoirement, mais devant représenter tous les groupes expérimentaux, afin de garantir qu'il puisse être appliqué sur l'ensemble de l'étude. Lors de l'entraînement, le modèle extrait les caractéristiques des cellules positives pour pouvoir prédire la classification des prochaines cellules. Une fois cet entraînement terminé, le modèle peut être appliqué sur l'ensemble du projet.

Peu importe la méthode de détection des cellules, elle est toujours suivie d'une correction manuelle par l'utilisateur afin de soustraire les entités positives qui correspondent en réalité au passage de l'aiguille, et qui ne sont donc pas discernables des vraies cellules par le logiciel.

VII. Analyses statistiques

L'ensemble des résultats est représenté sous la forme : moyenne \pm erreur-type. Tous les tests statistiques sont réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8, avec un seuil de significativité à $p < 0,05$. Dans un premier temps, la normalité de chaque échantillon est vérifiée avec un test de Shapiro-Wilk.

La comparaison statistique de deux échantillons ou d'un échantillon à une valeur de référence est réalisée grâce à un test-t de Student, à valeurs appariées le cas échéant. Lorsque l'un des échantillons ne suit pas la loi normale, ce test est remplacé par un test non paramétrique de

Mann-Whitney pour la comparaison de deux échantillons et par un test non paramétrique de Wilcoxon pour la comparaison à une valeur de référence.

Les analyses de variances sont réalisées grâce à des ANOVA à 1 ou 2 facteurs, et à mesures répétées, le cas échéant. Lorsqu'un effet significatif d'au-moins un des facteurs est mis en évidence, ces tests sont complétés par des comparaisons multiples post-hoc avec le test de Newman-Keuls. Lorsque l'un des échantillons ne suit pas la loi normale, l'ANOVA à 1 facteur est remplacée par un test non paramétrique de Kruskal Wallis.

VIII. Récapitulatif du plan expérimental

Ces travaux de thèse sont divisés en deux grandes parties regroupant 5 expériences (**Tableau 3**). La première partie traite de l'optimisation de la technique de déconnexion cortico-thalamique et comporte 3 expériences. L'**expérience 1** est une étude comparative de 3 virus rétrogrades exprimant la Cre-recombinase disponibles sur le marché. Ces virus sont ainsi injectés dans les ReRh de rats, en combinaison ou non avec une injection d'AAV5-taCasp dans le CPFm. Les rats sont mis à mort 5 semaines après les chirurgies stéréotaxiques pour permettre les analyses histologiques, telles que l'étude de l'infection des virus dans les ReRh et des rétroprojections dans le CPFm. L'**expérience 2** est une étude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh. Nous étudions, d'une part, le décours temporel de la neurotoxicité en injectant l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh et en sacrifiant les animaux à différents délais post-opératoires (1, 2.5, 5 et 10 semaines). Nous testons, d'autre part, plusieurs dilutions du virus (titre divisé par 4, 8, 20 et 200) afin de trouver un titre viral permettant une infection suffisante et une réduction de la toxicité. Enfin, nous vérifions la faisabilité de la déconnexion cortico-thalamique avec le titre choisi en injectant l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh et l'AAV5-taCasp dans le CPFm, de façon unilatérale. L'**expérience 3** est l'étude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre, un virus portant le gène de la Cre, mais sans gène rapporteur. Ce virus est ainsi injecté dans les ReRh des rats, en combinaison avec un AAV5-DIO-mCh dans le CPFm. Les rats sont sacrifiés 5 semaines après la chirurgie pour procéder aux analyses histologiques et notamment vérifier l'intégrité neuronale des tissus par immunomarquage.

La deuxième partie de la thèse porte sur l'étude du rôle de la projection cortico-thalamique dans la cognition spatiale. Dans l'**expérience 4**, les neurones du CPFm projetant

aux ReRh sont lésés de façon bilatérale par la combinaison de l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh et de l'AAV5-taCasp dans le CPFm. Les conséquences comportementales de cette lésion sont ensuite évaluées dans le labyrinthe en croix surélevé, dans la piscine de Morris avec un délai de 25 jours, dans la tâche d'Object-In-Place avec un délai de 3h, et dans le protocole de flexibilité cognitive en Double-H. Des analyses histologiques sont ensuite réalisées pour s'assurer de l'efficacité et de la spécificité de la déconnexion cortico-thalamique.

L'**expérience 5** permet l'étude du rôle fonctionnel de la projection cortico-thalamique par l'injection d'un AAV1-transCre injecté dans le CPFm et d'un AAV5-DIO-mCh injecté dans les ReRh. Cette combinaison de virus permet de marquer en rouge les neurones des ReRh recevant une afférence du CPFm. Les rats suivent également le protocole de flexibilité cognitive en Double-H, et sont sacrifiés 90 min après le deuxième test de rappel de celui-ci. Nous pouvons alors identifier les neurones actifs pendant la tâche grâce à un immunomarquage de la protéine c-Fos. Le co-marquage entre la mCherry et le c-Fos permet de mettre en évidence les neurones des ReRh recevant une afférence du CPFm et étant actif pendant le deuxième test de rappel en Double-H.

Tableau 3. Récapitulatif du plan expérimental

Expérience	Nombre d'animaux	Groupes	Virus injecté dans le CPFm	Virus injecté dans les ReRh	Tests comportementaux
1 Comparaison de 3 virus portant le gène de la Cre	28	CAV2-Cre-GFP (n=6)	Aucune	CAV2-Cre-GFP	Aucun
		AAVrg-Cre-mCh (n=16)	Aucune, AAV5-taCasp (unilatéral ou bilatéral)	AAVrg-Cre-mCh	
		AAVrg-Cre-GFP (n=6)	AAV5-taCasp (unilatéral)	AAVrg-Cre-GFP	
2 Neurotoxicité de l'AAVrg-Cre-GFP	36	Time course (4 groupes, n=16)	AAV5-taCasp (unilatéral)	AAVrg-Cre-GFP	Aucun
		Test de différents titres (4 groupes, n=20)			
3 Etude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre	10		AAV5-DIO-mCh	AAV-Cre	Aucun
4 Déconnection cortico-thalamique bilatérale	60	Déco CT (n=20 → 8)	AAV5-taCasp	AAVrg-Cre-GFP	Labyrinthe en croix surélevé Piscine de Morris (délai 25j) Object-In-Place (délai 3h) Double-H
		Casp (n=20 → 17)	AAV5-taCasp	AAVrg-GFP	
		Cre (n=20 → 11)	PBS	AAVrg-Cre-GFP	
5 Etude du rôle fonctionnel de la voie cortico-thalamique : comarquage c-Fos et mCh dans les ReRh	15	Strategy shifting (n=9)	AAV1-transCre	AAV5-DIO-mCh	Double-H
		Contrôle nage (n=3)			
		Contrôle home cage (n=3)			

Partie 1 : Optimisation de la technique de déconnexion cortico- thalamique

L'objectif de ces travaux de thèse est d'étudier l'impact comportemental de la lésion de la projection cortico-thalamique. Afin de léser spécifiquement les neurones du CPFm qui projettent aux ReRh, nous avons choisi une approche virale utilisant le système conditionnel Cre-lox. Ce système permet de faire exprimer une caspase de façon Cre-recombinase dépendante, dans les cellules d'intérêt. Cette technique est dérivée de celle que [Yang et al. \(2013\)](#) ont développée sur des souris transgéniques exprimant la Cre-recombinase. Dans notre cas, elle nécessite l'injection intracérébrale de deux virus, le premier, antérograde, dans le cortex préfrontal médian (**CPFm**), et le second, rétrograde, dans les noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus (**ReRh**). A ce jour, cette approche n'a été utilisée que peu de fois pour léser des voies de projection. [Laurent et al. \(2017\)](#) y ont eu recours pour cibler la voie de projection de l'habénula latérale vers le noyau tegmental rostromédian par exemple. [Marciante et al. \(2020\)](#) ont ciblé la voie du noyau préoptique médian vers le noyau paraventriculaire. Mais elle n'a jamais été utilisée pour cibler nos structures d'intérêt, chez le rat Long Evans.

Il est ainsi indispensable de vérifier que cette technique est applicable dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire en ciblant nos régions d'intérêt, sur nos souches d'animaux, avec nos délais post-chirurgicaux, etc. Il faut ensuite en déterminer les paramètres optimaux. Nous devons donc choisir des virus ayant un bon tropisme pour les régions que nous ciblons, déterminer leurs volumes et titres, ainsi que les coordonnées stéréotaxiques optimales pour ces injections. Nous devons alors vérifier que la combinaison de ces paramètres permet de léser la voie ciblée sans altérer le reste du tissu cérébral.

L'objectif de cette première partie est de mettre au point la technique de déconnexion cortico-thalamique, d'en déterminer les paramètres optimaux, ainsi que de vérifier sa faisabilité dans nos conditions.

Contributions expérimentales

I. Expérience 1 : Etude comparative de différents virus exprimant la Cre-recombinase

Notre approche virale de déconnexion cortico-thalamique repose sur l'utilisation de deux virus, dont l'un est un virus rétrograde portant le gène de la Cre-recombinase. Il existe plusieurs virus correspondant à ces critères sur le marché. L'objectif de cette première expérience est de tester et comparer 3 virus différents. Il s'agit du CAV2-Cre-GFP (de la plateforme de vectorologie de Montpellier), de l'AAVrg-Cre-mCh (d'Addgene®, USA) et de l'AAVrg-Cre-GFP (d'Addgene®, USA). Ces virus ont été injectés dans le ReRh de rats, en présence ou non de l'AAV5-taCasp dans le CPFm. Les rats ont été mis à mort 5 semaines après la chirurgie pour permettre le transport et l'expression du matériel génétique véhiculé par les virus avant de procéder aux analyses histologiques.

1. Etude de l'infection des ReRh

Dans un premier temps, il est indispensable d'étudier si, et comment, ces virus infectent les ReRh afin de vérifier leur tropisme. Pour cela, la fluorescence du gène rapporteur du virus portant le gène de la Cre-recombinase est observée dans les ReRh. Ces derniers sont délimités par un immunomarquage de la calrétinine.

a. CAV2-Cre-GFP

Pour étudier le CAV2-Cre-GFP, ce virus a été injecté dans les ReRh de 6 rats, sans injection d'AAV-taCasp dans le CPFm. Les différents profils d'infection du virus sont illustrés dans la **Figure 32a à d**. L'injection du CAV2-Cre-GFP ne conduit à aucune infection ni du Re, ni du Rh dans 16,67% des cas (1 rat ; **Figure 32a et b**). Elle conduit à une infection du Rh uniquement dans 50% des cas (3 rats ; **Figure 32a et c**), et à une infection des ReRh unilatérale et très latérale dans 33% des cas (2 rats ; **Figure 32a et d**). Bien que ces profils d'infection soient totalement insatisfaisants, nous avons tenté d'observer des rétroprojections dans le CPFm. Après l'amplification de la GFP par immunomarquage, nous n'observons absolument aucun neurone exprimant la GFP dans le CPFm de ces animaux (les **Figure 32e à h** illustrent le CPFm du rat avec l'infection des ReRh la plus étendue). Au regard du faible taux d'infections

des ReRh réussies et de l'absence de corps cellulaires exprimant la GFP dans le CPFm, le **CAV2-Cre-GFP n'est pas retenu pour la suite de nos expériences.**

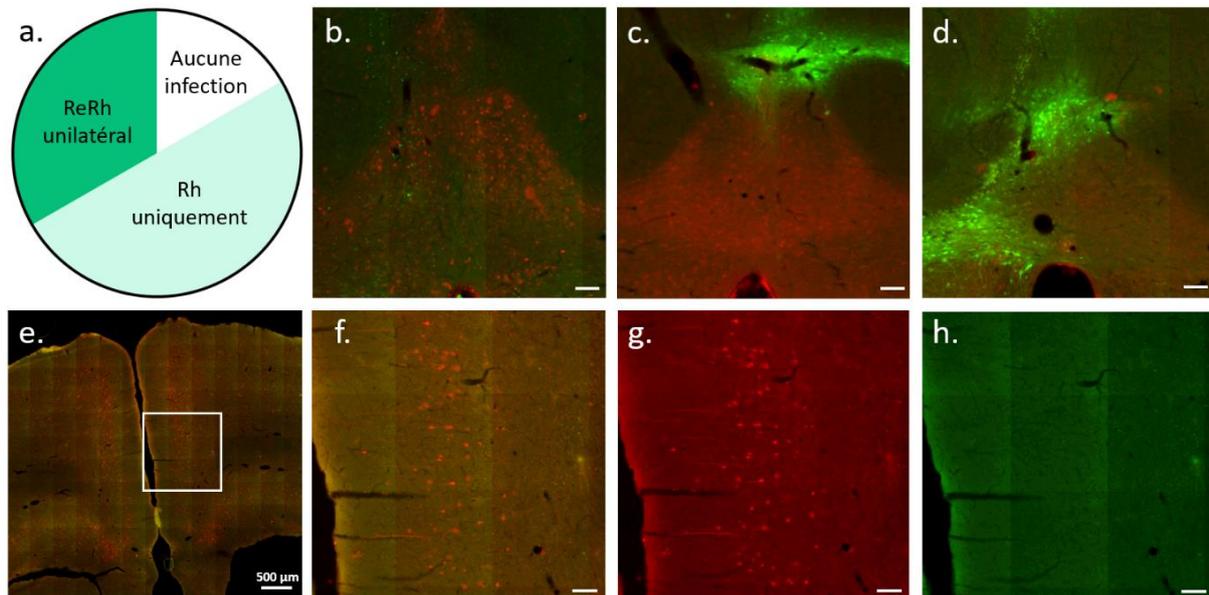


Figure 32. Profils d'infection des ReRh par le CAV2-Cre-GFP et rétro-marquages préfrontaux

a : Diagramme représentant la proportion des différents profils d'infection du CAV2-Cre-GFP dans les ReRh (n = 6). **b**, **c** et **d** : Photographies de coupes coronales de ReRh illustrant les différents profils d'infection : aucune infection (**b**), infection du Rh uniquement (**c**), infection des ReRh de façon unilatérale (**d**). La fluorescence rouge correspond à un immunomarquage de la calrétinine et permet de visualiser facilement les ReRh. La fluorescence verte est celle de la GFP du virus.
e : Photographie d'une coupe coronale de CPFm du rat ayant l'infection des ReRh la plus étendue.
f, **g** et **h** : Agrandissement de l'encart présent sur **e**. La fluorescence rouge correspond aux neurones rétro-marqués grâce à l'injection d'AAV-Cre-mCh (**g**), la fluorescence verte correspond à l'amplification de la GFP par immunomarquage, afin de mettre en évidence des neurones rétro-marqués grâce à l'injection de CAV2-Cre-GFP (**h**). La figure **f** est une superposition des figures **g** et **h**.

Sauf mention contraire, les barres d'échelle sont égales à 100 µm.

b. AAVrg-Cre-mCh

Pour étudier l'AAVrg-Cre-mCh, ce virus a été injecté dans les ReRh de 16 rats, dont 6 n'ont pas reçu de caspase dans le CPFm, 5 ont eu une injection bilatérale d'AAV5-taCasp dans le CPFm et 5 ont reçu une injection d'AAV5-taCasp uniquement dans un hémisphère.

L'injection de l'AAVrg-Cre-mCh conduit à 6 profils d'expression différents (**Figure 33**) : nous ne relevons aucune infection dans 12,5% des cas (2 rats – **Figure 33a et b**), une infection touchant uniquement le Rh dans 6,25% des cas (1 rat – **Figure 33a et c**), une infection franche dans les ReRh, mais unilatérale dans 31,25% des cas (5 rats – **Figure 33a et d**), ou bilatérale mais

légèrement asymétrique dans 18,75% des cas (3 rats – [Figure 33a et e](#)) et, enfin, une infection des ReRh qui s’avère bilatérale et symétrique dans 25% des cas (4 rats – [Figure 33a et f](#)). Dans 6,25% des cas, l’infection est bien trop étendue puisqu’elle gagne également de nombreux autres noyaux thalamiques (1 rat – [Figure 33a et g](#)). **L’AAVrg-Cre-mCh est donc capable d’infecter les ReRh**, avec un taux de réussite qualitative de 75%.

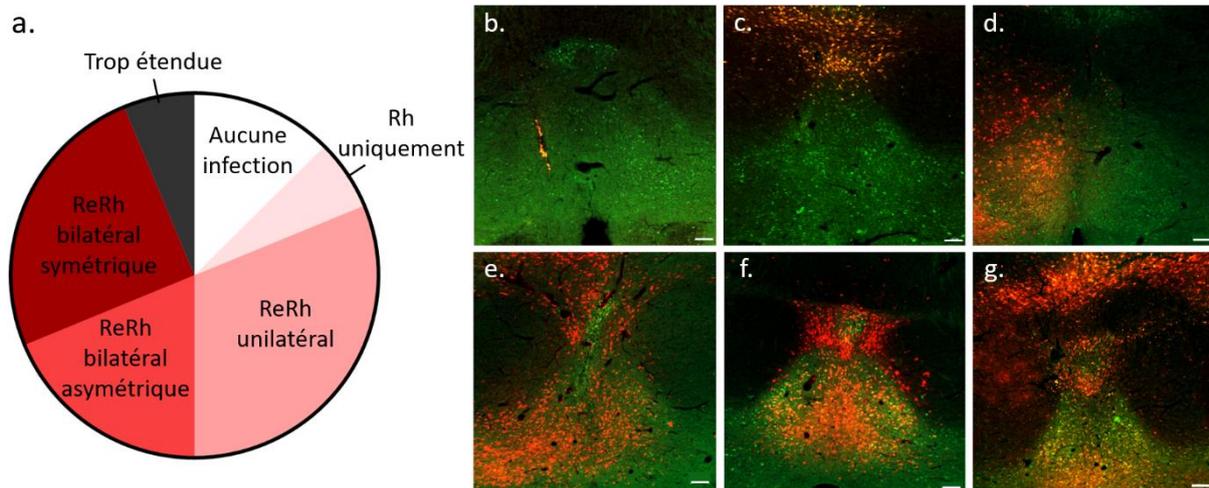


Figure 33. Profils d’infection des ReRh par l’AAVrg-Cre-mCh

a. Diagramme représentant la proportion des différents profils d’infection de l’AAVrg-Cre-mCh dans les ReRh (n = 16). **b à g :** Photographies de coupes coronales de ReRh illustrant les différents profils d’infection : aucune infection (**b**), infection du Rh uniquement (**c**), infection des ReRh de façon unilatérale (**d**), infection des ReRh de façon bilatérale mais asymétrique (**e**), infection des ReRh de façon symétrique (**f**), infection des ReRh mais trop étendue sur le reste du thalamus (**g**). La fluorescence verte correspond à un immunomarquage de la calrétinine et permet de visualiser facilement les ReRh. La fluorescence rouge est celle de la mCherry du virus. *Les barres d’échelle sont égales à 100 μ m.*

c. AAVrg-Cre-GFP

Pour étudier l’AAVrg-Cre-GFP, ce virus a été injecté dans les ReRh de 6 rats, combiné à une injection unilatérale d’AAV5-taCasp dans le CPFm. L’injection de l’AAVrg-Cre-GFP conduit à 4 profils d’expression différents ([Figure 34](#)) : une infection franche est relevée dans les ReRh, mais elle est unilatérale dans 16,67% des cas (1 rat – [Figure 34a et b](#)), ou bilatérale mais légèrement asymétrique dans 16,67% des cas (1 rat – [Figure 34a et c](#)). Dans 50% des cas (3 rats – [Figure 34a et d](#)), l’infection des ReRh est bilatérale et symétrique, et dans 16,67% des cas, elle est trop étendue puisque gagnant également de nombreux autres noyaux thalamiques (1 rat – [Figure 34a et e](#)). **L’AAVrg-Cre-GFP est donc capable d’infecter les ReRh**, avec un taux de réussite qualitative de 83,3%.

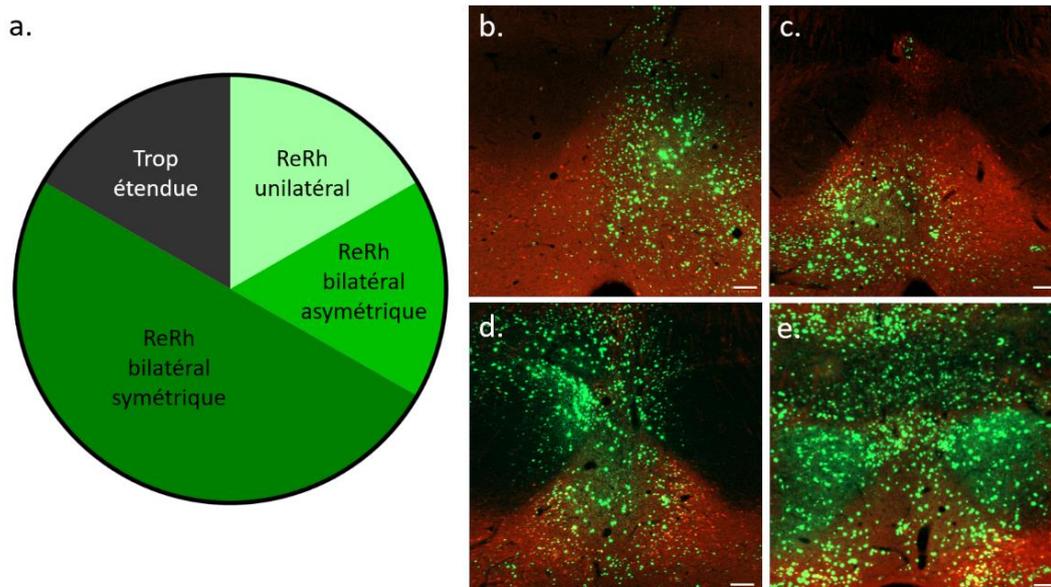


Figure 34. Profils d'infection des ReRh par l'AAVrg-Cre-GFP

a. Diagramme représentant la proportion des différents profils d'infection de l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh (n = 6). **b à e** : Photographies de coupes coronales de ReRh illustrant les différents profils d'infection : infection des ReRh de façon unilatérale (**b**), infection des ReRh de façon bilatérale mais asymétrique (**c**), infection des ReRh de façon symétrique (**d**), infection des ReRh mais trop étendue sur le reste du thalamus (**e**). La fluorescence rouge correspond à un immunomarquage de la calrétinine et permet de visualiser facilement les ReRh. La fluorescence verte est celle de la GFP du virus.

Les barres d'échelle sont égales à 100 μ m.

Cette étude de l'infection des ReRh par 3 virus rétrogrades portant le gène de la Cre-recombinase et présents sur le marché montre que **(i)** le CAV2-Cre-GFP génère un taux d'infection indiquant que son tropisme n'est pas satisfaisant pour les ReRh. Nous ne poursuivons pas les expériences avec ce virus. **(ii)** L'AAVrg-Cre-mCh et l'AAVrg-Cre-GFP sont de bons candidats, car ils conduisent l'un et l'autre à un bon taux d'infection des ReRh. L'AAVrg-Cre-GFP semble être un peu plus efficace, bien qu'il soit pour l'instant difficile d'établir une comparaison précise.

2. Etude des rétroprojections dans le CPFm

Après avoir validé la capacité des virus candidats à infecter les ReRh, il est nécessaire de vérifier qu'ils sont bien rétrogrades par l'étude des neurones marqués par le gène rapporteur dans les structures afférentes au site d'injection, que l'on appelle rétroprojections.

Aussi, dans le cadre de notre projet, il est très important de vérifier la présence de ces rétroprojections dans le CPFm, bien que cette structure d'intérêt se trouve à une distance relativement longue des ReRh. Pour cela, nous amplifions le signal du gène rapporteur par immunomarquage dans le CPFm afin de faciliter la visualisation des neurones. Cette amplification étant réalisée avec des anticorps différents, l'intensité des marquages peut être différentes entre les deux virus. Notons également que l'apparence des marquages neuronaux devrait différer entre l'AAVrg-Cre-mCh et l'AAVrg-Cre-GFP. En effet, la principale différence entre ces deux constructions virales, en dehors de leur promoteur, est la fusion ou non des gènes : dans un cas, les gènes de la mCherry et de la Cre ne sont pas fusionnés, la mCherry a alors une localisation cytoplasmique par défaut, tandis que dans l'autre cas, les gènes de la GFP et de la Cre sont fusionnés. Puisque la Cre cible l'ADN, sa localisation est nucléaire, donc lorsque la GFP est fusionnée à la Cre, elles sont toutes deux nucléaires. Cette différence aboutit à un marquage cytoplasmique des neurones de projection pour l'AAVrg-Cre-mCherry, tandis qu'il est nucléaire pour l'AAVrg-Cre-GFP.

Dans un second temps, il est également indispensable de vérifier que la combinaison des deux virus injectés (Cre-recombinase rétrograde et caspase antérograde) entraîne bien la mort des neurones de projection. Pour cela, nous étudions les rats ayant reçu une injection unilatérale du virus de la caspase dans le CPFm. En effet, la projection du CPFm vers les ReRh étant majoritairement ipsilatérale ([Vertes, 2002](#)), en injectant l'AAV5-taCasp dans un seul hémisphère, le deuxième hémisphère peut servir de contrôle. Toutefois, pour que la comparaison des deux hémisphères soit pertinente, il est indispensable de tenir compte de la spécificité de l'infection des ReRh de chaque rat. Nous ne sélectionnons donc que les rats qui présentent une infection bilatérale et la plus symétrique possible dans les ReRh, ou éventuellement ceux montrant une légère asymétrie à condition que le côté le plus infecté corresponde à l'hémisphère d'injection de la caspase dans le CPFm. Dans ce dernier cas, nous anticipons une augmentation du nombre de neurones marqués dans le CPFm de l'hémisphère le plus infecté ; si tel n'est pas le cas, c'est que la caspase a effectivement eu un effet apoptotique sur ces neurones. Il est évident qu'avec ces critères de sélection stricts, le nombre de rats pris en compte est très faible. Mais cela ne pose pas de problème car il s'agit ici d'une étude de preuve du concept de la déconnexion cortico-thalamique. Dans les expériences futures, notamment celles pour étudier les effets comportementaux d'une telle déconnexion,

l'injection d'AAV5-taCasp sera bilatérale, ce qui permettra d'adopter des critères d'inclusion exigeants mais moins stricts.

Les objectifs de cette partie sont donc de **(i)** vérifier la présence de neurones rétromarqués dans le CPFm des rats suite à l'injection du virus dans les ReRh, **(ii)** vérifier que la combinaison des deux virus entraîne la déconnexion de la voie de projection cortico-thalamique, **(iii)** comparer l'AAVrg-Cre-mCh et l'AAVrg-Cre-GFP.

a. AAV-Cre-mCh

L'amplification de la mCherry par immunomarquage dans le CPFm révèle un signal correspondant à un marquage cytoplasmique dans les neurones de rétroprojection. Ce signal étant superposé à un immunomarquage de la protéine NeuN, nous pouvons confirmer la présence de neurones exprimant la mCherry dans le CPFm (**Figure 35a à c**). Ces neurones sont majoritairement situés dans les couches profondes (V-VI) du CPFm (**Figure 35d**), ce qui est en accord avec la littérature (**McKenna and Vertes, 2004**). **L'AAVrg-Cre-mCh permet bien d'infecter les neurones du CPFm projetant aux ReRh**, ce qui en confirme le caractère rétrograde. Notons toutefois que la localisation cytoplasmique de la mCh implique qu'un nombre important de fibres est également marqué. Cela rend parfois difficile l'identification et la distinction des neurones dans les couches profondes.

En ce qui concerne l'étude de la lésion de ces neurones de projection, seuls 2 rats correspondent aux critères stricts de sélection, dont l'un n'a pas pu être quantifié pour des raisons techniques. Ainsi, la comparaison du nombre de neurones mCh-positifs dans le CPFm ayant reçu une injection d'AAV5-taCasp versus l'hémisphère contrôle n'a pu être effectuée que sur 7 coupes d'un seul rat. Toutefois, les résultats montrent une diminution du nombre de neurones mCh-positifs dans l'hémisphère ayant reçu l'injection d'AAV5-taCasp (**Figure 35d et e**). Un t-test pour échantillons appariés indique que cette différence est significative ($t_{(6)} = 5,401$; $p = 0,0017$). Ainsi, nous avons montré une **déconnexion effective d'environ 55% des neurones mCherry-positifs lors de l'injection d'AAV5-taCasp pour ce rat.**

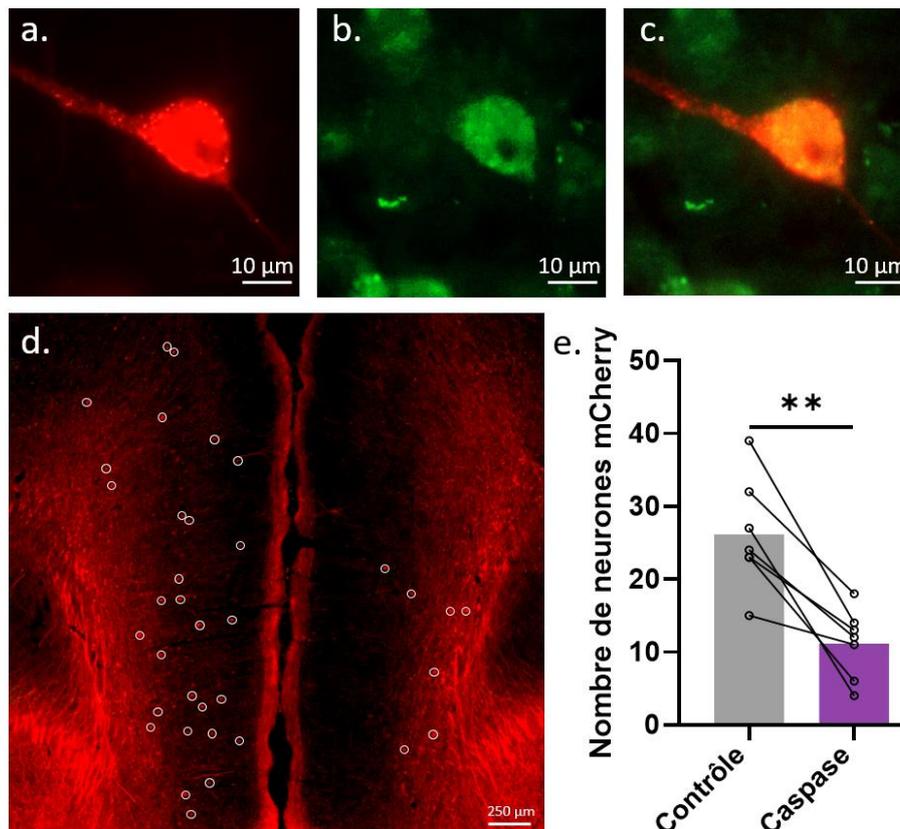


Figure 35. Etude des neurones rétromarqués dans le CPFm suite à une injection d'AAVrg-Cre-mCh dans les ReRh et une injection unilatérale d'AAV5-taCasp dans le CPFm

a à c : Photographies d'un neurone du CPFm exprimant la mCherry (en rouge, **a**) et avec un immunomarquage du NeuN (en vert, **b**). La figure **c** est la fusion des deux signaux.

d : Photographie d'une coupe coronale de CPFm après une amplification de la mCherry par immunomarquage. Les cercles blancs entourent les corps cellulaires de neurones mCherry positifs. L'hémisphère à gauche de l'image n'a pas reçu d'injection d'AAV5-taCasp, c'est l'hémisphère contrôle, tandis que l'hémisphère à droite a reçu une injection d'AAV5-taCasp, c'est l'hémisphère test.

e : Nombre de neurones mCherry positifs comptés sur les 7 coupes de CPFm d'un rat. Chaque ligne relie le point correspondant à l'hémisphère contrôle (n'ayant pas reçu d'AAV5-taCasp) à celui correspondant à l'hémisphère test (ayant reçu une injection d'AAV5-taCasp) d'une même coupe. Les barres montrent le nombre moyen de neurones mCherry positifs par coupe de l'hémisphère contrôle (à gauche) et de l'hémisphère test (à droite).

Statistiques : ** : $p < 0,01$, différence significative entre les deux hémisphères

b. AAVrg-Cre-GFP

L'amplification de la GFP par immunomarquage dans le CPFm révèle un signal correspondant à un marquage nucléaire des neurones concernés. Ce signal étant superposé à un immunomarquage de la protéine NeuN, nous pouvons confirmer la présence de neurones

exprimant la GFP dans le CPFm (**Figure 36a à c**). Ces neurones sont majoritairement situés dans les couches profondes (V-VI) du CPFm (**Figure 36d**), ce qui est en accord avec la littérature (**McKenna and Vertes, 2004**). **L'AAVrg-Cre-GFP permet bien d'infecter les neurones du CPFm projetant aux ReRh**, ce qui en confirme le caractère rétrograde. Notons également que la localisation nucléaire de la GFP facilite substantiellement la quantification des neurones, car aucune fibre n'est marquée.

En ce qui concerne l'étude de la lésion des neurones de projection, seuls 3 rats correspondent aux critères stricts de sélection. Ainsi, la comparaison du nombre de neurones GFP-positifs dans le CPFm ayant reçu une injection d'AAV5-taCasp versus l'hémisphère contrôle a été effectuée sur 7 coupes issues de 3 rats. Les résultats montrent une diminution du nombre de neurones GFP-positifs dans l'hémisphère ayant reçu l'injection d'AAV5-taCasp (**Figure 36d à g**). Un t-test pour échantillons appariés indique que cette différence est significative ($t_{(20)} = 5,385$; $p < 0,001$). Ces résultats sont confirmés avec la comparaison du pourcentage de neurones GFP-positifs en fonction du niveau d'antéro-postériorité du CPFm (**Figure 36h**), qui montre bien une différence significative entre les deux hémisphères. En effet, une ANOVA à deux facteurs n'indique pas d'effet significatif du niveau d'antéro-postériorité, mais elle met en lumière un effet significatif de l'hémisphère ($F(1, 2) = 27,60$; $p = 0,0344$), sans pour autant qu'il n'apparaisse une interaction significative entre ces deux facteurs ($F(6, 12) = 0,9410$; $p = 0,5014$). Il y a donc effectivement moins de neurones GFP dans l'hémisphère ayant reçu l'injection de caspase comparativement à l'hémisphère contrôle, et ceci, sur toute l'étendue antéro-postérieure que nous avons considérée. Notons que, d'un point de vue purement graphique, la différence est plus marquée au niveau + 3,00 mm par rapport au Bregma, ce qui correspond au point d'injection de l'AAV5-taCasp.

Ainsi, nous avons montré une **déconnexion effective d'environ 40% des neurones GFP-positifs lors de l'injection d'AAV5-taCasp**.

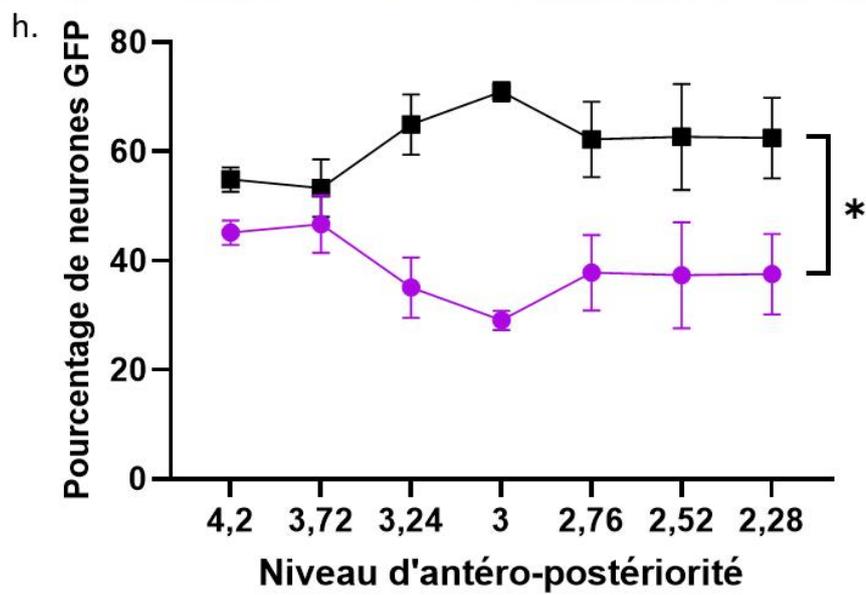
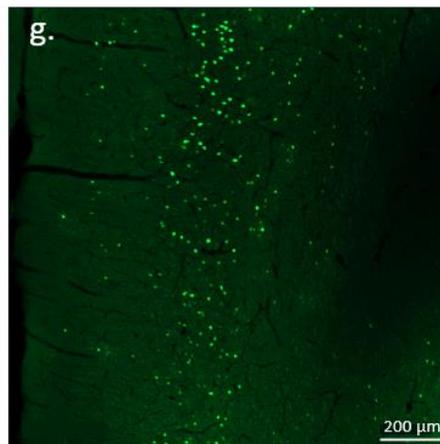
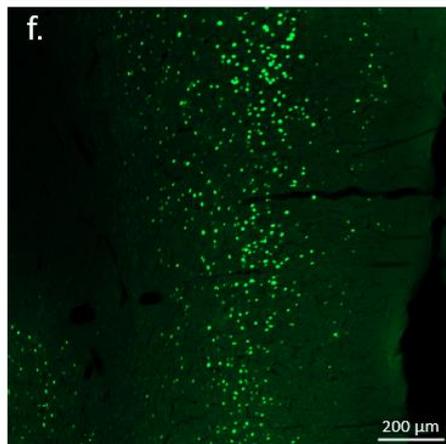
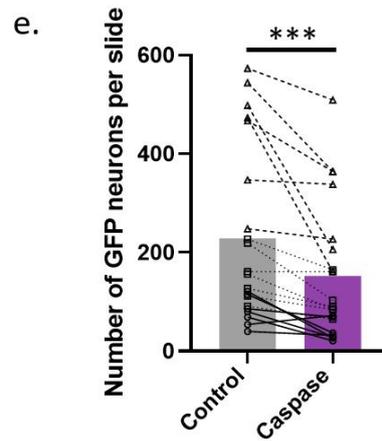
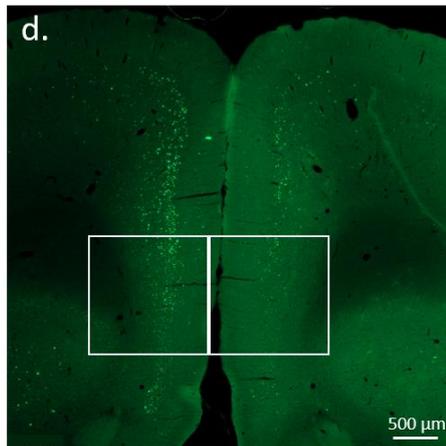
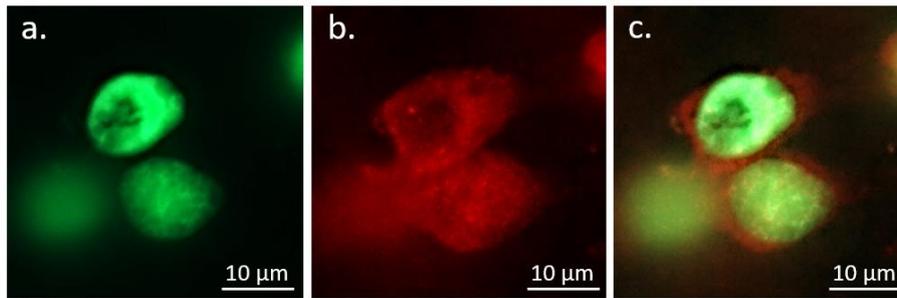


Figure 36. Etude des neurones rétro-marqués dans le CPFm suite à une injection d'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh et une injection unilatérale d'AAV5-taCasp dans le CPFm

a à c : Photographies de deux neurones du CPFm exprimant la GFP (en vert, **a**) et avec un immunomarquage du NeuN (en rouge, **b**). La figure **c** est la fusion des deux signaux.

d : Photographie d'une coupe coronale de CPFm après une amplification de la GFP par immunomarquage. L'hémisphère à gauche de l'image n'a pas reçu d'injection d'AAV5-taCasp, c'est l'hémisphère contrôle, tandis que l'hémisphère à droite a reçu une injection d'AAV5-taCasp, c'est l'hémisphère test.

f et g : Agrandissement des régions encadrées en blanc dans la figure **d**. La figure **f** correspond à l'hémisphère contrôle, la figure **g** correspond à l'hémisphère ayant reçu une injection de caspase.

e : Nombre de neurones GFP positifs comptés sur les 7 coupes de CPFm de 3 rats. Chaque ligne relie le point correspondant à l'hémisphère contrôle (n'ayant pas reçu d'AAV5-taCasp) à celui correspondant à l'hémisphère test (ayant reçu une injection d'AAV5-taCasp) d'une même coupe. Les différentes formes (triangle, rond, carré) et types de lignes (tirets, pointillés, lignes pleines) correspondent à des rats différents. Les barres montrent le nombre moyen de neurones GFP positifs par coupe de l'hémisphère contrôle (à gauche) et de l'hémisphère test (à droite).

h : Pourcentage des neurones GFP positifs comptés dans l'hémisphère contrôle (en noir) et dans l'hémisphère ayant reçu l'injection d'AAV5-taCasp (en violet), en fonction du niveau d'antéro-postériorité du CPFm (en mm par rapport au Bregma)

Statistiques : *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; différence significative entre les deux hémisphères

Les figures **d**, **e**, **f** et **g** sont issues de la figure 1 de l'article de [Panzer et al., 2024a](#)

Bien que la déconnexion de la voie cortico-thalamique soit possible et efficace avec les deux virus, l'AAVrg-Cre-GFP permet d'infecter environ 10 fois plus de neurones de projection dans l'hémisphère ne recevant pas la caspase. Cette plus grande efficacité d'infection permet, *in fine*, de léser une plus grande proportion de la voie de projection cortico-thalamique. C'est la raison pour laquelle **nous avons choisi l'AAVrg-Cre-GFP pour la suite de nos expériences.**

II. Optimisation des conditions d'injection de l'AAVrg-Cre-GFP

L'utilisation de vecteurs viraux présente une certaine complexité. Bien que l'AAVrg-Cre-GFP ait été choisi après validation d'un tropisme adéquat pour les ReRh, ainsi que de la possibilité de déconnecter la voie cortico-thalamique en combinaison avec l'AAV5-taCasp, il est indispensable de poursuivre la mise au point des protocoles d'injection afin d'optimiser leurs conditions. Cela concerne, par exemple, l'ajustement précis des coordonnées d'injection, ainsi que du volume et de la concentration de virus utilisés.

1. Expérience 2 : Neurotoxicité de l'AAVrg-Cre-GFP

Pour poursuivre la mise au point de l'approche virale, nous avons injecté l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh de 4 rats, en ajustant légèrement les coordonnées d'injection et avec un délai post-opératoire de 10 semaines, avant la mise à mort.

De la même façon que pour l'expérience 1, la première étape consiste à analyser l'infection de l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh. C'est pour cela qu'à l'origine, un immunomarquage contre la protéine NeuN a été réalisé, dans le but de faciliter l'identification des structures sur les coupes grâce à des différences de densités neuronales. Mais cet immunomarquage nous a permis de mettre en évidence que **l'AAVrg-Cre-GFP, bien que couramment utilisé, provoque une neurotoxicité massive dans la région d'injection**. L'étude de cette neurotoxicité est présentée dans l'article ci-dessous, publié en 2024 dans le *Journal of Neuroscience Methods*. Nous avons notamment étudié le décours temporel de ce phénomène, mettant ainsi en évidence une diminution de la densité neuronale dans la zone d'infection virale à partir d'un délai post-chirurgical de 2,5 semaines. Cette neurotoxicité s'aggrave avec le temps puisqu'elle touche 100% de l'aire d'infection virale après 10 semaines. La neurotoxicité s'accompagne également de phénomènes neuroinflammatoires, révélée par une augmentation de la densité microgliale dans la zone d'infection. Par ailleurs, la disparition de noyaux neuronaux est compensée par une augmentation progressive de la densité des astrocytes et des microglies. Cette augmentation de la densité des cellules gliales sur le lieu de la perte de neurones rend impossible la visualisation de la neurotoxicité par un simple marquage nucléaire au DAPI, ce qui est pourtant couramment réalisé dans la littérature.

Nous avons ensuite divisé le volume du virus par deux, et réduit et optimisé le titre viral pour atteindre une infection thalamique satisfaisante tout en minimisant la neurotoxicité.

Pour finir, nous avons démontré la faisabilité de la lésion cortico-thalamique projection-spécifique avec ces nouveaux paramètres, grâce à une injection de l'AAV5-taCasp dans le CPFm de façon unilatérale. Nous avons mis en évidence une perte d'environ 40% des neurones GFP-positifs du CPFm, ce sont ceux infectés par l'AAVrg-Cre-GFP, donc qui projettent sur les ReRh, ce qui valide notre approche.



Disconnecting prefrontal cortical neurons from the ventral midline thalamus: Loss of specificity due to progressive neural toxicity of an AAV-Cre in the rat thalamus

Elodie Panzer^{a,b}, Laurine Boch^{a,b}, Brigitte Cosquer^{a,b}, Iris Grgurina^{a,b}, Anne-Laurence Boutillier^{a,b}, Anne Pereira de Vasconcelos^{a,b,1}, Aline Stephan^{a,b,*}, Jean-Christophe Cassel^{a,b,*}

^a Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, Strasbourg F-67000, France

^b LNCA, UMR 7364 - CNRS, Strasbourg F-67000, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Adeno-associated virus – Caspase – Cre recombinase – Disconnection – Thalamus – Toxicity

ABSTRACT

Background: The thalamic reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei are bidirectionally connected with the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (Hip). Fiber-sparing N-methyl-D-aspartate lesions of the ReRh disrupt cognitive functions, including persistence of certain memories. Because such lesions irretrievably damage neurons interconnecting the ReRh with the mPFC and the Hip, it is impossible to know if one or both pathways contribute to memory persistence. Addressing such an issue requires selective, pathway-restricted and direction-specific disconnections.

New method: A recent method associates a retrograde adeno-associated virus (AAV) expressing Cre recombinase with an anterograde AAV expressing a Cre-dependent caspase, making such disconnection feasible by caspase-triggered apoptosis when both constructs meet intracellularly. We injected an AAVrg-Cre-GFP into the ReRh and an AAV5-taCasp into the mPFC. As expected, part of mPFC neurons died, but massive neurotoxicity of the AAVrg-Cre-GFP was found in ReRh, contrasting with normal density of DAPI staining. Other stainings demonstrated increasing density of reactive astrocytes and microglia in the neurodegeneration site.

Comparison with existing methods: Reducing the viral titer (by a 4-fold dilution) and injection volume (to half) attenuated toxicity substantially, still with evidence for partial disconnection between mPFC and ReRh.

Conclusions: There is an imperative need to verify potential collateral damage inherent in this type of approach, which is likely to distort interpretation of experimental data. Therefore, controls allowing to distinguish collateral phenotypic effects from those linked to the desired disconnection is essential. It is also crucial to know for how long neurons expressing the Cre-GFP protein remain operational post-infection.

1. Introduction

Historically, the about 60 nuclei forming the thalamus have been distinguished according to whether their projections concentrate on restricted cortical regions or are diffuse (Lorente de No, 1938). The former were attributed to a *specific* subdivision of the thalamus, the latter to a *non-specific* one, a view that has nevertheless been challenged since then (Bentivoglio et al., 1991; Groenewegen and Berendse, 1994). The reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei are part of the non-specific thalamus; they belong to its ventral midline roofing the third ventricle.

The Re projects to – and receives afferents from – more than 50 different brain regions. The Rh also projects to about 50 brain regions, but the regions providing its innervation are more limited in number (e.g., Cassel et al., 2021). Within this rich connectivity network, the ReRh nuclei occupy an ideal position in the bidirectional information flow between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (Hip). The Hip provides monosynaptic input to the mPFC (Hoover and Vertes, 2007; Jay and Witter, 1991), which is not the case the other way around (e.g., Vertes, 2004). From mPFC to Hip, signals cross more than one synapse, with a relay in e.g., the entorhinal cortex or the ReRh

* Correspondence to: LNCA – UMR 7364, Faculté de Psychologie, 12 rue Goethe, Strasbourg F-67000, France.

E-mail addresses: aline.stephan@unistra.fr (A. Stephan), jcassel@unistra.fr (J.-C. Cassel).

¹ With equivalent contribution

nuclei (e.g., Xu and Südhof, 2013).

If one is focusing in more detail on this connectivity network, it is to note that the ReRh nuclei have bidirectional connections with both the Hip (more with its ventral than dorsal region and only with CA1 neurons) and the mPFC (i.e., anterior cingulate, infralimbic, prelimbic regions). Furthermore, a small proportion (5–10%) of Re neurons send collaterals to both structures (Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014). Electrophysiological data demonstrate that the Re produces hippocampo-cortical synchronization of beta, delta, gamma and theta oscillations during a variety of cognitive tasks (Dolleman-van Der Weel et al., 2019; Jayachandran et al., 2023). More than a decade ago, we found (Loureiro et al., 2012), and later confirmed (Ali et al., 2017; Klein et al., 2019; Quet et al., 2020), that N-methyl-D-aspartate lesions of the ReRh nuclei disrupted remote memory for spatial and contextual information without altering encoding or persistence of recent memory. These findings demonstrate a contribution of the ReRh to systems-level consolidation and endurance of some types of memory (e.g., Cassel et al., 2013; Ferraris et al., 2021).

In our previous work (Ali et al., 2017; Klein et al., 2019; Loureiro et al., 2012; Quet et al., 2020), we performed N-methyl-D-aspartate lesions and the damage therefore disrupted projections from the ReRh to both the mPFC and Hip indistinctly and, at the same time, removed potentially important targets for projections arising therefrom. Therefore, it was impossible to know if one of these connecting pathways (e.g., from mPFC to ReRh) is more involved in systems-level consolidation than another (e.g., from ReRh to Hip or ReRh to mPFC) or, as an alternative, if the whole system operates in a closed loop to support memory persistence. To address such an issue, it would be necessary to perform selective, pathway-restricted and direction-specific disconnections. By associating a retrograde adeno-associated virus (AAV) expressing Cre recombinase with an anterograde AAV expressing a Cre-dependent caspase (Yang et al., 2013), such disconnection becomes possible, as shown previously in other brain systems (e.g., Basting et al., 2018; Laurent et al., 2017; Marcianete et al., 2020; Nadel et al., 2020; Walker et al., 2022).

In the current study, we started surgeries by using the virus preparations at half the concentration recommended by the supplier (i.e., 2.5×10^{13} GC/mL). AAVrg-Cre-GFP was injected into ReRh nuclei, AAV5-taCasp into medial mPFC. We were able to establish that, at the concentrations used, AAVrg-Cre-GFP caused protracted but ultimately severe neurodegeneration in and around the injection site. In addition, a DAPI staining failed to highlight this lesion because of an important glial infiltration in the area of neuronal loss, glial nuclei compensating for the lost neuronal ones. The lesion area was clearly evidenced with an immunostaining of the nuclear neuronal protein NeuN. To the best of our knowledge, this is the first study to provide evidence for AAVrg-Cre-GFP toxicity in the ReRh nuclei. Recent work had shown similar consequences after injections of AAVrg-Cre-GFP in the ventral tegmental area (Erben et al., 2022) or the substantia nigra (Rezai Amin et al., 2019), what, with our results, suggests a possibly region-independent neuronal toxicity of the viral construct.

In the following experiments we aimed to elucidate the dynamic of this neurotoxicity by analyzing the impact of AAVrg-Cre-GFP at different post mortem delays; 1 week, 2.5 weeks, 5 and 10 weeks. We quantified various parameters such as viral infection area, neuronal loss expanse, and glial response. After all, we managed to find appropriate viral infection parameters that would permit selective damage to prefrontal neurons projecting to the ReRh.

2. Experimental procedures

The study encompassed 4 experiments. In the first one, the AAVrg-Cre-GFP was injected into the ReRh at half the titration provided by the supplier. In the second experiment, the effects of the AAVrg-Cre-GFP were followed over 10 weeks, with verifications at 1, 2.5, 5 and 10 weeks post-injection. In the third experiment, we tested different

titrations at a single post-infection delay (i.e., 5 weeks). In the fourth experiment, we verified that the combination of the AAV5-taCasp and the AAVrg-Cre-GFP at a possibly non-toxic titration for the ReRh leads to damage affecting the cortico-thalamic pathway.

2.1. Animals

All experimental animals were used in compliance with the rules of the European Community Council Directive (2010/63/EU) and the French Agriculture Ministry. All approaches have been validated by the ethical committee of the University of Strasbourg (CREMEAS—authorizations #13261–2018012918394046). We used 45 adult Long-Evans male rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) weighing between 130 and 250 g at their arrival at the laboratory (they were 4–7 weeks old). The rats were housed 2 or 3 per cage 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 (22°C), and a hygrometry of about 55%. Before any experimental manipulation, rats were individually handled for 2 min/day over five consecutive days. We used 9 rats for the first experiment (Exp 1: 6 for the mPFC injection and 3 for the ReRh injection); 16 rats for the time-course experiment (Exp 2: 1 week, $n = 6$; 2.5 weeks, $n = 6$; 10 weeks, $n = 4$), 20 rats for testing different titrations (Exp 3: initial titer divided by 4, 8, 20 and 200; T/4, $n = 4$; T/8, $n = 4$; T/20, $n = 6$; T/200, $n = 6$, respectively). Experiment 4 focused on histological material from the 4 rats of the T/8 group of experiment 3.

2.2. Virus

The viral vector carrying the floxed caspase gene was the anterograde AAV5. EF1a.Flex-taCasp3-TEVp (UNC Gene Therapy Center-Vector Core), AAV5-taCasp hereafter. It was diluted twice in PBS from the stock solution (4.2×10^{12} particles/mL). The viral vector carrying the Cre-recombinase gene was the retrograde AAVrg.hSyn.eGFP-Cre-WPRE-SV40 (Addgene, MA, USA), AAVrg-Cre-GFP hereafter. For Exp 1, it was diluted twice in PBS from the stock solution (2.5×10^{13}), despite Addgene's recommendation to use the stock solution as is for in vivo experiments. For precise dilution see Table 1. This retrograde serotype has been engineered by Tervo et al. (2016) from an AAV2.

2.3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

This electrophoresis has been done in order to verify the purity of our AAVrg-Cre-GFP sample.

5 μ L of AAVrg-Cre-GFP virus (AAVrg.hSyn.eGFP-Cre-WPRE-SV40, Addgene, MA, USA) was mixed with 4X Laemmli buffer (Bio-rad, #1610747), with addition of 1/10 β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, #444203), to obtain a final 1X solution that was heated at 100°C for 4 min. Virus was then loaded on Midi-PROTEAN TGX Stain-Free™ Precast Gel (26 wells, 4–20%, Bio-Rad #5678095) and left to migrate for 40 min, at 150 V. This was followed by a UV-induced 1-min activation of the gel, using a ChemiDoc molecular imager (Bio-Rad), producing fluorescence that allows for visualization of the viral proteins on the gel.

2.4. Stereotactic Injections

After one week of acclimatization and another week of daily manipulation of the rats, the viral vectors were stereotactically injected in the brain. When unilateral, as in the mPFC, there was no injection on the contralateral side; for the illustrations shown in Supplementary Figure 6, rats received bilateral injections of the AAV-Cre in the mPFC (2 sites/site, 0.5 μ L/site for a post-surgical delay of 5 weeks; 3 sites/site, 0.6 μ L/site for a post-surgical delay of 10 weeks). For all surgeries, rats were anesthetized with Isoflurane (Isoflu-Vet®, Dechra, 4% for induction and 1.5% for maintenance) and placed into the stereotactic frame. Viral injections targeting the ReRh or the mPFC were made using slow

Table 1
 Summary table of viruses used, their characteristics, the initial titer, the injected titers, the injected volumes and the corresponding illustrations. Abbreviations: Hip = hippocampus; mPFC = medial prefrontal cortex; Suppl = supplementary; T = titer; wks = weeks (concerns duration of post-injection survival time). Note that for the 10-week delay in our second experiment, the AAV-Casp has been injected into the dorsal hippocampus (Hip).

Experiment	Associated figure (s)	Delay	Virus	Serotype	Promoter	Reference (website)	Plasmid	Structure	Used titer (vg/mL)	Injected volume	Coordinates
1	1, 2, 4, 5, 6	5 wks	AAV-taCasp	5	EF1 α	https://www.med.unc.edu/genetherapy/vectorcore/in-stock-aavvectors/shah/	pAAV.EF1a.flex-taCasp3-TEVp.WPRE.hGH	mPFC	2.1×10^{12}	2 \times 0.5 μ L (unilateral)	AP: +3.00 mL: +0.5 DV: -4.6 and -3.6
			AAV-Cre-GFP	retrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	pENN.AAV.hSyn.HLeGFP-Cre.WPRE.SV40	ReRh	1.25×10^{13}	2 \times 1 μ L	AP: -1.8 and -2.3 mL: -1.9 DV: -7.1 and -7.2 Angle of 15 $^\circ$
2	3, 4, 5, 6	1 and 2.5wks	AAV-taCasp	5	EF1 α	https://www.med.unc.edu/genetherapy/vectorcore/in-stock-aavvectors/shah/	pAAV.EF1a.flex-taCasp3-TEVp.WPRE.hGH	mPFC	2.1×10^{12}	3 \times 0.6 μ L (unilateral)	AP: +3.00 mL: +0.5 DV: -5, -3.8 and -2.2
			AAV-Cre-GFP	retrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	pENN.AAV.hSyn.HLeGFP-Cre.WPRE.SV40	ReRh	1.25×10^{13}	2 \times 1 μ L	AP: -1.7 and -2.2 mL: -1.9 DV: -7.1 and -7.2 Angle of 15 $^\circ$
		10 wks	AAV-taCasp	5	EF1 α	https://www.med.unc.edu/genetherapy/vectorcore/in-stock-aavvectors/shah/	pAAV.EF1a.flex-taCasp3-TEVp.WPRE.hGH	Hip	2.1×10^{12}	2 \times 1 μ L (unilateral)	AP: -5.4 mL: -3.5 DV: -9.2 and -3.2
			AAV-Cre-GFP	retrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	pENN.AAV.hSyn.HLeGFP-Cre.WPRE.SV40	ReRh	1.25×10^{13}	2 \times 1 μ L	AP: -1.7 and -2.2 mL: -1.9 DV: -7.1 and -7.2 Angle of 15 $^\circ$
3	7	5 wks	AAV-taCasp	5	EF1 α	https://www.med.unc.edu/genetherapy/vectorcore/in-stock-aavvectors/shah/	pAAV.EF1a.flex-taCasp3-TEVp.WPRE.hGH	mPFC	2.1×10^{12}	3 \times 0.6 μ L (unilateral)	AP: +3.00 mL: +0.5 DV: -5, -3.8 and -2.2
			AAV-Cre-GFP	retrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	pENN.AAV.hSyn.HLeGFP-Cre.WPRE.SV40	ReRh	From 1.25×10^{13} to 1.25×10^{11}	2 \times 0.5 μ L	AP: -1.8 and -2.3 mL: -1.9 DV: -7.1 and -7.2 Angle of 15 $^\circ$
4	7, 8	5 wks	AAV-taCasp	5	EF1 α	https://www.med.unc.edu/genetherapy/vectorcore/in-stock-aavvectors/shah/	pAAV.EF1a.flex-taCasp3-TEVp.WPRE.hGH	mPFC	2.1×10^{12}	3 \times 0.6 μ L (unilateral)	AP: +3.00 mL: +0.5 DV: -5, -3.8 and -2.2
			AAV-Cre-GFP	retrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	pENN.AAV.hSyn.HLeGFP-Cre.WPRE.SV40	ReRh	3.125×10^{12}	2 \times 0.5 μ L	AP: -1.8 and -2.3 mL: -1.9 DV: -7.1 and -7.2 Angle of 15 $^\circ$

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Experiment	Associated figure (s)	Delay	Virus	Serotype	Promoter	Reference (website)	Plasmid	Structure	Used titer (vg/mL)	Injected volume	Coordinates
//: thalamo-cortical disconnection	Suppl Fig. 6	5 wks	AAV-taCasp	5	EF1 α	https://www.mn.d.unc.edu/genetherapy/vectors/in-stock-aavvectors/shah/	pAAV.EF1 α .flex-taCasp3-TEVp.WPRE.hGH	PeriRe	2.1×10^{12}	1 \times 1 μ L	AP: -2.6 mL: +0.6 DV: -7.6
			AAV-Cre-GFP	retrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	pENN.AAV.hSyn.HLeGFP-Cre.WPRE.SV40	mPFC	1.25×10^{13}	2 \times 0.5 μ L (in each hemisphere)	AP: +3.00 mL: +/- 0.5 DV: -4.6 and -3.6
	AAV-taCasp	5	EF1 α	https://www.mn.d.unc.edu/genetherapy/vectors/in-stock-aavvectors/shah/	pAAV.EF1 α .flex-taCasp3-TEVp.WPRE.hGH	PeriRe	2.1×10^{12}	1 \times 1 μ L	AP: -2.6 mL: +0.6 DV: -7.6		
	AAV-Cre-GFP	retrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	pENN.AAV.hSyn.HLeGFP-Cre.WPRE.SV40	mPFC	1.25×10^{13}	3 \times 0.6 μ L (in every hemisphere)	AP: +3.00 mL: +/- 0.5 DV: -5, -3.8 and -2.2		

microinfusions (over 5 min) via a silicium infusion needle (30 G, Phymep). When both the mPFC and the ReRh were to be injected in the same animal, the surgeries were done in a single session. After leaving the needle in situ for an additional 5 min to ensure diffusion of the virus in the target structure, it was slowly retracted. Infusion sites were at the following coordinates (in mm): AP - 1.8 and -2.3 (from bregma), DV -7.1 and -7.2 (from skull), mL 1.9 (from midline of the sagittal sinus) for the ReRh, and for the mPFC, AP 3.0, DV -5.0, -3.8 and -2.2, and mL 0.5 and -0.5 (Paxinos and Watson, 2017) for all delays but 5 weeks; for the postsurgical delay of 5 weeks, only 2 injections were made on each side at DV -4.6 and -3.6 mm. In Exp 3, the vertical coordinates for the mPFC injections corresponded to those with the 3 sites/side. Finally, for ReRh sites, as the nuclei are medial, we used an angle of 15° to avoid damaging the venous sinus. More detail is given in Table 1 (volume, exact coordinates, etc).

After the last infusion, the scalp was sutured. All rats that underwent surgery were allowed to recover under a warm lamp for -30 min before being placed back into their homecage.

2.5. Histology

2.5.1. Perfusion and tissue sectioning

All rats were subjected to a lethal dose of ketamine (200 mg/kg, i.p.) and xylazine (30 mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with a cold (4°C) 4% paraformaldehyde (PFA) solution. Brains were removed and transferred to a 20% sucrose solution for 48 h at 4°C before being snap frozen (in isopentane, -40°C) and subsequently stored at -80°C. Serial coronal sections (40 μ m) were cut through the prefrontal cortex and the midline thalamus using a cryostat at -20°C (Leica CM3050S). The sections were kept floating in a cryoprotective solution at -80°C until being processed for histological staining.

2.5.2. Fluorescent Immunohistochemistry

The localization and extent of the viral infection could be observed directly under a fluorescence microscope, without any immunostaining. However, a NeuN protein immunostaining was performed in order to facilitate the observation of the different brain regions. Some sections were also immunostained for calretinin and calbindin, two neuronal cytoplasmic proteins. Sections were also stained for either GFAP (a marker of astrocytes) or Iba1 (a marker for microglia). Anti-GFP immunostaining was performed in the mPFC.

Every immunostaining was performed on free-floating brain sections evenly distributed along the entire rostro-caudal extent of the ReRh or the mPFC, as previously described (e.g. Klein et al., 2019). Briefly, sections were rinsed three times during 10 min in a PBS merthiolate buffer before being soaked for 1 h in 5% normal horse serum in PBS containing 0.5% Triton X-100. The sections were then transferred into the primary antibody solution and kept overnight at room temperature. Then, they were rinsed 3 \times 10 min in PBS, and soaked for 2 h in a buffer solution containing the secondary antibody. Finally, they were rinsed three times in PBS (the second rinsing contained DAPI to stain cell nuclei) and mounted with Mowiol® (Sigma Aldrich).

All the antibodies used are described in Table 2.

2.5.3. Image acquisition

All images were acquired with Axio Imager (Zeiss), an epifluorescent microscope equipped with a motorized x-y-z stage control. Mosaics were performed using the Zen (Zeiss) software. The same light intensity and exposure time were used for all sections. Focus was made on the NeuN channel, and parameters were determined according to the strongest signal. Areas of interest in stained sections were taken using a 10x objective.

2.5.4. Quantification

All quantifications were done with the free access software QuPath (e.g., Bankhead et al., 2017; Humphries et al., 2021). It is noteworthy

Table 2

Methodological precisions about the antibodies used for the various immunostainings performed in our four experiments.

Antibody against	Host species	Provided by	Catalog reference	Conjugated fluorochrome	Incubation dilution
GFAP	Rabbit	Millipore	AB5804	None	1/1000
Iba1	Guinea Pig	Synaptic systems	HS-234 004	None	1/500
NeuN	Mouse	Millipore	MAB377	None	1/1000
Calretinin	Mouse	Swant	6B3	None	1/1000
Calbindin	Rabbit	Millipore	ABN2192	None	1/500
Guinea Pig	Goat	Invitrogen	A21450	Alexa Fluor 647	1/500
Rabbit	Goat	Invitrogen	A32733	Alexa Fluor 647	1/500
Mouse	Donkey	Invitrogen	A32744	Alexa Fluor	1/1000

that we did not use an unbiased stereological method. Instead, quantification was performed with freely available software. As the immunostainings were not processed in a single batch, differences in fluorescence signal were normalized with visualization parameters. The quantifications were done on 7–12 slides (mean: 9.11) per rat for GFP and NeuN, on 3–9 slides (mean: 4.58) per rat for Iba1, and on 4–8 slides (mean: 4.78) per rat for GFAP. If not stated otherwise, we then calculated the mean of all slides for a single rat, before calculating the mean of all rats of every group.

2.5.5. Area delineation

In order to estimate the extent of the viral infection, neuronal loss, and glial responses, we outlined the associated regions with the “Polygon” tool (see [Supplementary Fig. 1](#)). To avoid any bias, we only selected the channel of interest (e.g.: Alexa Fluor 594 for neuronal loss) and outlined the region for every rat of every group (1WK, 2.5WKS, 5WKS, 10WKS) before starting the next channel.

2.5.6. Intensity measurements

The intensity of the GFP fluorescent signal was quantified with the “Add intensity features” tool of QuPath, in every viral infection area. The parameters were as follows: Preferred pixel size: 2 μm ; Region: ROI; Tile diameter: 25 μm ; Channels: GFP; Basic features: Mean; Haralick distance: 1; Haralick number of bins: 32.0.

2.5.7. Cell density

In order to evaluate the density of the different cell types (neurons, astrocytes, microglia), we used the “Classifier” tool. We first run the StarDist extension script, which was trained to detect and segment nuclei on a DAPI staining ([Weigert et al., 2020](#)).

Once the nuclei were detected, we trained a classifier to sort the nuclei that showed positive to another staining, for example the (DAPI+NeuN)-positive nuclei were sorted as neurons (see [Supplementary Fig. 1](#)). This training was made on 1 slide per rat, by one experimenter per channel, and in shades of grey to facilitate visualization of contrasts. For the reasons mentioned above, we trained a different classifier for every immunostaining batch. Once the classifier was trained, it was run on the viral infection area of every slide.

2.6. Statistical analyses

Unless otherwise specified and depending on the experiment, data analyses used Student’s t tests or two-way ANOVAs, with repeated measures where appropriate. Likewise, where appropriate, these analyses were completed by multiple comparisons using the Newman–Keuls multiple range test. In the case of non parametric distributions, we used a Kruskal–Wallis (K-W) test, followed by a Dunn multiple comparisons test. Homogeneity of variance and normality of distribution were tested systematically. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Experiment 1: Retrograde AAVrg-Cre-GFP injections into the ReRh nuclei combined with intracortical injections of anterograde AAV5-taCasp

We injected $2 \times 1 \mu\text{L}$ of the retrograde AAVrg-Cre-GFP preparation into the ReRh nuclei. The injected solution had a titer of 1.25×10^{13} vg/mL. This is half the titer preconized by Addgene, although in the website catalog, the viral solution is proposed for use in living animals as provided. It is also noteworthy that studies published in the literature have used titers $> 10^{12}$ vg/mL, with injection volumes usually of the μL order (e.g., [Cearley and Wolfe, 2007](#); [Chen et al., 2021](#); [Shen et al., 2016](#), [Stewart et al., 2021](#); see also [Erben et al., 2022](#) regarding the titer). All of our rats injected with the AAVrg-Cre-GFP also received a unilateral injection of the AAV5-taCasp ($2 \times 0.5 \mu\text{L}$) into the medial prefrontal cortex (mPFC), using a solution with a titer of 2.1×10^{12} vg/mL. The contralateral side was left unoperated and served as control. The rats were kept for a post-surgical survival time of 5 weeks. Histological observations are illustrated in [Figs. 1 and 2](#).

In the mPFC, we found a reduction of the number of GFP-positive cells on the side in which the AAV5-taCasp had been injected as compared to the contralateral hemisphere ([Fig. 1](#)). These GFP-positive cells were quantified, and the resulting data analyzed using a t-test for paired samples. On the side injected with the AAV5-taCasp, the number of GFP-positive neurons was reduced by about 40% in average as compared to the contralateral hemisphere. Statistical analyses considering the 21 sections from the 3 rats (7 per rat) with correct injections showed that this difference was significant ($t_{(20)} = 5.385$, $p < 0.001$; [Fig. 1](#)). It is noteworthy that, in contrast to the ReRh nuclei, where the virus also carries a reporter gene that reflected the localization and extent of infection, in the mPFC the extent of infection could only be visualized indirectly (i.e., by the reduction in the number of GFP-positive neurons). Indeed, the caspase gene is too large to associate a reporter gene with it in an AAV.

In the ventral midline thalamus (VMT), we induced a widespread transduction of the AAVrg-Cre-GFP, as illustrated by the localization of GFP-positive cells within and in the close vicinity of the ReRh nuclei ([Fig. 2a, 2b](#)). The brain sections through the VMT were processed for DAPI staining and anti-NeuN immunostaining. DAPI staining appeared normal in the region infected with the AAVrg-Cre-GFP ([Fig. 2c, 2d](#)). Indeed, the stained nuclei showed no abnormal density in comparison with surrounding regions. This infected region, however, was almost completely devoid of NeuN-positive cells ([Fig. 2d, 2e, 2f](#)), possibly indicating an unexpected loss of neurons in the region confined to the spread of the infection. Such loss would point to neuronal toxicity of the AAVrg-Cre-GFP construct in a region roughly corresponding to the viral infection. [Supplementary Fig. 2 and 3](#) provide illustrations with larger magnifications of the same kind of material.

As we could not exclude that this toxicity might have been related to an alteration of the viral construct, we checked that the construct had not been altered. We used a sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). It resulted in the separation of all the proteins into three distinct bands corresponding to the three AAV-capsid proteins VP1, VP2 and VP3 (see [supplementary Fig. 4](#)). The absence of

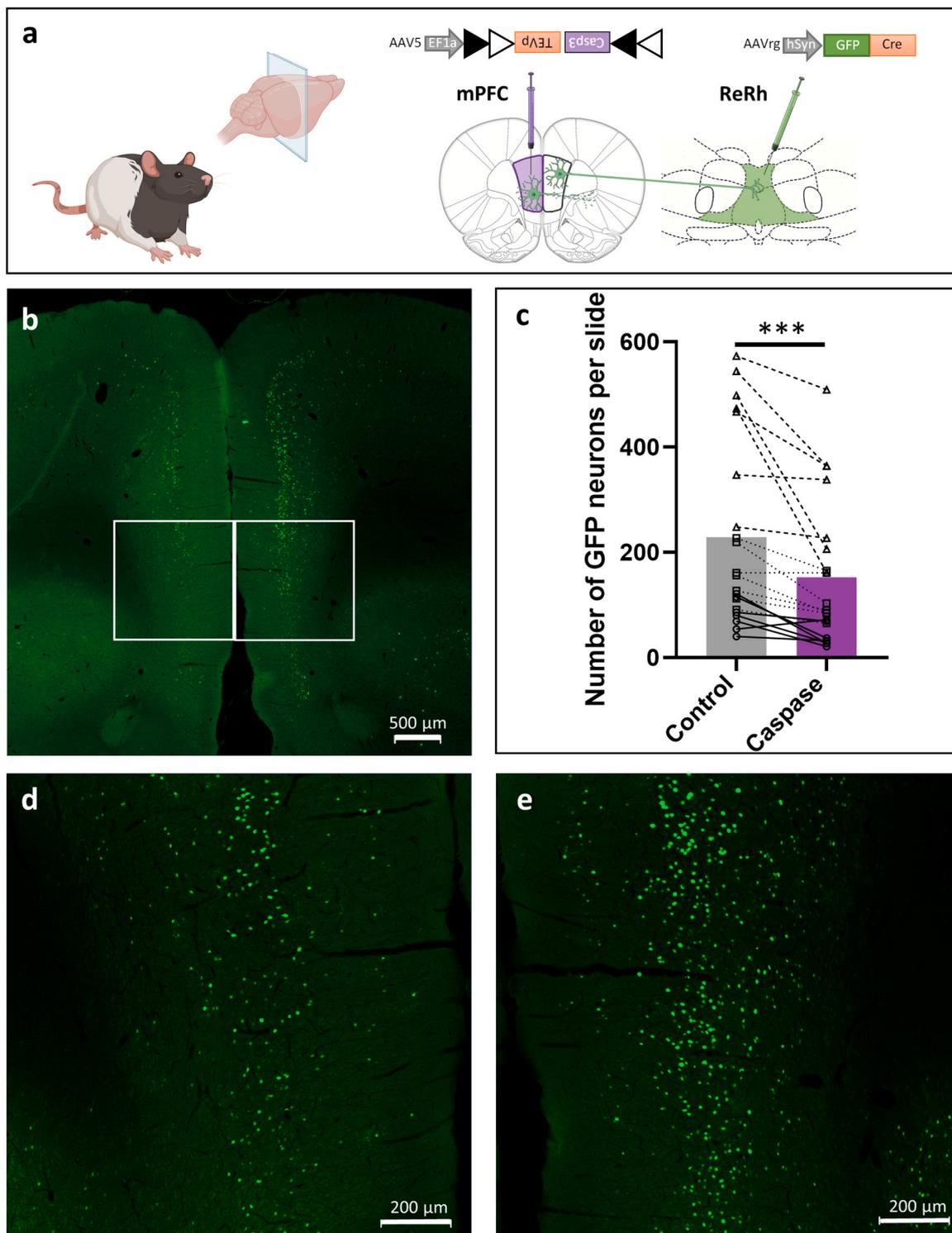


Fig. 1. (a) Surgical protocol used in Experiment 1. The AAV containing the floxed caspase gene was injected unilaterally into the medial prefrontal cortex (mPFC) of Long-Evans male rats, which also received an injection into the reuniens and rhomboid (ReRh) nuclei of the virus containing the Cre-GFP gene coding for the fluorescent fusion protein. (b) Image showing GFP-positive neuronal nuclei in the mPFC. (d) and (e) are higher magnifications of the cortical regions delimited by squares in (b); (d) is showing the side in which the AAV5-taCasp has been injected; the contralateral side (e) is used as the non-injected control. Scale bars are shown directly on the photographs. (c) Number of neurons counted in each section prepared from the brain of 3 rats; open circles joined by solid lines are from one rat, open triangles joined by dashed lines are from another rat, and open squares from the last rat are joined by stippled lines. The bars show the average value on the side injected with the AAV-taCasp (left) and its contralateral control (right). Statistical analysis: ***, $p < 0.001$. There is a relatively large inter-individual variability, which most probably reflects variability across infection degrees within the ReRh nuclei and thus across slices.

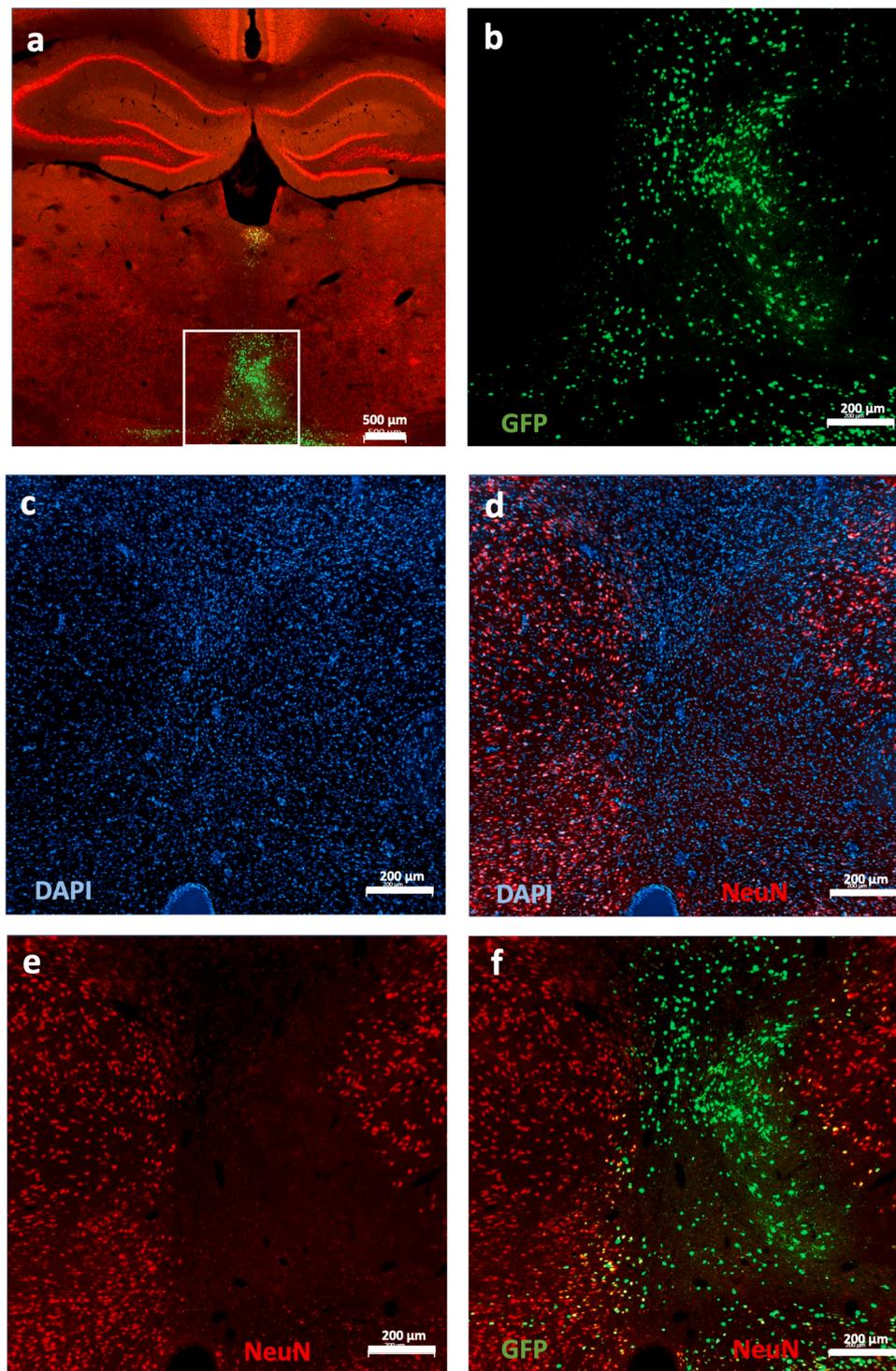


Fig. 2. (a) Images showing the localization of the transduction in the ReRh nuclei in a section immunostained for the neuronal nuclear protein NeuN. The post-surgical survival time was of 5 weeks; all photographs are from the same section. (b) is a higher magnification of the thalamic region delimited by the square in (a); only GFP staining is shown. (c) same region as in (b) with focus on DAPI staining in the ventral midline thalamus. (d) same region as in (b) and (c) with DAPI and NeuN staining merged; notice that there is a DAPI-positive region almost completely devoid of NeuN staining. (e) same region as in (b), (c) and (d), but with only NeuN-positive staining. (f) same region as in (b), (c), (d) and (e) with NeuN and GFP staining merged. Notice that GFP-positive staining (b,f) is confined to the ventral midline of the thalamus, in the region of the ReRh nucleus, and that the spread of neurodegeneration (d,e,f) is well superimposed with that of the infection (f), as accounted for by the GFP-positive staining. Dimensions of the scale bar are shown directly on the photographs.

an extra band indicates the absence of any virus contamination. Furthermore, we could not exclude a priori that subsequently to the nuclear production of the fused CreGFP protein, the recognition of NeuN by the anti-NeuN antibody could have been altered (e.g., due to epitope masking). Therefore, we performed additional immunostaining with

antibodies raised against either calbindin or calretinin, two calcium-binding proteins expressed by ReRh neurons either separately or conjointly, and characterizing different neuronal subpopulations of this thalamic brain region (Viena et al., 2021). This additional staining confirmed that, in the vicinity of the AAVrg-Cre-GFP

injection/transduction site, both single- and dual-labelled cells had almost completely disappeared (see [supplementary Fig. 5](#)). This observation confirmed that neurons were actually lost.

Were these observations specific to the VMT, which, for unknown reasons, might have shown a particular fragility to the viral infection or the AAV2 serotype? To address this question, we injected $2 \times 0.5 \mu\text{L}$ of AAVrg-Cre-GFP into the medial prefrontal cortex (mPFC) of 6 rats, at a titer of 1.25×10^{13} . After a postsurgical survival time of 5 weeks, we also

found evidence for neuronal degeneration in the mPFC ([supplementary Fig. 6](#)), indicating that the neurotoxicity was apparently not specific to a particular brain region. Again, DAPI staining appeared normal in the region of the mPFC that revealed devoid of neurons (not illustrated). Similar observations were made in rats injected with $3 \times 0.6 \mu\text{L}$ of AAVrg-Cre-GFP on each cortical side after a post-surgical survival time of 10 weeks (not illustrated).

The combination of the intrathalamic injection of the AAVrg-Cre-

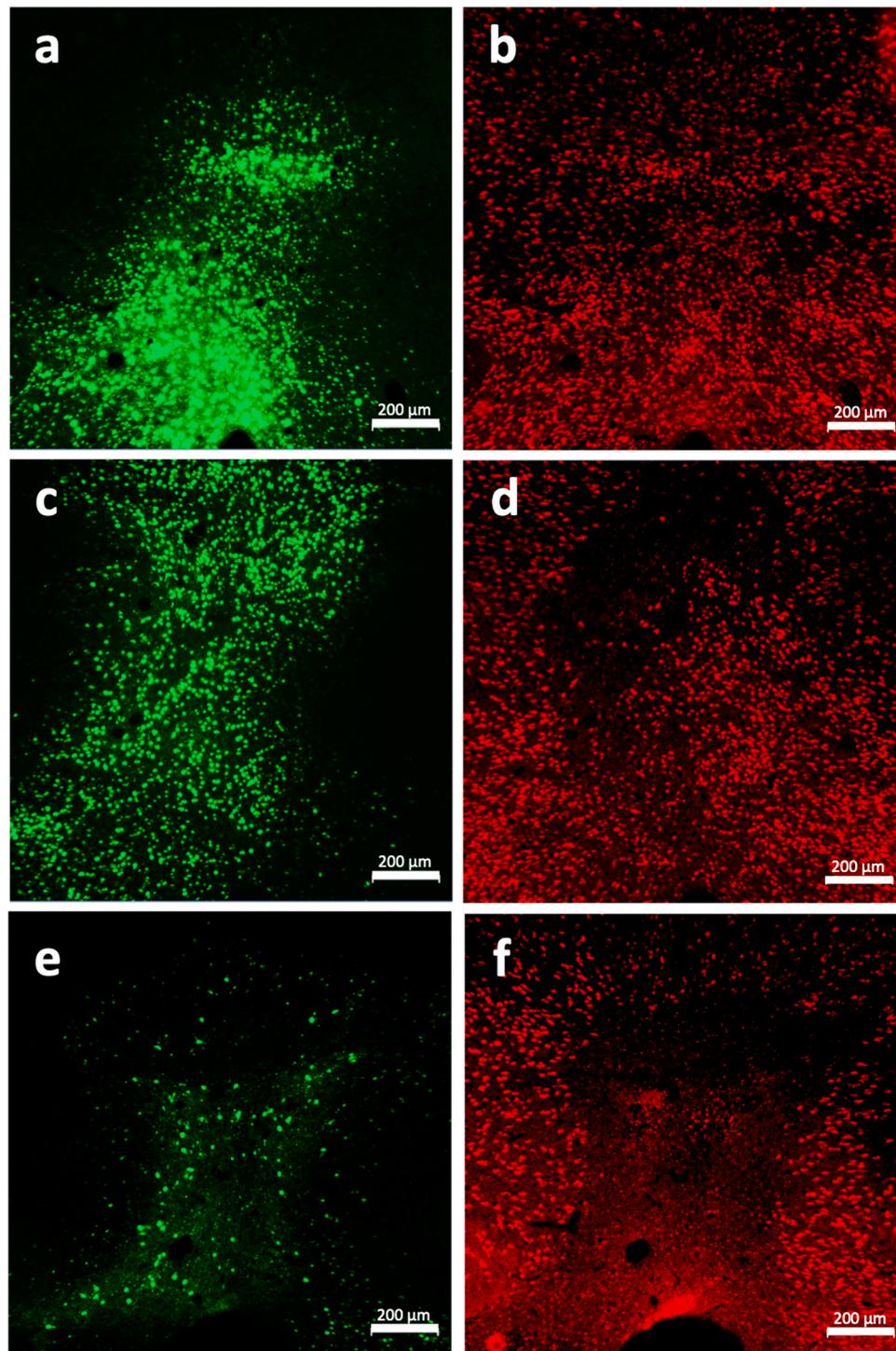


Fig. 3. Illustrations of the transduction found in the ReRh nuclei at post-injection delays of 1 (a,b), 2.5 (c,d) and 10 weeks (e,f). Rats have been injected with the AAVrg-Cre-GFP into the ReRh nuclei. (a), (c), (e) show GFP-positive nuclei in the ReRh, (b), (d), (f) show NeuN immunostaining in the same regions as shown on their left. Notice the evidence for a progressive disappearance of NeuN-positive cells within the region of transduction, which parallels a reduction of the GFP-positive signal. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

GFP and the intracortical injection of the AAV5-taCasp constructs resulted in damage to mPFC neurons. However, information provided by DAPI and NeuN staining in the ventral midline thalamus (near-normal nuclear staining vs. neuronal depletion) appeared paradoxical, what clearly required further investigation.

3.2. Experiment 2: Time line of AAV-Cre-GFP effects

3.2.1. Neuronal toxicity

To further our investigation, based on the observations shown in Fig. 2, we decided to characterize the effects of the retrograde AAVrg-Cre-GFP at various post-injection delays, with a maximal delay of 10 weeks post-surgery. This second experiment aimed to follow the chronology of the presumed neuronal toxicity of the viral construct. Our hypothesis was that, at shorter delays, toxicity could have been weaker or even absent. Therefore, we injected $2 \times 1 \mu\text{L}$ of the retrograde AAVrg-Cre-GFP preparation into the ReRh nuclei, using the same titration as in experiment 1 (i.e., 1.25×10^{13} vg/mL). As we only focused on the possible toxicity of AAVrg-Cre-GFP, no AAV5-taCasp construct was systematically injected into the prefrontal cortex. The rats were killed at postsurgical delays of 1, 2.5, and 10 weeks. Data are illustrated in Fig. 3. Evidence for transduction was found at all post-surgical delays, with an overall picture of fluorescence at 10 weeks post-surgery that was attenuated compared to that observed after 5 weeks in experiment 1 (Figs. 3a, 3c, 2b and 3e). At earlier time points (Figs. 3a and 3c), the amount of GFP-positive cells in the VMT was clearly larger. Because of these apparent differences, we decided to quantify the extent of the area in which fluorescence was increased in comparison with the background. We also quantified the intensity of the GFP signal (see

Experimental procedures) and the density of NeuN-positive nuclei in this area (see supplementary Fig. 1). Identical quantifications were performed on the histological material obtained in Experiment 1, thus corresponding to the 5-week post-surgical delay. Whereas the extent of the area of GFP fluorescence appeared relatively constant across delays, we observed a delay-dependent decrease of the GFP signal intensity: the longer the delay, the weaker this intensity (Figs. 3a, 3c, 2b and 3e). In parallel, we observed a progressive decrease of the density of NeuN-positive nuclei in the VMT (Figs. 3b, 3d, 2e and 3f). This was confirmed by an analysis of our quantitative data (Fig. 4). Regarding the extent of the transduction area, a one-way ANOVA showed no significant Delay effect ($F_{(3,15)} = 0.23$, $p = 0.87$). A Kruskal-Wallis (K-W) one-way ANOVA of the intensity of GFP-positive clusters within the transduction limits showed a significant Delay effect ($p < 0.001$). Using the Dunn test to perform multiple comparisons, we found the difference between the 1-week and 10-week delays to be significant ($p < 0.002$); the other differences did not reach significance. Regarding the density of NeuN-positive nuclei, the one-way ANOVA showed a significant Delay effect ($p < 0.0001$). Multiple comparisons (Newman-Keuls test) showed significant differences between the 10-week and either the 1-week ($p < 0.001$) or the 2.5-week ($p < 0.001$) delays; and between the 5-week and either the 1-week ($p < 0.01$) or the 2.5-week ($p < 0.01$) delays; the difference between 5 and 10 weeks did not reach significance. The extent of the area of neuronal loss (on frontal sections; Fig. 4e) as well as the ratio between the area of neuronal loss and the area of viral transduction (Fig. 4f) were also quantified. Regarding the former, an ANOVA showed a significant Delay effect ($F_{(3,15)} = 45.25$, $p < 0.001$). The following differences were significant: 1 week vs. 5 weeks ($p < 0.001$) and 10 weeks ($p < 0.001$); 2.5 weeks vs. 5 weeks ($p < 0.01$) and 10 weeks ($p <$

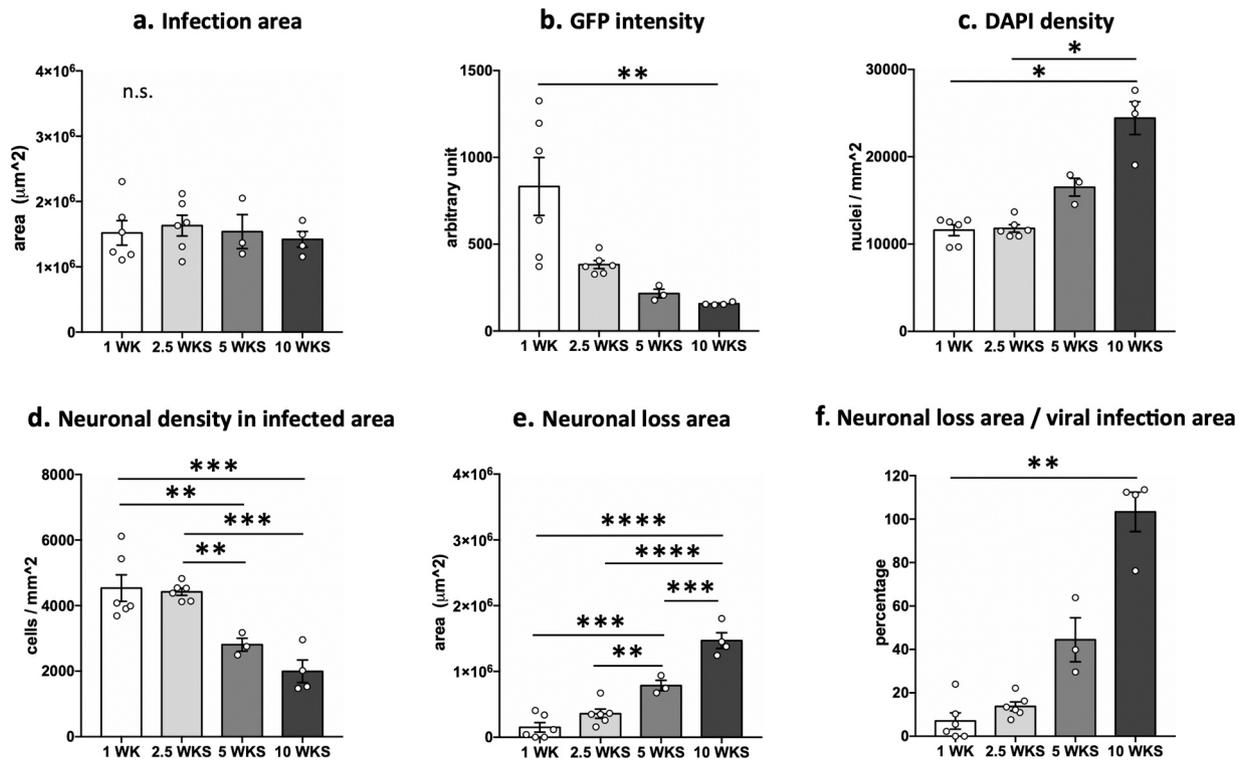


Fig. 4. Bar graphs illustrating our quantitative or semi-quantitative approaches. (a) Extent of the transduction area at various post-injection delays (1, 2.5, 5 and 10 weeks post-injection; data corresponding to 5 weeks are from experiment 1, the others are from experiment 2). (b) Semi-quantitative estimation of GFP intensity in the transduction area; the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.01$ (**). (c) Quantitative estimation of DAPI density in the transduction area; at 10 weeks post-injection, the density was significantly larger than at the 1-week and 2.5-week (*, $p < 0.05$) delays; the other differences were not significant. (d) Quantitative estimation of the neuronal density in the transduction area; significance for the indicated differences is: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (e) Quantitative estimation of the extent of the area of neuronal loss within the region of transduction; significance for the indicated differences is: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (f) Computation of the ratio between the extent of the area of neuronal loss and the area of transduction; the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.01$ (**).

0.001); 5 weeks vs. 10 weeks ($p < 0.001$). As to the ratio between both areas, the K-W ANOVA showed a significant Delay effect ($p < 0.001$), the only significant difference being between 1 and 10 weeks ($p < 0.01$).

Thus, taken together, these data point to an AAVrg-Cre-GFP that produced a protracted neuronal toxicity ending up, within 10 post-surgical weeks, in an almost complete loss of neurons in the region of transduction. Most of the toxic effects are reached between 2.5 and 5 weeks post-surgery. Again, as in experiment 1, DAPI staining appeared relatively constant, all along (Supplementary Fig. 7). As the DAPI density was also quantified, we performed a K-W ANOVA that showed a significant Delay effect ($p < 0.001$). With the Dunn test, we found a significant difference between the 10-week and either the 1-week ($p < 0.05$) or the 2.5-week ($p < 0.05$) delays; other differences did not reach significance.

3.2.2. Glial reactions

How can one explain that neurons undergo progressive degeneration following AAVrg-Cre-GFP injections into the VMT when the density of DAPI-stained nuclei remains apparently unchanged over the same time? Because DAPI does not distinguish between neurons and glial cells (for it stains AT regions of DNA), we hypothesized that cells within the region of transduction and neuronal loss could be glial cells reflecting a glial reaction, especially astrocytes and microglia. Indeed, astrocytes and microglia are major actors of neuroinflammation and come into play in case of neurodegeneration, whatever the latter's origin (e.g., Kwon and Koh, 2020). This is why we performed two additional immunostainings, one targeting astrocytes (with an antibody against GFAP), the other targeting microglial cells (with an antibody against Iba1). The data are illustrated in Fig. 5 and Fig. 6. At 1 week post-surgery, the GFAP immunoreactivity was virtually absent from the VMT. Clearly detectable at the 2.5-week delay, it reached a maximal staining intensity at the 5- and 10-week delays, suggesting a delay-dependent increase of astrocytic migration/reaction. A similar temporality was observed for microglial cells, the Iba1-positive staining being minimal (but not absent) at the 1-week delay and maximal at the 10-week delay. These staining signals were quantified. We measured the area covered by GFAP-positive or Iba1-positive staining, the density of cells within the stained areas, as well as the ratio between the area covered by the glial scar/region of microglial activation and that of the transduction as deduced from the GFP-positive staining. Regarding GFAP, K-W ANOVA of the area covered by the glial scar showed a significant Delay effect ($p = 0.02$). The only significant difference shown by a Dunn test was between 1 and 10 weeks ($p < 0.05$). The one-way ANOVA of GFAP density showed a significant Delay effect ($F(3,14) = 11.24$, $p < 0.001$). Multiple comparisons indicated significant differences between 1 week and either 5 ($p < 0.01$) or 10 weeks ($p < 0.001$), but also between 2.5 weeks and 5 ($p < 0.05$) or 10 weeks ($p < 0.01$). K-W ANOVA of the ratios showed a significant Delay effect ($p = 0.039$), but none of the differences reached significance. As to Iba1, one-way ANOVA of the activation area showed a significant Delay effect ($F(3,15) = 13.77$, $p < 0.001$), and multiple comparisons revealed significant differences between 1 week and 2.5 ($p < 0.05$), 5 ($p < 0.05$) and 10 weeks ($p < 0.001$), as well as 2.5 weeks ($p < 0.01$) or 5 weeks ($p < 0.05$) and 10 weeks. For the density of the Iba1 signal, a K-W ANOVA showed a significant Delay effect ($p < 0.001$), which was due to a significant difference between 1 and 10 weeks ($p < 0.01$), only. Finally, a K-W ANOVA of the ratio showed a significant Delay effect ($p < 0.001$), pairwise comparisons pointing to a larger ratio at 10 weeks as compared to 1 ($p < 0.01$) or 2.5 weeks ($p < 0.05$).

Altogether these data indicate that the AAVrg-Cre-GFP injection resulted in a progressive glial reaction, as attested for by the progressive increase of GFAP- and Iba1-positive staining. That this reaction was linked to the neurotoxic effects of the AAVrg-Cre-GFP is suggested by the high positive correlation between the area of neuronal loss and the area of microglial activation on sections passing through the ventral midline thalamus ($r = 0.924$, $p < 0.001$; see Supplementary Fig. 8).

3.3. Experiment 3: Reduction of the viral titer

Next, we tested if the injection of AAVrg-Cre-GFP using a smaller solution volume (i.e., $2 \times 0.5 \mu\text{L}$) and a reduced titer would result in attenuated toxicity in the ReRh nuclei. Four titers were tested: 6.25×10^{12} , 3.125×10^{12} , 1.25×10^{12} , 1.25×10^{11} vg/mL, in addition to the one used in Experiments 1 and 2. The volume/titer producing toxicity in the aforementioned experiments was not included, as we reduced the volume injected. Rats were kept for a 5-week post-surgical survival time, a delay at which we had observed strong toxicity with the highest titer used. Data are illustrated in Fig. 7. In this figure, one can see that the second lowest titer (i.e., 1.25×10^{12} vg/mL) used resulted in limited GFP-fluorescence which confined along the cannula track and showed minimal spreading in the target region. A similar picture was observed with the lowest titer (i.e., 1.25×10^{11} vg/mL; not illustrated). Clearly, the transduction was by far insufficient or even inefficient with these two titers. With the next higher titer (i.e., 3.125×10^{12} vg/mL), the transduction had spread in the ReRh nuclei and the NeuN immunostaining showed no obvious evidence for local neuronal toxicity; on some sections, however, closest to the injection site, a restricted region of limited neuronal loss could be identified. With the highest titer, the transduction appeared correct, but there was clear-cut evidence for neuronal toxicity in and around the injection site, although to a much weaker extent than with the titer used in experiments 1 and 2. All these qualitative observations were confirmed in a quantitative approach aiming at measuring the extent of the infection area, of the area showing neuronal loss, of the neuronal density therein, and of the ratio between the area of neuronal loss and that of the infection extent, as shown in Supplementary Fig. 9. It is noteworthy that even with the titer of 3.125×10^{12} vg/mL, we found quantitative evidence for limited toxicity, which was significant.

3.4. Experiment 4: Combination of the retrograde AAVrg-Cre-GFP injections into the ReRh nuclei (at a less toxic titer) with an intracortical injections of anterograde AAV5-taCasp

Next, we asked if AAVrg-Cre-GFP used at a titer of 3.125×10^{12} vg/mL in combination with an intracortical injection of the AAV5-taCasp would result in damage to cortical neurons projecting to the ReRh nuclei. To answer this question, rats were injected with both viral preparations, AAV5-taCasp in the medial prefrontal cortex (same conditions as in experiment 1) and AAVrg-Cre-GFP in the ReRh nuclei (i.e., 3.125×10^{12} vg/mL). The AAV5-taCasp was injected unilaterally and the contralateral side was used as control. Histological observations are illustrated in Fig. 8. In the mPFC, we found a reduction of the number of GFP-positive cells on the side in which the AAV5-taCasp had been injected as compared to the contralateral hemisphere (Fig. 8). On the side injected with the AAV5-taCasp, the number of GFP-positive neurons was reduced by about 40 % in average as compared to the contralateral hemisphere (Fig. 8); this reduction was comparable to the one found in Experiment 1. Statistical analyses on all sections showed that this reduction was significant ($t_{(27)} = 5.790$, $p < 0.001$).

Thus, when the titer of AAVrg-Cre-GFP injected into the ReRh was reduced from 1.25×10^{13} to 3.125×10^{12} and coupled to an intracortical injection of the AAV5-taCasp, we significantly reduced the intrathalamic toxicity of the first virus and found a capability for the combination to damage part of the mPFC neurons projecting on ventral midline thalamic targets.

4. Discussion

The start point of the current series of experiments consisted in combining an AAVrg-Cre-GFP injected into the ReRh nuclei with an AAV5-taCasp injected into the mPFC in order to selectively damage neurons that project from this cortical region to the ventral midline thalamus (VMT). While a proportion of neurons in the mPFC were

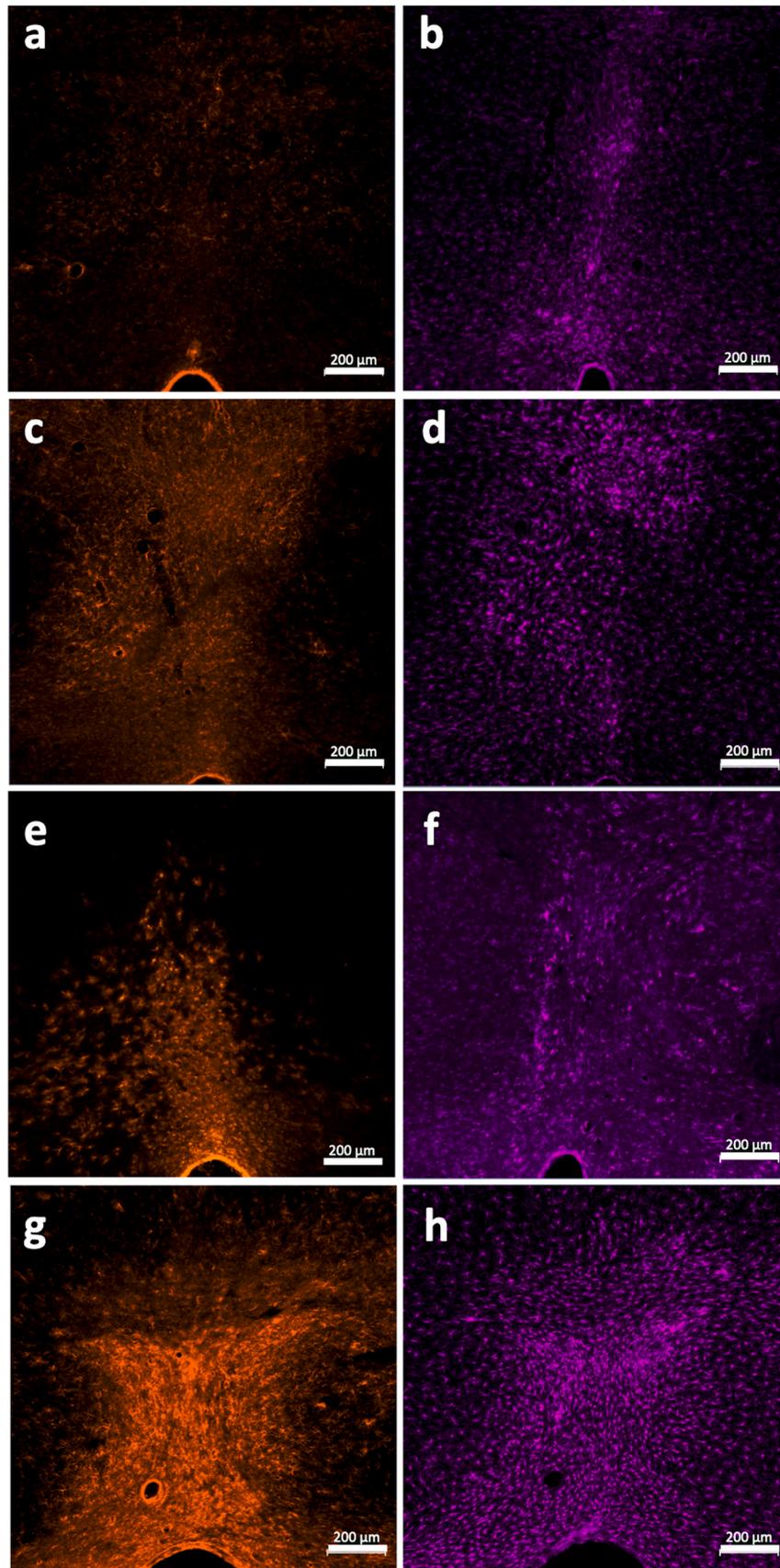


Fig. 5. Images showing GFAP (astrocytes; on the left) and Iba1 (microglia; on the right) immunostaining in the region of transduction at various delays after the injection into the ReRh nuclei of the AAV-Cre-GFP, namely 1 week (a,b), 2.5 weeks (c,d), 5 weeks (e,f), and 10 weeks (g,h). Notice the delay-dependent increase of staining accounting for reactive astrocytes and microglia. Dimensions of the scale bar are shown directly on the photographs.

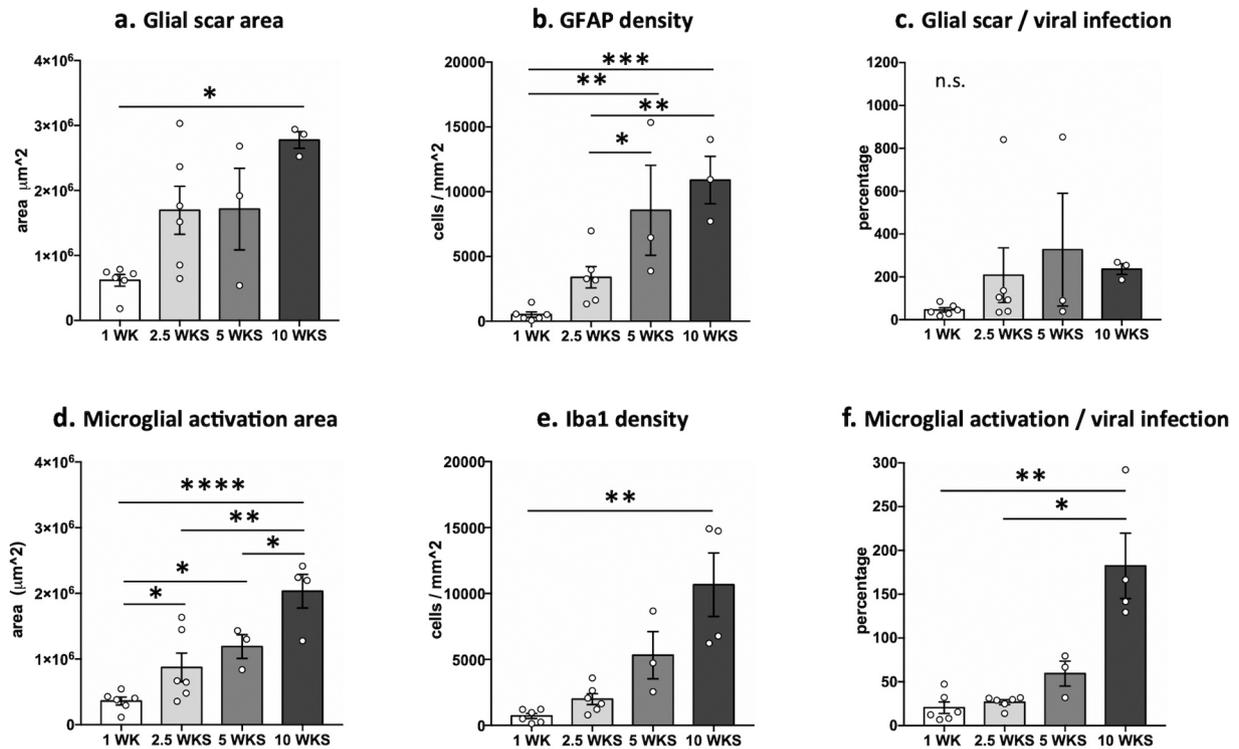


Fig. 6. Bar graphs illustrating our quantitative approaches of the histological material illustrated in Fig. 5. (a) Extent of the glial scar at various post-injection delays (1, 2.5, 5 and 10 weeks; data corresponding to 5 weeks are from experiment 1, the others from experiment 2); the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.05$ (*). (b) Quantitative estimation of GFAP staining density in the transduction area; at 10 weeks post-injection, the density was significantly larger than at the 1-week (***) and 2.5-week (**, $p < 0.01$) delays, and at 5 weeks post-injection, the density was also significantly larger than at 1 week (**, $p < 0.01$) and 2.5 weeks (*, $p < 0.05$). (c) Computation of the ratio between the extent of the glial scar and the area of transduction; no difference was significant. (d) Quantitative estimations of the extent of the glial scar at the various post-injection delays; analyses showed a progressive extension of the zone over time; significance for the indicated differences is: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (e) Quantitative estimation of the density of Iba1 staining in the transduction area over time; the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.01$ (**). (f) Computation of the ratio between the extent of the area of microglial activation and the area of transduction; the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.01$ (**), as well as that between 2.5 weeks and 10 weeks, $p < 0.05$ (*).

actually killed, we observed an unexpected and ultimately massive neurotoxicity of the AAVrg-Cre-GFP in the ReRh. Such neurotoxicity, which was also found when the viral construct was injected into the mPFC, contrasted with an apparently normal or slightly increased density of DAPI-positive nuclei. Staining of reactive astrocytes and microglial cells demonstrated a progressively increasing density of these cells within the limits of the viral transduction. By reducing the viral titer (to a 3.125×10^{12} vg/mL concentration + injecting half the volume, i.e., $2 \times 0.5 \mu\text{L}$, in the ReRh), we obtained a reduction of the toxicity in the ReRh, but kept the possibility to induce an at least partial but targeted disconnection between the mPFC and the ReRh nuclei.

4.1. Neuronal ablation a combination of virus-delivered Cre and Cre-dependent caspase

Cre-dependent caspase has been used to selectively ablate populations of neurons of the central nervous system in recent studies. A typical approach consists in using transgenic mice (or rats) preferentially expressing Cre in particular neurons of the brain. These regions are then infected with a viral vector carrying a floxed caspase (e.g., Basting et al., 2018; Bossert et al., 2023; Hatter and Scott, 2023; Laurent et al., 2017; Mazuski et al., 2020; Nadel et al., 2020; Walker et al., 2022; Whylings et al., 2021). In the current study, we combined the injection of two AAV vectors, one retrograde with both the Cre and a reporter genes injected into the ReRh nuclei, and another one, anterograde, with the caspase gene injected into the mPFC. Our goal was to specifically damage neurons of the mPFC that project to the ventral midline thalamus. To the best of our knowledge, it is the first time that such an

approach targeting mPFC to ReRh projections is performed in rats. The combination of a Cre-containing AAV with a caspase-containing AAV has been the methodological option in at least one other study, which aimed to damage the neurons of the median preoptic nucleus projecting to the paraventricular nucleus (Marciante et al., 2020). In a previous study, Xu and Südhof (2013) had blocked the projections from the mPFC to the Re. However, they bilaterally injected a 2xFlx-TetTox AAV into the mPFC and a WGA-cre AAV into the Re and subsequently assessed contextual fear generalization, which was affected by the selective blockade. If one disregards the undesired effects of AAVrg-GFP-Cre in the ReRh nuclei, our histological verifications demonstrate the feasibility of the combined anterograde and retrograde AAV approach. Indeed, for AAVrg-GFP-Cre, whether with a viral titer causing neurotoxicity in the VMT (Fig. 1) or with a titration reduced by a factor 4 and half the volume injected (Fig. 8), we have been able to observe an about 40% reduction of the number of GFP-positive neurons on the injected side of the mPFC as compared to the contralateral control side. Obviously, this finding does not allow us to conclude that we have destroyed neurons projecting from the mPFC to the ReRh nuclei in a proportion that would be sufficient to induce detectable behavioural alterations. To do this, one would need to have AAV5-taCasp bilaterally in the mPFC and test the rats in a battery of behavioural evaluations that have proved sensitive to damage to the ReRh nuclei (e.g., the cognitive shifting test used by Cholvin et al., 2013, or the systemic memory consolidation tests used by Loureiro et al., 2012, or Quet et al., 2020). Moreover, in the current study, despite our various quantifications, it was not possible to know what proportion of cortical neurons have been destroyed among all cortical neurons projecting to the ReRh nuclei. There were at least

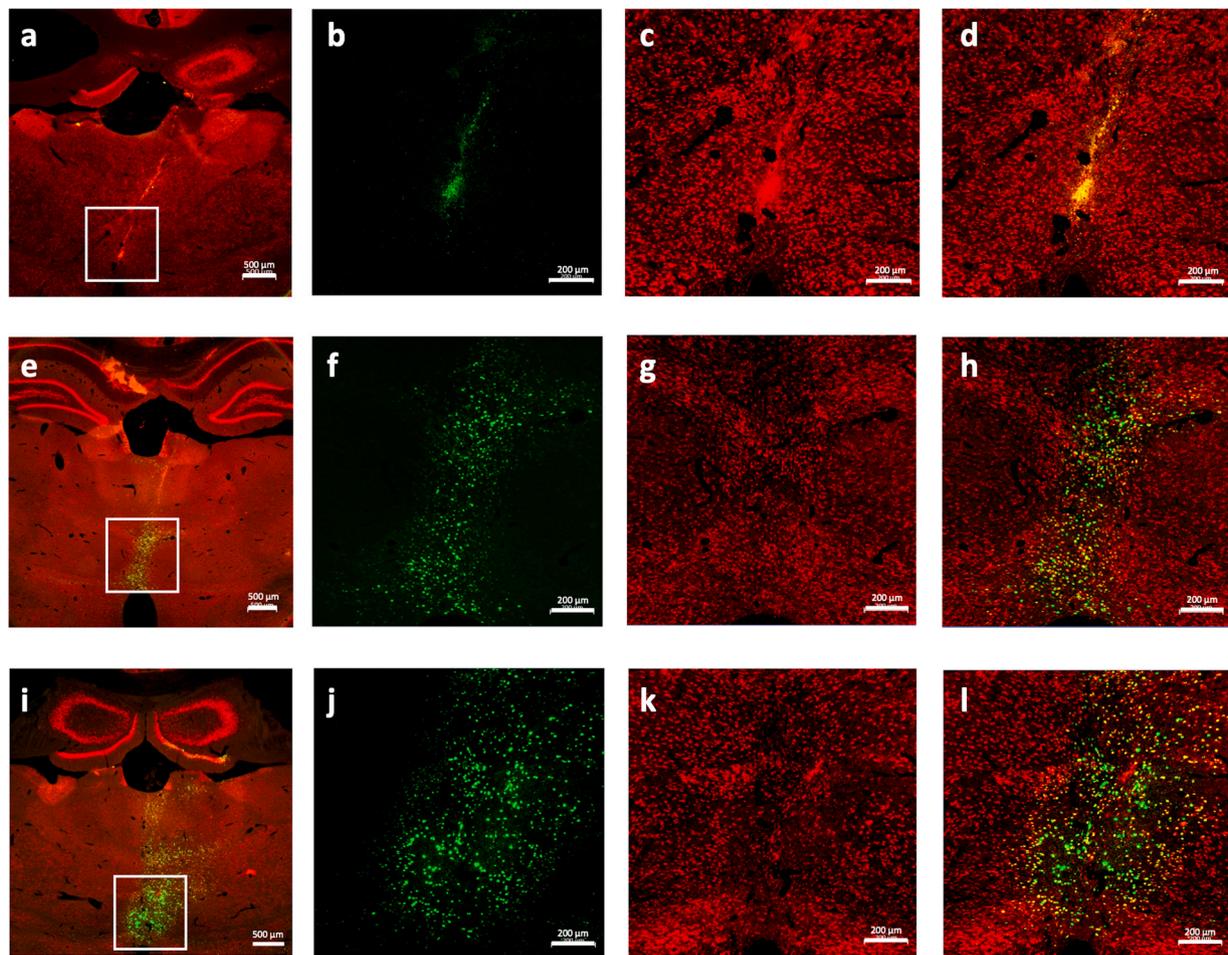


Fig. 7. Images showing the localization of the transduction in the ReRh nuclei on sections immunostained for the neuronal nuclear protein NeuN. Compared with experiments 1 and 2, the volume injected at each injection site was divided by 2 (i.e., 0.5 μ L instead of 1 μ L/site). In this experiment, we also reduced the titer. (a-d) are from rats injected with the AAV-Cre-GFP virus at a titer of 1.25×10^{12} vg/mL. (e-h) are from rats injected with the AAV-Cre-GFP virus at a titer of 3.125×10^{12} vg/mL. (i-l) are from rats injected with the AAV-Cre-GFP virus at a titer of 6.25×10^{12} vg/mL. The post-injection delay was of 5 weeks in all cases. On the left (a, e, i), NeuN and GFP are merged and low magnification indicates the location of the transduction region. All other photographs show a higher magnification focusing on the transduction region: GFP fluorescence is shown alone in (b,f,j), NeuN staining is shown alone in (c,g,k), and a merge of both is shown in (d,h,l). Notice that with the lowest titer the transduction was extremely limited, which is not the case with the two other titers; we found no evidence for toxicity. With the titer of 6.25×10^{12} vg/mL, we obtained a good transduction, but neuronal toxicity was observed. With the titer of 3.125×10^{12} vg/mL, the transduction was still acceptable, but we found no evidence for neurotoxicity. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

two reasons for this: first, the number/proportion of cortical neurons projecting to the ReRh nuclei is not known; second, we have no idea about the proportion of mPFC neurons projecting to the ReRh nuclei that have been labelled with the retrograde virus.

4.2. Neurotoxicity of the GFP-Cre fusion protein or of Cre

Our current report is the first to show neurotoxicity of AAVrg-Cre-GFP when the viral construct is injected into the VMT of rats. Such toxicity, however, is not particular to the VMT as it was also observed in the mPFC when the same viral construct was injected in this cortical region (supplementary Fig. 6; notice that the cortical lesions appeared less extended than in the ReRh nuclei, which was probably due to the fact that we injected a smaller volume of the viral construct into the mPFC). Other studies found similar results with an AAV-Cre-GFP injected in other brain regions. For instance, Rezaei Amin et al., (2019) have injected AAV2.hSyn.eGFP-Cre.WPRE.SV40 into the substantia nigra of mice that survived surgery for at least 8 weeks. They found toxicity to both dopaminergic neurons in the pars compacta and GABAergic neurons in the pars reticulata, with evidence for apoptosis and autophagy in both populations of neurons. The authors of this study

have raised the possibility that it is in fact the Cre-GFP fusion protein and its nuclear accumulation that has revealed toxic. Erben et al. (2022) injected an AAV1.hSyn.HI.eGFP-Cre.WPRE.SV40 unilaterally or bilaterally into the ventral tegmental area of mice. Four weeks after the injections, the number of cells immunoreactive for tyrosine hydroxylase or the dopamine transporter (DAT) was reduced to a dramatic extent, what occurred neither with an AAV1-GFP nor with an AAV9-GFP, which were used as controls. However, when an AAV-Cre was injected, neurotoxicity was also observed, indicating again that it is most probably the Cre (rather than GFP, that can also reveal cytotoxic; e.g., Ansari et al., 2016) which is responsible for the neuronal toxicity. In a still ongoing study, we confirmed toxicity of an AAV-Cre, this time without the gene coding for GFP; Panzer et al., unpublished. Indeed, and although much of the histological verifications remain to be done, after the injection into the ReRh of the AAV-Cre, NeuN-stained material clearly exhibited neurodegeneration patterns very similar to the ones reported herein after the injection of the AAV-Cre-GFP. The fact that Cre activity can be cytotoxic *per se* is not new (e.g., Janbandhu et al., 2014; Loonstra et al., 2001). For instance, the expression of the Cre transgene in the epidermis of otherwise normal mice induces tetraploidy and apoptosis (Janbandhu et al., 2014). Along the same line, when Cre is expressed in cultured cells, it

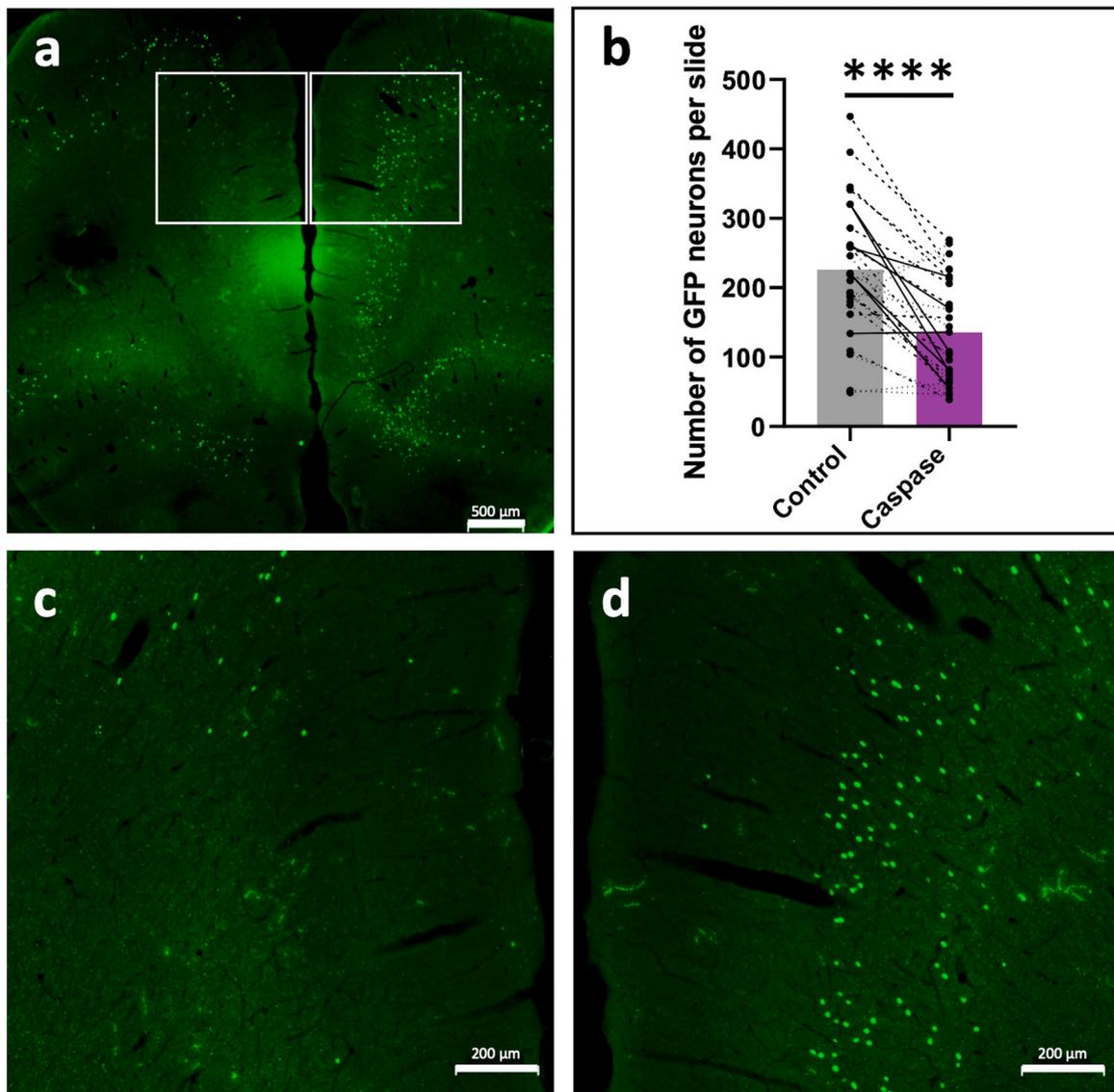


Fig. 8. The AAV containing the floxed caspase gene was injected unilaterally into the medial prefrontal cortex (mPFC) of Long-Evans male rats, which also received an injection into the reuniens and rhomboid (ReRh) nuclei of the virus containing the Cre-GFP gene coding for the fusion protein. This time, however, the titer used was the same as the one with which we found limited neurotoxicity in experiment 3 (i.e., 3.125×10^{12} vg/mL). (a) Image showing GFP-positive neuronal nuclei in the mPFC. (c) and (d) are higher magnifications of the cortical regions delimited by squares in (a); (c) is the side in which the AAV5-taCasp has been injected; the contralateral side (d) is used as the non-injected control. Dimensions of the scale bar are shown directly on the photographs. (b) Number of neurons counted on each section prepared from the brain of 3 rats (cells were counted in the mPFC ipsilateral to the AAV5-taCasp injection vs. the contralateral control side, in which no injection was made); filled circles joined by solid lines are from one rat, those joined by dashed lines are from another rat, and filled circles from the last rat are joined by stippled lines. The bars show the average value on the side injected with the AAV5-taCasp (left) and its contralateral control (right). Statistical analysis: ***, $p < 0.001$.

produces toxicity that can be related to genomic damage (Loonstra et al., 2001). When, in the current study, the viral titer was reduced, the undesirable neurotoxicity could be attenuated. This does not preclude the viral construct from being used at the titer used in our two first experiments, but specific effects would only be expected in a relatively narrow post-injection window, the duration of which remaining to be determined precisely yet. It would probably not exceed much more than a week post-injection (Fig. 4). Regarding the toxicity of the Cre protein, one could also argue that when the AAV5-taCasp is injected in the region from which the terminals infected with the AAVrg-Cre-GFP arise, neurons might not be killed by the caspase only, but also by the nuclear accumulation of Cre following retrograde infection. This possibility, which would be potentially problematic to all neurons projecting to the ReRh nuclei and obviously undermine specificity of the disconnection approach, cannot be excluded based on the results of the current study.

Indeed, Cre-mediated toxicity is affecting neurons in the ReRh nuclei in the absence of caspase. Because the AAV-Cre-GFP is retroactively taken up by cortical neurons projecting to the ReRh, it also penetrates the nucleus of these projection neurons, which could be theoretically killed by the same mechanism, independently of the expression of the caspase gene. If this would be the only mechanism leading to the damage of cortical neurons projecting to the ReRh, however, one would have observed comparable damage in the mPFC in the presence as well as in the absence of the intracortical AAV5-taCasp injection. This is not what we found, as shown in Figs. 1 and 8. While a partial AAV-Cre toxicity in cortical neurons cannot be excluded, the difference between the AAV-caspase-injected side and the contralateral non-injected one clearly accounts for apoptosis-triggered toxicity on corticothalamic neurons. Furthermore, in the present study, we injected the AAV-caspase on one side only. Even if some of the cortico-thalamic neurons had been killed

by the retrograde AAV-Cre virus, we must not lose sight of the fact that this type of approach, when deployed for functional studies, is usually based on bilateral injections. In such a hypothesis, whether some of the neurons are killed by caspase and others by Cre, it seems clear that both modes of destruction would affect cortico-thalamic neurons. It cannot be ruled out, however, that Cre could kill neurons projecting to the ReRh from other structures. Current experiments (Panzer et al., unpublished), however, seem to indicate that neuronal damage by Cre in non-cortical structures projecting to the ReRh nuclei is below visual detection limits within a post-surgical time window reaching up to 12 weeks.

4.3. Glial reactions and possible confusion/misinterpretation

Degeneration of neurons is usually accompanied by an inflammatory reaction, whether in neurodegenerative diseases (Kwon and Koh, 2020; Stephenson et al., 2018) or following neurotoxic treatments, stroke, traumatic injury, infections (e.g., Hosseini and Korte, 2023; Tran et al., 2022). Inflammatory reaction implicates, among other processes, activation of astrocytes and microglia, both types of cells having also physiological functions in a healthy brain, where they are in a so-called resting state. When resting, they are for instance implicated in homeostasis regulation, blood-brain barrier maintenance, synaptic support and communication, and phagocytosis (e.g., Garland et al., 2022). Evidence for an inflammatory reaction has been obtained in the current study, as attested for by the progressive increase of reactive astrocytic and microglial signals over the weeks that followed the injection into the ReRh nuclei of the AAVrg-Cre-GFP. Indeed, after one week, there were little GFAP-positive astrocytic and Iba1-positive microglial cells in the region of viral transduction. Starting from 2.5 week after the injection, but much more so 5 and 10 weeks thereafter, the staining had increased to reach an ultimately massive level. At both later stages, almost all neurons had disappeared from the injection site. As documented by our results, the conjunction of both phenomena, namely neuronal degeneration and glial reactions, can reveal extremely misleading. Indeed, if the histological material is examined after only a DAPI staining (as done in several formerly published studies), the cellular density, as it can be deduced from the number of stained cell nuclei, appears unaltered. To achieve a precise idea of what is going on in the region in which the AAVrg-Cre-GFP was injected, it is mandatory to perform a staining accounting for the preservation of neurons. As long as this staining does not demonstrate that neurons are present in the vicinity of AAVrg-Cre-GFP injection in a near normal density, it is impossible to differentiate possible effects of the AAV5-taCasp (i.e., due to the Cre/loxP recombination, and thus corresponding to a specific disconnection) from those of the AAVrg-Cre-GFP (i.e., due to the Cre or Cre-GFP toxicity). The picture could even be further complicated by synergistic interactions between both types of effects, thereby leading to additional confusion.

4.4. Reducing the titer, a possible solution to hamper neurotoxicity

Erben et al. (2022) have reported that neuronal toxicity of Cre-GFP could be substantially attenuated by reducing the titer of the viral preparation. Our own findings confirm that titer reduction reduces toxicity, although after a substantially weaker titer reduction (i.e., divided by 4, after half-dilution of the mother solution) than in the Erben et al. study (i.e., divided by 1000). We also found that when the highest titer was reduced by a factor 10 or 100, the transduction we obtained was largely insufficient. Regarding these results, one has to call for some degree of caution, and so for two reasons. First, we did not totally prevent toxicity but only reduced it substantially (Supplementary Fig. 9). An experiment currently running in our laboratory, however, indicates that this level of toxicity reduction in the ReRh is sufficient to preserve cognitive flexibility capacities that are blasted by an additional bilateral injection into the mPFC of the AAV5-taCasp. Second, we only assessed the effect of our titer reduction at one post-injection time point, namely

5 weeks after the infection. However, as long as the metabolic machinery of an infected neuron is functioning, there is no reason to believe that Cre-GFP synthesis is going to vanish or that nuclear metabolism might, *in fine*, be able to balance Cre-GFP production such as to keep the protein's concentration under a fatal nuclear toxicity threshold. It is well possible that by reducing the titer, rather than preventing toxicity, we have done nothing more than attenuating the slope of Cre-GFP production and thereby increasing the time window over which the neurotoxic threshold is reached. This would mean that the neurons would not, in absolute terms, be protected from toxicity, but that Cre-GFP production would take longer before becoming neurotoxic. Therefore, having observed a dramatically attenuated toxicity after 5 weeks post-injection with the reduced titer should not necessarily mean that no toxicity would be observed after an additional 5 weeks or later on. This possibility needs to be verified experimentally in a forthcoming study. In any case, the association of a retrograde AAV expressing Cre recombinase with an anterograde AAV expressing a Cre-dependent caspase should be used for experimental purposes only after having assessed that the time window in which experimental evaluations are performed, including behavioral ones, remains beyond the time at which a toxicity threshold might be reached.

The disconnection technique we have used here is of obvious interest for behavioral studies that seek to dissect the functioning of complex circuits formed by several brain structures and their interconnection systems. It should be emphasized, however, that before embarking on behavioral assessments, preliminary experiments carried out prior to these should enable the conditions for the most limited possible neurotoxicity of AAV-Cre-GFP to be defined. Indeed, should such toxicity prove unavoidable in the end, it is imperative that the experimenter has as precise an idea as possible of the post-surgical time window during which the data collected are free from any bias resulting from neurotoxicity induced by AAV-Cre-GFP.

We have used an approach combining two AAVs, one delivering a floxed gene coding for caspase and one delivering a gene coding for a Cre-GFP fusion protein. The former was injected into the mPFC, the latter into the ReRh nuclei, with the aim to damage neurons interconnecting these two brain regions. Our main finding was the severe neuronal toxicity of the AAVrg-Cre-GFP in the ReRh nuclei, although evidence was obtained that neurons of the mPFC projecting to the ReRh could actually be damaged. This toxicity was attenuated by using a reduced viral titer. The unexpected effects of the AAVrg-Cre-GFP reported herein clearly point to: **i)** the imperative need to verify the existence of potential collateral damage inherent in this type of approach because it is likely to distort the interpretation of the experimental data, and **ii)** the necessity to implement the essential controls in order to distinguish the phenotypic effects linked to this collateral damage from those linked to the desired disconnection, since, as we report here, the two types of damage can co-exist. It is also essential to know for how long neurons expressing the Cre-GFP protein remain operational after their infection.

CRedit authorship contribution statement

Pereira de Vasconcelos Anne: Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Stephan Aline:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Cassel Jean-Christophe:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Panzer Elodie:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Grgurina Iris:** Methodology, Investigation. **Boutillier Anne-Laurence:** Methodology, Investigation. **Boch Laurine:** Writing – original draft, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Cosquer Brigitte:** Methodology, Investigation.

Declaration of Competing Interest

none.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors would like to wholeheartedly acknowledge Ms Marion Santisteban and Mr Olivier and Brice Bildstein, as well as Daniel Egesi and George Edomwony for their contribution to animal care. We also thank University of Strasbourg, CNRS and INSERM for their support of research, as well as the Agence Nationale de la Recherche for providing dedicated funds to the project CHARM (coord. P. Quilichini). Finally, we are grateful to Ms Charleen Dias for her help during immunostaining and the quantification of our histological material, and especially to Dr Alexis Bemelmans for very constructive discussions on toxicity of viral constructs and derived proteins.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Declaration of Generative (AI) and AI-assisted technologies in the Writing Process.

No such technologies have been used in the writing process.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jneumeth.2024.110080.

References

- Ali, M., Cholvin, T., Muller, M.-A., Cosquer, B., Kelche, C., Cassel, J.-C., 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.
- Ansari, A.M., Ahmed, A.K., Matsangos, A.E., Lay, F., Born, L.J., Marti, G., Harmon, J.W., Sun, Z., 2016. Cellular GFP toxicity and immunogenicity: Potential confounders in *in vivo* cell tracking experiments. *Stem Cell Rev.* 12 (5), 553–559.
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 7 (1), 16878 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>.
- Basting, T., Xu, J., Mukerjee, S., Epling, J., Fuchs, R., Sriramula, S., Lazartigues, E., 2018. Glutamatergic neurons of the paraventricular nucleus are critical contributors to the development of neurogenic hypertension. *J. Physiol.* 596, 6235–6248.
- Bentivoglio, M., Balercia, G., Kruger, L., 1991. The specificity of the nonspecific thalamus: the midline nuclei. *Prog. Brain Res.* 87, 53–80.
- Bossert, J.M., Mejias-Aponte, C.A., Saunders, T., Altidor, L., Emery, M., Fredriksson, I., Batista, A., Claypool, S.M., et al., 2023. Effect of Selective Lesions of Nucleus Accumbens μ -Opioid Receptor-Expressing Cells on Heroin Self-Administration in Male and Female Rats: A Study with Novel *Oprm1-Cre* Knock-in Rats. *J. Neurosci.* 43, 1692–1713.
- Cassel, J.-C., Ferraris, M., Quilichini, P., Cholvin, T., Boch, L., Stephan, A., Pereira De Vasconcelos, A., 2021. The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: A crossroads for cognition-relevant information processing? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 126, 338–360.
- Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., Loureiro, M., Cholvin, T., Dalrymple-Alford, J. C., Vertes, R.P., 2013. The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog. Neurobiol.* 111, 34–52.
- Cearley, C.N., Wolfe, J.H., 2007. A Single Injection of an Adeno-Associated Virus Vector into Nuclei with Divergent Connections Results in Widespread Vector Distribution in the Brain and Global Correction of a Neurogenetic Disease. *J. Neurosci.* 27, 9928–9940.
- Chen, Y.-H., Wu, K.-J., Hsieh, W., Harvey, B.K., Hoffer, B.J., Wang, Y., Yu, S.-J., 2021. Administration of AAV-Alpha Synuclein NAC Antibody Improves Locomotor Behavior in Rats Overexpressing Alpha Synuclein. *Genes* 12, 948.
- Cholvin, T., Loureiro, M., Cassel, R., Cosquer, B., Geiger, K., De Sa Nogueira, D., Raingard, H., Robelin, L., Kelche, C., Pereira De Vasconcelos, A., Cassel, J.-C., 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.
- Dolleman-van Der Weel, M.J., Griffin, A.L., Ito, H.T., Shapiro, M.L., Witter, M.P., Vertes, R.P., Allen, T.A., 2019. The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior. *Learn Mem.* 26, 191–205.
- Erben, L., Welday, J.P., Murphy, R., Buonanno, A., 2022. Toxic and Phenotypic Effects of AAV_Cre Used to Transduce Mesencephalic Dopaminergic Neurons. *Int J. Mol. Sci.* 23, 9462.
- Ferraris, M., Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., Stephan, A., Quilichini, P.P., 2021. The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 125, 339–354.
- Garland, E.F., Hartnell, L.J., Boche, D., 2022. Microglia and Astrocyte Function and Communication: What Do We Know in Humans? *Front. Neurosci.* 16, 824888.
- Groenewegen, H.J., Berendse, H.W., 1994. The specificity of the 'non specific' midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci.* 17, 52–57.
- Hatter, J.A., Scott, M.M., 2023. Selective ablation of VIP interneurons in the rodent prefrontal cortex results in increased impulsivity. *PLoS One* 18, e0286209.
- Hoover, W.B., 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.
- Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212, 149–179.
- Hosseini, S., Korte, M., 2023. How viral infections cause neuronal dysfunction: a focus on the role of microglia and astrocytes. *Biochem Soc. Trans.* 51, 259–274.
- Humphries, M.P., Maxwell, P., Salto-Tellez, M., 2021. QuPath: The global impact of an open source digital pathology system. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 852–859. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.022>.
- Janbandhu, V.C., Moik, D., Fässler, R., 2014. Cre recombinase induces DNA damage and tetraploidy in the absence of loxP sites. *Cell Cycle* 13 (3), 462–470. <https://doi.org/10.4161/cc.27271>.
- Jay, T.M., 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.
- Jayachandran, M., Viena, T.D., Garcia, A., Veliz, A.V., Leyva, S., Roldan, V., Vertes, R.P., Allen, T.A., 2023. Nucleus reuniens transiently synchronizes memory networks at beta frequencies. *Nat. Commun.* 14 (1), 4326. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40044-z>.
- Klein, M.M., Cholvin, T., Cosquer, B., Salvadori, A., Le Mero, J., Kourouma, L., Boutillier, A.-L., Pereira De Vasconcelos, A., Cassel, J.-C., 2019. Ventral midline thalamus lesion prevents persistence of new (learning-triggered) hippocampal spines, delayed neocortical spinogenesis, and spatial memory durability. *Brain Struct. Funct.* 224, 1659–1676.
- Kwon, H.S., Koh, S.-H., 2020. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl. Neurodegener.* 9, 42.
- Laurent, V., Wong, F.L., Balleine, B.W., 2017. The Lateral Habenula and Its Input to the Rostromedial Tegmental Nucleus Mediates Outcome-Specific Conditioned Inhibition. *J. Neurosci.* 37, 10932–10942.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., Jonkers, J., 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (16), 9209–9214. <https://doi.org/10.1073/pnas.161269798>.
- Lorente de No, R., 1938. Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. *Physiology of the Nervous System (Fulton J.)*. Oxford University Press, London, pp. 291–340.
- Loureiro, M., Cholvin, T., Lopez, J., Merienne, N., Latreche, A., Cosquer, B., Geiger, K., Kelche, C., Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., 2012. The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *J. Neurosci.* 32, 9947–9959.
- Marcante, A.B., Wang, L.A., Little, J.T., Cunningham, J.T., 2020. Caspase lesions of PVN-projecting MnPO neurons block the sustained component of CIH-induced hypertension in adult male rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 318, H34–H48.
- Mazuski, C., Chen, S.P., Herzog, E.D., 2020. Different Roles for VIP Neurons in the Neonatal and Adult Suprachiasmatic Nucleus. *J. Biol. Rhythms* 35, 465–475.
- Nadel, J.A., Pawelko, S.S., Copes-Finke, D., Neidhart, M., Howard, C.D., 2020. Lesion of striatal patches disrupts habitual behaviors and increases behavioral variability. *PLoS One* 15, e0224715.
- Paxinos, G., Watson, C., 2017. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition. Elsevier, p. 388.
- Quet, E., Majchrzak, M., Cosquer, B., Morvan, T., Wolff, M., Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., Stéphan, A., 2020. The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats. *Brain Struct. Funct.* 225, 955–968.
- Rezai Amin, S., Gruszczynski, C., Guiard, B.P., Callebert, J., Launay, J.-M., Louis, F., Betancur, C., Vialou, V., Gautron, S., 2019. Viral vector-mediated Cre recombinase expression in substantia nigra induces lesions of the nigrostriatal pathway associated with perturbations of dopamine-related behaviors and hallmarks of programmed cell death. *J. Neurochem.* 150, 330–340. <https://doi.org/10.1111/jnc.14684>.
- Shen, M., Jiang, C., Liu, P., Wang, F., Ma, L., 2016. Mesolimbic leptin signaling negatively regulates cocaine-conditioned reward. *Transl. Psychiatry* 6 e972–e972.
- Stephenson, J., Nutma, E., Van Der Valk, P., Amor, S., 2018. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology* 154, 204–219.
- Tervo, D.G.R., Hwang, B.-Y., Viswanathan, S., Gaj, T., Lavzin, M., Ritola, K.D., Lindo, S., Michael, S., et al., 2016. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* 92, 372–382.
- Tran, V.T.A., Lee, L.P., Cho, H., 2022. Neuroinflammation in neurodegeneration via microbial infections. *Front Immunol.* 13, 907804.

- Varela, C., Kumar, S., Yang, J.Y., 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.
- Viena, T.D., Rasch, G.E., Silva, D., Allen, T.A., 2021. Calretinin and calbindin architecture of the midline thalamus associated with prefrontal–hippocampal circuitry. *Hippocampus* 31, 770–789.
- Walker, R.A., Suthard, R.L., Perison, T.N., Sheehan, N.M., Dwyer, C.C., Lee, J.K., Enabulele, E.K., Ray, M.H., et al., 2022. Dorsal Raphe 5-HT Neurons Utilize, But Do Not Generate, Negative Aversive Prediction Errors. *eNeuro* 9, ENEURO.0132-21.2022.
- Weigert M., Schmidt U., Haase R., Sugawara K., Myers G. (2020) Star-convex Polyhedra for 3D Object Detection and Segmentation in Microscopy. in: 2020 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV), pp 3655–3662.
- Whylings, J., Rigney, N., De Vries, G.J., Petrulis, A., 2021. Reduction in vasopressin cells in the suprachiasmatic nucleus in mice increases anxiety and alters fluid intake. *Horm. Behav.* 133, 104997.
- Xu, W., Südhof, T.C., 2013. A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science* 339, 1290–1295.
- Yang, C.F., Chiang, M.C., Gray, D.C., Prabhakaran, M., Alvarado, M., Juntti, S.A., Unger, E.K., Wells, J.A., et al., 2013. Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. *Cell* 9 153 (4), 896–909.

SUPPLEMENTARY MATERIAL TO:

**Disconnecting prefrontal cortical neurons from the ventral midline thalamus:
loss of specificity due to progressive neural toxicity of an AAV-Cre in the rat
thalamus**

Elodie Panzer^{1,2}, Laurine Boch^{1,2}, Brigitte Cosquer^{1,2}, Iris Grgurina^{1,2}, Anne-Laurence Boutillier^{1,2}, Anne Pereira de Vasconcelos^{1,2,3}, Aline Stephan^{1,2,3,4}, Jean-Christophe Cassel^{1,2,3,4}

¹ Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

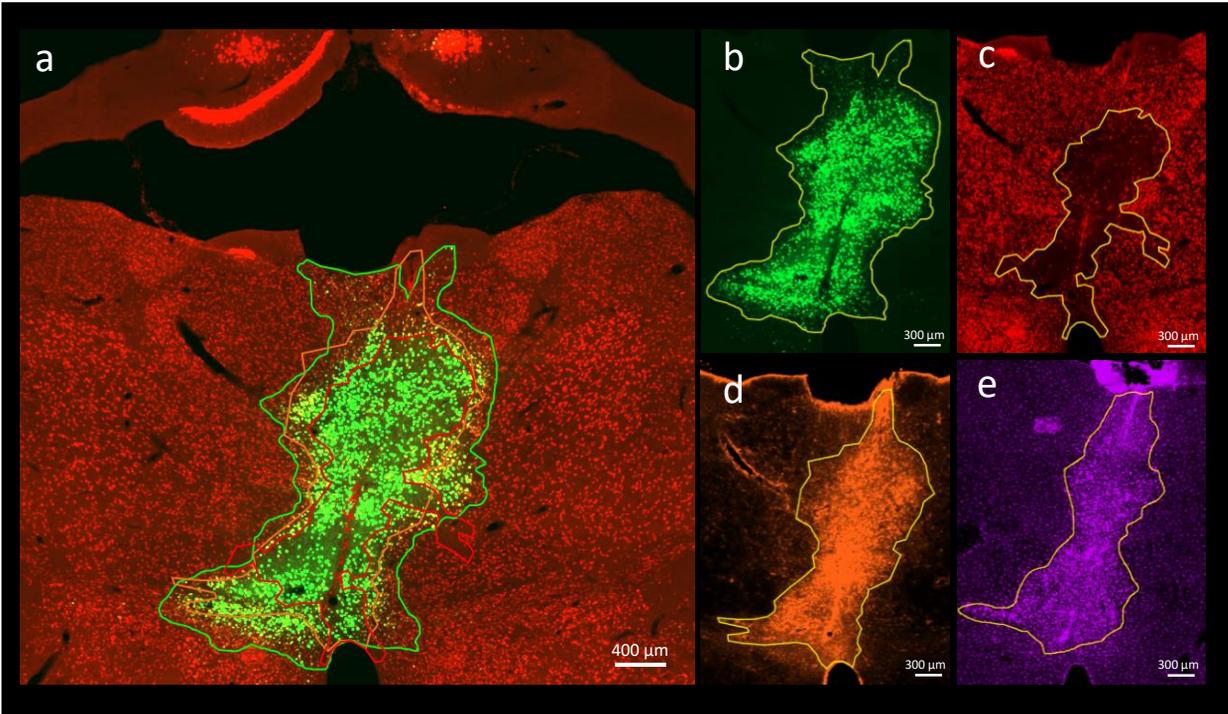
² LNCA, UMR 7364 - CNRS, F-67000 Strasbourg, France

³ With equivalent contribution

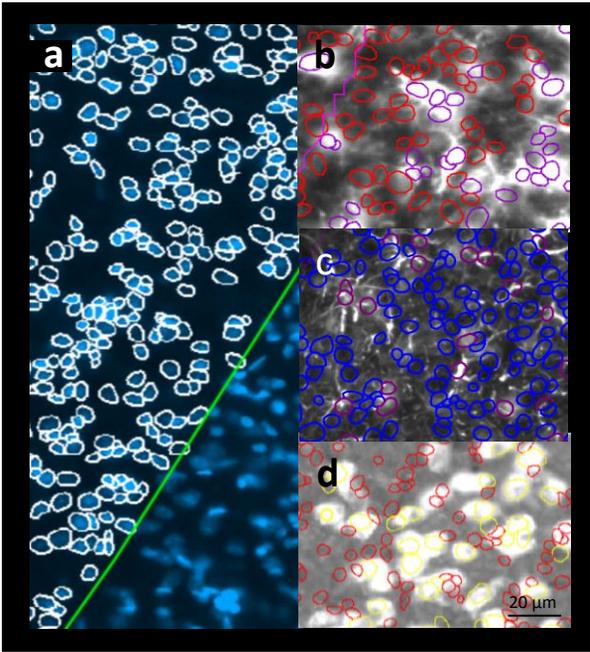
⁴ To whom correspondence should be addressed

Supplementary Figure 1

A. Delineation of infected area or area affected by neurodegeneration



B. Stardist & Classifier



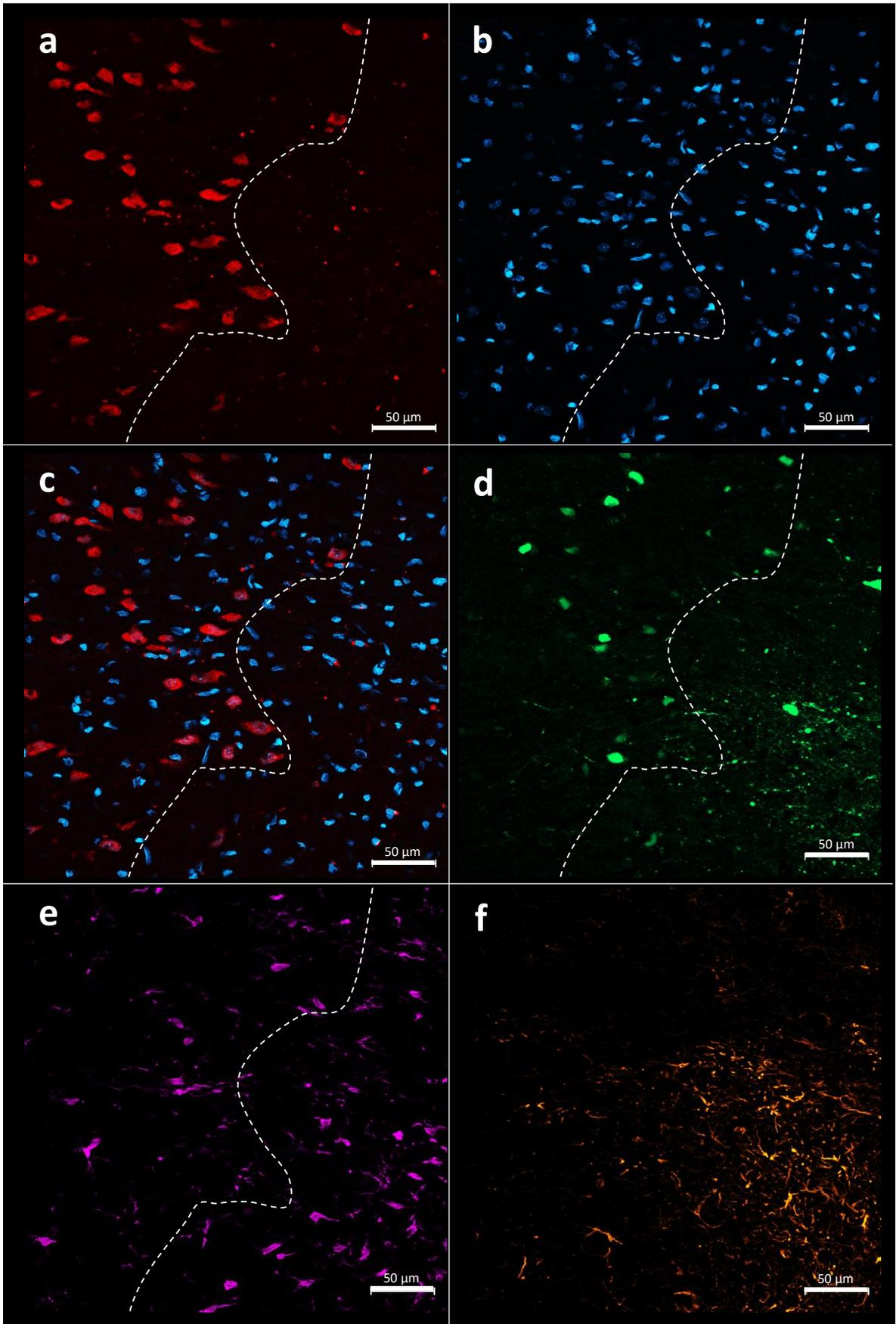
Codes according to Schmidt et al., 2018, International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI), Granada, Spain.

Weigert et al., *Star-convex Polyhedra for 3D Object Detection and Segmentation in Microscopy*. The IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV), Snowmass Village, Colorado, USA.

Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 1: (A) Illustration of the quantification methods with the QuPath software. **(a,b)** Example of how the delineation of the AAV-Cre-GFP infected region was performed, **(c)** of the neuronal loss, **(d)** of the glial scar, and **(e)** of the microglial activation zone. **(a)** is the superposition of NeuN immunostaining and the GFP-positive AAV-Cre-GFP infection, and of the associated delineated areas. **(B)** Example of how we counted the cells with different classifiers. **(a)** First, we ran a StarDist extension script to detect all the cell nuclei (circled in white) with the DAPI staining. **(b)** Then, we sorted these nuclei as microglia when they were Iba1-positive (circled in purple), **(c)** as astrocytes if they were GFAP-positive (circled in purple), or **(d)** neurons when they were NeuN-positive (circled in yellow).

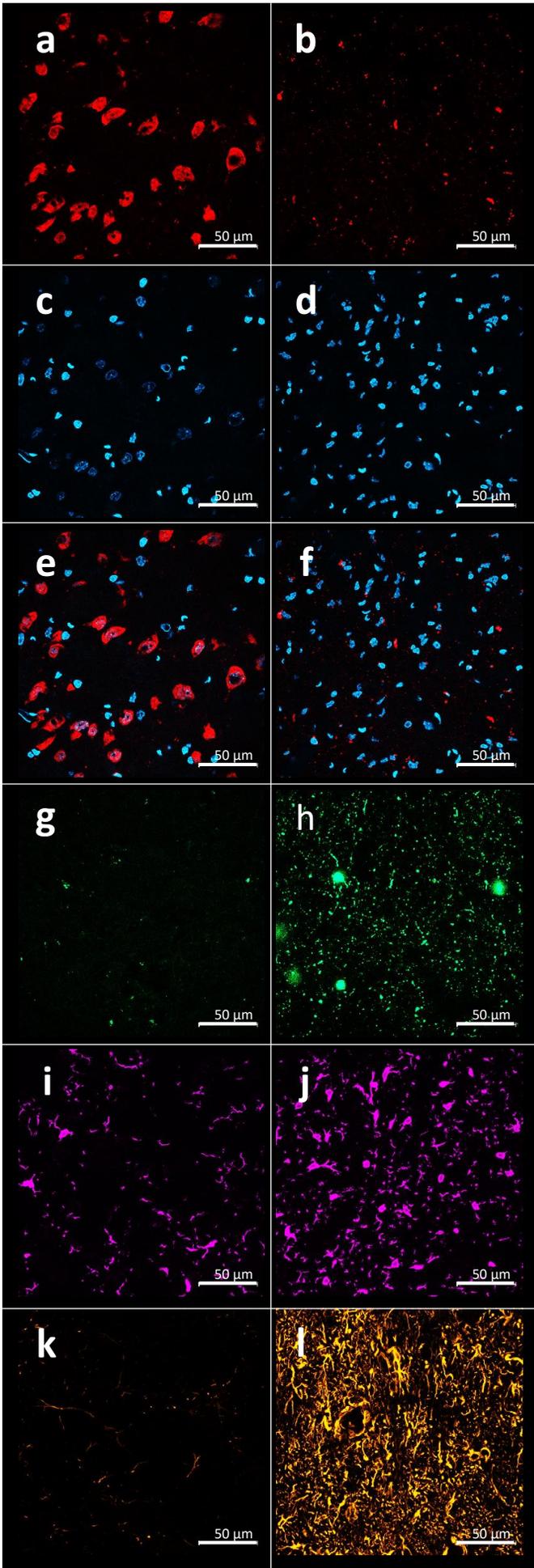
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2: Photographs of NeuN (a), DAPI (b), GFP (d), GFAP (e) and Iba1 (f) staining in a brain region in which the boundary between the zone of neuronal loss and that corresponding to the apparently intact parenchyma is marked by the dotted white line. c) has been obtained by merging a and b. Note that a, b, c, d, e are from the same section; f is from an adjacent one (which was not stained for NeuN, hence the absence of the dotted line separating the degeneration region from the healthy one. Dimensions of the scale bar are shown directly on the photographs (50 μm).

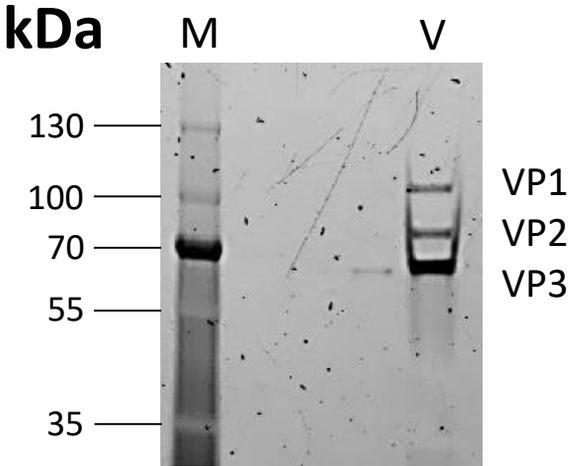
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3

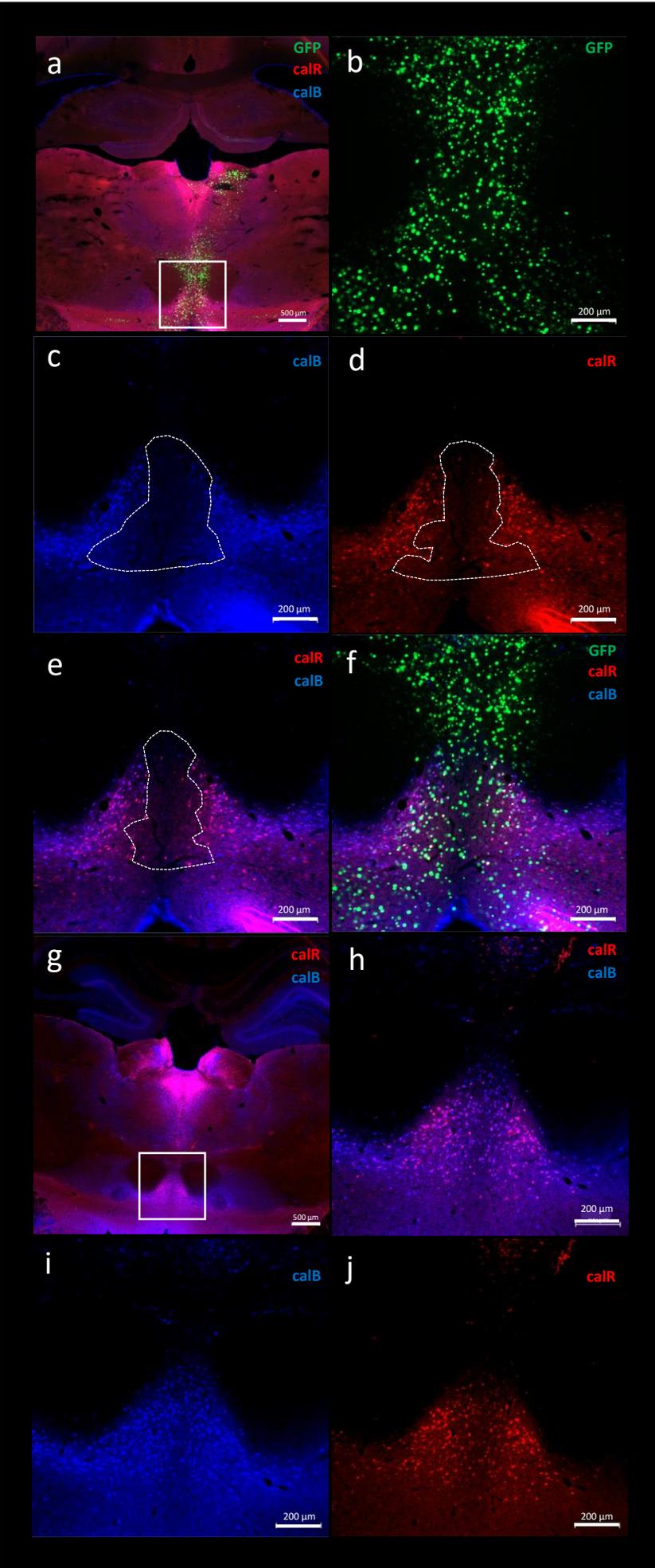
Supplementary Figure 3: Photographs of NeuN (a,b), DAPI (c,d), GFP (g,h), GFAP (i,j) and Iba1 (k,l) staining in a brain region infected with the AAV-Cre-GFP and exhibiting near-complete neuronal loss (left: a,c,e,g,l,k) as compared to a neighboring region (right: b,d,f,h,j,i) in which the brain parenchyma appeared unaltered. Photograph e merges a and c; photograph f merges b and d. All photographs were obtained from rats at a post-injection delay of 10 weeks. The photograph h shows mainly what could be GFP debris; they do not superimpose with any of the other stainings. Dimensions of the scale bar are shown directly on the photographs (50 μm).

Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 2: AAVrg-Cre-GFP capsid protein integrity determined by SDS-PAGE. A molecular-weight size marker has been loaded into the M well and 5 μ L of AAVrg-Cre-GFP have been loaded into the V well. VP1, VP2 and VP3 are the three capsid proteins of AAVs. The absence of any other band reveals the absence of any contamination in our viral sample.

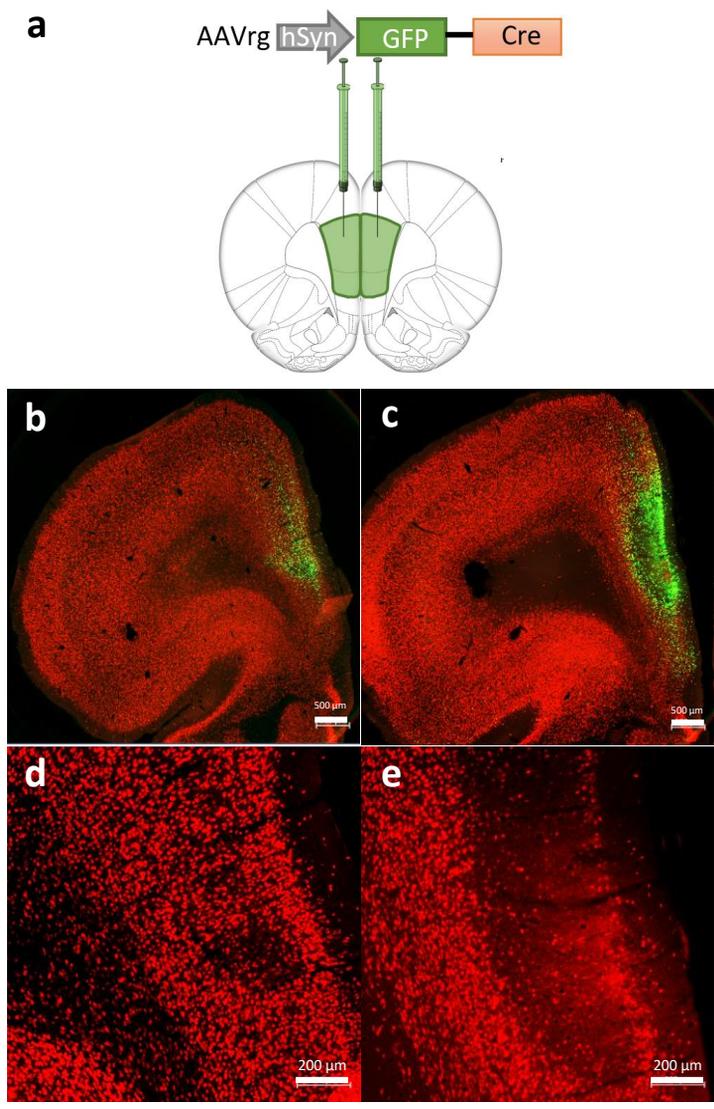
Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5

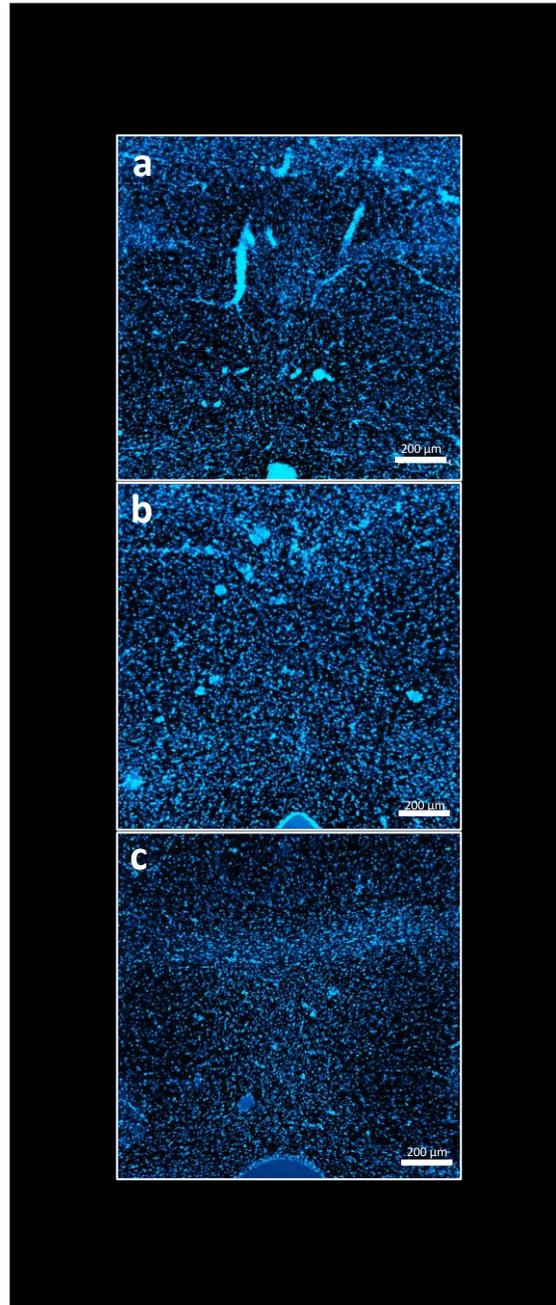
Supplementary Figure 5: Verification that the absence of NeuN staining is not due to any epitope masking. This verification was performed by additional immunostaining against either calbindin or calretinin. **(a)** Image showing the localization of the AAVrg-Cre-GFP (in green) transduction in the ReRh nuclei on a section immunostained for calretinin (calR, in red) and for calbindin (calB, in blue); blue and red are superimposed on this photograph. **(b)** is a higher magnification of the thalamic region delimited by the square in **(a)**; only GFP staining is shown. **(c)** same region as in **(b)** with calbindin staining in the ventral midline thalamus. The dotted line encircles the region devoid of calbindin staining. **(d)** same region as in **(c)** with calretinin staining in the ventral midline thalamus. **(e)** same region as in **(d)** with calretinin and calbindin stainings merged. **(f)** same region as in **(e)** with AAVrg-Cre-GFP, calretinin and calbindin stainings merged. **(g)** Image showing the ventral midline thalamus of a control rat, that did not receive any AAVrg-Cre-GFP injection on a section immunostained for calretinin (in red) or for the calbindin (in blue). **(h)** is a higher magnification of the thalamic region delimited by the square in **(g)**; calretinin and calbindin stainings are merged. **(i)** same region as in **(h)** with calbindin staining in the ventral midline thalamus. **(j)** same region as in **(i)** with calretinin staining in the ventral midline thalamus. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

Supplementary Figure 6



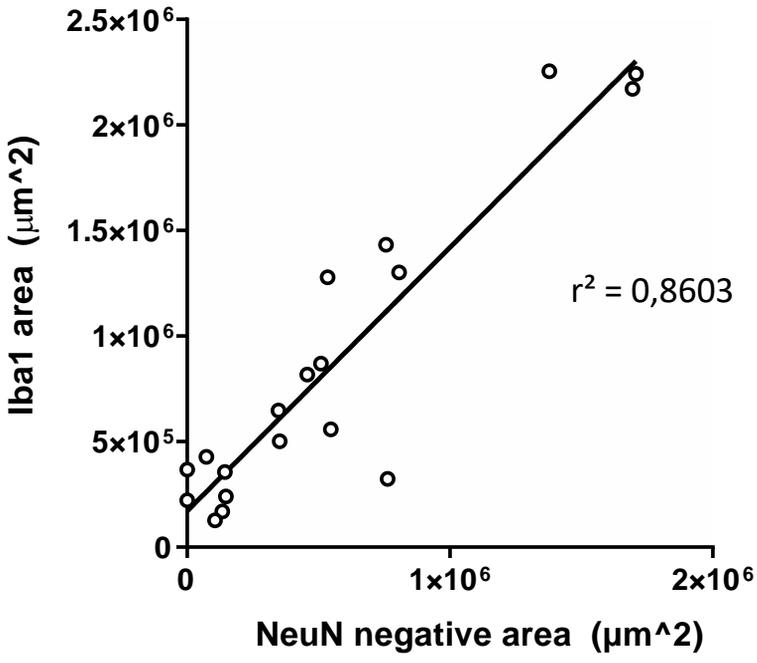
Supplementary Figure 6: (a) Surgical protocol used in Experiment 1 to verify if the neuronal toxicity phenomenon also occurs in the mPFC. The AAVrg-Cre-GFP was injected bilaterally into the mPFC of Long-Evans male rats. (b) and (c) Images showing the localization of the transduction in the mPFC on sections immunostained for the neuronal nuclear protein NeuN. (b) is the section with the lowest neuronal loss; (c) is the section with the largest one. (d) and (e) are higher magnifications of the cortical regions shown in (b) and (c); only NeuN staining is visualized. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

Supplementary Figure 7



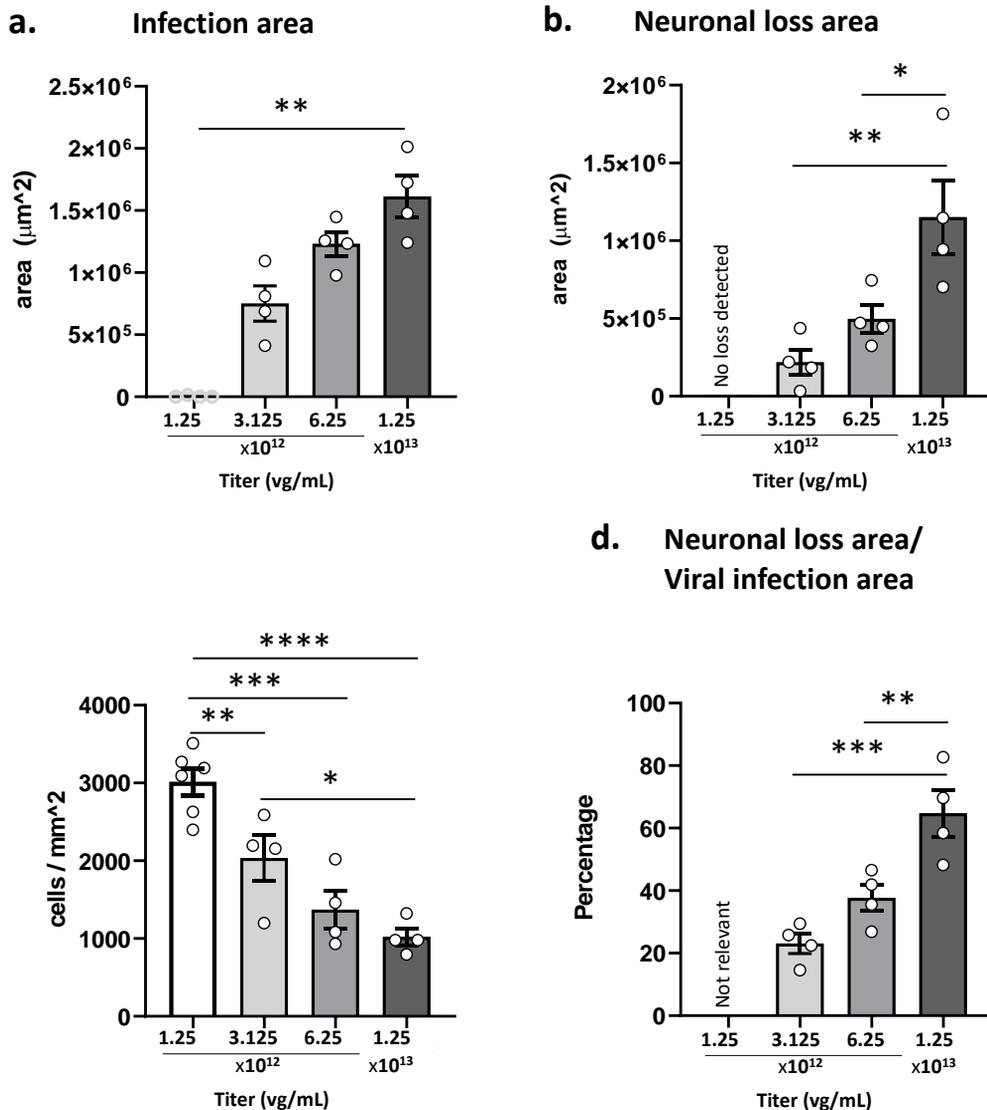
Supplementary Figure 7: Illustrations of the DAPI staining found in the ReRh nuclei at post-injection delays of 1 **(a)**, 2.5 **(b)**, and 10 weeks **(c)**. Rats have been injected with the AAVrg-Cre-GFP into the ReRh nuclei. (a), (b), (c) show nuclear DAPI staining. Notice that DAPI staining appears normal at every post-injection delay. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

Supplementary Figure 8



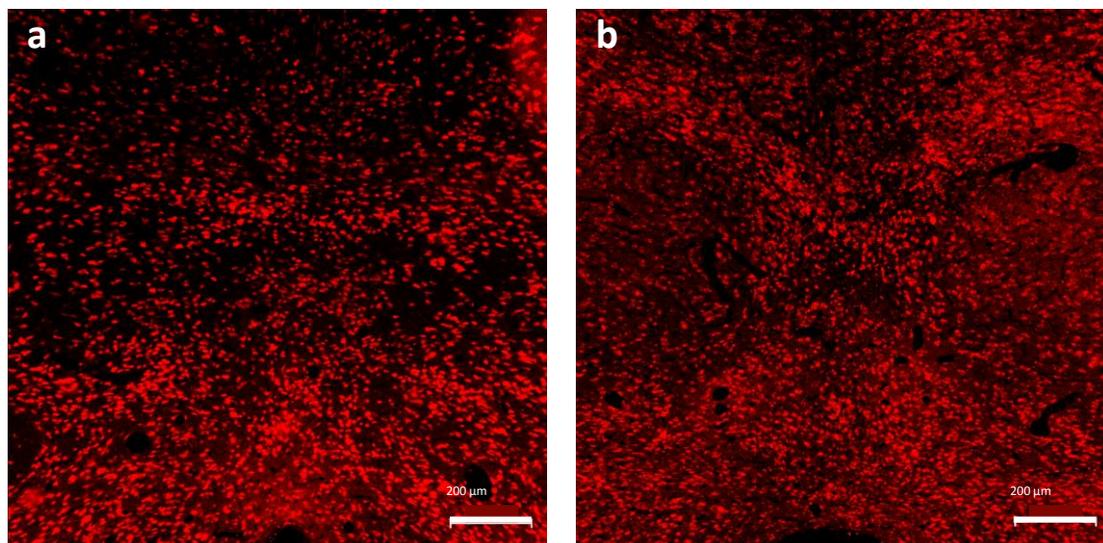
Supplementary Figure 8: Regression showing the positive correlation between the area of neuronal loss and the area of microglial activation in the ReRh of rats that received the AAVrg-Cre-GFP.

Supplementary Figure 9



Supplementary Figure 9: Bar graphs illustrating our quantitative approaches in Experiment 3. **(a)** Extent of the transduction area for the various titers used. **(b)** Extent of the area of neuronal loss. **(c)** Quantification of the density of neurons assessed on histological material immunostained for NeuN. **(d)** Computation of the ratio between the extent of the area of neuronal loss and the area of transduction. Significant differences: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***) ; (****) $p < 0.0001$. It is to note that due to inter-experiment variability in immunostaining (i.e., more background in Exp 3 as compared to Exp 2) we had to use a different classifier that underwent a different training. This explains why the highest and the lowest neuronal density in the ventral midline thalamus area shown in this figure were weaker than the highest and lowest ones shown in Figure 4. See Supplementary Fig 10 for a qualitative comparison of both NeuN stainings.

Supplementary Figure 10



Supplementary Figure 10: Photographs illustrating the difference in background immuno-staining of NeuN between slices of Exp 2 (a) and slices of Exp 3 (b); notice the higher background in b as compared to a. Due to this difference, we had to train another classifier, which generated, overall, a lower density counting in b as compared to a. Compare also the counting results shown in Supplementary Fig 9 © to those shown in Figure 4 of the article.

Au-delà d'être une étape d'optimisation et de levée des verrous techniques, cette étude a également pour but de sensibiliser la communauté scientifique sur la toxicité engendrée par l'AAVrg-Cre-GFP, dont l'utilisation est répandue pour ce type d'approche, et la nécessité de réaliser des contrôles adéquats de l'intégrité tissulaire lors de l'utilisation de virus.

Dans la discussion de cet article, et en nous basant sur la littérature (Erben et al., 2022), nous faisons des hypothèses sur la cause de la neurotoxicité observée. En effet, il est connu que la Cre-recombinase peut avoir des effets toxiques, notamment par son action sur l'ADN, qui ont été étudiés sur des modèles cellulaires ou murins (Loonstra et al., 2001 ; Janbandhu et al., 2014). Toutefois, comme nos injections d'AAVrg-Cre-mCh n'ont induit aucune toxicité, nous pouvons également suspecter la GFP, dont la toxicité n'est pas inconnue (Ansari et al., 2016). Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que c'est la fusion de la GFP avec la Cre qui entraîne son accumulation dans le noyau des cellules et donc sa toxicité.

Par conséquent, afin de séparer l'effet de la Cre de celui de la GFP, et ainsi d'identifier la cause de la toxicité, nous avons testé un virus portant le gène de la Cre-recombinase, mais en l'absence de gène rapporteur.

2. Expérience 3 : Etude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre

L'objectif de cette expérience est de tester l'éventuelle neurotoxicité de la Cre-recombinase. Pour cela, nous utilisons un AAVrg-Cre, virus de sérotype rétrograde, avec le même promoteur (hSyn) que pour l'AAVrg-Cre-GFP, mais ne contenant pas de gène rapporteur. Ce virus est injecté dans les ReRh de 10 rats, aux mêmes coordonnées que précédemment. Un AAV5-DIO-mCh, portant le gène floxé de la mCherry, est injecté dans le CPFm de ces animaux, afin de visualiser indirectement l'expression rétrograde de la Cre-recombinase par l'AAVrg-Cre. Les animaux sont mis à mort 5 semaines après les chirurgies afin de procéder aux analyses histologiques.

N'ayant pas de gène rapporteur, il est impossible de visualiser la zone d'infection du virus en tant que telle. Toutefois, nous avons réalisé un immunomarquage de la protéine NeuN afin d'étudier l'intégrité du tissu, et notamment des neurones. Ce marquage a révélé une très forte neurotoxicité de l'AAVrg-Cre (Figure 37), puisque l'aire moyenne de la neurotoxicité est de $1,1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ par coupe. Le t-test de comparaison d'un échantillon unique

à une valeur de référence indique que cette moyenne est significativement différente de 0 ($t_{(9)} = 5,034$; $p = 0,0007$).

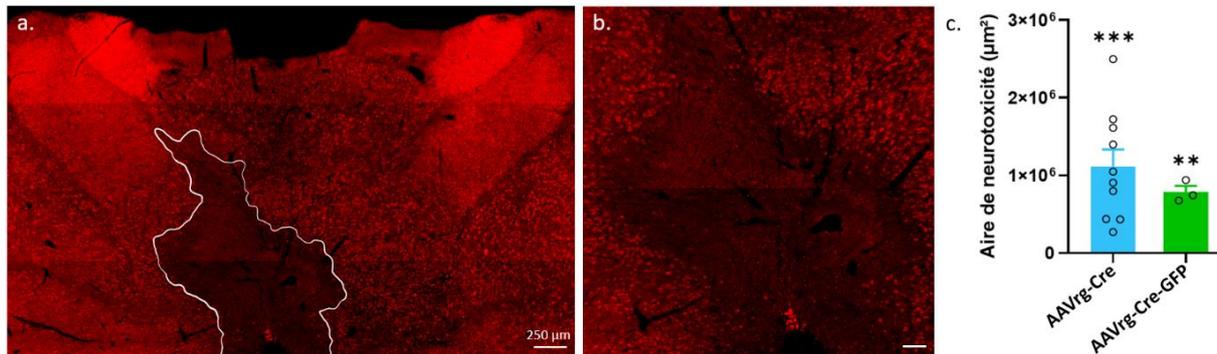


Figure 37. Etude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre

- a.** Photographie d'une coupe coronale du thalamus de rat après un immunomarquage de la protéine NeuN (en rouge). La zone de neurotoxicité (absence de neurone) est entourée en blanc.
- b.** Agrandissement de la zone de neurotoxicité visible sur la figure **a**.
- c.** Moyenne de l'aire de la zone de neurotoxicité sur 7 coupes coronales de thalamus par rat, après l'injection d'AAVrg-Cre dans les ReRh (à gauche) ou d'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh (à droite, données issues de la figure 4 de l'article de [Panzer et al., 2024](#)).

Statistiques : ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; différence significative par rapport à 0
Sauf mention contraire, les barres d'échelle sont égales à 100 µm.

Les résultats de l'aire de neurotoxicité des animaux du groupe "5 semaines" de l'expérience de décours temporel de notre article ([Panzer et al., 2024](#)) obtenus après l'injection d'AAVrg-Cre-GFP ont été juxtaposés à ceux obtenus après l'injection d'AAVrg-Cre dans la **Figure 37c**. D'un point de vue expérimental, ces deux cohortes d'animaux ne sont pas rigoureusement comparables, étant donné que les conditions d'injection ne sont pas les mêmes : le volume d'injection de l'AAVrg-Cre-GFP est de 2 x 1µL, tandis que celui de l'AAVrg-Cre est de 2 x 0,5µL. Toutefois, le titre des virus est équivalent, et les coordonnées d'injection, ainsi que le délai post-chirurgical sont identiques. Ainsi, j'ai fait le choix de les comparer d'un point de vue conceptuel, et je les ai donc combinés sur le même graphique, afin d'avoir une représentation de la similarité de la toxicité de ces deux virus. Un t-test pour échantillons non-appariés n'indique, en effet, pas de différence significative entre la toxicité des deux virus ($t_{(11)} = 0,7825$; $p = 0,4505$; ns).

Ainsi, nous avons montré que **l'AAVrg-Cre présente également une forte neurotoxicité**, bien qu'il ne contienne pas le gène de la GFP. Ces résultats n'excluent pas une

implication partielle de la GFP, mais établissent pour le moins une forte responsabilité de la Cre.

Au vu des résultats qui précèdent, nous choisissons de poursuivre notre étude du rôle de la projection cortico-thalamique en utilisant l'AAVrg-Cre-GFP avec le titre permettant de limiter sa toxicité, tout en déconnectant environ 40% des neurones GFP-positifs du CPFm.

Discussion

La déconnexion cortico-thalamique repose sur une approche virale, combinant deux vecteurs viraux, l'un, antérograde, exprimant le gène floxé de la caspase et l'autre, rétrograde, exprimant le gène de la Cre-recombinase (Yang et al., 2013). Cette approche n'ayant été réalisée que peu de fois (e.g. Marciante et al., 2020), et jamais dans nos structures d'intérêt, elle a nécessité une phase de mise au point.

Nous avons commencé par l'étude comparative de trois virus recombinants, rétrogrades, portant le gène de la Cre-recombinase : le CAV2-Cre-GFP, l'AAVrg-Cre-mCh et l'AAVrg-Cre-GFP. L'analyse de leur tropisme pour les ReRh a conduit à l'élimination du CAV2-Cre-GFP pour son très faible taux de réussite. L'étude comparative de l'AAVrg-Cre-mCh et de l'AAVrg-Cre-GFP a ensuite montré qu'ils étaient tous deux capables d'infecter les ReRh, et de léser la voie cortico-thalamique lorsqu'ils sont associés avec l'injection d'AAV5-taCasp dans le CPFm. L'AAVrg-Cre-GFP a été sélectionné pour sa meilleure efficacité. Néanmoins, la suite des expériences réalisées avec l'AAVrg-Cre-GFP a montré sa neurotoxicité à forte concentration, une neurotoxicité probablement causée par la Cre-recombinase elle-même, puisque l'AAVrg-Cre (sans gène rapporteur) provoque des effets similaires.

Cette première partie de thèse a permis, non seulement d'optimiser nos outils d'investigation pour la suite des expériences, mais a également mis en lumière l'importance des étapes de mises au point lors de l'utilisation d'une nouvelle méthode, ainsi que la nécessité de l'inclusion de contrôles adéquats lors de la conception des expériences. Nous discuterons également des causes potentielles de la toxicité de l'AAVrg-Cre-GFP.

I. Importance de la mise au point

Les résultats des expériences 1 à 3, notamment ceux qui montrent l'absence de tropisme du CAV2-Cre-GFP pour le Re, ainsi que la toxicité de l'AAVrg-Cre-GFP, reflètent l'importance de la réalisation de cohortes pilotes, de petit effectif, afin de mettre au point les techniques nouvellement mises en pratique.

1. Tropisme du CAV2-Cre-GFP

Le CAV2 est un virus connu pour son tropisme préférentiel pour les neurones et son caractère rétrograde (Soudais et al., 2001). Il est utilisé à plusieurs reprises pour cibler des régions du thalamus chez la souris (Lau et al., 2010) et chez le rat (Morceau et al., 2019). En nous basant sur cette littérature, nous considérons ce virus comme un bon candidat pour l'expression rétrograde de la Cre dans nos neurones de projection. D'autant plus que Ramanathan et al. (2018) injectent un CAV2-Cre dans le Re de leurs rats Long Evans afin d'induire l'expression conditionnelle d'un récepteur hM4D(G_i) (outil **DREADD** inhibiteur) dans les neurones du CPFm projetant au Re. Ils ciblent donc les mêmes neurones que nous. Notons tout de même que dans cet article, aucune illustration ni quantification de l'infection du CAV2 dans le Re n'a été possible, car le virus ne porte pas de gène rapporteur. Contre toute attente, nos résultats montrent que le CAV2-Cre-GFP a un très faible taux d'infection des ReRh, et en particulier du Re, reflétant son mauvais tropisme pour notre noyau d'intérêt dans nos conditions.

Afin d'infecter une cellule, le CAV2 lie le récepteur des adénovirus et des coxsackievirus (**CAR**, Soudais et al., 2001). Ce récepteur a une expression différentielle en fonction des régions et des types cellulaires du système nerveux central (Persson et al., 2006). Bien que l'expression du CAR dans le thalamus, et en particulier dans le Re, ne soit pas connue, il est imaginable que ce récepteur soit très peu ou pas exprimé dans notre région d'intérêt. Cela expliquerait l'absence de tropisme du CAV2 pour le Re. Notons également que, contrairement au Re, le CAV2-Cre-GFP infecte bien le Rh. Cette caractéristique pourrait être exploitée pour cibler spécifiquement le Rh mais pas le Re, afin de pouvoir dissocier la fonction de ces deux noyaux très proches.

Ces résultats montrent que le tropisme d'un virus peut être très variable, y compris parmi les différents noyaux d'une même structure comme le thalamus. Il n'est donc pas suffisant de se baser sur la littérature pour choisir un virus approprié.

2. Toxicité de l'AAVrg-Cre-GFP

Nos résultats ont mis en évidence la neurotoxicité de l'AAV-Cre-GFP, ayant pour conséquence une diminution de la densité neuronale dans la région d'injection (Panzer et al., 2024). Ce virus, commercialisé par Addgene® (USA), est pourtant couramment utilisé dans la

recherche. Effectivement, nous ne sommes pas les premiers à identifier la toxicité de ce virus, puisque [Rezai Amin et ses collaborateurs \(2019\)](#) l'ont montrée suite à son injection dans la substance noire de souris, après un délai de 8 semaines. [Erben et al. \(2022\)](#) l'ont également montrée 4 semaines après son injection dans l'aire tegmentale ventrale (**VTA**) de souris. Plus récemment, [Savani et al. \(2024\)](#) ont injecté l'AAV-Cre-GFP dans le noyau hypothalamique paraventriculaire (**PVN**) et dans le septum dorso-latéral de lignées de souris porteuses du gène floxé de la corticolibérine ou *wild-type*. Après un délai de 3 semaines, ils observent une diminution de la densité des neurones, accompagnée d'une astrogliose et d'une activation microgliale, à la fois pour les souris floxées et pour les wild-type. Ces altérations cellulaires entraînent des répercussions comportementales, notamment de l'obésité liée à une hyperphagie. Toutefois, à notre connaissance, nous sommes les premiers à mettre en évidence les effets nocifs de l'AAV-Cre-GFP chez un modèle de rat, soulignant qu'ils ne sont pas particuliers à une espèce murine. Il est évident qu'une telle toxicité, pour un outil largement utilisé, pose problème, et que l'identification de sa cause est un point méthodologique essentiel à prendre en considération.

Notons que la toxicité de l'AAV-Cre-GFP existe avec un AAV de sérotype 2 ([Rezai Amin et al., 2019](#)), de sérotype 1 ([Erben et al., 2022](#)), de sérotype 8 ([Savani et al., 2024](#)) et de sérotype rétrograde ([Panzer et al., 2024](#)). L'utilisation d'AAV et le sérotype étant mis hors de cause, les hypothèses se focalisent sur les gènes véhiculés par ce virus. L'AAV-Cre-GFP contient deux gènes fusionnés, celui de la Cre-recombinase, et celui de la GFP. Cela conduit à trois hypothèses : (1) La toxicité est causée par la Cre-recombinase, (2) elle est causée par la GFP, (3) elle est causée par la fusion des deux gènes.

Dans nos conditions, nous avons montré une neurotoxicité de l'AAVrg-Cre-GFP, mais pas de l'AAVrg-Cre-mCh, c'est pourquoi notre attention s'est portée sur une toxicité, au moins partielle, de la GFP. En effet, celle-ci n'est pas inconnue puisqu'elle est décrite dès 1999 par [Liu et al. \(1999\)](#) des cultures cellulaires, et résumée dans la revue d'[Ansari et al. \(2016\)](#). D'autant plus que la fusion des gènes de la Cre et de la GFP dans la construction virale entraîne la fusion des protéines lors de la traduction. Puisque la Cre est une ADN-recombinase, son action, et par conséquent sa localisation, sont nucléaires. Les protéines étant fusionnées, la GFP a donc également une localisation nucléaire. Sa présence, et même son accumulation

dans le noyau pourraient potentialiser sa dangerosité, comme le suggèrent les travaux de [Verma et al. \(2024\)](#) sur la toxicité d'une GFP nucléaire chez des souris transgéniques.

Il est important de souligner que dans plusieurs études, le virus contrôle employé en comparaison de l'AAV-Cre-GFP est un AAV-GFP (sans Cre-recombinase) (e.g. [Rezai Amin et al., 2019](#) ; [Erben et al., 2022](#) ; [Savani et al., 2024](#)). Dans ce cas, la GFP a une localisation cytoplasmique par défaut, ce qui empêche de conclure sur l'absence de participation de la GFP aux effets toxiques de l'AAV-Cre-GFP. C'est la raison pour laquelle nous avons testé un autre virus, l'AAVrg-Cre dépourvu de gène rapporteur. Avec ce virus, nous avons également observé une perte de neurones dans la structure d'injection (**Figure 37**), indiquant qu'il est tout aussi neurotoxique que l'AAVrg-Cre-GFP. Nos résultats sont en contradiction avec ceux d'Erben et al. (2022), qui ne montrent aucune perte de neurones dopaminergiques dans l'aire tegmentale ventrale après l'injection d'AAV9-Cre (sans GFP) alors que l'AAV1-Cre-GFP est neurotoxique dans cette région.

Finalement, ces résultats, s'ils n'excluent pas une implication partielle de la GFP, montrent une nette participation de la Cre aux effets neurotoxiques, ce qui n'est finalement pas si surprenant. En effet, la toxicité de la Cre a été identifiée dans de nombreux types cellulaires, principalement dans des lignées de souris transgéniques exprimant la Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Cette toxicité a ainsi été montrée, par exemple, dans les spermatozoïdes ([Schmidt et al., 2000](#)), les pneumocytes ([Jeannotte et al., 2011](#)), les cellules cardiaques ([Buerger et al., 2006](#) ; [Bersell et al., 2013](#) ; [Pugach et al., 2015](#)), et les podocytes rénaux ([Frahsek et al., 2019](#)). Le système nerveux central n'est pas épargné puisque les effets nocifs de la Cre ont également été mis en évidence dans les progéniteurs neuronaux ([Forni et al., 2006](#)), les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien ([Thanos et al., 2012](#)), les cellules du cristallin ([Lam et al., 2019](#)), les microglies ([Sahasrabudde and Ghosh, 2022](#)), ainsi que dans les lignées d'expression de la Cre sous dépendance du promoteur de la Nestin ciblant les neurones ([Harno et al., 2013](#)). Toutefois, lorsque la toxicité de la Cre est identifiée sur des lignées de souris transgéniques, il est difficile de faire la différence entre l'impact de la Cre *per se*, et la toxicité éventuellement liée à l'intégration de son transgène dans le génome de souris. Les études utilisant des vecteurs AAV portant le gène de la Cre-recombinase, telles que la nôtre, montrent qu'il y a bien une toxicité totalement inhérente à la Cre elle-même puisque son gène ne s'intègre pas, mais reste très majoritairement sous forme épisomale.

Les effets nocifs de la Cre se manifestent par des phénotypes variés, allant de pathologies ou anomalies à l'échelle de l'organe, en fonction du type cellulaire ciblé, comme par exemple des malformations pulmonaires lorsque la Cre est exprimée dans les pneumocytes (Jeannotte et al., 2011), des cardiomyopathies lorsqu'elle est exprimée dans les cardiomyocytes (Buerger et al., 2006), une glomérulosclérose segmentaire focale lorsqu'elle est exprimée dans les podocytes rénaux (Frahsek et al., 2019), ou encore une atrophie du thymus dans un modèle d'induction systémique de la Cre (Higashi et al., 2009). Des dommages de structures cérébrales sont décrites par Pfeifer et al. (2001) après l'expression de la Cre via un vecteur lentiviral chez la souris. Des anomalies cellulaires sont également décrites, comme des modifications de la morphologie et de l'ultrastructure des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Thanos et al., 2012), ou encore une accumulation des phases G2/M du cycle cellulaire *in vitro* (Pfeifer et al., 2001). De nombreuses études montrent également une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* (e.g. Loonstra et al., 2001 ; Pfeifer et al., 2001 ; Forni et al., 2006 ; Higashi et al., 2009), ainsi que des augmentations de l'apoptose, à la fois *in vitro* (e.g. Pfeifer et al., 2001) et *in vivo* (e.g. Buerger et al., 2006 ; Forni et al., 2006 ; Naiche and Papaioannou, 2007 ; Higashi et al., 2009 ; Jae Huh et al., 2010 ; Jeannotte et al., 2011 ; Bersell et al., 2013). Des anomalies chromosomiques sont également décrites, comme des recombinaisons illégitimes (Schmidt et al., 2000 ; Higashi et al., 2009) ; une augmentation du nombre d'échanges entre chromatides-sœurs (Loonstra et al., 2001) et des tétraploïdies (Janbandhu et al., 2014). La toxicité de la Cre conduit également à des dommages de l'ADN (Jae Huh et al., 2010 ; Bersell et al., 2013 ; Janbandhu et al., 2014 ; Pugach et al., 2015), et même à des dérégulations de l'expression de gènes (Thanos et al., 2012 ; Sahasrabudde and Ghosh, 2022), dont certains sont associés à l'apoptose (Lam et al., 2019).

Tout comme nous avons montré que la diminution du titre viral permet de réduire les altérations neuronales causées par l'AAVrg-Cre-GFP (Panzer et al., 2024), plusieurs études montrent que la toxicité de la Cre est dose-dépendante. En effet, alors qu'ils observent une cardiotoxicité de la Cre sur des lignées transgéniques l'exprimant fortement, Buerger et al. (2006) montrent également que les lignées avec une expression faible sont saines et sans déficience cardiaque. Dans un modèle d'expression inductible de la Cre dans les cardiomyocytes, Bersell et al. (2013) ont également décrit une toxicité dépendante de la dose de tamoxifène (substance induisant l'expression de Cre dans ce modèle). Après vérification du

fait que le tamoxifène seul n'est pas délétère, ces résultats indiquent que la toxicité est dépendante de la quantité de Cre ayant une localisation nucléaire.

Cette dose-dépendance pourrait aussi expliquer pourquoi nous avons établi une toxicité de l'AAVrg-Cre-GFP mais pas de l'AAVrg-Cre-mCh. Tout d'abord, le titre de l'AAVrg-Cre-GFP est plus de 20 fois supérieur à celui de l'AAVrg-Cre-mCh. Cette concentration accrue du premier virus pourrait donc engendrer une production plus élevée de Cre-recombinase. Par ailleurs, l'une des différences majeures entre ces deux virus concerne le promoteur. La Cre est sous le contrôle du promoteur EF1 α dans l'AAVrg-Cre-mCh, et du promoteur hSyn dans l'AAVrg-Cre-GFP. Il est possible que le promoteur hSyn soit plus fort qu'EF1 α , ce qui entraînerait une expression plus marquée de la Cre, et donc une toxicité également plus importante. Un effet similaire est observé par [Baba et ses collaborateurs \(2005\)](#) lorsqu'ils expriment la Cre dans des cultures de cellules de mammifères par le biais d'adénovirus recombinants, et sous le contrôle de trois promoteurs différents (SV40, SR α et CAG). Les auteurs ont montré un taux de survie plus élevé lorsque la Cre est exprimée sous le contrôle d'un promoteur faible.

En ce qui concerne les causes de la toxicité de la Cre, elle est directement liée à sa fonction d'ADN recombinase, puisqu'une Cre mutée sans activité recombinante n'a aucun effet délétère sur des cellules de mammifère ([Loonstra et al., 2001](#)). Cette toxicité n'est pourtant pas dépendante de la présence de sites loxP, puisqu'elle existe même en l'absence de gènes floxés (e.g. [Loonstra et al., 2001](#) ; [Silver and Livingston, 2001](#) ; [Naiche and Papaioannou, 2007](#) ; [Janbandhu et al., 2014](#)). Ainsi, une des hypothèses les plus répandues concernant la toxicité de la Cre repose sur la présence de sites pseudo-loxP endogènes, très similaires aux sites loxP et donc également reconnus par la Cre-recombinase. Ces sites ont été identifiés par [Thyagarajan et al. \(2000\)](#) dans des cultures de cellules de mammifères. Suite à cela, le développement d'outils bio-informatiques a permis de détecter ce type de séquences dans les génomes entiers. Ces sites sont notamment présents à une fréquence de 1,2 par mégabase dans le génome de souris ([Semprini et al., 2007](#)). [Higashi et al. \(2009\)](#) ont ainsi montré que la toxicité engendrée par l'expression de la Cre de façon systémique est directement liée au clivage de l'ADN au niveau de ces sites pseudo-loxP. Ainsi, lorsque la Cre exerce son activité d'ADN recombinase sur ces sites génomiques, elle entraîne des mécanismes cellulaires en réponse à ces altérations nucléotidiques. Il peut s'agir de mécanismes de réparation de l'ADN, par exemple, ou encore une réponse immunitaire innée

dépendante de la protéine STING et de ses voies de signalisation, qui jouent un rôle dans la détection de pathogènes dérivés d'ADN cytoplasmique (Pépin et al., 2016). L'hypothèse étant que ces altérations de l'ADN seraient si nombreuses que les réponses cellulaires s'avèreraient insuffisantes, ce qui conduit à l'apoptose de la cellule.

Toutefois, cette hypothèse de la recombinaison des sites pseudo-loxP n'explique pas la totalité de la toxicité de la Cre, puisqu'il existe également de nombreuses lignées de souris Cre qui ne montrent aucune altération (alors qu'elles contiennent aussi des sites loxP et/ou pseudo-loxP). Par exemple, Lam et al. (2019) expriment la Cre dans les cellules du cristallin de leurs lignées de souris transgéniques, et observent des effets nocifs sur certains fonds génétiques, mais pas sur tous. Aussi, Zhu et al., (2012) décrivent l'absence de toxicité de leurs lignées de souris Cre en l'absence d'introduction de sites loxP conçus génétiquement, et indiquent ainsi que l'apoptose induite par la Cre n'est pas uniquement la conséquence de recombinaisons des sites pseudo-loxP. Les mécanismes précis conduisant à la toxicité de la Cre-recombinase dans certains cas sont donc toujours à établir.

3. Contre la toxicité de l'AAV-Cre-GFP

Il est évident que le système Cre-lox reste un outil très utile pour étudier de nombreux phénomènes. Il est donc indispensable de trouver une solution pour palier à la toxicité qu'il peut engendrer.

Puisque la toxicité de la Cre semble dépendre de sa dose, l'utilisation d'un système de Cre inducible a paru être une alternative pertinente (Heidmann and Lehner, 2001). En effet, lorsque la Cre est fusionnée au récepteur aux œstrogènes muté (**ER^T**), elle reste cytoplasmique et n'a donc pas d'action, ni de toxicité (e.g. Forni et al., 2006). Lors de l'administration de tamoxifène, celui-ci se lie à l'ER, exposant ainsi son signal de localisation nucléaire, tout le complexe migre alors dans le noyau. Ce n'est donc que lors de la présence de tamoxifène que la Cre a une localisation nucléaire et peut effectuer sa fonction d'ADN recombinase. Grâce à ce système, la Cre n'exerce son activité que pendant une période courte et contrôlée, ce qui semble prometteur pour diminuer sa toxicité. Cependant, plusieurs études utilisant cette méthode décrivent tout de même une toxicité de la Cre lors de l'administration de tamoxifène, même si celle-ci a lieu pendant un temps court. C'est le cas, par exemple, de Forni et al. (2006)

qui observent une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux lors de l'injection intrapéritonéale de tamoxifène chez la mère gestante de souris exprimant la CreER^{T2} dans ces cellules. De la même manière, [Naiche et Papaioannou \(2007\)](#) décrivent une augmentation de l'apoptose des embryons de souris exprimant la Cre après l'injection intrapéritonéale de tamoxifène à leur mère gestante. Certaines lignées de souris exprimant la CreER^{T2} de façon ubiquitaire montrent également des signes de toxicité (augmentation de l'apoptose) à l'âge adulte après l'administration de tamoxifène, par voie orale ([Higashi et al., 2009](#)) ou par injection intrapéritonéale ([Jae Huh et al., 2010](#)). Toutefois, ces différentes études permettent de confirmer que c'est la localisation nucléaire de la Cre qui cause sa toxicité. En effet, dans ces modèles, en l'absence de tamoxifène, la Cre est cytoplasmique et qu'il n'y a aucun signe de toxicité.

Le caractère dose-dépendant de la toxicité de la Cre a conduit plusieurs auteurs à chercher des solutions pour exciser la Cre une fois son action d'ADN recombinase effectuée. [\(Silver and Livingston, 2001\)](#), par exemple, ont développé un vecteur viral s'auto-inhibant, dans lequel le gène de la Cre-recombinase est lui-même également floxé. Cela entraîne une boucle de rétrocontrôle négatif, puisque lorsque la Cre est fortement exprimée, elle a aussi une action sur les sites loxP entourant son propre gène, ce qui conduit à l'excision de celui-ci. Ce système permet de diminuer la durée et l'intensité d'expression de la Cre, ce qui réduit les anomalies chromosomiques et de prolifération cellulaire, tout en ayant l'effet désiré sur le gène d'intérêt. [Pfeifer et al. \(2001\)](#) ont conçu un lentivirus portant le gène de la Cre-recombinase, lui-même également floxé, et ils ont montré une réduction de l'expression de la Cre après seulement 48h. Ils mettent en évidence une diminution de la toxicité, ainsi qu'une efficacité à modifier des gènes cibles dans plusieurs structures cérébrales comme le striatum, le cortex, l'hippocampe, le thalamus ou le cervelet. De la même façon, il pourrait ainsi être intéressant de développer des AAV de différents sérotypes, portant le gène floxé de la Cre-recombinase afin de réduire sa toxicité sans diminution du titre viral, s'affranchissant de la perte d'efficacité d'infection qui y est associée.

Plus récemment, [Savani et al. \(2024\)](#) ont testé un autre virus : l'AAV8-hSyn-Cre-GFP d'UNC Viral Vector Core. Contrairement à l'AAV8-Cre-GFP d'Addgene®, pour lequel ils observent une perte de densité neuronale, le virus d'UNC Viral Vector Core montre une réelle atténuation de la toxicité puisqu'il n'y a ni perte de densité neuronale, ni modification de la masse corporelle. Notons tout de même que ce virus est utilisé à un titre 10 fois moins élevé

que l'AAV8-hSyn-Cre-GFP d'Addgene®. Cette différence de titre pourrait expliquer l'absence de toxicité, indépendamment de la nature de la construction virale.

Dans notre cas, la réduction du titre du virus est suffisante pour contrer, ou du moins, retarder de manière satisfaisante, la toxicité de l'AAVrg-Cre-GFP, afin de poursuivre nos expériences avec ce virus.

Outre le gain de temps et d'énergie que représente le fait d'éviter des expériences avec un virus non adapté ou toxique, la réalisation de cohortes pilotes est aussi indispensable d'un point de vue éthique, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés par la suite.

II. Importance des conditions contrôles

Au-delà de mettre en évidence la toxicité spécifique à l'AAVrg-Cre-GFP, les résultats des expériences 2 et 3 nous rappellent que les technologies ne doivent pas être considérées comme établies et infaillibles, même si elles existent depuis longtemps et sont largement publiées. En effet, nous avons montré que, bien qu'un outil soit commercialisé, il peut en réalité être toxique dans certaines conditions.

Ainsi, nous souhaitons mettre l'accent sur la nécessité des contrôles histologiques lors de l'utilisation de vecteurs viraux. En effet, dans la majorité des articles scientifiques réalisant des injections intracérébrales d'AAV, le site d'injection n'est pas illustré, et/ou il n'est pas fait mention du contrôle de la qualité de l'injection et de l'intégrité tissulaire. Qui plus est, lorsqu'un tel contrôle est effectué, il repose très majoritairement sur un marquage cellulaire au DAPI. Or, nos résultats montrent bien qu'un marquage au DAPI ne suffit pas à mettre en évidence une éventuelle toxicité neuronale, puisque celle-ci peut être compensée par une prolifération gliale conduisant à une densité de noyaux cellulaires paraissant globalement normale. Nous espérons ainsi que nos travaux sensibiliseront la communauté scientifique à l'importance de contrôles histologiques cellule-spécifiques lors de l'utilisation de vecteurs viraux, ou de toute autre substance.

Dans un deuxième temps, nos résultats mettent également en lumière l'absolue nécessité d'intégrer des groupes contrôles adéquats, notamment lors de l'utilisation de Cre-recombinase. Dans ce cas, il est indispensable d'avoir des conditions contrôles de l'expression de Cre-recombinase en l'absence de gène floxé, afin d'isoler l'effet potentiel de la Cre en tant que telle, en particulier lorsque cet effet relève d'une toxicité. Il est également important de considérer un contrôle possédant le gène floxé d'intérêt, mais sans Cre-recombinase, afin de contrôler l'absence de recombinaison inopinée du gène floxé. C'est pour ces raisons que nous avons un groupe contrôle avec l'injection de l'AAVrg-Cre-GFP, mais sans injection d'AAV5-taCasp, ainsi qu'un groupe contrôle avec l'injection d'AAV5-taCasp et d'AAVrg-GFP (sans Cre-recombinase) pour nos études comportementales.

Partie 2 : Etude du rôle de la projection préfrontale vers les ReRh dans la flexibilité cognitive

Contributions expérimentales

Le CPFm, les ReRh et l'Hip sont connus pour être impliqués dans différents processus cognitifs spatiaux et/ou mnésiques. Ces trois structures sont interconnectées entre elles et forment un réseau cortico-thalamo-hippocampique anatomique et fonctionnel. L'objectif du projet est d'étudier individuellement chaque voie de projection au sein de ce réseau afin de comprendre son fonctionnement de façon plus fine.

Mon projet de thèse porte sur la voie cortico-thalamique de ce réseau, c'est-à-dire les neurones du CPFm projetant aux ReRh.

Cette seconde partie consiste donc à étudier le rôle de la projection cortico-thalamique dans la cognition spatiale.

I. Expérience 4 : Etude de l'impact de la déconnexion cortico-thalamique sur la cognition spatiale

Afin d'étudier le rôle de la voie de projection cortico-thalamique, nous avons décidé de la léser sélectivement, et d'observer les conséquences comportementales. Pour ce faire, nous utilisons une approche virale reposant sur le système Cre-lox permettant d'exprimer la caspase dans les neurones du CPFm projetant aux ReRh de façon Cre-recombinase dépendante. Grâce à cette technique, seuls les neurones infectés par les deux virus sont tués, c'est-à-dire les neurones de projection du CPFm vers les ReRh.

Cette expérience a été réalisée sur 2 cohortes de 30 rats, répartis en 3 groupes (**Figure 38a**) :

- Un groupe expérimental de déconnexion cortico-thalamique (**Déco CT** représenté en **orange**) recevant l'AAV5-taCasp dans le CPFm et l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh (20 rats)
- Un groupe contrôle de l'effet de l'AAV5-taCasp (**Casp**, représenté en **violet**) recevant l'AAV5-taCasp dans le CPFm, mais en association avec un virus contrôle AAVrg-GFP, qui ne porte pas le gène de la Cre-recombinase dans les ReRh (20 rats)
- Un groupe contrôle de l'effet de l'AAVrg-Cre-GFP (**Cre**, représenté en **vert**) recevant l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh en association avec une injection de PBS dans le CPFm (20 rats)

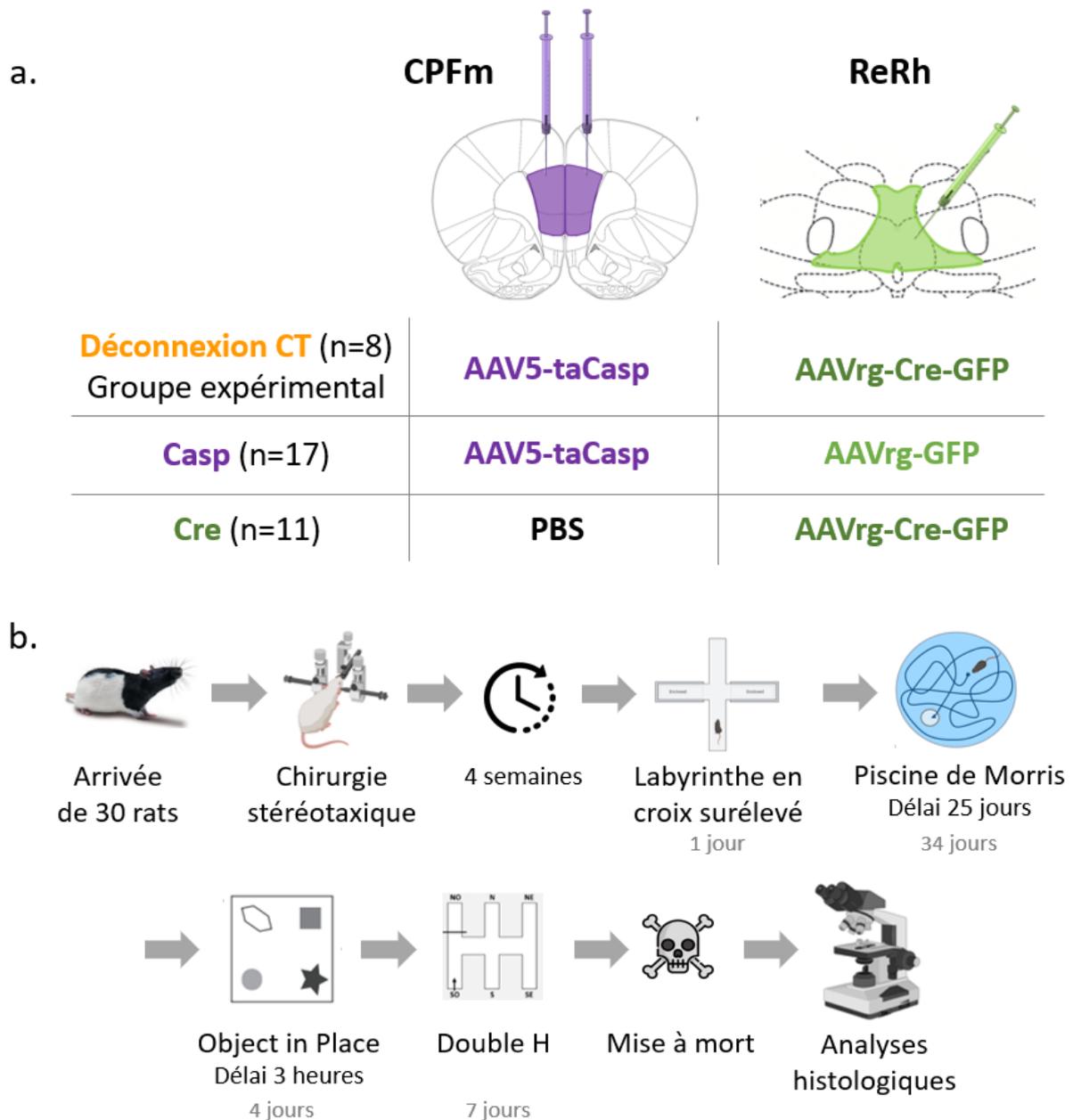


Figure 38. Design expérimental de l'expérience 4

a. Illustration des 3 groupes. Le groupe Déco CT (n=8) reçoit l'AAV5-taCasp dans le CPFm de façon bilatérale et l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh. Le groupe Casp (n=17) reçoit l'AAV5-taCasp dans le CPFm et le virus contrôle AAVrg-GFP dans les ReRh. Le groupe Cre (n=11) reçoit du PBS dans le CPFm et l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh.

b. Illustration du protocole suivi par les deux cohortes de 30 rats. Après leur arrivée, ils sont acclimatés et manipulés pendant 2 semaines, puis ils sont opérés pour l'injection des virus. Après un délai de 4 semaines pour permettre le transport et l'expression des virus, ils font le test du labyrinthe en croix surélevé. Ils continuent avec le protocole de piscine de Morris avec 8 jours d'acquisition et le rappel avec un délai de 25 jours. Ils poursuivent avec la tâche d'Object-in-Place avec un délai de 3h puis avec le protocole de Double-H. Ils sont mis à mort 90 min après le deuxième test de rappel en Double-H, puis leurs cerveaux sont disséqués et coupés, pour permettre les analyses histologiques.

L'ensemble des animaux a suivi le protocole détaillé ci-dessus (**Figure 38b**). Après un délai post-opératoire de 4 semaines, les rats ont passé la tâche du labyrinthe en croix surélevé pour évaluer leur phénotype de type anxieux. Cette précaution vise à éviter une mauvaise interprétation des autres résultats comportementaux qui pourraient être affectés par une modification du niveau d'anxiété des animaux. Ensuite, les rats ont été entraînés dans la piscine de Morris en vue d'un test de rappel de la localisation de la plateforme, effectué 25 jours après la fin de l'acquisition. Ce délai permet d'évaluer le processus de consolidation systémique d'un souvenir spatial. Ils ont poursuivi avec une tâche d'*Object-in-Place* avec un délai de 3h afin d'évaluer la mémoire d'association entre un objet et sa place, puis ils ont suivi le protocole de Double-H pour évaluer leur flexibilité comportementale. Toutes ces tâches comportementales ont été choisies car elles sont connues pour impliquer les ReRh et le CPFm. La mise à mort des animaux a eu lieu 90 minutes après le test du Double-H afin de pouvoir faire des analyses histologiques et fonctionnelles grâce à un immunomarquage du marqueur d'activité neuronale c-Fos. Les cerveaux ont ensuite été congelés et coupés afin de procéder aux analyses histologiques.

L'ensemble des analyses histologiques repose sur la visualisation de la GFP associée à l'AAVrg injecté dans les ReRh. Dans les groupes Cre et Déco CT, la GFP est exprimée en fusion avec la Cre, ce qui lui donne une localisation nucléaire. En revanche, dans le groupe Casp, l'absence du gène de la Cre conduit à une localisation cytoplasmique de la GFP, rendant ce groupe moins pertinent pour une comparaison directe avec les deux autres. Par conséquent, le groupe Casp ne constitue pas un contrôle histologique rigoureux, mais plutôt un contrôle comportemental.

Les résultats des analyses histologiques sont présentés dans le manuscrit en préparation ci-dessous. Ils permettent la validation des paramètres essentiels à l'inclusion des animaux dans l'analyse des résultats comportementaux, et mènent ainsi à l'exclusion des rats ne respectant pas ces critères. Il s'agit de :

- Une infection suffisante des ReRh par l'AAVrg-Cre-GFP ou l'AAVrg-Cre → Exclusion des animaux avec une infection de moins de 20% du Re en moyenne sur 6 coupes (3 rats Casp, 8 rats Cre et 9 rats Déco CT)

- L'absence d'infection du noyau médiodorsal du thalamus (**MD**), recevant également de nombreuses afférences du CPFm, par l'AAVrg-Cre-GFP ou l'AAVrg-Cre → Exclusion des animaux avec une infection de plus de 50% des MD sur au moins une coupe (1 rat Déco CT)
- Une déconnexion cortico-thalamique bilatérale → Exclusion des animaux avec une déconnexion thalamique unilatérale (2 rats Déco CT)
- L'absence de neurotoxicité de l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh → Exclusion des animaux avec une neurotoxicité couvrant plus de 30% des ReRh (1 rat Cre)

L'élimination de ces animaux porte l'effectif à 17 rats pour les Casp, 11 rats pour les Cre et 8 rats pour les Déco CT.

Les résultats portant sur les analyses histologiques, le labyrinthe en croix surélevé, la piscine de Morris ainsi que le Double-H se trouvent dans le manuscrit en préparation.

Projections from the medial prefrontal cortex to the ventral midline thalamus determine cognitive flexibility but not system consolidation in the rats

Elodie Panzer, Laurine Boch, Isabella Guimaraes-Olmo, Pauline Mabile, Brigitte Cosquer, Solène Poivey, Arthur Grudler, Julia Martinez, Lilian Medina, Emma Candelon, Lin Ziyang, Marie Boivin, Axelle Papillon, Anne Pereira de Vasconcelos, Aline Stephan, Jean-Christophe Cassel

Abstract

Reciprocal connections with the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus make the reuniens and rhomboid (ReRh) thalamic nuclei a major functional hub for regulations of cortico-hippocampal interactions. In a previous experiment (Cholvin et al., 2013), we found that reversible inactivation of the ReRh produced a marked strategy shifting deficit in a water escape navigation task for rodents in the double-H maze. Interestingly, the reversible inactivation of the medial prefrontal cortex (mPFC) produced similar deficits, raising the possibility that cortical neurons projecting to the ReRh nuclei participate in strategy shifting and cognitive flexibility. Two experiments were used to address this hypothesis. First, a functional analysis of c-Fos expression, combined with an mCherry labelling of ReRh neurons receiving a prefrontal input, showed an increased activity of these neurons during the second probe of the double-H maze. Secondly, pathway-restricted and direction-specific mPFC to ReRh disconnections were made by the combination of a retrograde adeno-associated virus (AAV) expressing Cre recombinase (AAVrg-Cre-GFP) injected into the ReRh and an anterograde AAV expressing a Cre-dependent caspase (AAV5-DIO-taCasp) injected into the mPFC. We showed that this cortico-thalamic disconnection led to an impairment in a strategy shifting task, but not in a Morris water maze task with a 25-day delay.

These data clearly show that mPFC neurons projecting to the ReRh nuclei have a major contribution to cognitive flexibility, but not to system consolidation of a spatial memory.

Keywords: reuniens nucleus; rhomboid nucleus; strategy shifting; prefrontal cortex; system consolidation

Introduction

Lesions affecting certain thalamic nuclei induce cognitive alterations reminiscent of deficits produced by hippocampal or prefrontal damage (Van der Werf et al., 2003; Aggleton et al., 2011; Carlesimo et al., 2011). For instance, whereas N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced lesions of the intralaminar thalamic nuclei do not interfere with the acquisition of a spatial memory task, these lesions obliterate spatial memory persistence by disrupting systems-level consolidation of the learned task (Lopez et al., 2009). Belonging to the ventral midline thalamus, the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei also participate in systems-level consolidation, as shown for both spatial and contextual memories (Loureiro et al., 2012; Klein et al., 2019; Quet et al., 2020). Furthermore, anatomical and electrophysiological observations point to a role of the Re and Rh in the information flow between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (Vertes, 2006; Vertes et al., 2007; Hoover and Vertes, 2012). The Re nucleus projects densely to CA1 in the hippocampus and to the subiculum, a bit less densely to the mPFC, among other innervated structures (Cassel et al., 2021), while the Rh nucleus has additional connections with other cortices, ventral striatum, and amygdala (Su and Bentivoglio, 1990; Dolleman-Van der Weel and Witter, 1996; Vertes et al., 2006; Xu and Südhof, 2013). About 8% of the Re neurons have collaterals in both the hippocampus and mPFC (Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014), which could contribute to synchronize the activity of both structures (Varela et al., 2014). The Re and the Rh nuclei also receive afferents from the hippocampus and the mPFC, what places these two diencephalic nuclei in a hub position between both telencephalic structures.

The mPFC has a crucial role in executive functions, behavioral flexibility, and strategy shifting (Ragozzino et al., 2003; Floresco et al., 2008). The role of the ReRh in such cognitive flexibility is also known (Panzer et al., 2024b). Particularly, in a previous experiment, we found that rats which had acquired two repetitive escape response sequences in a simple spatial navigation task lost their cognitive flexibility during a misleading probe trial following reversible, muscimol-induced inactivation of the Re and Rh nuclei (Cholvin et al., 2013). More recently, this finding was confirmed in rats injected with clozapine-NO after the hM4Di DREADD had been expressed in the excitatory neurons of the Re and Rh nuclei (Quet et al., 2020). As the inactivation of the mPFC produced identical effects in the same task (Cholvin et al., 2013), we logically hypothesized that projections from the mPFC to the Re and Rh nuclei could be involved in cognitive flexibility and strategy shifting. To address this hypothesis, we first used a combination of a floxed mCherry injected in the ReRh and a trans-synaptic Cre-recombinase (Zingg et al., 2022) to stain ReRh neurons receiving a prefrontal input. We then evaluated the activity of these neurons during a strategy shifting task, using c-Fos immunostaining. In a second step, we performed selective, pathway-restricted and direction-specific mPFC to ReRh disconnections by associating a retrograde adeno-associated virus (AAV) expressing Cre recombinase, injected into the

Re and Rh nuclei, with an anterograde AAV expressing a Cre-dependent caspase, injected into the mPFC. This technical approach has been used and validated previously in other brain systems (e.g., Basting et al., 2018; Laurent et al., 2017; Marciante et al., 2020; Nadel et al., 2020; Walker et al., 2022). Recently, we have been able to use it to damage neurons of the prefrontal cortex projecting to the ventral midline thalamus (Panzer et al., 2024a). Our currently reported results provide clear evidence for an implication of mPFC-to-ReRh projections in cognitive flexibility and strategy shifting, but not in system consolidation of a spatial memory.

Materials and Methods

Animals

All experimental animals were used in compliance with the rules of the European Community Council Directive (2010/63/EU) and the French Agriculture Ministry. All approaches have been validated by the ethical committee of the University of Strasbourg (CREMEAS—authorizations #13261-2018012918394046 and #45564-2023110117317004). Our experiments used a total of 75 adult Long–Evans male rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) aged 7 weeks at their arrival at the laboratory (250 g in average). 15 rats were used in Experiment 1, and 60 rats in Experiment 2, divided into two cohorts of 30 rats. Animals were housed 3 per cage, in quiet facilities, under a 12h light/dark cycle (light on at 7:00 A.M. in winter and 8 :00 A.M. in summer) with access to food and water *ad libitum*, controlled temperature (22°C), and a hygrometry of ~55%. Before any experimental manipulation, rats were individually handled for 2 min each day over 5 consecutive days in their housing room.

mCherry staining of ReRh neurons receiving a projection from the mPFC

In order to stain ReRh neurons that receive an afference from the mPFC, we used a trans-synaptic Cre-dependant mCherry expression approach. This technique is based on the combination of a trans-synaptic adeno-associated virus (AAV, Zingg et al., 2022) expressing Cre-recombinase, injected in the mPFC, with an AAV expressing a Cre-dependent mCherry injected in the ReRh (Fig. 1a).

The viral vector carrying the Cre-recombinase gene is the AAV1.hSyn.Cre-WPRE-SV40 (Addgene, MA, USA, not diluted (6.6×10^{12} particles/mL) or the AAV1.hSyn.Cre- Δ WPRE-SV40 (designed by the Vectorology and Molecular Biology Platform of IGBMC, Strasbourg, donated by Frédéric Dousseau), AAV1.hSyn.Cre hereafter. The latter was either used with no dilution, either diluted two or four times in PBS from the stock solution (6.6×10^{12} particles/mL). A PBS-control group (n=2) was used to control

the absence of mCherry expression in the absence of Cre. In this group, the AAV1.hSyn.Cre was replaced by PBS. The results of these two rats concerning mCherry and cFos coexpression are not shown. Regarding the behavioral results, the PBS-control rats are part of control groups.

The viral vector carrying the floxed mCherry gene is the anterograde AAV5.hSyn.DIO-mCherry-WPRE (Addgene, MA, USA), AAV5-mCh hereafter. It was diluted twice in PBS from the stock solution (final titer: 1.1×10^{13} particles/mL).

Corticothalamic disconnection with a viral approach

In order to disconnect the corticothalamic pathway between the mPFC and the ReRh, we used the Cre-dependent caspase expression approach, developed by Yang et al., in 2013. This technique is based on the combination of a retrograde AAV expressing Cre-recombinase injected in the ReRh, with an anterograde AAV expressing a Cre-dependent caspase injected in the mPFC (Fig. 2a).

The viral vector carrying the Cre-recombinase gene is the retrograde AAVrg.hSyn.eGFP-Cre-WPRE-SV40 (Addgene, MA, USA), AAVrg-Cre-GFP hereafter. It was diluted eight times in PBS from the stock solution (final titer: 3.125×10^{12} particles/mL). This retrograde serotype has been engineered by Tervo et al. (2016) from an AAV2.

The viral vector carrying the floxed caspase gene is the anterograde AAV5.EF1a.Flex-taCasp3-TEVp (UNC Gene Therapy Center-Vector Core), AAV5-taCasp hereafter. It was diluted twice in PBS from the stock solution (final titer: 2.1×10^{12} particles/mL).

In the Cre group, the AAV5-taCasp was replaced by PBS. In the Casp group, the AAVrg-Cre-GFP was replaced by a control virus carrying only the GFP gene (and no Cre-recombinase): the retrograde AAVrg.hSyn.eGFP-WPRE-hGH (Addgene, MA, USA), AAVrg-GFP hereafter.

Stereotactic injection

After one week of acclimatization and another week of manipulation of the rats, the viral vectors were stereotactically injected into their brain. First, rats were anesthetized by Isoflurane (Isoflu-Vet®, Dechra, 4% for induction and 1,5% for maintenance) and placed into the stereotactic frame. Viral injections targeting the ReRh or the mPFC were made using slow microinfusions (over 5 min) via a silicium infusion needle (30G, Phymep). After leaving the needle in situ for an additional 5 min to ensure diffusion of the virus in the target structure, it was slowly retracted.

For Experiment 1, we injected $2 \times 0.5\mu\text{L}$ of AAV5-mCh in the ReRh, at the following coordinates (in mm): AP - 1.8 and - 2.3 (from bregma), DV -7.1 and -7.2 (from skull), ML 1.9 (from midline of the sagittal

sinus) and with an angle of 15°. And we injected 3 x 0.6µL of AAV1.hSyn.Cre unilaterally in the mPFC, at the following coordinates (in mm): AP 3.0, DV -5.0, -3,8 and -2,2, and ML 0,5. All coordinates were in accordance with Paxinos and Watson, Seventh Edition (2014).

For Experiment 2, we injected 2 x 0.5µL of AAVrg-Cre-GFP (Cre and Casp+Cre groups) or AAVrg-GFP (Casp group) in the ReRh, at the following coordinates (in mm): AP - 1.8 and - 2.3 (from bregma), DV - 7.1 and -7.2 (from skull), ML 1.9 (from midline of the sagittal sinus) and with an angle of 15°. And we injected 6 x 0.6µL of AAV5-taCasp (Casp and Casp+Cre groups) or PBS (Cre group) in the mPFC, at the following coordinates (in mm): AP 3.0, DV -5.0, -3,8 and -2,2, and ML 0,5 and -0,5. All coordinates were in accordance with Paxinos and Watson, Seventh Edition (2014).

After the last infusion, the scalp was sutured. All rats that underwent surgery were allowed to recover under a warm lamp for 20 –30 min before being placed back into their homecage. They were given a 4 weeks rest period before the start of the behavioral evaluations.

Behavioral Evaluations

The double-H maze task (Experiments 1 and 2)

Testing apparatus

The specifications of the Double-H and the testing procedures have been described previously (Cholvin et al., 2013). In brief, the apparatus 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 central corridor (Fig. 1b), thus approximately corresponding to the shape of two contiguous Hs. Each of these arms is delimited by transparent Plexiglas side walls, 35 cm high. By convention, the two opposing arms in the middle are designed as north (N) and south (S), respectively. Both other pairs of side arms are termed northwest (NW), northeast (NE), southwest (SW), and southeast (SE) hereafter (Fig. 1b). The double-H device was placed on a table, 80 cm from the floor, in a large room with several well-contrasted cues on the walls (black disk, black triangles, orange-painted heating ducts). The double-H was filled with fresh water (20 +/- 1°C) to a height of 15 cm. The water was made opaque by addition of Meudon white. A platform (11 cm diameter x 14 cm high), was immersed 1 cm beneath the water surface at the extremity of one arm (for details, see Fig. 1b). For each rat, the task consisted of learning to swim from the start point to the escape platform, which was always located at the extremity of one arm.

Training protocol

A first day of pretraining habituated the rats to the testing device and the water. For only this habituation session, the water was left without Meudon white, the platform protruded 1 cm above the water surface, and the rats were given four consecutive trials, for which the platform was located at the end of the SW arm and the rats were released from the NW. A transparent guillotine door blocked the access to the central corridor, so that rats could only swim straight to the opposite arm.

Over the following training days, the rats were also given four daily trials, but now the water was opaque, and the platform was immersed at the extremity of the NE arm. These trials were separated from each other by a 15 s interval. The rats were released in the maze either from the N or the S arm (N, S, S, N on day 1; S, N, S, N on day 2; S, N, N, S on day 4, and N, S, N, S on day 5), and the opposite arm was closed by a transparent guillotine door to prevent any entry. When released from the S, the rats had to turn once right and then left to reach the platform directly. When released from the N, the correct sequence consisted of two consecutive left turns. Each trial lasted for a maximum of 60 s. When the rat did not reach the platform within this delay, it was gently guided to the platform by the experimenter. Once a rat had climbed on the platform, it was left there for 10 s before the next trial was started. 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: (1) one 24 h after the first 2 training days and (2) another one 24 h after 2 additional days of training (Fig. 1b). For both probe trials, the platform was removed from the apparatus. The probe trial duration was 60 s. Rats were released from the SW arm, with the entry of NW arm closed by a guillotine door. This procedure 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 during negative feedback (corresponding to entering the N arm after successive right and left turns). It is noteworthy that, because rats were released from the SW arm, which corresponds to a shift of their start place in the device relative to the testing environment by only 60 cm to the left, the visuospatial context at the start of the probe trial was relatively comparable with that of all training trials started from the S arm. Therefore, the potential of the probe trial to mislead was extremely high. In our previous experiments, we found that, after such a weak shift of the start point, ~80% of the rats first behaved as if they had been released from the usual training arm (Cholvin et al., 2013). 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 consequence of a strategy shift. The variables recorded and analyzed were the time spent in the different arms and zones of the maze.

In Experiment 2, all rats followed this protocol. In Experiment 1, we added a group “Swimming control” that was released from the N during the probe, exactly the same way as the acquisition. Therefore, they don’t need to switch the strategy to look for the platform in the right arm NE. A third group, home cage, that did not perform the Double-H maze at all, was also added.

Elevated Plus Maze (Experiment 2)

As previously described (Loureiro et al., 2012), the elevated plus maze was made of black Plexiglas and consisted of four arms (50 cm long x 10 cm wide) fixed to a central platform (10 x 10 cm): two with 40 cm high walls (closed arms) and two with 1.5 cm high borders (open arms). The maze is placed 73 cm above the floor. Light adjustments were made to have the same intensity on both open arms (i.e., 10 lux), and in both closed arms (i.e., 5 lux). For testing, rats were placed individually in the center of the maze, their head facing a closed arm (the same for all rats). The movements of the rats were followed by a computer-based video camera fixed above the maze. The measures were taken over 5 min. An entry in a given arm was counted when the rat had all four paws in the arm. The total number of entries as well as the total time spent in open- versus closed-arms were recorded and analyzed.

Open Field (Experiment 2)

Rats were tested over 3 days, with a 10 min free-exploration session in an open field. The device was previously described by Loureiro et al. (2012) and consisted of a wooden square arena with 43.5 cm high walls and a 65 x 65 cm floor. The thigmotaxis, defined as moving within 10 cm of the edge of the apparatus, was measured as an anxiety-like behavior marker.

Morris Water Maze (Experiment 2)

The specifications of the water maze (160 cm diameter and 60 cm high) and the testing procedures have been described previously (e.g., Loureiro et al., 2012). In brief, the first pretraining day consisted of one four-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, painted black, 1 cm above the water surface) located in the southeast quadrant of the pool, starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool (Fig. 5a). The rats were then given four successive acquisition trials per day (intertrial interval, 10–15 s) for 8 days. The maximum duration of each trial is 60 s, using a random starting point from each of the four cardinal points from the edge of the pool. This acquisition allows rats to learn the location of a platform (diameter 11 cm) hidden 1 cm below the water surface in the northwest quadrant. The distance traveled before reaching the platform was recorded and subsequently computed by a video-tracking system. The probe trial occurred 25 days after the end of the acquisition, no platform was placed in the pool. The rats were released from the NE or SW start point and allowed a 60 s swim time to explore the pool. The time spent in the four virtual quadrants,

the thigmotactic behavior, as well as the latency to first entry in the target area, the number of crossings in the target area, in the annulus zone (i.e., size of the platform surface enlarged by a 10 cm wide annulus) were recorded: the three last parameters were used as an index of memory precision (Lopez et al., 2012).

Histological verifications

Perfusion and tissue sectioning

Ninety minutes after the second probe test in the double-H maze, the rats were subjected to a lethal dose of ketamine (200mg/kg, i.p.) and xylazine (30mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with a 4% phosphate-buffered (0.1 M) paraformaldehyde solution (4°C). Brains were removed, postfixed for 2 h in the same fixative at 4°C, and transferred to a 20% phosphate-buffered (0.1 M) sucrose solution for 48 h at 4°C before being snap frozen (isopentane, -40°C) and stored at -80°C. Serial coronal sections (40 µm) were cut through the prefrontal cortex, the midline thalamus, and the hippocampus using a cryostat (Leica CM3050S). The sections were kept floating in a cryoprotective solution at -80° C until being processed for staining.

Fluorescent immunohistochemistry

For Experiment 1, a c-Fos immunostaining was performed in order to assess the number of activated neurons during the second probe trial of the Double-H. The ReRh were made visible by a calretinin immunostaining. A DsRed immunostaining was also performed to amplify the mCherry fluorescent signal.

For Experiment 2, the localization and extent of the viral infection in the ReRh could first be observed directly under a fluorescence microscope, without any immunostaining. However, a NeuN protein immunostaining was performed to facilitate the observation of the different brain regions.

Second, the GFP-retrolabelled neurons counting in the mPFC and the Hip has been done after a signal amplification thanks to a GFP protein immunostaining.

All immunostaining experiments were performed on free-floating brain sections evenly distributed along the entire rostro-caudal extent of the ReRh or the mPFC, as previously described (e.g. Klein et al., 2019). Briefly, sections were rinsed three times during 10 min in a PBS merthiolate buffer before being soaked for 1h in 5% normal horse serum in PBS containing 0.5% Triton X-100. The sections were then transferred into the primary antibody solution and kept there overnight at room temperature. Then, they were rinsed 3x10 min in PBS and soaked for 2 hrs in a buffer solution containing the

secondary antibody. Finally, they were rinsed three times in PBS (the second rinsing contained DAPI) and mounted with Mowiol® (Sigma Aldrich).

All the antibodies used are described in Table 1.

Image acquisition

All images from sections at the level of the ReRh were acquired with Axio Imager (Zeiss®), an epifluorescent microscope equipped with a motorized x–y–z stage control. Mosaics were performed using the Zen (Zeiss®) software. The same light intensity and exposure time were used for all sections and were determined according to the strongest signal. Areas of interest in stained sections were taken using a 10x objective.

All images at the level of mPFC and hippocampus were acquired with NanoZoomer (Hamamatsu), a high-resolution epifluorescent slide scanner and the NDP Scan (Hamamatsu) software. The same light intensity and exposure time were used for all sections. Parameters were determined according to the strongest signal. Number of GFP-retrolabelled neurons in stained sections was counted using a 40x objective.

Quantification

All quantifications were made with the free access software QuPath (e.g., Bankhead et al., 2017; Humphries et al., 2021) on 6 sections per region and per rat.

Area delineation

In Experiment 1, the ReRh were delineated with the “*Polygon*” tool thanks to the calretinin immunostaining, in order to count the cFos and mCherry in these regions.

In Experiment 2, the extent of the viral infection in the ReRh and in the rest of the thalamus was estimated. We first made the Paxinos and Watson, Seventh Edition (2014) atlas pages transparent and overlaid them on our section images. Then, we outlined the GFP positive region for every thalamic nucleus with the “*Polygon*” tool. We then calculated the percentage of infection for each nucleus. To avoid any bias, we only selected the fluorescent channel of interest (GFP).

Cell counting

In Experiment 1, we quantified the c-Fos positive neurons with the “*Cell detection*” tool with these parameters (Requested pixel size: 0.5µm; Background radius: 5µm; Median filter radius: 0µm; Sigma:

1.8 μm ; Minimum area: 45 μm^2 ; Maximum area: 150 μm^2 ; Threshold: 600; Split by shape; Smooth boundaries; Make measurements).

In Experiment 2, we evaluated the efficiency of the cortico-thalamic disconnection by counting the GFP-retrolabelled neurons in the mPFC, these are the cortical neurons that receive the AAVrg-Cre-GFP or AAVrg-GFP, thus projecting to the ReRh. We also evaluated the specificity of this disconnection by counting the GFP-retrolabelled neurons in the Hip.

For the Cre and the Casp+Cre groups, we used the “*Cell detection*” tool using the following parameters: Requested pixel size: 0.5 μm ; Background radius: 10 μm ; Median filter radius: 0 μm ; Sigma: 3 μm ; Minimum area: 5 μm^2 ; Maximum area: 200 μm^2 ; Threshold: 4 for mPFC, 10 for Hip ; Split by shape ; Smooth boundaries ; Make measurements.

For the Casp group, we used the “Classifier” tool. We first ran the StarDist extension script, which was trained to detect and segment nuclei on a DAPI staining. Once the nuclei were detected, we trained a classifier to sort the nuclei that are positive to GFP. This training was made for each rat in shades of grey to facilitate visualization of contrasts. Once the classifier was trained, it was run on the mPFC or Hip areas of every section.

Exclusion criteria (Experiment 2)

For our behavioral results to be representative of the consequences of the cortico-thalamic disconnection, we excluded all rats that didn't meet the following criteria: (1) a minimum of 20% of the Re infected by the retrograde virus, (2) not any section with more than 50% of the medio-dorsal nucleus (MD) infected by the retrograde virus (as this nucleus also receives projections from the mPFC, if it is infected with the retrograde virus, it can lead to a cortico-MD disconnection instead of a cortico-ReRh one), (3) not more than 30% of the Re that was damaged due to AAVrg-Cre-GFP neurotoxicity, and (4) the caspase-virus injection in both hemisphere of the mPFC.

Statistical analysis

Unless otherwise specified and depending on the experiment, data analyses used Student's t tests, one-way or two-way ANOVAs, with repeated measures where appropriate. Likewise, where appropriate, these analyses were completed by multiple comparisons using the Newman-Keuls multiple range test. In the case of non-parametric distributions, we used a Kruskal-Wallis (K-W) test, followed by a Dunn multiple comparisons test. Homogeneity of variance and normality of distribution were tested systematically. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Experiment 1: mCherry staining of ReRh neurons receiving a projection from the mPFC and c-Fos co-expression

a. Validation of the performance in the double-H maze

Four weeks after the viral injections by stereotactic surgery (Fig. 1a), we started the double-H maze protocol (Fig. 1b). The training was organized over two 2-d periods with each ending up with a probe trial 24h later. During training, the distances swum before reaching the platform shortened over days ($F(3, 30) = 5.007, p = 0.0062$), indicating learning (Fig. 1c). There was no significant difference between the two groups ($F(1, 10) = 1.300, p = 0.2808$) and no Group x Day interaction ($F(3, 30) = 0.4597, p = 0.7125$). Analyses of the latencies and swim velocities led to comparable conclusions (data not shown). During the second probe trial, both groups (strategy shifting and swimming control) spent significantly more time in the NE arm than chance (Fig. 1d), as shown by the comparison with 8.2 sec (chance level) using a one-sample t-test (Swimming control: $t_2 = 6.511, p = 0.0228$; Strategy shifting: $t_8 = 4,798, p = 0.0014$).

In summary, rats in both groups were able to search for the platform in the NE arm. Rats in the strategy shifting group were able to shift from an egocentric to an allocentric strategy.

b. The probe trial in double-H maze activates neurons in the Re, of which some receive afferents from the mPFC

As rats were killed 90 min after the second probe trial in the double-H, we were able to assess the neuronal activity in the ReRh with c-Fos immunostaining. We distinguished the ventral midline thalamic nuclei, i.e., Re, the Rh, and the VRe. As both control groups (home cage and swimming control) showed similar c-Fos density, they were pooled. The c-Fos density in the ventral midline thalamus is illustrated in Fig 1i. A 2-way ANOVA showed significant Group ($F(1, 12) = 8.443, p = 0.0132$) and Region ($F(2, 24) = 160.1, p < 0.0001$) effects, but no Group x Region interaction ($F(2, 24) = 0.3995, p = 0.6750$). Multiple comparisons showed a significant increase of c-Fos density in the strategy shifting condition in both the Re ($p = 0.0183$) and the VRe ($p = 0.0394$), but not in the Rh ($p = 0.2145$). Hence, the second probe of the double-H task activated some neurons in the Re and the VRe.

In the ReRh, the mCherry-positive neurons were mostly those on which afferents from the mPFC synapse (Vertes et al., 2007), whether in the VRe, they are mostly thalamo-cortical neurons stained by the retrograde nature of the AAV1.hSyn.Cre (Hoover and Vertes, 2012 ; Varela et al., 2014) . After the exclusion of the rats with less than 3 mCherry-positive neurons per section, we assessed the percentage of mCherry-positive neurons that co-expressed c-Fos in the ventral midline thalamus (Fig.

1e-h, j). A mixed-effects analysis showed significant Group ($F(1, 8) = 7.134, p = 0.0283$) and Region ($F(1.411, 5.644) = 8.502, p = 0.0240$) effects, but no Group x Region interaction ($F(2, 8) = 0.1215, p = 0.8872$). Multiple comparisons showed no difference between the groups, but show significantly less co-expression in Rh than VRe ($p = 0.0403$),

It is noteworthy that due to small samples, the power of our statistical analyses has been too weak. This is why this experiment will be replicated using larger samples. The paper will be submitted only after the results of this additional (and already ongoing) experiment have been analyzed.

Experiment 2: cortico-thalamic disconnection and behavioral consequences

a. Histological validation

After the stereotactic injection of a combination of two viruses (Fig. 2a), our first validation consisted in checking the location of AAVrg-Cre-GFP or AAVrg-GFP injections in the ReRh. All sites were found to be localized in the ReRh, but rats with less than 20% infection of the Re were excluded. Typical examples of AAVrg-GFP and AAVrg-Cre-GFP infections are illustrated in Fig. 2, along with the extent of the infections (Fig 2i). There was a significant difference between the groups ($F(2, 33) = 9.153, p = 0.0007$), the Casp group having a larger infection than the two others. This can be attributed to differences in the viral constructs. The AAVrg-GFP may have exhibited greater diffusion within the thalamus. Additionally, the cytoplasmic localization of GFP could have led to an overestimation of the infected area.

The second important validation was the effectiveness of the cortico-thalamic disconnection. To assess it, we amplified the GFP signal in the mPFC by immunostaining and counted GFP-positive neurons. These were the neurons infected by the AAVrg-Cre-GFP or AAVrg-GFP, thus cortical neurons projecting to the ReRh. Fig. 2e, f, and g show typical examples of GFP-positive neurons in the mPFC for each group. As the Casp group did not receive the same GFP-virus as the two other groups, it was not relevant to compare the number of GFP-neurons with the other groups. We used it more as a behavioral control than a histological one. After the exclusion of the rats with a unilateral disconnection, a t-test for unpaired samples showed a significant difference between the Cre and the Casp+Cre groups ($t_{17} = 3.971, p = 0.0010$); Fig. 2h). In the Casp+Cre group, the number of GFP-positive neurons was reduced by about 70% on average as compared to the Cre group. Thus, the combination of an AAVrg-Cre-GFP injected into the ReRh and an intracortical injection of the AAV5-taCasp allowed to damage part of the mPFC neurons projecting to the ventral midline thalamus. This cortico-thalamic disconnection was specific to the mPFC as shown by no loss of GFP-positive neurons in the Hip, another

structure projecting to the ReRh (Fig. 2j). Statistical analysis showed no difference between the groups ($p = 0.5840$).

To conclude, the rats that were kept in the behavioral analysis were those with a consistent ReRh infection with the AAVrg-Cre-GFP or AAVrg-GFP, and a specific loss of GFP-positive mPFC neurons, thus ReRh projecting neurons.

b. The cortico-thalamic disconnection does not induce anxiety-like behavior

To confirm that the cortico-thalamic disconnection had no impact on some non-mnemonic variables that could bias performance in the double-H or the Morris water maze, we assessed anxiety-like behaviors. In the elevated plus maze, Casp+Cre rats did not show any alteration in anxiety-like behavior, as compared to both control groups. A 2-way ANOVA of the time spent in the open or closed arms (Fig. 3a) showed a significant Arm effect ($F(1, 33) = 59.73, p < 0.0001$), as expected, the rats spending more time in the closed than in the open arms. There was no significant Group effect ($F(2, 33) = 0.3001, p = 0.7427$) and no significant Arm x Group interaction ($F(2, 33) = 0.2023, p = 0.8179$). Considering the number of entries in open and closed arms (Fig. 3b), the results were similar. A 2-way ANOVA showed a significant Arm effect ($F(1, 33) = 27.05, p < 0.0001$), rats entering more often in the closed- as compared to the open arms. Although there was a significant Group effect ($F(2, 33) = 5.436, p = 0.0091$), multiple comparisons showed no significant between-group difference. The Arm x Group interaction was not significant ($F(2, 33) = 0.1297, p = 0.8788$).

In an open-field arena, we measured time in the thigmotaxis area on 3 consecutive days, a variable usually considered to reflect anxiety-like behavior (Fig. 3c). A 2-way ANOVA showed a significant Day effect ($F(2, 64) = 8.416, p = 0.0006$), rats spending less time in the thigmotaxis area on days 2 and 3 than on day 1. There was no significant Group effect ($F(2, 32) = 0.7469, p = 0.4819$), and no significant Day x Group interaction ($F(4, 64) = 0.1245, p = 0.9731$).

Thus, the cortico-thalamic disconnection had no effect on anxiety-like behavior.

c. The cortico-thalamic disconnection disrupted performance in the probe trial of the double-H maze

Strategy shifting was assessed in the double-H maze. The training was organized over two 2-d periods ending with a probe trial 24h later (Fig. 1a; with no *Swimming control* group). Because cortico-thalamic disconnection might induce non-mnemonic effects (e.g., on motivation), we first verified that groups showed comparable behavior during the habituation phase (pre-training day), which consisted of four consecutive trials run with a visible platform. It was the case (data not shown). During training, the distances swum before reaching the platform shortened over days ($F(3,99) = 168.5, p < 0.0001$),

indicating learning (Fig. 4a). There was no significant Group effect ($F(2, 33) = 0.2451, p = 0.7840$), and no significant Day x Group interaction ($F(6, 99) = 0.5694, p = 0.7538$). Analyses of the latencies and swim velocities led comparable conclusions (data not shown). Concerning the probe test, as previously shown by Cholvin et al. (2013), 2 days of acquisition were not sufficient to demonstrate good memory in the first probe trial. Indeed, only the Cre group spent more time than chance in the NE arm (Suppl. Fig. 1, Casp: $t_{16} = 2.119, p = 0.0501$; Cre: non-parametric Wilcoxon test: $p = 0.0020$; Casp+Cre: $t_7 = 0.6529, p = 0.5347$). In the second probe trial, however, the three groups spent less time than chance (8.2 s) in the N arm (Casp: $t_{16} = 5.395, p < 0.0001$; Cre: $t_{10} = 3.177, p = 0.0099$; Casp+Cre: $t_7 = 4.878, p = 0.0018$), indicating weakened attractiveness of this arm (Fig. 4c). Conversely, in the NE arm, the two control groups performed significantly above chance (Casp: $t_{16} = 6.733, p < 0.0001$; Cre: $t_{10} = 5.819, p = 0.0002$). This was not the case in the Casp+Cre group, in which the time in the NE arm was not different from chance ($t_7 = 1.759, p = 0.1220$). Taken together, these results show that Casp+Cre rats had lost the ability to shift from an egocentric to an allocentric strategy, what reflects reduced behavioral flexibility. Given that these rats did not spend more time in the N arm, we refined analysis of their behavior and found out that they spent more time in the central corridor of the maze, especially the center-west part (Fig. 4b), where their time was significantly above chance ($t_7 = 2.549, p = 0.0381$). Such behavior was not observed in the two control groups (Casp: $t_{16} = 0.8852, p = 0.3891$; Cre: $t_{10} = 0.6584, p = 0.5252$). A 2-way ANOVA confirmed these results, revealing a significant Zone effect ($F(3, 99) = 37.59, p < 0.0001$), but no significant Group effect ($F(2, 33) = 1.606, p = 0.2160$). There was a significant Zone x Group interaction ($F(6, 99) = 3.242, p = 0.0060$). These results clearly indicate that the projection pathway from mPFC to the ReRh is necessary to ensure behavioral flexibility in a spatial navigation task in which rats have to give up an egocentric approach to the benefit of an allocentric one.

d. The cortico-thalamic disconnection did not impair spatial remote memory in the Morris water maze

We assessed systemic consolidation of a spatial memory in a Morris water maze after 8 training days. The probe trial, which was given after a post-acquisition delay of 25 days, assessed remote memory (Fig. 5a). Because a cortico-thalamic disconnection might impact non-mnemonic aspects of water-maze performance (e.g., motivation, sensorimotor coordination), we first verified that groups performed equally in the habituation phase (pre-training day), which consisted of four consecutive trials-with a visible platform. There was no bias (data not shown). During training (hidden platform), the distance to reach the platform progressively decreased over days ($F(7, 231) = 40.65, p < 0.0001$) showing progressive learning of the-platform location (Fig. 5b). The 2-way ANOVA showed no significant Group effect ($F(2, 33) = 0.08493, p = 0.9188$), and there was no significant Group x Day

interaction ($F(14, 231) = 1.159, p = 0.3084$). Thus, a cortico-thalamic disconnection had no impact on the acquisition of the platform location in the water maze.

The time spent in each quadrant during the probe trial is illustrated in Fig. 5c. The statistical analysis showed a significant Quadrant effect ($F(3, 99) = 22.60, p < 0.0001$), but no significant Group effect ($F(2, 33) = 1.220, p = 0.3081$), and there was no significant Quadrant x Group interaction ($F(6, 99) = 1.323, p = 0.2541$). These results were consistent with all three groups spending more time in the target quadrant (NW) than chance (15 s), (Casp : $t_{16} = 5.669, p < 0.0001$; Cre : $t_{10} = 3.744, p = 0.0038$; Casp+Cre : $t_7 = 2.376, p = 0.0491$). The cortico-thalamic disconnection had no effect on remote memory. Nevertheless, because the Casp+Cre p-value was close to significance threshold, we also checked other variables. Additional analysis showed no group differences for the latency to first entry in the platform zone (Suppl. Fig. 2a, $p = 0.4406$) or the number of platform zone crossings (Suppl. Fig. 2b, $p = 0.4795$). Here, the term annulus refers to the area of the platform widened by 10 cm. There was no group difference for the number of annulus crossings (Suppl. Fig. 2c, $p = 0.7805$), nor for the time spent in the thigmotaxis area, which is usually considered to reflect anxiety-like behavior (Suppl. Fig. 2d, $p = 0.5205$). The absence of any group difference for all these memory precision parameters confirmed that the Casp+Cre group was able to recall the location of the platform 25 days after the end of training. Thus, the prefrontal-to-reuniens projection pathway does not appear to be necessary for systemic consolidation of a spatial memory.

Discussion

This study aimed to understand the functioning of the cortico-thalamo-hippocampo-cortical circuit, including mPFC, ReRh and Hip. We addressed the role of the mPFC neurons projecting to the ReRh nuclei of the midline thalamus in spatial cognition and behavioural flexibility. To this end, we conducted two experiments. First, we showed that a strategy shifting task in the double-H maze activated neurons in Re and VRe, but not in Rh. Our results also indicated that part of these activated neurons may receive afferent projections from the mPFC. Then we found that rats with a lesion of mPFC neurons projecting to the ReRh were still able to learn and subsequently find the location of a hidden platform in a Morris water maze after a 25-days post-training delay. However, they were no longer able to shift from an egocentric to an allocentric strategy in the double-H maze.

1. The cortico-thalamic pathway is necessary for strategy shifting in the Double-H maze

The demonstration that the second probe test of the double-H maze protocol, during which rats need to switch from an egocentric to an allocentric strategy, activates neurons in Re and Vre, is in line with previous work of the team, though with different methods. Actually, using the same protocol, Cholvin et al. (2013) showed that a muscimol-induced inactivation of the ReRh prevented strategy shifting, whereas Quet et al. (2020) showed that a DREADD-mediated inhibition of the ReRh excitatory neurons produced a similar effect. These results confirm that the ReRh, and perhaps particularly the Re, are involved in cognitive flexibility. We also showed that a certain proportion of Re neurons receiving afferent projections from mPFC were activated during the set-shifting task. This suggests that the cortico-thalamic projections could be necessary to strategy shifting in the double-H maze. We confirmed this hypothesis by showing that the cortico-thalamic disconnection led to an impairment in cognitive flexibility, even with a damage affecting about 70% of the GFP-positive mPFC neurons. Actually, we observed that rats with a cortico-thalamic disconnection were not able to search for the platform in the NE arm but spent more time than chance (and than both control groups) in the central corridor of the device. This finding is consistent with the idea that these rats could be less confident about the location of the platform, or the path to reach it. However, results obtained in the Morris Water Maze showed that the same rats were able to encode and recall a spatial memory, even after a 25-day post-training delay. This means that the deficits observed in the double-H maze are not the consequence of spatial memory dysfunctions *per se*, but rather stem from an inability to switch from an egocentric strategy to an allocentric alternative, revealing alteration of cognitive flexibility.

The idea of an implication of the mPFC and the ReRh in cognitive flexibility is not new (e.g. Floresco et al., 2009 for mPFC; Panzer et al., 2024b for ReRh) and has been especially supported in the strategy shifting task in the double-H maze using by the pharmacologic inactivation of the thalamic or cortical part of this circuit (Cholvin et al., 2013). It is therefore not surprising that the projection from the mPFC to the ReRh is essential to this process. We hypothesize that, in this task, the ReRh serve as a relay for information integration from the mPFC to the Hip. The mPFC might compute a need to adapt the strategy to new task constraints and, from there, activate the engagement of the hippocampus and its cognitive map to substitute an allocentric navigation for an egocentric one. Following an alteration of the mPFC-to-ReRh pathway, the information engaging the strategy shifting might not be properly transferred to the Hip, preventing the use of the cognitive map.

Interestingly, the involvement of this mPFC-to-ReRh pathway was also highlighted in another cognitive flexibility paradigm by Moscarello (2020). These authors studied signalled active avoidance in rats, which models the adaptive transition from reactive to proactive forms of coping, a behaviour that requires flexibility in the face of threat. They showed that the pharmacogenetic inhibition of mPFC terminations in the ReRh led to an impairment of signalled active avoidance learning and recall, meaning that this specific projection pathway is crucial for the switch from a freezing response to an active avoidance response when facing a threat.

2. The cortico-thalamic pathway is not necessary to systems consolidation of spatial memory in the Morris Water Maze

In the Morris Water Maze, we showed that rats with a lesion of mPFC neurons projecting to ReRh were still able to acquire the platform location and to remember it 25 days after acquisition, a timing corresponding to remote memory. This means that the cortico-thalamic disconnection prevented neither encoding, nor consolidation or recall of a spatial memory. Concerning encoding and recall, these results are not surprising as Loureiro et al. (2012) could exclude an implication of the ReRh in these processes (later confirmed by Klein et al., 2019). However, concerning systems consolidation, the absence of impairment might seem surprising as Loureiro et al. (2012) showed the involvement of the ReRh in the consolidation supporting memory persistence after permanent excitotoxic ReRh lesion.

There could be different reasons to this. First, only about 70% of the GFP-positive mPFC neurons were killed, the rest being still connected with the ReRh. Moreover, GFP neurons are those that were infected by the AAVrg-Cre-GFP, but only about 30% of the ReRh volume was effectively infected. Thus, although we do not know which proportion of the projection pathway has eventually been damaged, it cannot be excluded that a significant part of it remained intact and sufficient for systems consolidation of a spatial memory to occur.

Second, the delay elapsed between the end of training and recall was of 25 days. This time could be sufficient to implement plasticity and compensation phenomena through functional circuit reorganizations. One of the candidate regions potentially contributing to such reorganization could be the entorhinal cortex (EC), as this region also receives mPFC afferents (Vertes, 2004) and sends projections to the hippocampus. Inputs from both Re and EC modulate hippocampal excitability, with their combined activation resulting in synaptic facilitation within CA1 (Dolleman-van der Weel et al., 2017). Moreover, this region is already known for its role in consolidation of hippocampus-dependent

memory (Kitamura et al., 2017; Remondes and Schuman, 2004). However, if so, it is surprising that such plasticity has not compensated for the effects of the neurotoxic lesion of the ReRh in former studies that used an identical post-training delay (Ali et al., 2017; Klein et al., 2019; Loureiro et al., 2012).

It is also possible that the dissociation between the effects on strategy shifting and systems consolidation was due to the fact that each of these operations relies on different processes using different connections. The strategy shifting is an online process, as the rat has to notice its error and to switch to another strategy during the ongoing navigation. On the other hand, the systems consolidation of a spatial memory is an offline process, which occurs off-situation, mostly during slow wave sleep (e.g. Diekelmann and Born, 2010). Then, our hypothesis is that the “directionality of information” could be different for the two processes. On the one hand, the decision of strategy shifting mostly relies on the mPFC, and the ReRh can be seen as integrating top-down information from the mPFC enabling strategy adaption. On the other hand, the systems consolidation is known to rely on protracted, sleep-dependent signal exchange between the Hip and the mPFC (Frankland and Bontempi, 2005), which is known to involve an activity synchronisation between the two regions. The ReRh are at the root of the mPFC-Hip gamma-band synchronisation, as shown by the abolition of this coupling during pharmacological inactivation of the Re with muscimol (Ferraris et al., 2018). In this case, one could speculate that the disruption of the cortico-thalamic pathway was not sufficient to disrupt this synchronisation, whereby systems consolidation was preserved.

3. Limits of the study

The current work holds several limits.

First, the anterograde, retrograde or trans-synaptic behaviour of the different viruses used is not fully understood and cannot be considered entirely predictable (Zingg et al., 2022). Thus, the use of the AAV1.hSyn.Cre for its trans-synaptic nature, may also lead to a retrograde expression of the Cre-recombinase gene. As the mPFC and the ReRh are bidirectionally connected, this would be problematic because we could have expressed mCherry not only in cortico-thalamic post-synaptic neurons, but also in ReRh neurons projecting to the mPFC. To overcome this technical limitation, in Experiment 1, we distinguished the VRe, which contains most of the thalamo-cortical neurons (Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014), from the lateral Re, which predominantly comprises neurons receiving cortical afferents (Vertes, 2002).

Regarding Experiment 2, it is also possible that the AAVrg-Cre-GFP underwent anterograde transport and that the AAV5-taCasp displayed partial retrograde transport. This might lead to an issue in the specificity of the disconnection, because we would have killed also some thalamo-cortical neurons. The number of animals used can also be regarded as a limit as it affects statistical power. It is noteworthy, however, that the reduction of our sample sizes was the consequence of an *a posteriori* application of strict exclusion criteria, whereby we expected more rigorous results.

Third, we do not know exactly how effective our disconnection was. In fact, we could only quantify the loss among GFP-positive neurons. These were the neurons infected by the AAVrg-Cre-GFP. But as we infected about 30% of the ReRh volume, it was not possible to know the exact percentage of the projection pathway that had been actually damaged.

Finally, one could also discuss about the specificity of the disconnection. In order to increase this specificity, we excluded all the rats with an infection of more than 50% of the mediodorsal thalamic nucleus (MD), which also receives prefrontal afferents. In addition, it is not impossible that we killed some prefrontal neurons projecting to the MD or to other thalamic nuclei that are close to the ReRh, like the anterior thalamic nucleus (ATN). However, considering the major role of ATN in spatial memory, the lack of impairment following cortico-thalamic disconnection in the Morris water maze task suggests that the damage of mPFC-to-ATN projections were minimal. Moreover, mPFC neurons projecting to ReRh also send collaterals to the reticular thalamic nucleus (RTN; Zimmerman and Grace, 2018). Our viral approach could not distinguish between behavioural effects of damage of the prefrontal projections to the ReRh from those to the RTN. Therefore, it would be of great interest to replicate experiment 2 using a termination-specific approach to target either the ReRh or the RTN collaterals.

Conclusion

Keeping the aforementioned limits in mind, our results remain compatible with the idea that prefrontal-to ReRh projecting neurons are essential to operate strategy shifting in the double-H maze, but not to systems consolidation of a spatial memory. Our findings would therefore challenge the vision of the cortico-thalamo-hippocampo-cortical circuit as a closed loop, in which the ReRh would be a simple relay of information between the mPFC and the hippocampus, independently of the task under consideration. They also support the hypothesis that cognitive flexibility is driven by a top-down control from the mPFC, whereas systems consolidation could be driven by other mechanisms such as

a bottom-up synchronisation of cortical and hippocampal oscillations orchestrated by the ventral midline thalamus.

Bibliography

Aggleton, J.P., Dumont, J.R., Warburton, E.C., 2011. Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: A review. *Learn. Mem.* 18, 384–400.

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

Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7, 16878.

Basting, T., Xu, J., Mukerjee, S., Epling, J., Fuchs, R., Sriramula, S., Lazartigues, E., 2018. Glutamatergic neurons of the paraventricular nucleus are critical contributors to the development of neurogenic hypertension. *The Journal of Physiology* 596, 6235–6248.

Carlesimo, G.A., Costa, A., Serra, L., Bozzali, M., Fadda, L., Caltagirone, C., 2011. Prospective memory in thalamic amnesia. *Neuropsychologia* 49, 2199–2208.

Cassel, J.-C., Ferraris, M., Quilichini, P., Cholvin, T., Boch, L., Stephan, A., Pereira De Vasconcelos, A., 2021. The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: A crossroads for cognition-relevant information processing? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 126, 338–360.

Cholvin, T., Loureiro, M., Cassel, R., Cosquer, B., Geiger, K., De Sa Nogueira, D., Raingard, H., Robelin, L., Kelche, C., Pereira De Vasconcelos, A., Cassel, J.-C., 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.

Diekelmann, S., Born, J., 2010. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11, 114–126.

Dolleman-Van Der Weel, M.J., Lopes Da Silva, F.H., Witter, M.P., 2017. Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat. *Brain Struct Funct* 222, 2421–2438.

Dolleman-Van Der Weel M.J., 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, 637-50.

Ferraris, M., Ghestem, A., Vicente, A.F., Nallet-Khosroffian, L., Bernard, C., Quilichini, P.P., 2018. The Nucleus Reuniens Controls Long-Range Hippocampo–Prefrontal Gamma Synchronization during Slow Oscillations. *J. Neurosci.* 38, 3026–3038.

Floresco, S.B., Zhang, Y., Enomoto, T., 2009. Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Research* 204, 396–409.

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

Hoover, W.B., 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.

- Humphries, M.P., Maxwell, P., Salto-Tellez, M., 2021. QuPath: The global impact of an open source digital pathology system. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19, 852–859.
- Kitamura, T., Ogawa, S.K., Roy, D.S., Okuyama, T., Morrissey, M.D., Smith, L.M., Redondo, R.L., Tonegawa, S., 2017. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science* 356, 73–78.
- Klein, M.M., Cholvin, T., Cosquer, B., Salvadori, A., Le Mero, J., Kourouma, L., Boutillier, A.-L., Pereira De Vasconcelos, A., Cassel, J.-C., 2019. Ventral midline thalamus lesion prevents persistence of new (learning-triggered) hippocampal spines, delayed neocortical spinogenesis, and spatial memory durability. *Brain Struct Funct* 224, 1659–1676.
- Laurent, V., Wong, F.L., Balleine, B.W., 2017. The Lateral Habenula and Its Input to the Rostromedial Tegmental Nucleus Mediates Outcome-Specific Conditioned Inhibition. *J. Neurosci.* 37, 10932–10942.
- Lopez, J., Herbeaux, K., Cosquer, B., Engeln, M., Muller, C., Lazarus, C., Kelche, C., Bontempi, B., Cassel, J.C., Pereira De Vasconcelos, A., 2012. Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22, 827–841.
- Lopez, J., Wolff, M., Lecourtier, L., Cosquer, B., Bontempi, B., Dalrymple-Alford, J., Cassel, J.-C., 2009. The Intralaminar Thalamic Nuclei Contribute to Remote Spatial Memory. *J. Neurosci.* 29, 3302–3306.
- Loureiro, M., Lecourtier, L., Engeln, M., Lopez, J., Cosquer, B., Geiger, K., Kelche, C., Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., 2012. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct Funct* 217, 93–106.
- Marciante, A.B., Wang, L.A., Little, J.T., Cunningham, J.T., 2020. Caspase lesions of PVN-projecting MnPO neurons block the sustained component of CIH-induced hypertension in adult male rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 318, H34–H48.
- Moscarello, J.M., 2020. Prefrontal cortex projections to the nucleus reuniens suppress freezing following two-way signaled avoidance training. *Learn. Mem.* 27, 119–123.
- Nadel, J.A., Pawelko, S.S., Copes-Finke, D., Neidhart, M., Howard, C.D., 2020. Lesion of striatal patches disrupts habitual behaviors and increases behavioral variability. *PLoS ONE* 15, e0224715.
- Panzer, E., Boch, L., Cosquer, B., Grgurina, I., Boutillier, A.-L., Pereira De Vasconcelos, A., Stephan, A., Cassel, J.-C., 2024a. Disconnecting prefrontal cortical neurons from the ventral midline thalamus: Loss of specificity due to progressive neural toxicity of an AAV-Cre in the rat thalamus. *Journal of Neuroscience Methods* 405, 110080.
- Panzer, E., Guimares-Olmo, I., Pereira De Vasconcelos, A., Stéphan, A., Cassel, J.-C., 2024b. In relentless pursuit of the white whale: A role for the ventral midline thalamus in behavioral flexibility and adaption? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 163, 105762.
- Paxinos, G., Watson, C., 2017. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition. Elsevier, p.388.
- Quet, E., Majchrzak, M., Cosquer, B., Morvan, T., Wolff, M., Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., Stéphan, A., 2020. The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats. *Brain Struct Funct* 225, 955–968.
- Ragozzino, M.E., Kim, J., Hassert, D., Minniti, N., Kiang, C., 2003. The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behavioral Neuroscience* 117, 1054–1065.
- Remondes, M., Schuman, E.M., 2004. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature* 431, 699–703.
- Su, H., Bentivoglio, M., 1990. Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J of Comparative Neurology* 297, 582–593.

- Tervo, D.G.R., Hwang, B.-Y., Viswanathan, S., Gaj, T., Lavzin, M., Ritola, K.D., Lindo, S., Michael, S., Kuleshova, E., Ojala, D., Huang, C.-C., Gerfen, C.R., Schiller, J., Dudman, J.T., Hantman, A.W., Looger, L.L., Schaffer, D.V., Karpova, A.Y., 2016. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* 92, 372–382.
- Van der Werf, Y., Jolles, J., Witter, M., Uylings, H., 2003. Contributions of Thalamic Nuclei to Declarative Memory Functioning. *Cortex* 39, 1047–1062.
- Varela, C., Kumar, S., Yang, J.Y., 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., 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., 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51, 32–58.
- Vertes, R.P., 2002. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J of Comparative Neurology* 442, 163–187.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Do Valle, A.C., Sherman, A., Rodriguez, J.J., 2006. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J of Comparative Neurology* 499, 768–796.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Szigeti-Buck, K., Leranth, C., 2007. Nucleus reuniens of the midline thalamus: Link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Research Bulletin* 71, 601–609.
- Walker, R.A., Suthard, R.L., Perison, T.N., Sheehan, N.M., Dwyer, C.C., Lee, J.K., Enabulele, E.K., Ray, M.H., McDannald, M.A., 2022. Dorsal Raphe 5-HT Neurons Utilize, But Do Not Generate, Negative Aversive Prediction Errors. *eNeuro* 9, ENEURO.0132-21.2022.
- Xu, W., Südhof, T.C., 2013. A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science* 339, 1290–1295.
- Yang, W., Carrasquillo, Y., Hooks, B.M., Nerbonne, J.M., Burkhalter, A., 2013. Distinct Balance of Excitation and Inhibition in an Interareal Feedforward and Feedback Circuit of Mouse Visual Cortex. *J. Neurosci.* 33, 17373–17384.
- Zimmerman, E.C., Grace, A.A., 2018. Prefrontal cortex modulates firing pattern in the nucleus reuniens of the midline thalamus via distinct corticothalamic pathways. *Eur J of Neuroscience* 48, 3255–3272.
- Zingg, B., Dong, H., Tao, H.W., Zhang, L.I., 2022. Application of AAV1 for Anterograde Transsynaptic Circuit Mapping and Input-Dependent Neuronal Cataloging. *Current Protocols* 2, e339.

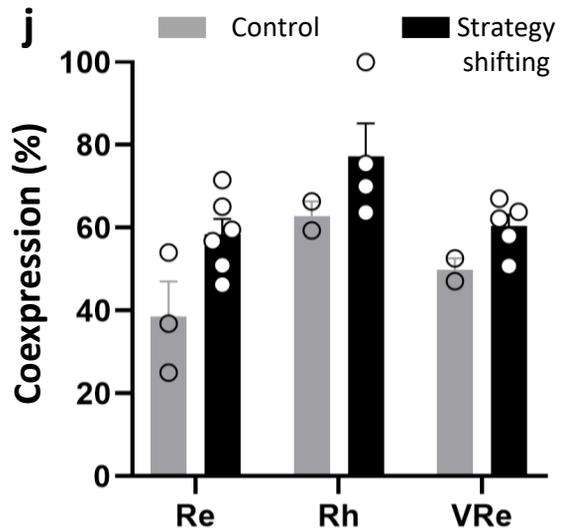
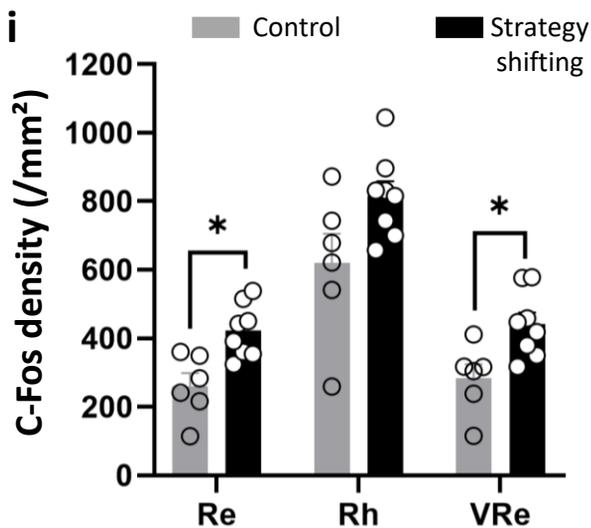
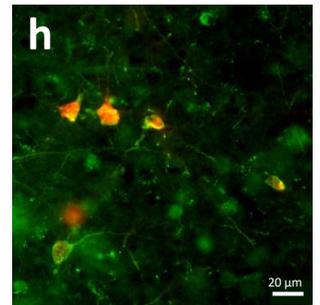
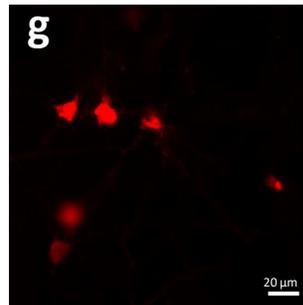
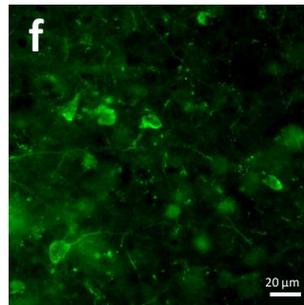
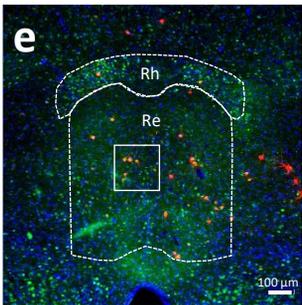
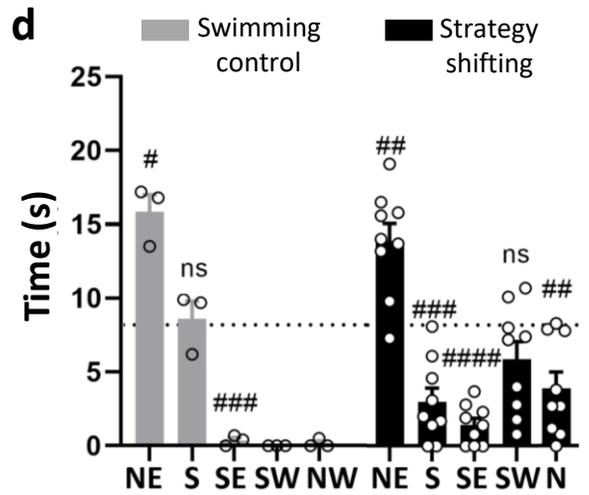
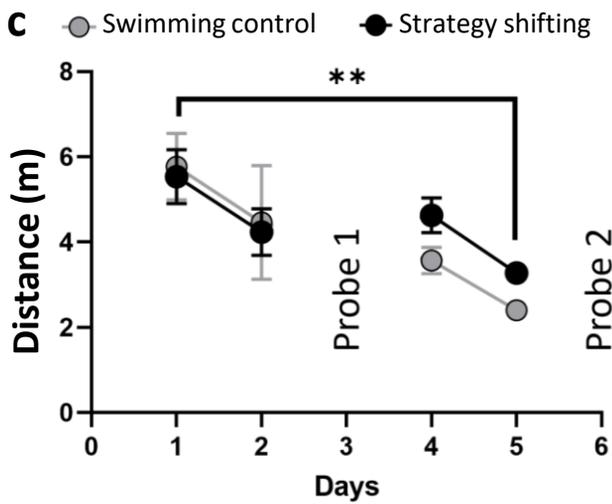
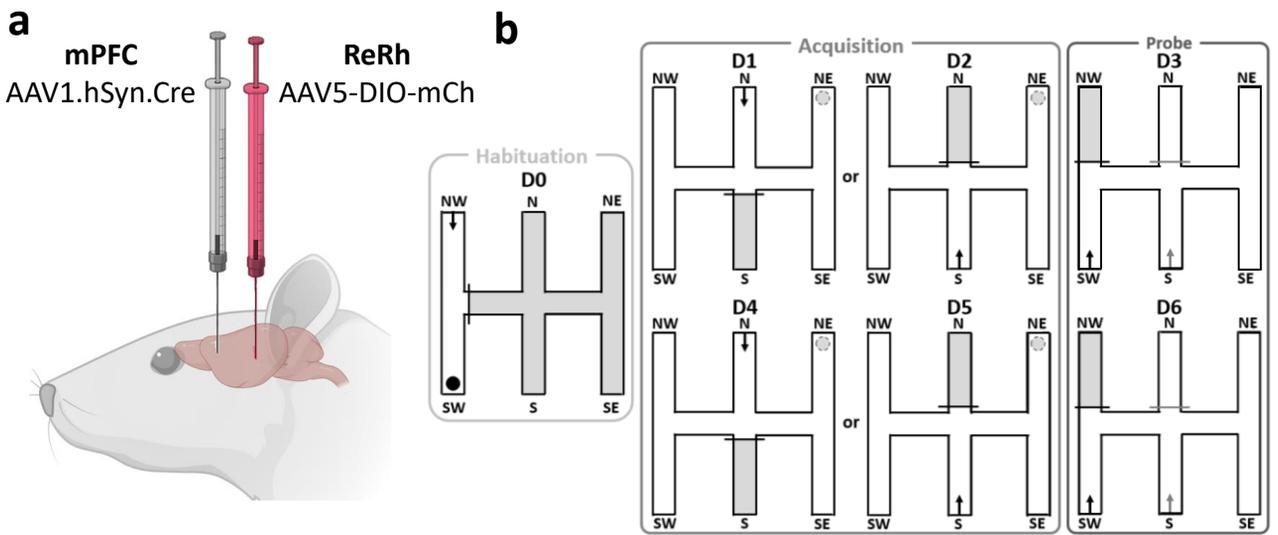


Fig. 1. (a) Surgical protocol used in Experiment 1. The trans-synaptic AAV1 carrying the Cre gene was injected in the mPFC of Long-Evans male rats, which also received an injection into the ReRh of the virus containing the floxed mCherry gene. **(b) Protocol of the Double-H maze.** After a habituation day (D0), rats were trained for 2 consecutive days (D1 and D2). During this acquisition, rats were given four daily trials for which they were released twice from the N and twice from the S (in a randomized order). The platform was always located in the NE arm. The arm opposite to the one in which the rats were placed at the start of each trial was always closed by a transparent guillotine door (black line on the illustration). The most direct swim paths to the escape platform consisted of successive left–left or right–left turns. After two acquisition days, rats were given a first 24h delayed probe trial (D3). For the probe trial, the strategy shifting group was released from the SW arm (black arrow), which corresponds to a shift of their start place in the device relative to the testing environment by only 60cm to the left. Therefore, the potential of the probe trial to mislead was extremely high, and rats need to switch from the egocentric to the allocentric strategy to find the target arm (NE). The NW arm was closed by a guillotine door. The swimming control group was released from the S arm (grey arrow), the N arm being closed (grey line). This is the same configuration as one of the acquisition setup. These rats don't need to switch their strategy to find the target arm (NE). The probe trial lasted for 60s and the platform was been removed from the device. Rats were then trained for two additional days (D4 and D5) and given a second 24h delayed probe trial (D6). **(c) Acquisition curve in the double-H maze.** Acquisition expressed as average distance swum to reach the platform during the four daily trials on days 1, 2, 4, and 5. A probe trial was given on days 3 and 6. There was no significant difference among the swimming control (grey) and the strategy shifting (black) groups in terms of learning curves. ** $p < 0.01$, significant difference between D1 and D5 **(d) Performances in the second probe of the Double-H maze.** Time spent in each arm during the second probe for the swimming control (grey) and the strategy shifting (black) groups. Both groups spent more time than chance in the NE arm, meaning that they were able to look for the platform in the right place. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, ns $p > 0.05$, difference from chance (8.2s). The difference of the represented arms across the groups is explained by the closure of the NW arm for the Strategy Shifting group and the N arm for the Swimming Control group. **(e) Image of a coronal section of the ReRh.** mCherry expression appears in red and corresponds to neurons that receive an afference from the mPFC. c-Fos immunostaining appears in green and corresponds to neurons that were activated during the second probe trial of the Double-H maze. DAPI staining appears in blue. Re and Rh are delimited by a dotted line **(f)** is a higher magnification of the thalamic region delimited by the square in (e); only c-Fos staining is shown. **(g)** same region as in (f) with mCherry signal. **(h)** same region as in (f) and (g) with c-Fos staining and mCherry signal merged; notice that there is a co-expression of both mCherry and c-Fos in these neurons. Dimensions of the scale bar are shown directly on the photographs. **(i) Density of c-Fos positive neurons** in the Re, Rh and VRe, 90 min after the second probe trial in the Double-H maze, quantified on 6 sections per rat. * $p < 0.05$, significant difference between the control group (grey, combination of swimming control and home cage control) and the strategy shifting (black) groups. **(j) Percentage of mCherry neurons that coexpressed c-Fos** in the Re, Rh, and VRe, 90 min after the second probe trial in the Double-H maze, quantified on 6 sections per rat. The control group encompasses swimming- and home-cage groups.

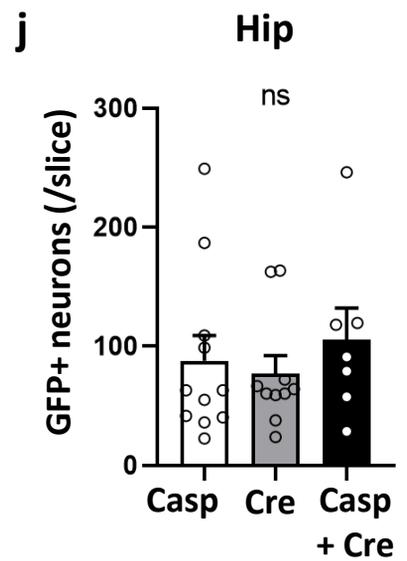
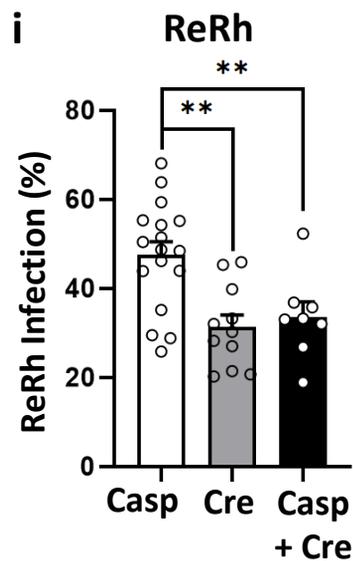
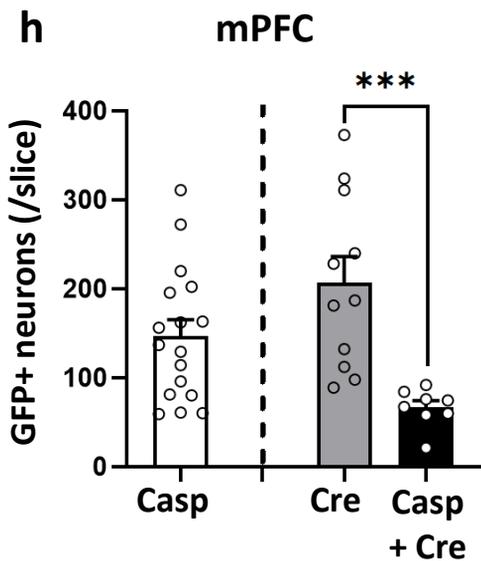
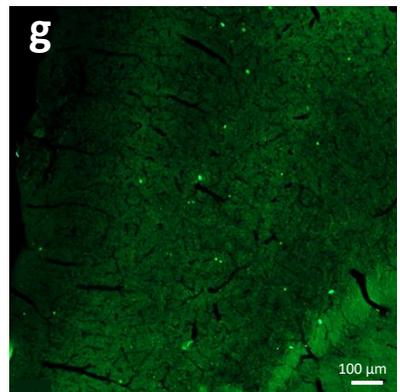
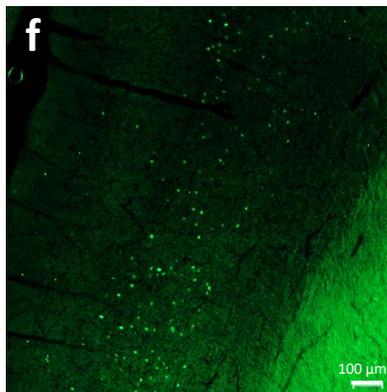
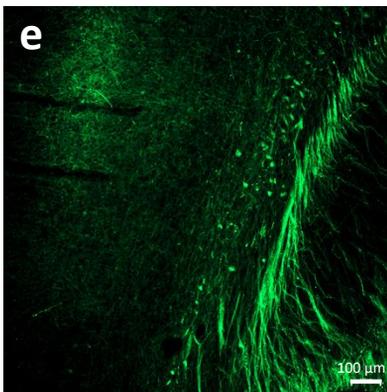
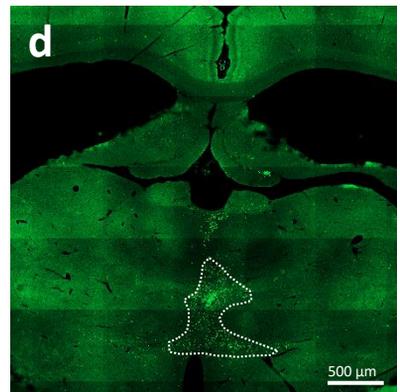
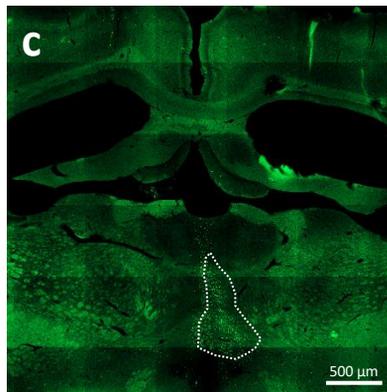
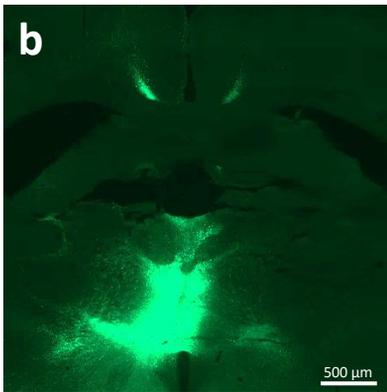
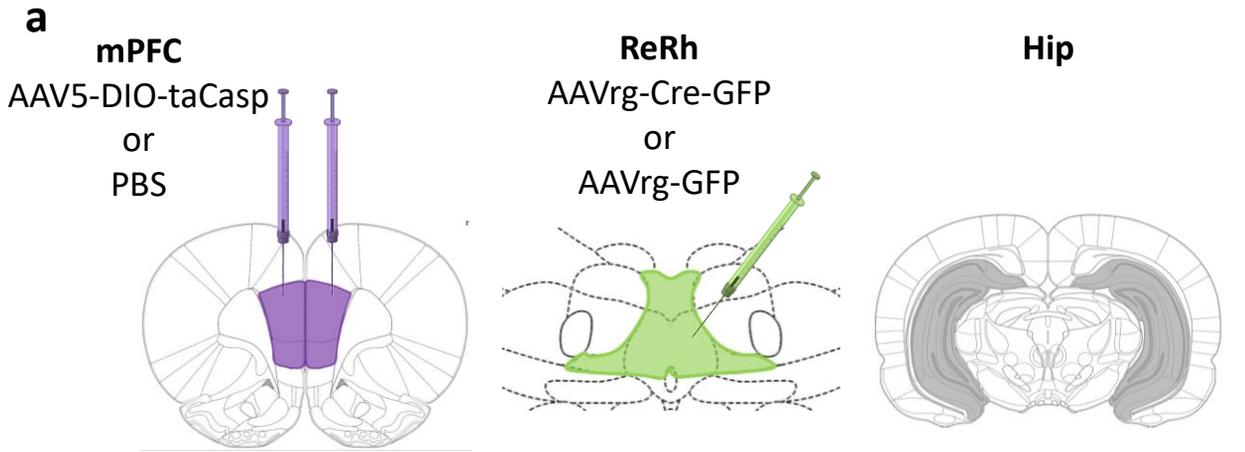


Fig. 2. (a) Surgical protocol used in Experiment 2. The AAV carrying the floxed caspase gene (or PBS for the Cre group) was injected in the mPFC of Long-Evans male rats, which also received an injection into the ReRh of the retrograde virus containing the Cre-GFP gene coding for the fluorescent fusion protein (or only the GFP gene for the Casp group). No injection was done in the hippocampus **(b) Image showing the infection site of the AAVrg-GFP** on a coronal section of the thalamus of a Casp rat. **(c) Image showing the infection site of the AAVrg-Cre-GFP** (surrounded by a white dotted line) on a coronal section of the thalamus of a Cre rat. **(d) Image showing the infection site of the AAVrg-Cre-GFP** (surrounded by a white dotted line) on a coronal section of the thalamus of a Casp+Cre rat. **(e) Image showing GFP neurons in the mPFC**, which project to the ReRh, on a coronal section of the prefrontal cortex of a Casp rat. **(f) Image showing GFP neurons in the mPFC**, which project to the ReRh, on a coronal section of the prefrontal cortex of a Cre rat. **(g) Image showing GFP neurons in the mPFC**, which project to the ReRh, on a coronal section of the prefrontal cortex of a Casp+Cre rat. **(h) Number of GFP neurons** counted in the mPFC, expressed as average per section, on 6 sections per rat. *** $p < 0.001$, significant difference between Cre and Casp+Cre groups. **(i) ReRh infection** as the percentage of the area stained by AAVrg-GFP (for Casp group) or AAVrg-Cre-GFP (Cre and Casp+Cre groups), relative to the total area of the ReRh, on 6 sections per rat. ** $p < 0.01$, significant difference between the Casp and both other groups. **(j) Number of GFP neurons** counted in the hippocampus, a region that also projects to the ReRh, expressed as average per section, on 7 sections per rat. ns $p > 0.05$, no significant difference between the three groups.

Dimensions of the scale bar are shown directly on the photographs.

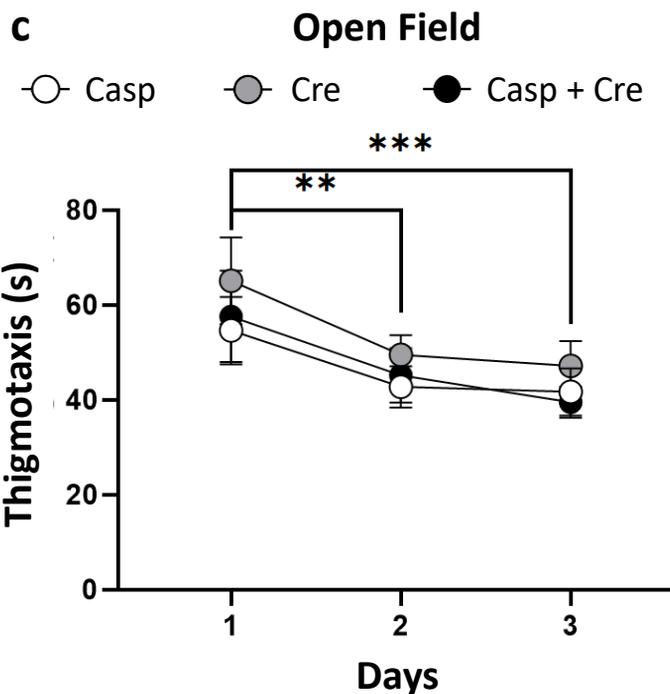
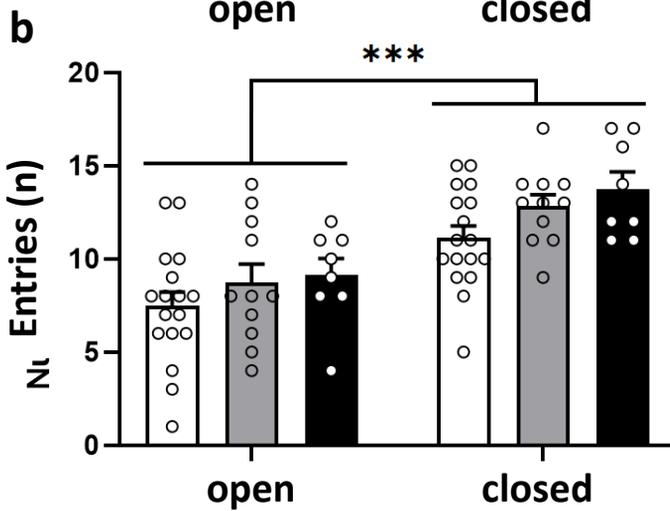
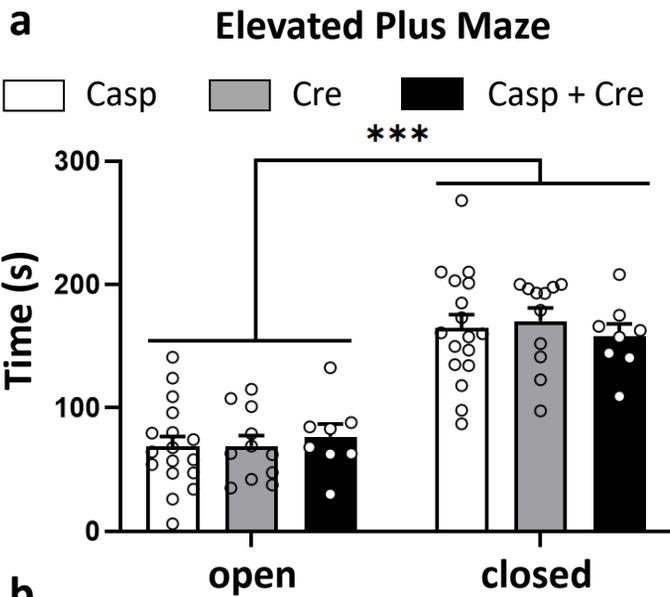


Fig. 3. Effects of a cortico-thalamic disconnection on anxiety-like behavior

(a) Time spent in the open versus closed arms in the elevated plus maze. *** $p < 0,001$, significant difference between open and closed arms, no significant difference between the groups. (b) Total number of entries in the open versus closed arms in the elevated plus maze. *** $p < 0,001$, significant difference between open and closed arms, no difference between the groups (c) Time spent in the thigmotaxis zone (less than 10 cm from the edge) in an open field among 3 days. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant difference between day 1 and days 2 and 3, no difference between the groups.

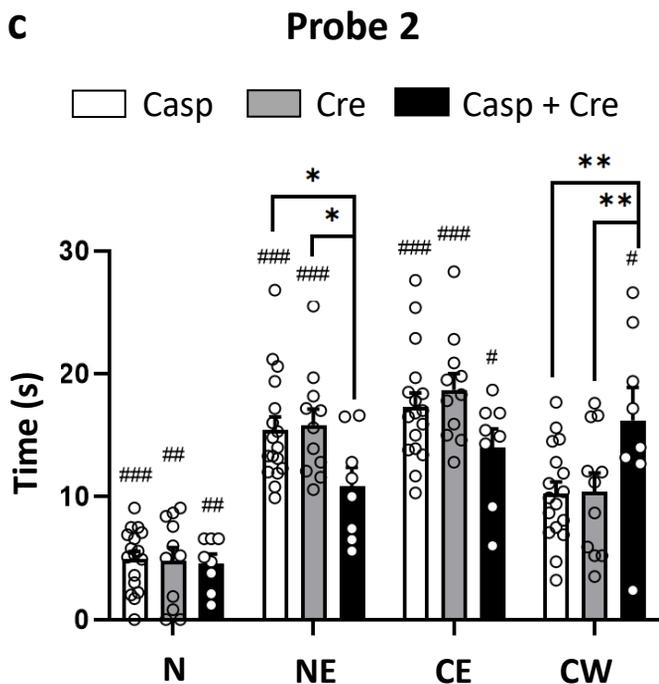
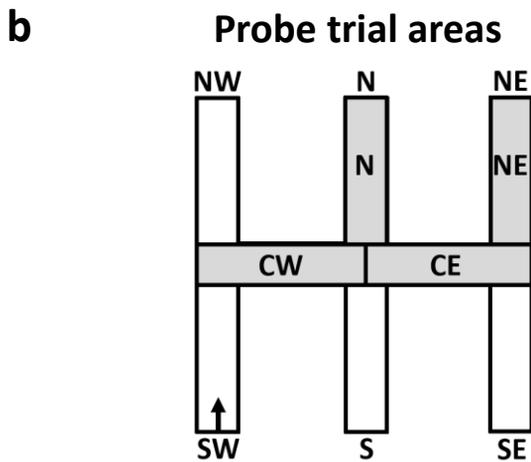
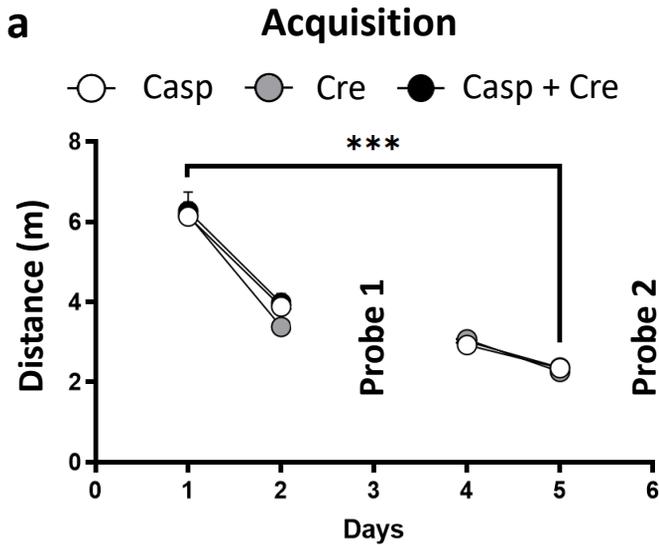


Fig. 4. (a) Acquisition curve in the double-H maze. Acquisition expressed as average distance swum to reach the platform during the four daily trials on days 1, 2, 4, and 5. A probe trial was given on days 3 and 6. There was no significant difference among the three groups in terms of learning curves. *** $p < 0.001$, significant difference between D1 and D5. **(b) Illustration of the zones** considered for the performances in the second probe, namely the N and NE arms, and the Center-West and Center-East zones. **(c) Performances in the second probe of the Double-H maze.** Time spent in these different zones during the second probe. Both control groups spent more time than chance in the NE arm, meaning that they were able to look for the platform in the right place. It was not the case for the Casp+Cre group, which spend more time than chance in the CW zone. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, ns $p > 0.05$, significant difference from chance (8.2s for N and NE; 9.4s for CE and CW); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significant difference between the groups.

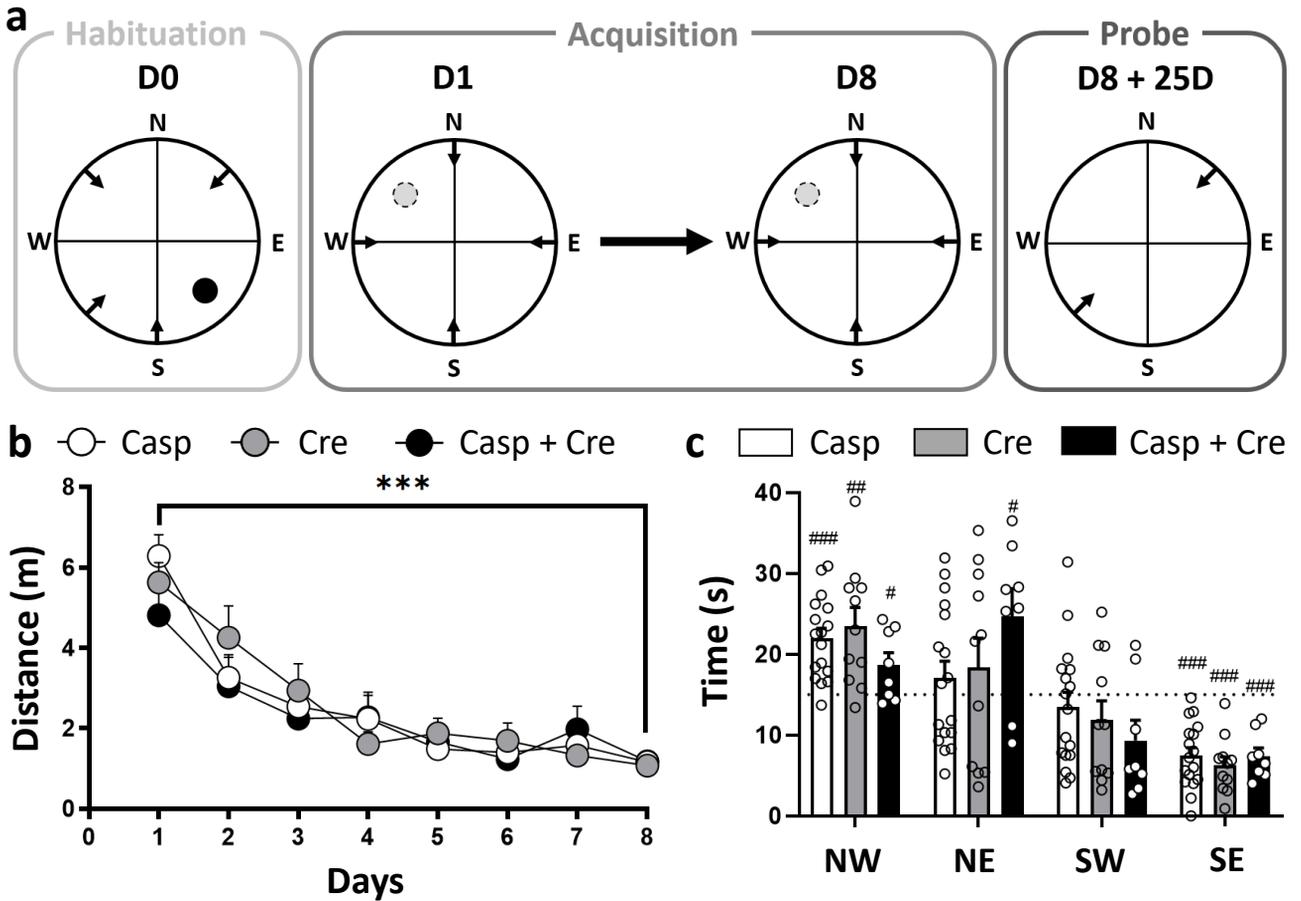
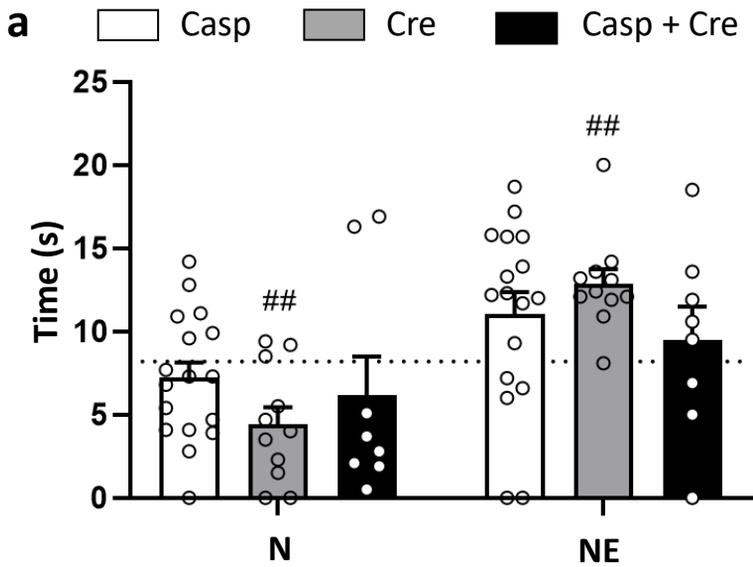
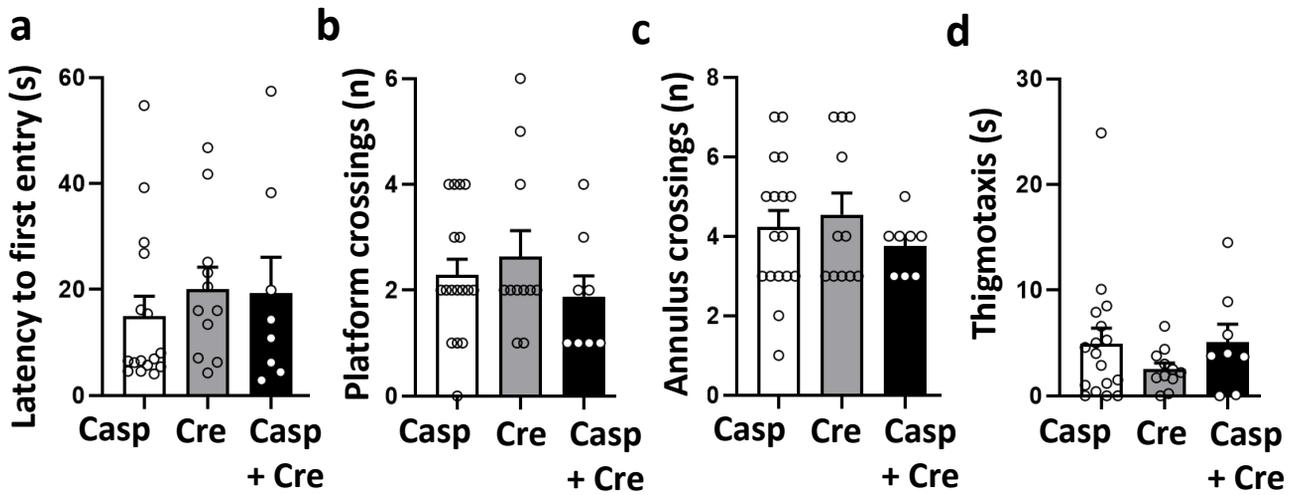


Fig. 5. (a) Protocol of the Morris Water maze. After a habituation day (D0), rats were trained for 8 consecutive days (D1 to D8). During this acquisition, rats were given four daily trials for which they were released once from every cardinal point (N, E, S, W). The platform was always located in the NW quadrant. After eight acquisition days, rats were given a 25-days delayed probe trial, where they were released either in NE, either in SW. The platform had been removed from the device. The probe trial lasted for 60s. **(b) Acquisition curve in the Morris Water maze.** Acquisition expressed as average distance swum to reach the platform during the four daily trials on days 1 to 8. There was no significant difference among the three groups in terms of learning curves. *** $p < 0.001$, significant difference between D1 and D8 **(c) Performances in the probe of the Morris Water maze.** Time spent in each quadrant during the probe trial. All three groups spent more time than chance in the NW quadrant, meaning that they were able to look for the platform in the right place. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, ns $p > 0.05$, difference from chance (15s)



Suppl Fig. 1. (a) Performances in the first probe of the Double-H maze. Time spent in the N and NE arm during the first probe. Only the Cre group spent less time than chance in the N arm and more time than chance in the NE arm, meaning that they were able to look for the platform in the right place. It was not the case for the Casp and Casp+Cre groups. ## $p < 0.01$, ns $p > 0.05$, significant difference from chance (8.2s)



Supp. Fig. 2. Precision parameters during the probe of the Morris Water Maze. (a) Latency to first entry to the platform area. No significant difference between the three groups. (b) Number of platform area crossings. No significant difference between the three groups. (c) Number of annulus area crossings, corresponding to the platform area widened by 10 cm. No significant difference between the three groups. (d) Time spent in thigmotaxis zone, reflecting anxiety-like behavior. No significant difference between the three groups.

Table 1

Methodological precisions about the antibodies used for the various immunostainings performed in our experiments.

Antibody against	Host species	Provided by	Catalog Reference	Conjugated fluorochrome	Incubation Dilution
Calretinin	Mouse	Swant	6B3	None	1/1000
GFP	Rabbit	Invitrogen	A21311	Alexa Fluor 488	1/500
DsRed	Rabbit	Takara	632496	None	1/1000
NeuN	Mouse	Millipore	ABN78	None	1/1000
cFos	Guinea Pig	Synaptic Systems	226308	None	1/1000
Rabbit	Donkey	Invitrogen	A21207	Alexa Fluor 594	1/1000
Mouse	Donkey	Invitrogen	A21203	Alexa Fluor 594	1/1000
	Goat	Invitrogen	A11045	Alexa Fluor 350	1/500
Guinea Pig	Goat	Abcam	AB150185	Alexa Fluor 488	1/1000

En complément de ces résultats, nous avons réalisé des analyses supplémentaires.

1. Contrôle de l'absence de neurotoxicité dans les ReRh

Le titre de l'AAVrg-Cre-GFP a été déterminé lors des étapes de mise au point (Panzer et al., 2024) comme étant un titre minimisant la toxicité tout en ayant une infection des ReRh suffisante. Il est toutefois important de vérifier l'absence de neurotoxicité dans les conditions de l'expérience 4 puisque celles-ci ne sont pas tout à fait identiques à celles de l'expérience 2. La principale différence concerne le délai entre la chirurgie et la mise à mort des animaux, facteur souvent déterminant de la toxicité des vecteurs viraux, il est de 5 semaines dans l'expérience 2 contre 12 semaines dans l'expérience 4.

Ainsi, l'aire de neurotoxicité dans les ReRh a été quantifiée sur 5 à 7 coupes de cerveau par rat après un immunomarquage de la protéine NeuN, avec la même technique que pour l'expérience 2. Puis le pourcentage de neurotoxicité en fonction de la surface totale des ReRh (Figure 39a) ou en fonction de la surface de l'infection de l'AAVrg-Cre-GFP (Figure 39b) a été calculé. Cette analyse quantitative a été effectuée uniquement pour les groupes Cre et Déco CT qui ont reçu l'injection de l'AAVrg-Cre-GFP, puisque le groupe Casp a reçu l'AAVrg-GFP et ne montre aucun signe de toxicité.

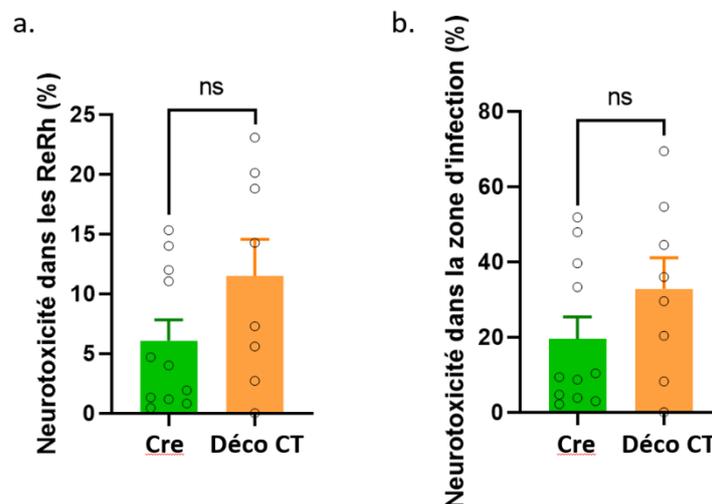


Figure 39. Etude de la neurotoxicité de l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh

a. Pourcentage de surface de neurotoxicité, évaluée par l'absence d'immunomarquage de la protéine NeuN, par rapport à la surface totale des ReRh, sur 5 à 7 coupes par rat. **b.** Pourcentage de surface de neurotoxicité, évaluée par l'absence d'immunomarquage de la protéine NeuN, par rapport à la surface de l'infection de l'AAVrg-Cre-GFP dans les ReRh, sur 5 à 7 coupes par rat.

Statistiques : ns : $p > 0,05$, pas de différence significative entre les deux groupes

Le pourcentage de neurotoxicité par rapport à la surface totale des ReRh (**Figure 39a**) n'est pas nul (6,072% en moyenne pour le groupe Cre et 11,48% en moyenne pour le groupe Déco CT), ce qui indique tout de même la présence d'une neurotoxicité. Nous excluons ainsi le rat dont la proportion des ReRh lésés est de plus de 30%. Un test de comparaison entre les deux échantillons (Mann-Whitney) n'indique pas de différence significative entre les groupes ($p = 0,1518$). Les résultats concernant le pourcentage de neurotoxicité par rapport à la surface d'infection des ReRh par l'AAVrg-Cre-GFP montrent également la présence de toxicité (moyenne de 19,52% pour le groupe Cre et de 32,83% pour le groupe Déco CT). Le test de comparaison entre les deux échantillons (Mann-Whitney) n'indique aucune différence significative entre les groupes ($p = 0,3100$).

Ces résultats montrent que la toxicité est effectivement plus faible que celle observée dans l'expérience 2 avec un titre plus élevé (30% de la surface d'infection après un délai de 12 semaines *versus* 100% de neurotoxicité après un délai de 10 semaines dans l'expérience 2), mais celle-ci n'est pas inexistante.

Nous avons ainsi montré que **le titre d'AAVrg-Cre-GFP utilisé ne permet pas d'empêcher totalement la neurotoxicité** après un délai de 12 semaines, soulignant une fois de plus l'importance des groupes contrôles comportementaux, ainsi que de l'analyse histologique appuyée.

2. Analyse des séquences procédurales dans le Double-H

L'analyse du temps passé dans les bras N et NE lors du deuxième test de rappel dans le labyrinthe en Double-H a révélé un déficit significatif pour le groupe Déco CT comparativement aux deux groupes contrôles (voir **manuscrit Figure 5c**).

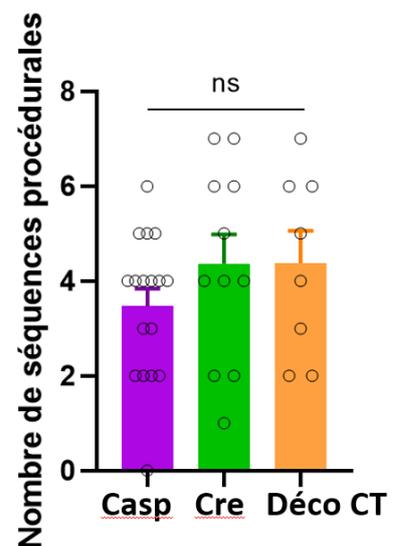
Afin d'analyser plus finement le comportement des animaux, nous avons souhaité étudier leur navigation dans le labyrinthe. En particulier, nous avons vérifié s'ils reproduisent une succession de séquences procédurales précédemment apprises, ce qui témoignerait d'un défaut de flexibilité comportementale. En effet, lors de l'acquisition, les rats sont entraînés à apprendre deux trajectoires pour retrouver la plateforme, l'une correspondant au trajet du N au NE, c'est-à-dire à une succession de deux virages à gauche, l'autre correspondant au trajet du S au NE, c'est-à-dire à un virage à droite suivi par un virage à gauche (**Figure 29**). Lors du test de rappel, la majorité des rats, lâchés au SO, est piégée et reproduit la trajectoire droite-

gauche apprise lors de l'acquisition avec un lâché au S. Ils arrivent alors au N, et il est possible qu'ils reproduisent ensuite une succession de séquences procédurales dans tout le labyrinthe. Afin de le vérifier, nous avons quantifié la totalité des séquences procédurales réalisées : soit gauche-gauche, soit droite-gauche, à partir de n'importe quel bras. Ce nombre de séquences procédurales est représenté en **Figure 40** et s'élève à 4 en moyenne pour chacun des groupes (3,47 pour Casp, 4,36 pour Cre, 4,38 pour Déco CT). L'ANOVA à un facteur ne met en évidence aucun effet significatif du groupe ($F(2, 33) = 1,140$; $p = 0,3320$). Ainsi, **aucun des groupes ne semble réaliser une succession de séquences procédurales** lors du test de rappel. La différence entre les groupes, observée pour le temps passé dans les différents bras, ne peut s'expliquer par un tel comportement.

Figure 40. Nombre de séquences procédurales lors du deuxième test de rappel en Double-H

Nombre total de séquences procédurales (gauche-gauche ou droite-gauche) effectuées à partir de n'importe quel bras, lors du deuxième test de rappel en Double-H.

Statistiques : ns : $p > 0,05$, pas de différence significative entre les trois groupes



3. Analyse fonctionnelle : comptage des neurones c-Fos positifs

L'analyse comportementale de la flexibilité cognitive dans le labyrinthe en Double-H a révélé un déficit pour le groupe Déco CT. Nous avons souhaité corroborer ces résultats à une échelle fonctionnelle avec l'étude de l'activité neuronale grâce au marqueur c-Fos, protéine issue de l'expression du gène précoce *cfos*. Les animaux ont été mis à mort 90 minutes après le deuxième test de rappel en Double-H, un délai compatible avec l'expression de la protéine c-Fos. Nous pouvons donc étudier l'activité neuronale dans les structures cibles par un immunomarquage de cette protéine. Cette analyse aurait dû être réalisée dans le CPFm et les ReRh, mais également dans le striatum et l'hippocampe, avec l'hypothèse que les profils d'activité de ces régions seraient modifiés pour les rats du groupe Déco CT, incapables de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique.

Dans le CPFm, la densité des neurones c-Fos-positifs quantifiée sur 8 coupes par rat est représentée en **Figure 41a**. Le test non paramétrique de comparaison entre plusieurs échantillons (Kruskal-Wallis) n'indique pas de différence significative entre les trois groupes ($p = 0,4387$). Dans les ReRh, la densité des neurones c-Fos-positifs quantifiée sur 4 coupes par rat est représentée en **Figure 41b**. L'ANOVA à un facteur ne met en évidence aucun effet significatif du groupe ($F(2, 33) = 0,06590$; $p = 0,9363$).

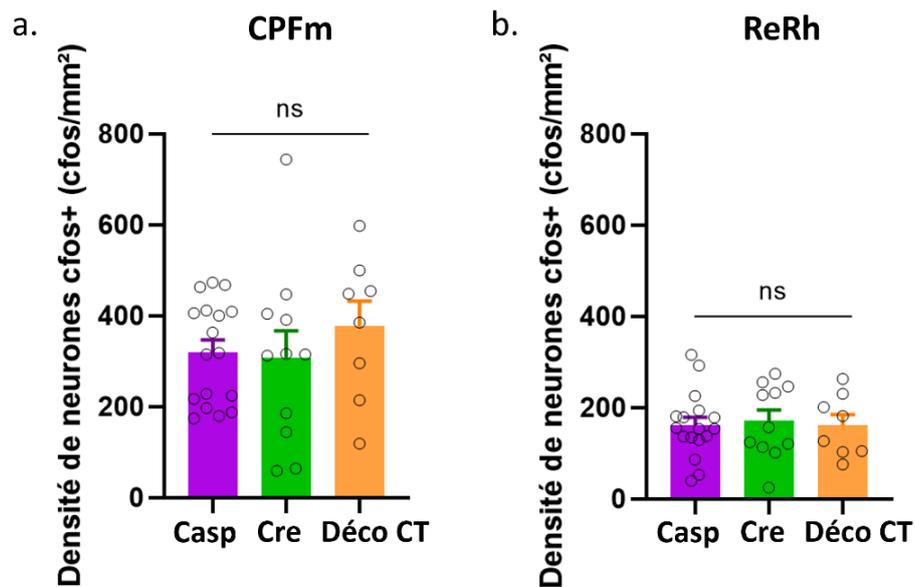


Figure 41. Analyse fonctionnelle après le deuxième test de rappel en Double-H

a. Densité de neurones c-Fos-positifs dans le CPFm 90 min après le test de rappel en Double-H, moyenne sur 8 coupes par rat

b. Densité de neurones c-Fos-positifs dans le ReRh 90 min après le test de rappel en Double-H, moyenne sur 4 coupes par rat

Statistiques : ns : $p > 0,05$, pas de différence significative entre les trois groupes

Ainsi, l'analyse fonctionnelle de l'activité neuronale par l'immunomarquage de la protéine c-Fos ne révèle **aucune différence entre nos trois groupes, ni dans le CPFm, ni dans les ReRh.**

Puisque la lésion des neurones du CPFm projetant aux ReRh entraîne un déficit comportemental pour le groupe Déco CT, nous nous attendions à une diminution du nombre de neurones activés dans le CPFm de ces mêmes animaux. Cela aurait été le reflet de la lésion des neurones de projection indispensables à la réalisation de cette tâche. Nous imaginions également que le nombre de neurones activés dans les ReRh serait diminué puisque cette région a perdu une afférence également indispensable à la flexibilité cognitive.

Ainsi, puisque nos résultats ne mettent pas en évidence ces différences qui nous paraissent les plus probables, nous avons décidé de ne pas faire l'analyse fonctionnelle dans le striatum et dans l'hippocampe.

Nous ne sommes, toutefois, pas en mesure de réfuter nos hypothèses car cette analyse fonctionnelle n'a pas été réalisée dans des conditions optimales. En effet, nous n'avions pas inclus de groupe contrôle de la tâche comportementale (par exemple un groupe home cage), condition pourtant indispensable pour comparer la densité de neurones c-Fos à une valeur de référence. Qui plus est, le niveau basal d'expression de c-Fos est relativement faible (Herdegen et al., 1995), il n'est donc pas le marqueur d'activité neuronale le plus approprié dans le cas où l'on souhaite observer une moindre activation.

4. Object-In-Place

La tâche d'*Object-in-Place* est une tâche reposant sur la propension naturelle des rongeurs à explorer la nouveauté. Elle permet d'étudier la mémoire d'association entre un objet et sa position dans l'espace. Barker and Warburton (2018) ont montré que cette tâche impliquait les ReRh lorsque le délai entre l'échantillonnage et le test était de 3 heures. Nous avons donc souhaité étudier le rôle de la projection cortico-thalamique dans une tâche de mémoire d'association entre un objet et sa position. Nous avons reproduit le protocole de Barker and Warburton (2018) à l'identique. Il débute par une phase d'habituation au champ ouvert à raison de 10 min par jour pendant 3 jours. Le lendemain, la phase d'échantillonnage dure 5 min, pendant lesquelles les rats peuvent explorer 4 objets différents posés dans les 4 quadrants du champ ouvert. La phase de rappel a lieu 3 heures après l'échantillonnage et dure 3 min. Pendant le rappel, la position de deux des quatre objets est échangée. Si l'animal se souvient de la position des objets lors de l'échantillonnage, il devrait passer plus de temps à explorer les objets déplacés pendant le rappel, puisque leur position est nouvelle, bien les objets soient connus.

Les phases d'échantillonnage et de rappel n'ayant pas la même durée, tous les paramètres qui sont comparés entre ces deux phases sont exprimés en pourcentage.

En ce qui concerne **l'habituation**, le temps passé dans la zone de thigmotaxie, reflétant le comportement de type anxieux des rats, est illustré dans la **Figure 42a**. Une ANOVA à deux facteurs indique un effet significatif du jour ($F(2, 64) = 8,416$; $p = 0,0006$), montrant qu'il y a bien une diminution du temps passé dans la zone de thigmotaxie au cours des jours d'habituation et que les rats sont progressivement moins anxieux dans le champ ouvert. Cette ANOVA à deux facteurs ne montre, par contre, aucun effet significatif du groupe ($F(2, 32) = 0,7469$; $p = 0,4819$), ni d'interaction significative entre les deux facteurs ($F(4, 64) = 0,1245$; $p = 0,9731$). L'habituation est donc bien efficace pour tous les groupes.

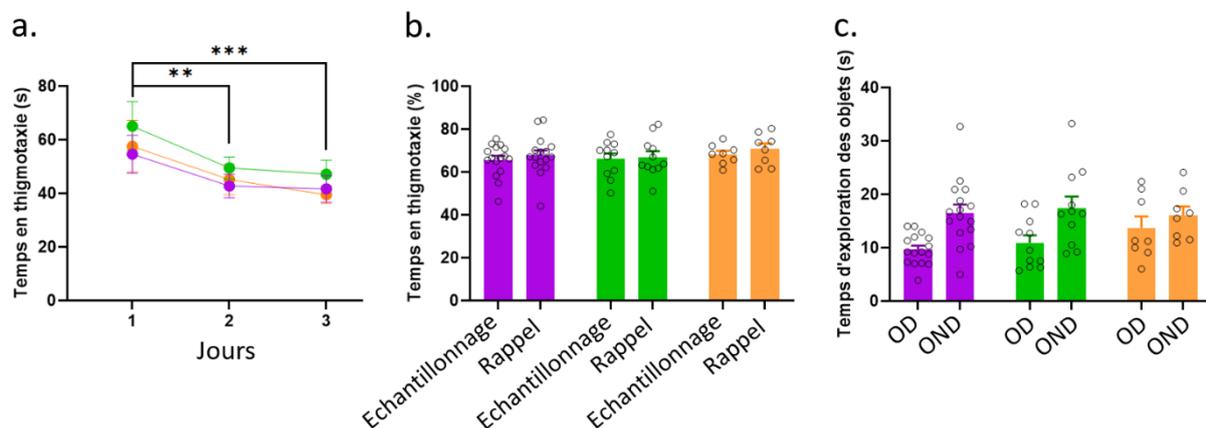


Figure 42. Contrôles prérequis dans la tâche d'Object-in-Place

Casp **Cre** **Déco CT**

a. Temps passé dans la zone de thigmotaxie (à moins de 10 cm des bords du dispositifs) pendant les 3 jours d'habituation dans le champ ouvert vide (10 min par jour). Issue du manuscrit en préparation Panzer et al.

b. Pourcentage de temps passé dans la zone de thigmotaxie pendant la phase d'échantillonnage (durée totale = 5 min) et pendant la phase de test (durée totale = 3 min).

c. Temps passé à explorer les deux objets déplacés (OD) et les deux objets non déplacés (OND) pendant la phase d'échantillonnage.

Statistiques : ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; différence significative par rapport au jour 1

ns : $p > 0,05$, pas de différence significative entre les trois groupes

Afin de vérifier que les comportements observés pendant les phases d'échantillonnage et de rappel ne sont pas dus à des phénotypes de type anxieux, le pourcentage de temps passé dans la zone de thigmotaxie pendant ces deux phases du test est également reporté dans la **Figure 42b**. L'ANOVA à deux facteurs n'indique aucun effet significatif de la phase ($F(1, 32) = 1,166$; $p = 0,2884$), ni du groupe ($F(2, 32) = 0,5953$; $p = 0,5574$), ni d'interaction

significative entre les deux facteurs ($F(2, 32) = 0,08430$; $p = 0,9194$). Cela signifie qu'une éventuelle différence d'exploration observée entre les deux phases du test ou entre les groupes ne pourrait pas être imputée à une différence de phénotype anxieux.

Lors d'une expérience pilote, nous avons mis en évidence un biais de préférence de certains objets. Nous avons alors décidé de déplacer systématiquement les deux objets qui ont été les moins explorés par les rats lors de l'étude pilote. Dans la présente expérience, nous avons donc commencé par vérifier la préférence des rats pour les objets non déplacés pendant l'échantillonnage. Il est important de souligner que lors de la phase d'échantillonnage, tous les objets sont nouveaux pour les animaux, il n'y a donc pas d'objet déplacé ou non déplacé. Ainsi, la nomenclature "objets déplacés" ou "objets non déplacés" fait référence aux objets qui seront déplacés lors du rappel. Le temps passé à explorer les différents objets pendant la phase d'échantillonnage est représenté dans la **Figure 42c**. L'ANOVA à deux facteurs montre un effet significatif du type d'objet ($F(1, 32) = 29,44$, $p < 0,0001$), signifiant que les animaux passent effectivement plus de temps à explorer les objets non déplacés que les objets déplacés. Il n'y a pas d'effet significatif du groupe ($F(2, 32) = 0,4289$, $p = 0,6549$), ni d'interaction significative entre le type d'objet et le groupe ($F(2, 32) = 1,929$, $p = 0,1618$). Toutefois, on peut observer une tendance, avec une préférence entre les objets qui seront déplacés et non déplacés qui n'est pas similaire pour les deux groupes contrôles et le groupe Déco CT. Cette différence, dont la raison resterait à déterminer, entraîne un biais dans cette tâche comportementale, et diminue la pertinence d'une comparaison du comportement des animaux lors du rappel.

Nous avons néanmoins analysé les résultats obtenus lors de la phase de rappel. Le temps passé à explorer les différents objets pendant cette phase est représenté dans la **Figure 43a**. L'ANOVA à deux facteurs n'indique aucun effet significatif du type d'objet ($F(1, 32) = 0,7647$; $p = 0,3884$), ni du groupe ($F(2, 32) = 0,2758$; $p = 0,7607$), ni d'interaction significative entre les deux facteurs ($F(2, 32) = 1,503$; $p = 0,2379$). Ces résultats indiquent que les rats n'explorent pas davantage les objets déplacés que les objets non déplacés, ce qui peut signifier qu'ils ne rappellent pas l'association entre l'objet et sa position dans l'espace. De la même manière, l'indice de discrimination, largement utilisé dans la littérature pour évaluer les tâches d'exploration d'objets, est illustré dans la **Figure 43b**. Un indice de discrimination positif démontre une préférence pour les objets déplacés, tandis qu'un indice de

discrimination négatif démontre une préférence pour les objets non déplacés. Le t-test de comparaison d'un échantillon unique à une valeur de référence indique que la moyenne d'aucun des trois groupes ne diffère significativement de 0 (Casp : $p = 0,2860$; Cre : $p = 0,0778$; Déco CT : $p = 0,6906$), indiquant qu'aucun des groupes ne discrimine les objets déplacés et non déplacés.

Toutefois, en raison du biais observé entre les groupes concernant la préférence des objets (les deux groupes contrôles ayant une préférence pour les objets non déplacés pendant l'échantillonnage plus marquée que le groupe Déco CT), j'ai comparé le pourcentage de temps

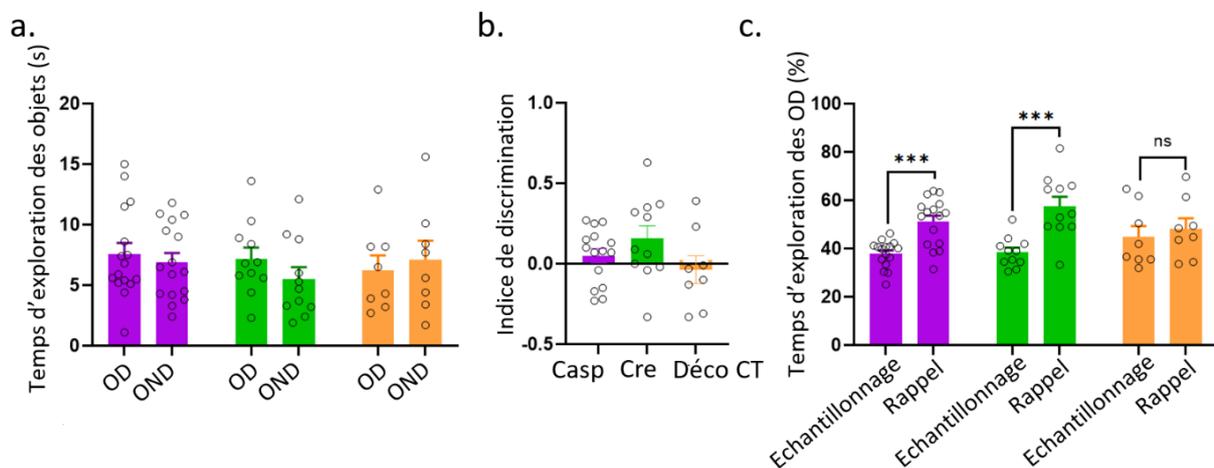


Figure 43. Performances des animaux lors de la phase de rappel de l'Object-In-Place

■ Casp ■ Cre ■ Déco CT

a. Temps passé à explorer les objets déplacés (OD) et non déplacés (OND) pendant la phase de rappel (durée totale = 3 min).

b. Indice de discrimination lors du rappel, calculé selon la formule suivante :
$$\frac{\text{temps (OD)} - \text{temps (OND)}}{\text{temps total}}$$

Un indice positif reflétant une préférence pour les objets déplacés, un indice négatif reflétant une préférence pour les objets non déplacés, un indice nul reflétant l'absence de distinction des objets déplacés et non déplacés.

c. Pourcentage de temps passé à explorer les objets déplacés pendant les phases d'échantillonnage et de rappel.

Statistiques : *** : $p < 0,001$; ns : $p > 0,05$; différence significative entre l'échantillonnage et le rappel

passé à explorer les objets déplacés entre les phases d'échantillonnage et de rappel (Figure 43c). Une ANOVA à deux facteurs indique un effet de la phase ($F(1, 32) = 27,24$; $p < 0,0001$), mais pas d'effet significatif du groupe ($F(2, 32) = 0,7665$; $p = 0,4730$). L'ANOVA met toutefois

en évidence une interaction significative entre les deux facteurs ($F(2, 32) = 3,385$; $p = 0,0464$). La comparaison multiple de Sidak indique une différence significative entre les phases d'échantillonnage et de rappel pour les groupes Casp ($p = 0,0007$) et Cre ($p < 0,0001$), mais pas pour le groupe Déco CT ($p = 0,8507$). Ces résultats indiquent que les deux groupes contrôles explorent plus les objets déplacés pendant le rappel que pendant l'échantillonnage, ils n'ont alors plus de préférence pour les objets non déplacés. Cette perte du biais existant lors de l'échantillonnage pourrait signifier qu'ils distinguent tout de même le changement de position de ces objets. Cela n'est pas le cas du groupe Déco CT.

Les résultats de la tâche d'Object-in-Place ne nous permettent pas de conclure à propos du rôle de la voie cortico-thalamique dans la mémoire d'association entre l'identité d'un objet et sa position. En effet, ils sont biaisés de plusieurs manières. Tout d'abord, les quatre objets utilisés dans cette tâche ne sont pas équivalents puisque les rats montrent une préférence pour certains d'entre eux. Afin de parer ce biais, nous avons pris la décision de déplacer systématiquement les objets préalablement identifiés comme étant moins explorés. Malheureusement, ce biais de préférence n'est pas identique entre nos groupes contrôles et notre groupe expérimental, ce qui rend impossible l'interprétation rigoureuse des résultats. Enfin, l'indice de discrimination n'indique qu'aucun des groupes, pas même les groupes contrôles, ne discriminent réellement les objets déplacés des objets non déplacés. Il en ressort que notre tâche d'*Object-In-Place* n'est pas concluante. Une des raisons potentielles pourrait être la présence d'une forte intensité lumineuse pendant le protocole (90 lux), qui a pu mettre les rats en situation de stress ou d'inconfort, inhibant alors leur comportement exploratoire.

On peut prudemment retenir de ces résultats qu'ils semblent indiquer une tendance à une différence entre le groupe Déco CT et les groupes contrôles. La poursuite de l'étude du rôle de la voie cortico-thalamique dans la mémoire d'association entre un objet et sa position pourrait donc se révéler intéressante, à condition de mettre au point la tâche comportementale avec des objets différents, mais équivalents entre eux en termes d'attractivité, et une luminosité plus adaptée, donc moins forte.

II. Expérience 5 : Etude du rôle fonctionnel de la voie CPFm → ReRh

Les résultats de l'expérience 4 sont complétés par la confirmation de l'importance de la connexion cortico-thalamique à l'échelle anatomo-fonctionnelle.

Dans cette dernière expérience, une autre approche virale est utilisée, quoique reposant toujours sur le système Cre-lox. Elle provoque l'expression conditionnelle d'un fluorochrome (mCh) floxé dans les ReRh, mais cette fois-ci sous la dépendance d'une Cre-recombinase trans-synaptique injectée dans le CPFm. Les neurones exprimant la mCherry dans les ReRh sont donc ceux qui reçoivent une afférence directe du CPFm. Après un délai post-opératoire de 4 semaines, les rats ont réalisé la tâche du Double-H, avec soit le protocole de flexibilité cognitive, soit un protocole nommé "contrôle nage". Ce dernier est identique à celui de flexibilité cognitive hormis pour les tests de rappel, pour lesquels les rats n'ont pas été piégés par une translation du point de départ, et ont donc été placés dans le bras S, comme lors de l'acquisition. Ainsi, ce groupe contrôle n'a pas besoin de changer de stratégie.

Cette expérience permet de mettre en évidence la proportion des neurones des ReRh recevant une afférence excitatrice du CPFm (donc exprimant la mCherry), qui sont actifs lors du test en Double-H, grâce à un co-marquage avec la protéine c-Fos, marqueur d'activité neuronale.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **Figure 1 du manuscrit** Panzer et al.

Ces résultats sont préliminaires, mais montrent une augmentation du nombre de neurones actifs lors du deuxième test de rappel en Double-H dans le Re et dans le PériRe, mais pas dans le Rh. Ils suggèrent également une tendance à l'augmentation du pourcentage de neurones mCherry avec un co-marquage c-Fos dans le Re et le Rh du groupe ayant réalisé le protocole de flexibilité cognitive en Double-H en comparaison à leurs contrôles ayant réalisé une simple tâche de natation dans ce même labyrinthe. Ces résultats sont toutefois à interpréter avec prudence, car ils concernent un très faible nombre de rats et seront répliqués avec un effectif plus important à l'avenir.

Discussion générale

Le réseau cortico-thalamo-hippocampique, qui relie le CPFm, les ReRh et l'hippocampe, est connu pour son rôle dans de nombreuses fonctions cognitives, entre autres spatiales et/ou mnésiques. L'objectif de ces travaux de thèse a été de décortiquer le fonctionnement de ce circuit, et en particulier d'étudier le rôle fonctionnel de la voie de projection cortico-thalamique dans la cognition spatiale.

Pour cela, nous avons lésé les neurones du CPFm projetant aux ReRh chez le rat en utilisant une approche virale. Ensuite, nous avons étudié les conséquences comportementales de cette lésion sur la consolidation systémique d'un souvenir spatial, la mémoire d'association entre un objet et sa place, ainsi que sur la flexibilité cognitive dans un contexte spatial. Nous avons montré que la déconnexion cortico-thalamique n'entraîne pas de comportement de type anxieux, et qu'elle n'altère pas le processus de consolidation systémique d'un souvenir spatial. Cette déconnexion semble cependant avoir un impact sur la mémoire d'association entre un objet et sa place, lorsque le délai est de 3 heures entre l'échantillonnage et le rappel. Ces résultats nécessitent toutefois d'être confirmés dans de meilleures conditions, notamment en ce qui concerne les performances de nos témoins. Enfin, la déconnexion cortico-thalamique empêche les animaux de passer d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique lorsque les conditions de la tâche le nécessitent, ce qui traduit un déficit de flexibilité cognitive. Cette implication des projections préfrontales vers les ReRh dans la flexibilité cognitive semble confirmée par l'étude préliminaire qui suggère une augmentation de l'activation des neurones thalamiques recevant une afférence préfrontale lors du test de rappel en Double-H chez le rat au cerveau intact.

Plusieurs aspects sont déjà traités dans la partie **“Discussion” du manuscrit** Panzer et al., évoquant notamment les causes potentielles de l'absence d'effet de la déconnexion cortico-thalamique dans la tâche de piscine de Morris, ainsi que les limites associées à cette étude. Ainsi, cette discussion générale abordera 2 grands points. Tout d'abord nous développerons les différences entre les processus de flexibilité cognitive et de consolidation systémique d'un souvenir spatial, qui pourraient expliquer la divergence des résultats obtenus dans les deux tâches étudiées. Ensuite, nous traiterons de l'apport de ces résultats à notre connaissance sur le fonctionnement du réseau cortico-thalamo-hippocampique.

I. Les différences entre les deux tâches/processus

Plusieurs hypothèses sont émises dans la [discussion du manuscrit](#) Panzer et al. concernant le contraste entre l'effet de la déconnexion dans le Double-H et l'absence d'effet en piscine de Morris. Nous nous attarderons ici sur l'hypothèse que cette différence pourrait s'expliquer par la nature distincte des processus impliqués dans ces tâches. Nous discuterons ainsi des principales différences entre la flexibilité cognitive et la consolidation systémique d'un souvenir spatial.

1. L'origine de l'information – Contrôle top-down VS synchronisation bottom-up

Le rôle de la voie de projection du CPFm vers les ReRh, dont nous avons démontré l'implication dans la flexibilité cognitive, a également été mis en évidence dans d'autres processus cognitifs. C'est le cas, par exemple, du rappel de l'extinction d'une peur conditionnée ([Ramanathan et al., 2018](#)), de la dimension de mémoire de travail dans une tâche de séquences d'évènements ([Jayachandran et al., 2019](#)), de la flexibilité de réponse face à une menace ([Moscarello, 2020](#)), de la spécificité de l'association entre le stimulus et la réponse dans un conditionnement de réponse palpébrale ([Yu et al., 2022](#)), ainsi que de la mémoire de travail dans une tâche opérante non-concordante avec la position, avec un délai ([Ciacciarelli et al., 2025](#)). Le rôle de cette voie de projection est également mis en évidence dans le cadre de protocoles de conditionnement de peur, soit concernant la spécificité du contexte correspondant ([Xu and Südhof, 2013](#)), soit concernant l'encodage de l'extinction d'une peur conditionnée ([Ramanathan et al., 2018](#)). Toutefois, la combinaison des virus utilisés dans le cadre de ces deux dernières études, et notamment l'absence d'un virus rétrograde, me contraignent à questionner la spécificité de leur approche quant à la projection du cortex préfrontal aux ReRh. La méthodologie de [Xu et Südhof \(2013\)](#) semble ainsi cibler davantage les neurones du CPFm qui reçoivent une afférence thalamique que ceux qui projettent vers les ReRh.

L'ensemble des processus énumérés ci-dessus sont connus pour être orchestrés par le CPFm (e.g. [Giustino and Maren, 2015](#) pour le conditionnement de peur ; [Kesner and Churchwell, 2011](#) pour la mémoire de travail et la flexibilité ; [Weible et al., 2000](#) pour le

conditionnement de réponse palpébrale). Ces tâches reposent donc, au moins en partie, sur un contrôle top-down du cortex vers les structures sous-corticales.

La consolidation systémique, quant à elle, trouve son point de départ dans l'Hip. En effet, malgré leurs divergences, les trois théories de la consolidation s'accordent sur l'idée que l'Hip joue un rôle central dans l'encodage initial de l'information, qu'il transmet ensuite au néocortex au cours d'un processus progressif de consolidation (Takehara-Nishiuchi et al., 2020). Un tel échange d'informations nécessite une synchronisation de l'Hip et du CPFm, permettant l'ouverture de fenêtres de communication. Le Re joue un rôle important dans cette synchronisation corticale (Ferraris et al., 2021).

Ainsi, l'origine de l'information n'étant pas la même, la directionnalité de la communication est également différente.

Dans la tâche de flexibilité cognitive, elle est plutôt dans le sens CPFm → Hip, il n'est donc pas surprenant que la déconnexion cortico-thalamique empêche ce processus dont le contrôle est néocortical, puisqu'elle altère la communication top-down.

La consolidation systémique repose sur un dialogue mettant en jeu une boucle hippocampo-thalamo-corticale (Basha et al., 2025). La déconnexion cortico-thalamique n'aurait ainsi pas d'impact sur la communication de l'Hip vers le CPFm, et ne serait pas suffisante pour empêcher la synchronisation corticale dont l'origine pourrait être thalamique.

Cette hypothèse étayée principalement par des arguments anatomiques a également son corrélat du point de vue des activités oscillatoires.

2. Processus *online* VS *offline*

Concernant le traitement de l'information par le cerveau, il est possible de distinguer les processus *online* des processus *offline*. L'état ***online*** correspond à un mode d'activité cérébrale dans lequel le cerveau est engagé dans l'interaction active avec l'environnement pour guider le comportement en temps réel. Cela inclut des processus comme la perception sensorielle, la prise de décision et les actions motrices, ou encore les fonctions exécutives impliquant une attention soutenue et un traitement cognitif. *A contrario*, l'état ***offline*** désigne un mode d'activité dans lequel le cerveau n'est pas engagé activement dans l'interaction avec l'environnement, mais est centré sur des processus internes, comme les pensées introspectives ou le vagabondage (chez l'humain), ou encore le sommeil.

Le test de rappel en Double-H peut être décomposé en plusieurs étapes : d'abord, piégés par la translation du point de départ, les rats engagent une stratégie égocentrique reposant sur une mémoire procédurale et reproduisent la séquence droite-gauche précédemment apprise. Ils arrivent alors dans le bras N, où ils perçoivent et traitent les éléments de l'environnement et réalisent qu'ils ne sont pas dans le bon bras. Ils doivent alors prendre la décision de changer de stratégie, et en particulier engager une stratégie allocentrique qui repose sur une mémoire spatiale pour se diriger vers le bras NE. Ils reconnaissent alors la position préalable de la plateforme et insistent dans ce bras, comme ils le feraient lors d'un test de rappel dans une piscine de Morris. Il apparaît clairement que toutes ces étapes ont lieu pendant que le rat est dans le labyrinthe, et reposent sur un traitement immédiat de l'information. Il s'agit donc d'une succession de **processus online**.

Il est évident que le test de rappel en piscine de Morris repose également sur des processus *online* de traitement immédiat de l'information. Toutefois, le processus d'intérêt, que nous étudions grâce à la mise en place d'un délai de 25 jours, est celui de la consolidation d'un souvenir ancien. Or, la consolidation systémique du souvenir spatial a lieu majoritairement pendant le sommeil à ondes lentes (**SWS** pour *Slow Wave Sleep* ; e.g. [Diekelmann and Born, 2010](#)). Il s'agit donc d'un **processus offline**.

Ainsi, les deux processus étudiés reposent sur des états cérébraux différents, eux-mêmes associés à des oscillations cérébrales différentes.

D'une part, la consolidation systémique repose sur le dialogue entre le CPFm et l'Hip ([Frankland and Bontempi, 2005](#)) et a lieu majoritairement pendant le SWS, lors duquel l'activité cérébrale est dominée par les oscillations lentes (0,5 à 4 Hz). Ce dialogue est soutenu par les fenêtres temporelles optimales de communication établies par les ondes lentes, favorisant la synchronisation de populations neuronales distantes. Ces oscillations lentes contiennent également des rythmes corticaux plus rapides, comme les *spindles* thalamo-corticaux (10 à 15 Hz) ou les *sharp wave-ripples* hippocampiques (80 à 200 Hz), au cours desquels les motifs neuronaux activés lors de l'encodage sont réactivés de façon accélérée (voir [Ferraris et al. \(2021\)](#) pour revue). [Ferraris et al. \(2018\)](#) ont montré la synchronisation d'oscillations gamma (30-90 Hz) entre le CPFm et l'Hip sur des rats anesthésiés à l'uréthane (modélisant un état cérébral dominé par les ondes lentes, tel que le SWS), mais pas sur des rats anesthésiés avec un mélange de kétamine/xylazine (modélisant un état cérébral dominé

par les ondes thêta, tel que le sommeil paradoxal). Cette synchronisation d'oscillations gamma pendant le SWS pourrait permettre l'échange d'informations entre l'Hip et le CPFm, et notamment de celles qui sous-tendent la consolidation systémique. Les auteurs ont également montré que les neurones du Re augmentent leur activité juste avant la survenue de cette synchronisation et que l'inactivation pharmacologique du Re avec le muscimol empêche la coordination temporelle des oscillations gamma entre les deux structures. Le Re permet donc la coordination des oscillations gamma entre le CPFm et l'Hip pendant un état cérébral dominé par les ondes lentes, qui pourrait sous-tendre la consolidation systémique. Ces résultats, montrant l'importance du Re dans la stabilisation et la coordination des assemblées cellulaires préfrontales et hippocampiques chez un rat anesthésié à l'uréthane ont été ensuite corroborés par [Angulo-Garcia et al. \(2020\)](#), et plus récemment chez le chat en sommeil naturel ([Basha et al., 2025](#)). Ce rôle-clé du Re dans la coordination des interactions préfronto-hippocampiques pendant un état cérébral dominé par les ondes lentes est confirmé par [Hauer et al. \(2019\)](#). Ces auteurs montrent que l'inhibition pharmacogénétique (DREADD) du Re ne réduit pas la puissance des ondes lentes dans l'Hip, ni dans le CPFm de rats anesthésiés à l'uréthane, mais qu'elle altère la coordination des ondes lentes entre ces deux régions. Un support anatomique potentiel de cette coordination des interactions préfronto-hippocampiques par le Re pourrait résider dans la présence de neurones dans le Re ayant des projections collatérales à la fois vers le CPFm et l'Hip ([Hoover and Vertes, 2012](#) ; [Varela et al., 2014](#)).

D'autre part, le changement de stratégie est orchestré par le CPFm (e.g. [Ragozzino et al., 2003](#) ; [Floresco et al., 2009](#)) et a lieu pendant un état d'éveil actif, lors duquel le rat navigue dans le labyrinthe. Le cerveau est ainsi dominé par le rythme thêta ([Buzsáki and Moser, 2013](#)). Mais [Fujisawa et Buzsáki \(2011\)](#) ont proposé que le couplage préfronto-hippocampique implique également un second rythme, d'origine préfrontale, qui coïncide avec le thêta de l'Hip et pourrait être à l'origine de l'influence exercée par le CPFm. La fréquence de cette oscillation varie entre 2 et 5 Hz dans la plage haute des ondes delta, mais sa régularité, caractérisée par un pic spectral net, distingue clairement ce signal de l'activité delta à large bande (1 à 4 Hz) principalement enregistrée pendant le sommeil. [Roy et al. \(2017\)](#) proposent alors que ces oscillations de 2 à 5 Hz pourraient permettre au CPFm de synchroniser son activité avec d'autres régions du cerveau. Ces auteurs ont montré que l'inactivation du Re à la

lidocaïne chez des rats anesthésiés à l'uréthane, diminue la cohérence des oscillations de 2 à 5 Hz entre le CPF et l'Hip, sans compromettre la cohérence thêta (Roy et al., 2017). Ces résultats suggèrent que la projection du CPFm vers le Re pourrait participer à la cohérence des oscillations de 2 à 5 Hz. A ma connaissance, cette bande de fréquences n'a pas été mise en évidence dans des tâches de flexibilité cognitive ou de *strategy shifting*, mais c'est le cas pour d'autres processus dépendant du CPFm comme la mémoire de travail (Fujisawa and Buzsáki, 2011) ou encore les erreurs commises dans une tâche d'estimation du temps écoulé (Narayanan et al., 2013). Puisqu'il a été montré que la voie cortico-thalamique est nécessaire à la flexibilité cognitive et qu'elle pourrait être à l'origine de la cohérence cortico-hippocampique dans la bande de fréquence 2 à 5 Hz, nous pourrions émettre l'hypothèse que le *strategy shifting* orchestré par le CPFm pourrait reposer sur cette bande de fréquence.

Ainsi, la déconnexion de la voie cortico-thalamique empêcherait le processus *online* de flexibilité cognitive en altérant la cohérence cortico-hippocampique des oscillations dans la bande de fréquence de 2 à 5 Hz d'origine préfrontale, tandis qu'elle n'empêcherait pas le processus *offline* de consolidation systémique, car elle n'empêche pas la synchronisation cortico-hippocampique des ondes lentes et des oscillations gamma, qui pourrait reposer sur les neurones des ReRh ayant des collatérales vers le CPFm et l'Hip.

Cette différence de fonctionnement entre les processus *online* et *offline* est en accord avec les résultats de Hauer et al. (2019, voir revue (Hauer et al., 2022)). En effet ces auteurs montrent une dichotomie dans la communication préfronto-hippocampique qui est totalement différente entre les états cérébraux dominés par les ondes lentes et ceux qui sont dominés par les ondes thêta. Ils montrent également que le Re serait impliqué dans la communication du CPFm vers l'Hip pendant les ondes lentes, mais pas pendant les ondes thêta, suggérant que les voies anatomiques de communication pourraient être différentes en fonction de l'état cérébral. Ces résultats font également écho à ceux de Crandall et al. (2015), qui montrent que l'influence dynamique du cortex somatosensoriel sur le noyau thalamique correspondant dépend de la fréquence de l'activité. Lorsque celle-ci est faible, l'influence cortico-thalamique est plutôt suppressive, tandis qu'elle est plutôt amplificatrice lorsque l'activité est forte.

3. La navigation spatiale dirigée vers un but

Une autre distinction possible entre les deux tâches étudiées repose sur la différence entre la navigation et la localisation spatiales.

La navigation spatiale suppose un déplacement motivé dans l'espace à travers une trajectoire, tandis que la localisation spatiale est l'identification d'un lieu au sein d'un espace. Ainsi, la tâche en Double-H a une charge de navigation plus importante que la tâche en piscine de Morris. En effet, dans cette dernière, il s'agit de localiser la plateforme grâce aux indices présents dans la pièce, mais il est possible d'y accéder par n'importe quel chemin. Dans le Double-H, il n'est pas seulement question de la position de la plateforme par rapport aux indices distaux, mais également de la trajectoire permettant de la rejoindre.

La projection du CPFm vers les ReRh pourrait être impliquée dans la représentation des trajectoires, donc dans la navigation spatiale dirigée vers un but. C'est ce que suggèrent [Ito et al. \(2015\)](#), qui ont montré que la fréquence de décharge des neurones du CPFm, du Re ainsi que de la région CA1 de l'Hip dépend de la trajectoire empruntée dans une tâche d'alternance continue dans un labyrinthe en T. En revanche, cette dépendance vis-à-vis de la trajectoire n'est pas observée dans la région CA3 de l'Hip, qui ne reçoit pas de projection du Re. Cette observation renforce l'idée que le Re puisse être un acteur majeur dans la modulation des décharges neuronales en fonction de la trajectoire. Pour confirmer cette hypothèse, les auteurs provoquent une lésion du Re à l'acide iboténique, ou encore une inhibition optogénétique du Re. Ces interventions diminuent considérablement la dépendance des décharges des neurones de CA1 vis-à-vis de la trajectoire, suggérant que les projections du CPFm vers l'Hip, via le Re, sont cruciales pour la représentation des trajectoires dans un comportement de navigation spatiale dirigée vers un but. Toutefois, ces interventions n'empêchent pas la réalisation de la tâche d'alternance continue. Les auteurs proposent alors que l'influence du CPFm sur l'Hip, via le Re, ne devient essentielle que lorsque la prise de décision nécessite à la fois une représentation de la trajectoire, et de la localisation. Ce n'est pas le cas dans un T-maze, puisqu'il s'agit uniquement d'alterner entre les trajectoires, sans prise en compte de la localisation dans l'environnement. En revanche, la tâche de Double-H implique bien une combinaison de la représentation de la localisation (où est la plateforme par rapport aux indices de l'environnement ?), et de la trajectoire (comment atteindre cette

position, sachant que les déplacements possibles sont limités et contraints ?). Dans ce contexte, l'influence du CPFm vers l'Hip, via le Re, deviendrait essentielle à la navigation dirigée vers un but. D'autant plus que le PL et l'IL contiennent des neurones dont l'activité dépend de la localisation d'un objectif dans une tâche de navigation spatiale (Hok et al., 2005). Cette hypothèse pourrait alors expliquer les déficits observés lors de la déconnexion cortico-thalamique dans la tâche en Double-H.

Des résultats préliminaires de l'équipe de Hiroshi T. Ito montrent également que les cellules de lieu de l'Hip modifient leur fréquence de décharge en fonction de la destination de l'animal, bien qu'elles ne changent pas de champ récepteur. L'inactivation du Re altère cette dépendance de la modulation de la fréquence de décharge des neurones de CA1 vis-à-vis de l'objectif (Poster de Zahra Golipour, présenté au Congrès de la FENS, Vienne, juin 2024). Ces résultats suggèrent que les circuits hippocampiques spatiaux sont capables d'intégrer des informations correspondant au but, actualisant la carte cognitive de façon pertinente, et que le Re est un des acteurs de cette intégration. D'autres résultats préliminaires de cette équipe de recherche montrent que l'inhibition optogénétique du Re entraîne un déficit dans la capacité des animaux à planifier un itinéraire pertinent. En effet, bien que les animaux empruntent une trajectoire correcte, celle-ci n'est pas la plus directe pour atteindre la récompense dans une tâche de navigation dirigée vers un but dans l'obscurité (Poster de Hye-A Kim, présenté au Congrès de la FENS, Vienne, juin 2024). Ces observations suggèrent un rôle du Re, non pas dans la reconnaissance de l'objectif, mais dans la pertinence de la trajectoire suivie.

L'ensemble de ces résultats indique un rôle du Re dans la navigation spatiale dirigée vers un but, et notamment dans la mise en place de trajectoires pertinentes, et suggère l'implication des voies cortico-thalamiques puis thalamo-hippocampiques dans ces processus. Ainsi, dans notre tâche de Double-H, il est possible que les rats déconnectés connaissent la localisation de la plateforme, mais n'empruntent pas la trajectoire la plus directe. Cela pourrait expliquer pourquoi ils passent tout de même plus de temps dans le bras NE que dans les autres bras, tout en passant aussi plus de temps dans la zone centrale que le hasard. Si le comportement observé dans le Double-H provient en réalité d'une dégradation des capacités de navigation dirigée vers un but, alors la piscine de Morris pourrait ne pas imposer une charge de navigation suffisante pour révéler ce type de déficit. En effet, la piscine

de Morris est finalement une enceinte ouverte, remplie d'eau. Elle ne représente donc pas un réel labyrinthe nécessitant des choix de trajectoire complexes.

Puisque la navigation spatiale nécessite un déplacement motivé, il est également possible de s'interroger sur l'aspect motivationnel de la tâche. Toutefois, les travaux de [Jayachandran et al. \(2019\)](#) et de [Ciacciarelli et al. \(2025\)](#) n'indiquent pas de conséquence motivationnelle à l'inhibition pharmacogénétique de la projection du préfrontal vers le Re dans un contexte non spatial. En effet, [Jayachandran et al. \(2019\)](#) ne montrent pas de diminution de la vitesse ni de la latence à recevoir la récompense dans leur tâche évaluant la mémoire de séquences d'évènements. D'autre part, [Ciacciarelli et al. \(2025\)](#) ne montrent pas de diminution de la latence d'activation du levier, ni d'augmentation des omissions dans leur tâche opérante non-concordante avec la position, avec un délai. Ainsi, il est peu probable que les résultats observés suite à notre déconnexion cortico-thalamique soient imputables à un problème motivationnel.

II. Une nouvelle vision du réseau cortico-thalamo-hippocampique

Le réseau cortico-thalamo-hippocampique est l'objet d'étude de plusieurs groupes de recherche, en particulier par rapport à son implication dans les fonctions cognitives spatiales et/ou mnésiques. D'un point de vue anatomique, l'Hip a des projections directes vers le CPFm, tandis que la réciproque n'est pas vraie. Les ReRh, de par leurs connexions bidirectionnelles vers le CPFm et l'Hip, sont régulièrement décrits dans la littérature comme un relai anatomique, permettant la communication indirecte entre le CPFm et l'Hip. Ainsi, ces noyaux thalamiques sont majoritairement étudiés pour leur rôle dans les fonctions reposant sur le CPFm et l'Hip. Dans cette deuxième partie, nous verrons que nos résultats mènent à une reconsidération de cette vision du réseau cortico-thalamo-hippocampique.

1. Les ReRh comme relai entre le CPFm et l'Hip

Le thalamus est généralement considéré comme une structure intermédiaire entre les afférences sensorielles ou les efférences motrices, et leurs structures corticales associées. Bien qu'ils soient parfois attribués à un ensemble nommé "thalamus limbique", les ReRh ne

dérogent pas à cette réputation de relai. Ainsi, dans la littérature, les ReRh sont souvent présentés comme des structures jouant un rôle-clé dans la communication entre le CPFm et l'Hip, en palliant l'absence de projection directe du CPFm vers l'Hip. Leur implication dans diverses tâches nécessitant cette interaction cortico-hippocampique a été largement démontrée (e.g. [Dolleman-van Der Weel et al., 2019](#)). Ces noyaux sont donc souvent décrits comme des relais anatomiques bidirectionnels entre le CPFm et l'Hip, impliqués dans la communication entre ces deux structures, et donc implicitement nécessaires aux processus reposant sur cette interaction, de façon non spécifique à la nature de la tâche. Le réseau cortico-thalamo-hippocampique apparaît alors comme une boucle de communication, reposant sur un circuit fermé. Si tel était le cas, la déconnexion cortico-thalamique aurait entraîné l'ouverture du circuit, et ainsi empêché tout processus reposant sur le CPFm et l'Hip. Or, la dichotomie des effets de la déconnexion cortico-thalamique sur la flexibilité cognitive et sur la consolidation systémique d'un souvenir spatial atteste que le circuit cortico-thalamo-hippocampique n'est pas une boucle fermée. Il s'agit plutôt d'un réseau dynamique, dont chaque acteur est impliqué de façon différente en fonction du processus en cours. Un tel changement de vision des noyaux thalamiques, non plus comme des simples relais, mais comme ayant des rôles spécifiques dans la cognition, a déjà été proposé par [Alcaraz et al. \(2018\)](#), concernant le noyau médio-dorsal.

2. Vers une distinction du Re et du Rh ?

Les noyaux Re et Rh sont proches et relativement petits (surtout le Rh). Il est alors quasiment impossible de ne cibler que l'un de ces noyaux par chirurgie stéréotaxique, notamment dans le cadre d'approches lésionnelles ou d'inactivations. C'est pour cela qu'ils sont généralement étudiés de façon indissociable. Toutefois, ces noyaux ne sont pas absolument identiques, comme en témoignent les différences qui existent quant à leur connectivité (voir [Cassel et al. \(2021\)](#) pour revue). Le Rh a, par exemple, des afférences un peu plus étendues et cible des régions comme le cortex occipital, ou encore les noyaux centraux et corticaux de l'amygdale, sur lesquelles le Re ne projette pas. Par contre, le Re projette vers tout l'axe antéro-postérieur de la région CA1 de l'Hip, tandis que le Rh ne projette que vers sa partie dorsale. Les afférences, quant à elles, semblent provenir d'un nombre plus important de régions pour le Re que le Rh, avec notamment des projections limitées de l'hippocampe et

des cortex parahippocampiques vers le Rh. Les motifs d'expression de la calrétinine et de la calbindine sont également différents entre ces deux noyaux (Viena et al., 2020). Il convient, toutefois, de considérer ces différences à la lumière du nombre limité d'études portant sur le Rh.

Ainsi, les études qui manipuleraient séparément le Re et le Rh sont quasiment impossibles, mais l'analyse fonctionnelle de l'activité des neurones par des immunomarquages de l'expression de gènes précoces pourrait être une voie d'accès vers la différenciation de ces deux noyaux. Une telle analyse a été réalisée par (Loureiro et al., 2012) lors du test de rappel en piscine de Morris, pour lequel ils ont montré une augmentation de la densité de neurones c-Fos positifs dans le Re et dans le Rh lorsque le délai post-acquisition est de 25 jours, mais pas au délai de 5 jours. Dans cette étude, les profils d'activation du Re et du Rh semblent très similaires. *A contrario*, l'analyse de la densité de neurones exprimant la protéine Zif268 lors du rappel d'une tâche d'association objet-odeur avec un délai de 10 secondes, met en évidence une différence d'activation du Re et du Rh (Hamilton and Dalrymple-Alford, 2023). En effet, la densité de neurones actifs dans le Re est plus importante lorsque le délai post-acquisition est de 25 jours, par rapport à un délai court de 5 jours et par rapport aux conditions contrôles. Dans le Rh, la densité de neurones actifs est plus importante lors du rappel de la tâche que dans la condition home cage, mais il n'y a, par contre, pas de différence d'activation en fonction du délai. Ces résultats suggèrent que les deux noyaux sont activés par le rappel de la tâche, mais que le Re l'est de façon délai-dépendante, tandis que le Rh l'est de façon délai-indépendante.

Les résultats de l'expérience 5 de ce manuscrit tendent à suggérer une augmentation du nombre de neurones actifs dans le Re et les PériRe durant le deuxième test de rappel en Double-H, ce qui ne serait pas le cas dans le Rh. Bien entendu, ces résultats ne sont que très préliminaires, mais s'ils venaient à être confirmés avec un effectif plus grand, ils renforceraient cette idée d'une distinction entre le Re et le Rh. Le Re semble alors spécifiquement activé par le processus de *strategy shifting*, tandis que le Rh serait activé de façon non spécifique, aussi bien par la tâche que dans la condition home cage.

Nous avons également montré que le tropisme du CAV2-Cre-GFP est très mauvais pour le Re, mais semble un peu meilleur en ce qui concerne le Rh. Ainsi, il pourrait être envisageable d'utiliser des constructions virales du CAV2, en adaptant les conditions d'injection pour cibler

spécifiquement le Rh, en limitant fortement l'infection du Re. Il serait alors possible d'évaluer les conséquences comportementales de la manipulation spécifique du Rh ou de ses projections, ouvrant la voie à une éventuelle distinction fonctionnelle entre ces deux noyaux thalamiques.

3. La prise en considération du TRN

Lorsque le réseau cortico-thalamo-hippocampique est présenté sous la forme CPFm – ReRh – Hip, cette présentation occulte le système inhibiteur thalamique majeur : le noyau réticulaire du thalamus (TRN, Halassa and Acsády, 2016). Or, nous savons que les neurones de la couche VI du CPFm, projetant au Re, font des collatérales vers la partie rostrale médiane du TRN (Zimmerman and Grace, 2018), cette même partie du TRN projetant vers le Re (Kolmac and Mitrofanis, 1997). C'est également ce TRN rostromédian qui reçoit des projections du Re et de l'Hip (Çavdar et al., 2008). Le TRN antérieur est ainsi une autre structure-clé au sein du réseau étudié, de par ses connexions riches avec les trois autres protagonistes, et notamment son influence inhibitrice sur les ReRh.

Dans le contexte de notre étude, lorsque nous lésons la projection du CPFm vers les ReRh, nous lésons également sa collatérale vers le TRN. Selon l'organisation canonique des projections cortico-TRN-thalamiques, cette collatérale devrait contacter un neurone du TRN, qui projette lui-même ensuite vers le Re. On pourrait alors imaginer que la lésion de cette voie de projection n'aurait pas d'impact, car elle supprimerait à la fois une afférence excitatrice directe du CPFm sur les ReRh, mais également une afférence inhibitrice indirecte via le TRN. Mais nos résultats montrent le contraire. Par ailleurs, ces deux afférences présentent des cinétiques distinctes, la projection bisynaptique étant légèrement retardée en raison du passage par une deuxième synapse. Il est donc peu probable qu'elles se neutralisent simplement l'une et l'autre.

De plus, le contrôle inhibiteur du TRN semble être principalement impliqué dans l'amplification du signal et la genèse de rythmes (Halassa and Acsády, 2016). Grâce à une inhibition thalamique relativement faible et lente, le TRN peut moduler la magnitude des entrées corticales, sans modifier leur contenu (Halassa and Acsády, 2016). Par ailleurs, (Zimmerman and Grace, 2018) montrent que l'inhibition du TRN au muscimol chez des rats anesthésiés ne modifie pas la fréquence ni la propension aux décharges en *burst* dans le Re,

mais y diminue le nombre de neurones spontanément actifs. Par contre, la voie de projection du CPFm vers le Re exerce une modulation des motifs de décharge, et est notamment nécessaire au maintien de certaines caractéristiques de ces décharges en *burst* dans le Re. Ainsi, la projection du CPFm vers les ReRh pourrait supporter le “contenu” de l’information transmise, tandis que la projection du CPFm vers le TRN en modulerait l’amplitude. Il est donc indispensable de considérer le TRN comme un quatrième maillon du réseau cortico-thalamo-hippocampique (**Figure 44**).

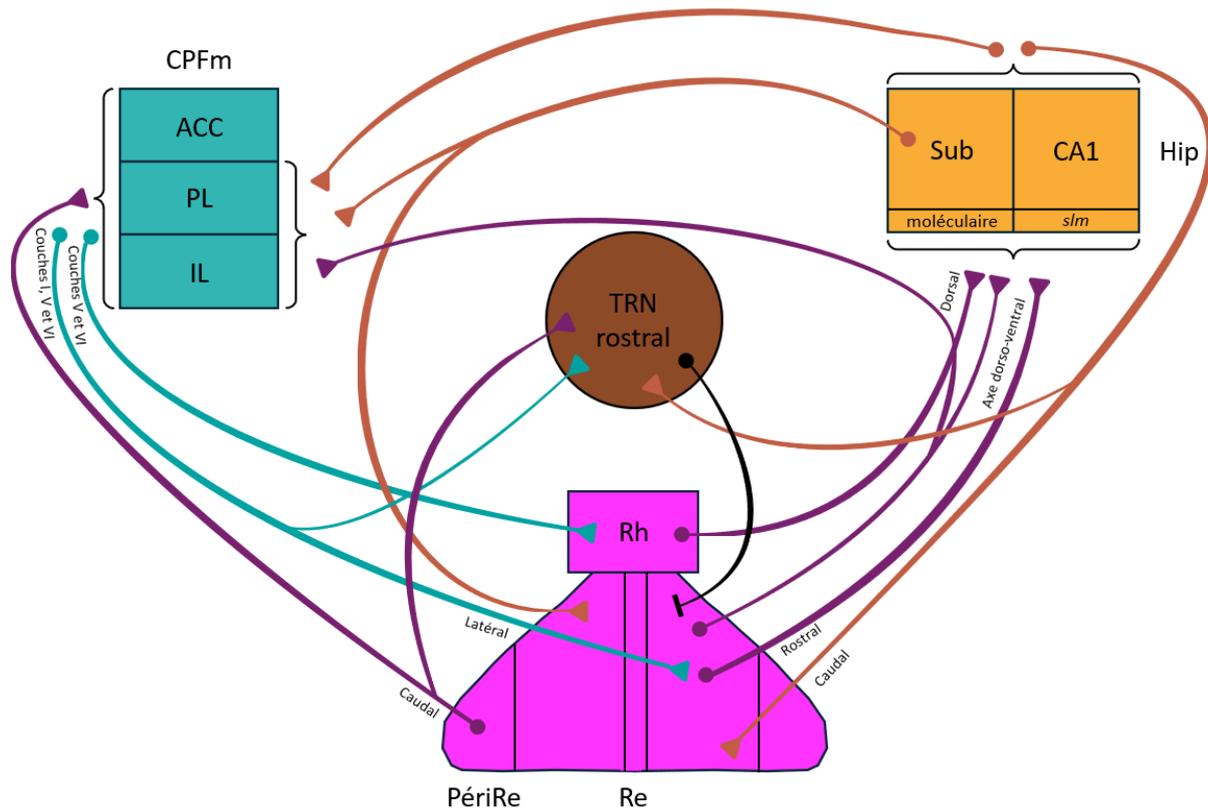


Figure 44. La nouvelle version du réseau cortico-thalamo-hippocampique

Représentation schématique du réseau cortico-thalamo-hippocampique, avec les projections excitatrices afférentes et efférentes du CPFm, de l’Hip et des ReRh, et avec l’ajout du TRN rostral et de ses projections dans ce réseau.

Abréviations : CPFm : Cortex Préfrontal médian ; ACC : Cortex Cingulaire Antérieur ; PL : Cortex Prélimbique ; IL : Cortex Infralimbique ; Rh : Noyau Rhomboïde ; Re : Noyau Reuniens ; PériRe : péri-reuniens ; Sub : subiculum ; CA1 : Corne d’Ammon 1 ; moléculaire : couche moléculaire du subiculum ; slm : stratum lacunosum-moleculare de CA1 ; Hip : Hippocampe ; TRN : Noyau Réticulaire Thalamique

Perspectives

Ces travaux de thèse ouvrent la voie à plusieurs perspectives. Nous développerons ici la dissociation des collatérales du CPFm vers le TRN et vers les ReRh, ainsi que l'étude des autres voies de projection du réseau cortico-thalamo-hippocampique.

I. La dissociation des collatérales du CPFm vers le TRN et vers les ReRh

Nous avons discuté précédemment du fait que la lésion de la projection du CPFm aux ReRh détruit également la collatérale de ces neurones vers le TRN (Zimmerman and Grace, 2018). Il serait donc très intéressant de pouvoir dissocier les influences directes du CPFm vers les ReRh, de celles indirectes passant par le TRN, en déconnectant spécifiquement l'une ou l'autre des collatérales de la voie cortico-thalamique. Plusieurs auteurs ont déjà réalisé des inhibitions pharmacogénétiques terminaisons-spécifiques grâce à la combinaison de l'injection d'un récepteur (hM4Di) dans les neurones de projection et l'injection locale de son ligand de façon à cibler les terminaisons locales plutôt que l'ensemble des terminaisons de la cellule, grâce à une canule mise en place par chirurgie stéréotaxique (e.g. Zimmerman and Grace, 2018 ; Jayachandran et al., 2019). Toutefois, ces approches sont très invasives car elles nécessitent l'implantation de canules intracérébrales, fixées au crâne avec du ciment dentaire. Cela implique également d'isoler les animaux pour ne pas qu'ils se blessent entre eux et risquent de s'arracher les canules. Cet isolement entrave le bien-être des rats, qui sont des animaux grégaires. Il est également une source de stress, qui pourrait avoir une incidence sur les tests comportementaux conduits ensuite. Afin de palier à cela, nous envisageons de dissocier les terminaisons de la projection du CPFm dans le TRN et dans les ReRh de façon plus indirecte, en inhibant le neurone post-synaptique à cette voie de projection. Dans le TRN, ce neurone post-synaptique projetterait au Re (Cornwall et al., 1990 ; Kolmac and Mitrofanis, 1997 ; Çavdar et al., 2008), tandis que dans le Re, il projetterait à l'Hip (Vertes et al., 2007).

Cette inhibition pharmacogénétique reposerait également sur un système Cre-lox, mais cette fois-ci avec l'utilisation d'une Cre-recombinase trans-synaptique (Zingg et al., 2022). Ainsi, le virus portant le gène floxé d'un récepteur DREADD inhibiteur (hM4Di) est injecté dans les ReRh ou dans le TRN. Le virus portant la Cre trans-synaptique est injecté dans le CPFm. La Cre est alors exprimée dans les neurones post-synaptiques recevant une projection préfrontale. Cela permet de faire exprimer le récepteur hM4Di spécifiquement dans le neurone post-synaptique du noyau thalamique en question (Figure 45).

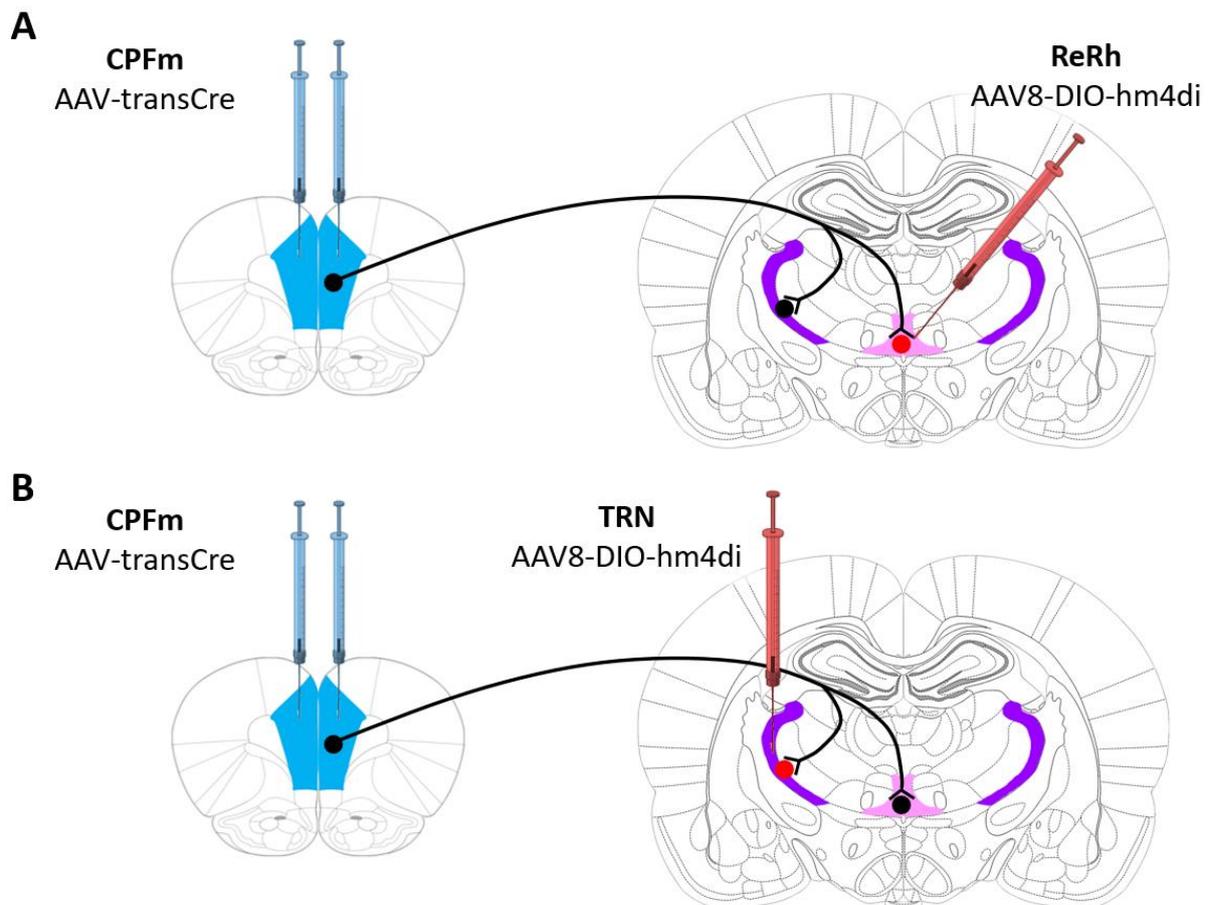


Figure 45. Schéma de la dissociation des collatérales par inhibition pharmacogénétique

Il est possible de dissocier le rôle des collatérales du CPFm (en bleu) vers les ReRh (en rose, **A**) versus celles vers le RTN (en violet, **B**).

Pour cela, nous pouvons injecter un AAV permettant l'expression d'une Cre trans-synaptique dans le CPFm (à gauche). La Cre sera alors exprimée dans tous les neurones post-synaptiques des projections du CPFm, y compris dans le thalamus. En injectant un AAV portant le gène floxé du récepteur DREADD inhibiteur hM4Di dans les ReRh (**A**), ou dans les RTN (**B**), ce récepteur ne sera exprimé que dans les neurones post-synaptiques recevant une afférence du CPFm dans le noyau thalamique d'intérêt. Ainsi, en ajoutant le ligand de ce récepteur dans l'eau de boisson des animaux, il est possible d'inhiber le neurone post-synaptique respectivement de la voie CPFm → ReRh ou CPFm → RTN, et d'en étudier les conséquences comportementales.

Ce neurone est ensuite inhibé par la liaison du ligand sur le récepteur. Ce ligand n'a pas besoin d'être injecté de façon intracérébrale puisque le récepteur est exprimé de façon spécifique. Le ligand peut ainsi être ajouté à l'eau de boisson, ce qui permet de maintenir la stabulation groupée des rats. Le ligand choisi est la deschloroclozapine (**DCZ**), qui présente une affinité supérieure pour les récepteurs hM4Di, tout en induisant moins d'effets aspécifiques liées à des interactions avec d'autres cibles, comparé au N-oxyde de clozapine (**CNO**) habituellement utilisé et rapidement métabolisé en clozapine, même à de très faibles doses (Nagai et al., 2020).

L'expérience 5 de ce manuscrit constitue ainsi une preuve de concept de l'expression trans-synaptique de la Cre-recombinase, puisqu'elle a permis l'expression d'une mCherry floxée dans les neurones post-synaptiques des ReRh.

II. L'étude des autres voies de projection du réseau cortico-thalamo-hippocampique

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans l'étude du rôle des voies de projection du réseau cortico-thalamo-hippocampique. Après avoir démontré l'implication des projections préfrontales vers les ReRh dans la flexibilité cognitive, tout en écartant leur rôle dans la consolidation systémique d'un souvenir spatial, l'une des perspectives pertinentes serait d'explorer les autres voies de projection au sein de ce réseau. Une telle investigation pourrait être menée à l'aide de la même approche virale (en ciblant l'expression Cre-dépendante d'une caspase), en adaptant les structures cibles pour l'injection des virus, après optimisation des coordonnées. Il sera ensuite possible d'évaluer les conséquences fonctionnelles de chacune des autres déconnexions.

La déconnexion thalamo-corticale, par exemple, pourra être réalisée en injectant l'AAVrg-Cre-GFP dans le CPFm, et l'AAV5-taCasp dans les ReRh. D'après notre hypothèse sur les processus *online* et *offline*, cette déconnexion thalamo-corticale pourrait ne pas empêcher le processus *online* de flexibilité cognitive, dont le contrôle est top-down. Elle pourrait, cependant, empêcher la consolidation systémique du souvenir spatial en empêchant la synchronisation cortico-hippocampique des ondes lentes et des oscillations gamma.

Cette étude comparative du rôle des voies cortico-thalamique versus thalamo-corticale pourrait se révéler prometteuse. En effet, l'étude du rôle des voies de projection réciproques entre le CPFm et le MD dans une tâche évaluant le comportement motivé par un but a conduit (Alcaraz et al., 2018) à suggérer que les voies thalamo-corticales et cortico-thalamiques peuvent être recrutées dans les mêmes tâches comportementales, mais soutenir des aspects différents de ces tâches.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre général de l'étude du réseau cortico-thalamo-hippocampique, reliant le CPFm, les ReRh et l'Hip. Ces trois structures sont connues pour leur implication dans de nombreux processus mnésiques et/ou spatiaux. La poursuite de ce projet consiste à distinguer le rôle de chaque voie de projection au sein de ce réseau. L'objectif de mes travaux de thèse était donc d'établir le rôle de la projection du CPFm vers les ReRh dans la cognition spatiale, et en particulier dans la flexibilité cognitive. Pour cela, nous avons lésé les neurones du CPFm projetant aux ReRh grâce à une approche virale reposant sur l'expression conditionnelle de la caspase sous dépendance d'une Cre-recombinase.

Cette technique, nécessitant l'injection intracérébrale ciblée de deux virus et n'ayant jamais été réalisée dans nos structures d'intérêt, elle a nécessité une étape de mise au point et d'optimisation de protocole, détaillées dans la première partie de ce manuscrit. Cette étape a révélé la neurotoxicité de l'un de nos virus, soulignant ainsi l'importance de l'utilisation de contrôles comportementaux et histologiques adéquats.

L'optimisation de ce protocole nous a ensuite permis de poursuivre le travail de recherche grâce à la lésion bilatérale cortico-thalamique projection-spécifique, et l'étude de ses conséquences comportementales. Nous avons ainsi montré que la projection du CPFm vers les ReRh n'est pas indispensable à la consolidation systémique d'un souvenir spatial, tandis qu'elle est nécessaire à la flexibilité cognitive spatiale sous la forme d'un changement de stratégie de navigation.

Ces résultats montrent que le réseau cortico-thalamo-hippocampique fonctionne différemment pendant une tâche *online* de flexibilité cognitive et pendant un processus *offline* de consolidation systémique. Mes travaux remettent ainsi en question la vision de ce réseau comme une boucle fermée, dans laquelle les ReRh seraient un simple relai anatomique entre le CPFm et l'Hip, de façon indépendante de la tâche et donc du processus en cours.

Bibliographie

- Aggleton, J.P., Desimone, R., Mishkin, M., 1986. The origin, course, and termination of the hippocampothalamic projections in the macaque. *J. Comp. Neurol.* 243, 409–421. <https://doi.org/10.1002/cne.902430310>
- Ahmed, Z., Shaw, G., Sharma, V.P., Yang, C., McGowan, E., Dickson, D.W., 2007. Actin-binding Proteins Coronin-1a and IBA-1 are Effective Microglial Markers for Immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 687–700. <https://doi.org/10.1369/jhc.6A7156.2007>
- Alcaraz, F., Fresno, V., Marchand, A.R., Kremer, E.J., Coutureau, E., Wolff, M., 2018. Thalamocortical and corticothalamic pathways differentially contribute to goal-directed behaviors in the rat. *eLife* 7, e32517. <https://doi.org/10.7554/eLife.32517>
- Amaral, D.G., Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Anastasiades, P.G., Carter, A.G., 2021. Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends Neurosci.* 44, 550–563. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.03.006>
- Andrianova, L., Brady, E.S., Margetts-Smith, G., Kohli, S., Craig, M.T., 2021 Hippocampal CA1 pyramidal cells do not receive monosynaptic input from thalamic nucleus reuniens.
- Angulo-Garcia, D., Ferraris, M., Ghestem, A., Nallet-Khosroffian, L., Bernard, C., Quilichini, P.P., 2020. Cell Assemblies in the Cortico-Hippocampal-Reuniens Network during Slow Oscillations. *J. Neurosci.* 40, 8343–8354. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0571-20.2020>
- Ansari, A.M., Ahmed, A.K., Matsangos, A.E., Lay, F., Born, L.J., Marti, G., Harmon, J.W., Sun, Z., 2016. Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev. Rep.* 12, 553–559. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9670-8>
- Arai R, Jacobowitz DM, Deura S, 1994. Distribution of calretinin, calbindin-D28k, and parvalbumin in the rat thalamus. *Brain Res Bull* 33:595–614
- Arleo, A., Rondi-Reig, L., 2007. MULTIMODAL SENSORY INTEGRATION AND CONCURRENT NAVIGATION STRATEGIES FOR SPATIAL COGNITION IN REAL AND ARTIFICIAL ORGANISMS. *J. Integr. Neurosci.* 06, 327–366. <https://doi.org/10.1142/S0219635207001593>
- Atchison, R.W., Casto, B.C., Hammon, W.McD., 1965. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754–756. <https://doi.org/10.1126/science.149.3685.754>
- Baba Y, Nakano M, Yamada Y, Saito I, Kanegae Y. 2005. Practical range of effective dose for Cre recombinase-expressing recombinant adenovirus without cell toxicity in mammalian cells. *Microbiol Immunol.* ;49(6):559-70. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03753.x.
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M., Hamilton, P.W., 2017. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* 7, 16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Barker, G.R.I., Warburton, E.C., 2018. A Critical Role for the Nucleus Reuniens in Long-Term, But Not Short-Term Associative Recognition Memory Formation. *J. Neurosci.* 38, 3208–3217. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1802-17.2017>
- Basha D, Azarmehri A, Proulx E, Chauvette S, Ghorbani M, Timofeev I. 2025. The reuniens nucleus of the thalamus facilitates hippocampo-cortical dialogue during sleep. Preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2023.09.12.557350>
- Beckstead, R.M., 1979. An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 184, 43–62. <https://doi.org/10.1002/cne.901840104>
- Bennett, A.T.D., 1996. Do Animals Have Cognitive Maps? *J. Exp. Biol.* 199, 219–224. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.1.219>
- Bentivoglio M, Balercia G, Kruger L. 1991. The specificity of the nonspecific thalamus: the midline nuclei. *Prog Brain Res.*87:53-80. doi: 10.1016/s0079-6123(08)63047-2.
- Bersell, K., Choudhury, S., Mollova, M., Polizzotti, B.D., Ganapathy, B., Walsh, S., Wadugu, B., Arab, S., Kühn, B., 2013. Moderate and high amounts of tamoxifen in α -MHC-MerCreMer mice induce

- a DNA damage response, leading to heart failure and death. *Dis. Model. Mech.* dmm.010447. <https://doi.org/10.1242/dmm.010447>
- Birrell, J.M., Brown, V.J., 2000. Medial Frontal Cortex Mediates Perceptual Attentional Set Shifting in the Rat. *J. Neurosci.* 20, 4320–4324. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04320.2000>
- Block, A.E., Dhanji, H., Thompson-Tardif, S.F., Floresco, S.B., 2007. Thalamic-Prefrontal Cortical-Ventral Striatal Circuitry Mediates Dissociable Components of Strategy Set Shifting. *Cereb. Cortex* 17, 1625–1636. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhl073>
- Boch, L. 2023. Dynamique temporelle de la persistance d'un souvenir spatial : étude de l'implication des noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus dans différents systèmes de mémoire – mémoire de travail et mémoire à long terme. *Neurosciences*. Université de Strasbourg, 2023. Français. (NNT : 2023STRAJ115).
- Bokor, H., Csáki, Á., Kocsis, K., Kiss, J., 2002. Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1227–1239. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02189.x>
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., Jaffard, R., 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400, 671–675. <https://doi.org/10.1038/23270>
- Buchanan, S.L., Thompson, R.H., Maxwell, B.L., Powell, D.A., 1994. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit.
- Buerger, A., Rozhitskaya, O., Sherwood, M.C., Dorfman, A.L., Bisping, E., Abel, E.D., Pu, W.T., Izumo, S., Jay, P.Y., 2006. Dilated Cardiomyopathy Resulting From High-Level Myocardial Expression of Cre-Recombinase. *J. Card. Fail.* 12, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2006.03.002>
- Bullitt, E., 1990. Expression of *C-fos*-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 296, 517–530. <https://doi.org/10.1002/cne.902960402>
- Buzsáki, G., Moser, E.I., 2013. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat. Neurosci.* 16, 130–138. <https://doi.org/10.1038/nn.3304>
- Carlén M. 2017. What constitutes the prefrontal cortex? *Science*. Oct 27;358(6362):478-482. doi: 10.1126/science.aan8868.
- Cassel, J.-C., Ferraris, M., Quilichini, P., Cholvin, T., Boch, L., Stephan, A., Pereira De Vasconcelos, A., 2021. The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: A crossroads for cognition-relevant information processing? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 126, 338–360. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.023>
- Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., Loureiro, M., Cholvin, T., Dalrymple-Alford, J.C., Vertes, R.P., 2013. The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog. Neurobiol.* 111, 34–52. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.08.006>
- Çavdar, S., Onat, F.Y., Çakmak, Y.Ö., Yananli, H.R., Gülçebi, M., Aker, R., 2008. The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reuniens nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat. *J. Anat.* 212, 249–256. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00858.x>
- Chafee, M.V., Heilbronner, S.R., 2022. Prefrontal cortex. *Curr. Biol.* 32, R346–R351. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.02.071>
- Chen, S., Haam, J., Walker, M., Scappini, E., Naughton, J., Martin, N.P., 2019. Recombinant Viral Vectors as Neuroscience Tools. *Curr. Protoc. Neurosci.* 87, e67. <https://doi.org/10.1002/cpns.67>
- Cholvin, T., Loureiro, M., Cassel, R., Cosquer, B., Geiger, K., De Sa Nogueira, D., Raingard, H., Robelin, L., Kelche, C., Pereira De Vasconcelos, A., Cassel, J.-C., 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013>
- Ciacciarelli, E.J., Dunn, S.D., Gohar, T., Joseph Sloand, T., Niedringhaus, M., West, E.A., 2025. Medial prefrontal cortex to nucleus reuniens circuit is critical for performance in an operant delayed nonmatch to position task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 217, 108007. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2024.108007>

- Clayton, N.S., Dickinson, A., 1998. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395, 272–274. <https://doi.org/10.1038/26216>
- Cornwall, J., Cooper, J.D., Phillipson, O.T., 1990. Projections to the rostral reticular thalamic nucleus in the rat. *Exp. Brain Res.* 80. <https://doi.org/10.1007/BF00228857>
- Crandall, S.R., Cruikshank, S.J., Connors, B.W., 2015. A Corticothalamic Switch: Controlling the Thalamus with Dynamic Synapses. *Neuron* 86, 768–782. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.040>
- Cruikshank, S.J., Ahmed, O.J., Stevens, T.R., Patrick, S.L., Gonzalez, A.N., Elmaleh, M., Connors, B.W., 2012. Thalamic Control of Layer 1 Circuits in Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 32, 17813–17823. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3231-12.2012>
- Dajani, D.R., Uddin, L.Q., 2015. Demystifying cognitive flexibility: Implications for clinical and developmental neuroscience. *Trends Neurosci.* 38, 571–578. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.07.003>
- Dalley, J.W., Cardinal, R.N., Robbins, T.W., 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>
- D’Cruz, A.-M., Ragozzino, M.E., Mosconi, M.W., Shrestha, S., Cook, E.H., Sweeney, J.A., 2013. Reduced behavioral flexibility in autism spectrum disorders. *Neuropsychology* 27, 152–160. <https://doi.org/10.1037/a0031721>
- D’Hooge, R., De Deyn, P.P., 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 36, 60–90. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00067-4)
- Di Prisco, G.V., 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. <https://doi.org/10.1002/syn.20271>
- Diekelmann, S., Born, J., 2010. The memory function of sleep. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 114–126. <https://doi.org/10.1038/nrn2762>
- Dix, S.L., Aggleton, J.P., 1999. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav. Brain Res.* 99, 191–200. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00079-5)
- Dolleman-van Der Weel, M.J., Griffin, A.L., Ito, H.T., Shapiro, M.L., Witter, M.P., Vertes, R.P., Allen, T.A., 2019. The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior. *Learn. Mem.* 26, 191–205. <https://doi.org/10.1101/lm.048389.118>
- Dolleman-van Der Weel, M.J., Lopes Da Silva, F.H., Witter, M.P., 2017. Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat. *Brain Struct. Funct.* 222, 2421–2438. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1350-6>
- Dolleman-Van Der Weel, M.J., Lopes Da Silva, F.H., Witter, M.P., 1997. Nucleus Reuniens Thalami Modulates Activity in Hippocampal Field CA1 through Excitatory and Inhibitory Mechanisms. *J. Neurosci.* 17, 5640–5650. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05640.1997>
- Dolleman-Van der Weel MJ, Witter MP, 2000. Nucleus reuniens thalami innervates gamma aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. *Neurosci Lett.* Jan 14;278(3):145-8. doi: 10.1016/s0304-3940(99)00935-0.
- Eichenbaum, H., Cohen, N.J., 2014. Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function? *Neuron* 83, 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.032>
- Ekstrom, A.D., Kahana, M.J., Caplan, J.B., Fields, T.A., Isham, E.A., Newman, E.L., Fried, I., 2003. Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature* 425, 184–188. <https://doi.org/10.1038/nature01964>
- Erben, L., Welday, J.P., Murphy, R., Buonanno, A., 2022. Toxic and Phenotypic Effects of AAV_Cre Used to Transduce Mesencephalic Dopaminergic Neurons. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9462. <https://doi.org/10.3390/ijms23169462>

- Ferino, F., Thierry, A.M., Glowinski, J., 1987. Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat. *Exp. Brain Res.* 65. <https://doi.org/10.1007/BF00236315>
- Ferraris, M., Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., Stephan, A., Quilichini, P.P., 2021. The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 125, 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.02.025>
- Ferraris, M., Ghestem, A., Vicente, A.F., Nallet-Khosrofian, L., Bernard, C., Quilichini, P.P., 2018. The Nucleus Reuniens Controls Long-Range Hippocampo–Prefrontal Gamma Synchronization during Slow Oscillations. *J. Neurosci.* 38, 3026–3038. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3058-17.2018>
- Floresco, S.B., Zhang, Y., Enomoto, T., 2009. Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 204, 396–409. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.001>
- Flotte, T.R., Berns, K.I., 2005. Adeno-Associated Virus: A Ubiquitous Commensal of Mammals. *Hum. Gene Ther.* 16, 401–407. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.401>
- Forni, P.E., Scuoppo, C., Imayoshi, I., Taulli, R., Dastrù, W., Sala, V., Betz, U.A.K., Muzzi, P., Martinuzzi, D., Vercelli, A.E., Kageyama, R., Ponzetto, C., 2006. High Levels of Cre Expression in Neuronal Progenitors Cause Defects in Brain Development Leading to Microencephaly and Hydrocephaly. *J. Neurosci.* 26, 9593–9602. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2815-06.2006>
- Frahsek, M., Schulte, K., Chia-Gil, A., Djudjaj, S., Schueler, H., Leuchtle, K., Smeets, B., Dijkman, H., Floege, J., Moeller, M.J., 2019. Cre recombinase toxicity in podocytes: a novel genetic model for FSGS in adolescent mice. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 317, F1375–F1382. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00573.2018>
- Frankland, P.W., Bontempi, B., 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 119–130. <https://doi.org/10.1038/nrn1607>
- Fujisawa, S., Buzsáki, G., 2011. A 4 Hz Oscillation Adaptively Synchronizes Prefrontal, VTA, and Hippocampal Activities. *Neuron* 72, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.018>
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M.P., Moser, E.I., Moser, M.-B., 2004. Spatial Representation in the Entorhinal Cortex. *Science* 305, 1258–1264. <https://doi.org/10.1126/science.1099901>
- Gabbott, P.L.A., Warner, T.A., Jays, P.R.L., Salway, P., Busby, S.J., 2005. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J. Comp. Neurol.* 492, 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Gasser, J., Pereira De Vasconcelos, A., Cosquer, B., Boutillier, A.-L., Cassel, J.-C., 2020. Shifting between response and place strategies in maze navigation: Effects of training, cue availability and functional inactivation of striatum or hippocampus in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 167, 107131. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107131>
- Geoffroy, M.-C., Salvetti, A., 2005. Helper Functions Required for Wild Type and Recombinant Adeno-Associated Virus Growth. *Curr. Gene Ther.* 5, 265–271. <https://doi.org/10.2174/1566523054064977>
- Giardino, L., Calza, L., Zanni, M., Velardo, A., Pantaleoni, M., Marrama, P., 1989. Daily modifications of 3H-naloxone binding sites in the rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Chronobiol. Int.* 6 (3) 203–216
- Giustino, T.F., Maren, S., 2015. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front. Behav. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298>
- Golipour, Z., 2024. Prefrontal to reuniens inputs for goal-dependant place cell remapping and replay sequences in the hippocampus. [Affiche présentée au congrès de la Fédération des Sociétés Européennes de Neurosciences], FENS Forum, Vienne.
- Grant, D.A., Berg, E.A., 1948. A behavioral analysis of degree of reinforcement and ease of shifting to new responses in a Weigl-type card-sorting problem. *J Exp Psychol.* Aug;38(4):404-11. doi: 10.1037/h0059831.
- Gray, H. 1918. *Anatomy of the Human Body.*

- Grieves, R.M., Jeffery, K.J., 2017. The representation of space in the brain. *Behav. Processes* 135, 113–131. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.12.012>
- Grunert, P., 2013. From the Idea to Its Realization: The Evolution of Minimally Invasive Techniques in Neurosurgery. *Minim. Invasive Surg.* 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/171369>
- Gusel'nikova, V.V., Korzhevskiy, D.E., 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 7, 42–47. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-42-47>
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., Moser, E.I., 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801–806. <https://doi.org/10.1038/nature03721>
- Halassa, M.M., Acsády, L., 2016. Thalamic Inhibition: Diverse Sources, Diverse Scales. *Trends Neurosci.* 39, 680–693. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.08.001>
- Hamilton, J.J., Dalrymple-Alford, J.C., 2023. The thalamic reuniens is associated with consolidation of non-spatial memory too. *Front. Behav. Neurosci.* 17, 1215625. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1215625>
- Hanganu-Opatz, I.L., Klausberger, T., Sigurdsson, T., Nieder, A., Jacob, S.N., Bartos, M., Sauer, J.-F., Durstewitz, D., Leibold, C., Diester, I., 2023. Resolving the prefrontal mechanisms of adaptive cognitive behaviors: A cross-species perspective. *Neuron* 111, 1020–1036. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.03.017>
- Harno, E., Cottrell, E.C., White, A., 2013. Metabolic Pitfalls of CNS Cre-Based Technology. *Cell Metab.* 18, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.019>
- Hauer, B.E., Pagliardini, S., Dickson, C.T., 2022. Prefrontal-Hippocampal Pathways Through the Nucleus Reuniens Are Functionally Biased by Brain State. *Front. Neuroanat.* 15, 804872. <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.804872>
- Hauer, B.E., Pagliardini, S., Dickson, C.T., 2019. The Reuniens Nucleus of the Thalamus Has an Essential Role in Coordinating Slow-Wave Activity between Neocortex and Hippocampus. *eneuro* 6, ENEURO.0365-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0365-19.2019>
- Heidmann, D., Lehner, C.F., 2001. Reduction of Cre recombinase toxicity in proliferating *Drosophila* cells by estrogen-dependent activity regulation. *Dev. Genes Evol.* 211, 458–465. <https://doi.org/10.1007/s004270100167>
- Henke, K., 2010. A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 523–532. <https://doi.org/10.1038/nrn2850>
- Herdegen, T., Kovary, K., Buhl, A., Bravo, R., Zimmermann, M., Gass, P., 1995. Basal expression of the inducible transcription factors c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, and Krox-24 in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 354, 39–56. <https://doi.org/10.1002/cne.903540105>
- Herkenham, M., 1978. The connections of the nucleus reuniens thalami: Evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.* 177, 589–609. <https://doi.org/10.1002/cne.901770405>
- Hermonat, P.L., Muzyczka, N., 1984. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6466–6470. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.20.6466>
- Higashi, A.Y., Ikawa, T., Muramatsu, M., Economides, A.N., Niwa, A., Okuda, T., Murphy, A.J., Rojas, J., Heike, T., Nakahata, T., Kawamoto, H., Kita, T., Yanagita, M., 2009. Direct Hematological Toxicity and Illegitimate Chromosomal Recombination Caused by the Systemic Activation of CreERT2. *J. Immunol.* 182, 5633–5640. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802413>
- Hok, V., Poucet, B., Duvelle, É., Save, É., Sargolini, F., 2016. Spatial cognition in mice and rats: similarities and differences in brain and behavior. *WIREs Cogn. Sci.* 7, 406–421. <https://doi.org/10.1002/wcs.1411>
- Hok, V., Save, E., Lenck-Santini, P.P., Poucet, B., 2005. Coding for spatial goals in the prelimbic/infralimbic area of the rat frontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 4602–4607. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407332102>
- Hoover, W.B., 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. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0345-6>
- Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212, 149–179. <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>
- Horsley VA, Clarke RH. 1908. The structure and functions of the cerebellum examined by a new method. *Brain* 31 :45-85, 1908.
- Humphries, M.P., Maxwell, P., Salto-Tellez, M., 2021. QuPath: The global impact of an open source digital pathology system. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 852–859. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.022>
- Issa, S.S., Shaimardanova, A.A., Solovyeva, V.V., Rizvanov, A.A., 2023. Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy: An Overview. *Cells* 12, 785. <https://doi.org/10.3390/cells12050785>
- Ito, H.T., Zhang, S.-J., Witter, M.P., Moser, E.I., Moser, M.-B., 2015. A prefrontal–thalamo–hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature* 522, 50–55. <https://doi.org/10.1038/nature14396>
- Iwasaki, H., Jodo, E., Kawauchi, A., Miki, T., Kayama, Y., Koyama, Y., 2010. Role of the lateral preoptic area and the bed nucleus of stria terminalis in the regulation of penile erection. *Brain Res.* 1357, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.006>
- Izquierdo, A., Brigman, J.L., Radke, A.K., Rudebeck, P.H., Holmes, A., 2017. The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience* 345, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.021>
- Jae Huh, W., Mysorekar, I.U., Mills, J.C., 2010. Inducible activation of Cre recombinase in adult mice causes gastric epithelial atrophy, metaplasia, and regenerative changes in the absence of “floxed” alleles. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G368–G380. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00021.2010>
- Janbandhu, V., Moik, D., Fässler, R., 2014. Cre recombinase induces DNA damage and tetraploidy in the absence of *LoxP* sites. *Cell Cycle* 13, 462–470. <https://doi.org/10.4161/cc.27271>
- Jay, T.M., 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. <https://doi.org/10.1002/cne.903130404>
- Jayachandran, M., Linley, S.B., Schlecht, M., Mahler, S.V., Vertes, R.P., Allen, T.A., 2019. Prefrontal Pathways Provide Top-Down Control of Memory for Sequences of Events. *Cell Rep.* 28, 640–654.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.053>
- Jeannotte, L., Aubin, J., Bourque, S., Lemieux, M., Montaron, S., Provencher St-Pierre, A., 2011. Unsuspected effects of a lung-specific cre deleter mouse line. *genesis* 49, 152–159. <https://doi.org/10.1002/dvg.20720>
- Jensen RL, Stone JL, Hayne RA, 1996. Introduction of the human Horsley-Clarke stereotactic frame. *Neurosurgery.* Mar;38(3):563-7; discussion 567. doi: 10.1097/00006123-199603000-00029.
- Joyce, M.K.P., Marshall, L.G., Banik, S.L., Wang, J., Xiao, D., Bunce, J.G., Barbas, H., 2022. Pathways for Memory, Cognition and Emotional Context: Hippocampal, Subgenual Area 25, and Amygdalar Axons Show Unique Interactions in the Primate Thalamic Reuniens Nucleus. *J. Neurosci.* 42, 1068–1089. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1724-21.2021>
- Kandel, E.I., Schavinsky, Y.V., 1972. Stereotaxic apparatus and operations in Russia in the 19th century. *J. Neurosurg.* 37, 407–411. <https://doi.org/10.3171/jns.1972.37.4.0407>
- Kaplitt, M.G., Leone, P., Samulski, R.J., Xiao, X., Pfaff, D.W., O’Malley, S., K.L., During, M.J., 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction using adena-associated virus vectors in the mammalian brain 8.
- Kesner, R.P., Churchwell, J.C., 2011. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 417–431. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.07.002>

- Kim, H.A., 2024. The nucleus reuniens drives hippocampal goal-directed trajectory sequences for route planning. [Affiche présentée au congrès de la Fédération des Sociétés Européennes de Neurosciences], FENS Forum, Vienne.
- Kolmac, C.I., Mitrofanis, J., 1997. Organisation of the reticular thalamic projection to the intralaminar and midline nuclei in rats. *J. Comp. Neurol.* 377, 165–178. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970113\)377:2<165::AID-CNE2>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970113)377:2<165::AID-CNE2>3.0.CO;2-1)
- Korte, M., Schmitz, D., 2016. Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. *Physiol. Rev.* 96, 647–693. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2015>
- Lam, P.T., Padula, S.L., Hoang, T.V., Poth, J.E., Liu, L., Liang, C., LeFever, A.S., Wallace, L.M., Ashery-Padan, R., Riggs, P.K., Shields, J.E., Shaham, O., Rowan, S., Brown, N.L., Glaser, T., Robinson, M.L., 2019. Considerations for the use of Cre recombinase for conditional gene deletion in the mouse lens. *Hum. Genomics* 13, 10. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0192-8>
- Lau, A.A., Hopwood, J.J., Kremer, E.J., Hemsley, K.M., 2010. SGSH gene transfer in mucopolysaccharidosis type IIIA mice using canine adenovirus vectors. *Mol. Genet. Metab.* 100, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.02.006>
- Laubach, M., Amarante, L.M., Swanson, K., White, S.R., 2018. What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eneuro* 5, ENEURO.0315-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0315-18.2018>
- Laurent, V., Wong, F.L., Balleine, B.W., 2017. The Lateral Habenula and Its Input to the Rostromedial Tegmental Nucleus Mediates Outcome-Specific Conditioned Inhibition. *J. Neurosci.* 37, 10932–10942. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3415-16.2017>
- Liu, H.-S., Jan, M.-S., Chou, C.-K., Chen, P.-H., Ke, N.-J., 1999. Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260.
- Liu, X., Carter, A.G., 2018. Ventral Hippocampal Inputs Preferentially Drive Corticocortical Neurons in the Infralimbic Prefrontal Cortex. *J. Neurosci.* 38, 7351–7363. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0378-18.2018>
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., Van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A., Jonkers, J., 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9209–9214. <https://doi.org/10.1073/pnas.161269798>
- Loureiro, M., Lecourtier, L., Engeln, M., Lopez, J., Cosquer, B., Geiger, K., Kelche, C., Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., 2012. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct. Funct.* 217, 93–106. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0332-y>
- Marciante, A.B., Wang, L.A., Little, J.T., Cunningham, J.T., 2020. Caspase lesions of PVN-projecting MnPO neurons block the sustained component of CIH-induced hypertension in adult male rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 318, H34–H48. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00350.2019>
- McCaffrey, A.P., Fawcett, P., Nakai, H., McCaffrey, R.L., Ehrhardt, A., Pham, T.-T.T., Pandey, K., Xu, H., Feuss, S., Storm, T.A., Kay, M.A., 2008. The Host Response to Adenovirus, Helper-dependent Adenovirus, and Adeno-associated Virus in Mouse Liver. *Mol. Ther.* 16, 931–941. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.37>
- McKenna, J.T., Vertes, R.P., 2004. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 480, 115–142. <https://doi.org/10.1002/cne.20342>
- McLendon, R.E., Bigner, D.D., 1994. Immunohistochemistry of the Glial Fibrillary Acidic Protein: Basic and Applied Considerations. *Brain Pathol.* 4, 221–228. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00837.x>
- Miles, S., Howlett, C.A., Berryman, C., Nedeljkovic, M., Moseley, G.L., Phillipou, A., 2021. Considerations for using the Wisconsin Card Sorting Test to assess cognitive flexibility. *Behav. Res. Methods* 53, 2083–2091. <https://doi.org/10.3758/s13428-021-01551-3>
- Morceau, S., Piquet, R., Wolff, M., Parkes, S.L., 2019. Targeting Reciprocally Connected Brain Regions Through CAV-2 Mediated Interventions. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 303. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00303>

- Morgan, C.W., Julien, O., Unger, E.K., Shah, N.M., Wells, J.A., 2014. Turning ON Caspases with Genetics and Small Molecules, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 179–213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417158-9.00008-X>
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4)
- Moscarello, J.M., 2020. Prefrontal cortex projections to the nucleus reuniens suppress freezing following two-way signaled avoidance training. *Learn. Mem.* 27, 119–123. <https://doi.org/10.1101/lm.050377.119>
- Moscovitch, M., Nadel, L., Winocur, G., Gilboa, A., Rosenbaum, R.S., 2006. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.03.013>
- Mueller GE, Pilzecker A, 1900. Experimentelle Beitrage zur Lehre vom Gedachtniss. *Zeitschrift fuer Psychologie*, 1, pp. 1-288.
- Nagai, Y., Miyakawa, N., Takuwa, H., Hori, Y., Oyama, K., Ji, B., Takahashi, M., Huang, X.-P., Slocum, S.T., DiBerto, J.F., Xiong, Y., Urushihata, T., Hirabayashi, T., Fujimoto, A., Mimura, K., English, J.G., Liu, J., Inoue, K., Kumata, K., Seki, C., Ono, M., Shimojo, M., Zhang, M.-R., Tomita, Y., Nakahara, J., Suhara, T., Takada, M., Higuchi, M., Jin, J., Roth, B.L., Minamimoto, T., 2020. Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat. Neurosci.* 23, 1157–1167. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0661-3>
- Naiche, L.A., Papaioannou, V.E., 2007. Cre activity causes widespread apoptosis and lethal anemia during embryonic development. *genesis* 45, 768–775. <https://doi.org/10.1002/dvg.20353>
- Narayanan, N.S., Cavanagh, J.F., Frank, M.J., Laubach, M., 2013. Common medial frontal mechanisms of adaptive control in humans and rodents. *Nat. Neurosci.* 16, 1888–1895. <https://doi.org/10.1038/nn.3549>
- Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., Strohl, W.R., 2017. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31, 317–334. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>
- Ogundele, O.M., Lee, C.C., Francis, J., 2017. Thalamic dopaminergic neurons projects to the paraventricular nucleus-rostral ventrolateral medulla/C1 neural circuit. *Anat. Rec.* 300, 1307–1314. <https://doi.org/10.1002/ar.23528>
- O’Keefe, J., 1976. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* 51, 78–109. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)
- O’Keefe, J., Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- O’Keefe, J.M., Nadel, L., O’Keefe, J., 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press, Oxford.
- Packard, M.G., Knowlton, B.J., 2002. Learning and Memory Functions of the Basal Ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 563–593. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937>
- Packard, M.G., McGaugh, J.L., 1996. Inactivation of Hippocampus or Caudate Nucleus with Lidocaine Differentially Affects Expression of Place and Response Learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 65, 65–72. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0007>
- Panzer, E., Boch, L., Cosquer, B., Grgurina, I., Boutillier, A.-L., de Vasconcelos, A.P., Stephan, A., Cassel, J.-C., 2024. Disconnecting prefrontal cortical neurons from the ventral midline thalamus: Loss of specificity due to progressive neural toxicity of an AAV-Cre in the rat thalamus. *J. Neurosci. Methods* 405, 110080. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2024.110080>
- Parra-Barrero, E., Vijayabaskaran, S., Seabrook, E., Wiskott, L., Cheng, S., 2023. A map of spatial navigation for neuroscience. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 152, 105200. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105200>
- Paxinos G., Watson, C., 2014. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition, Elsevier

- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., Topple, A., 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci. Methods* 13, 139–143. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90026-3)
- Peel AL, Klein RL. 2000. Adeno-associated virus vectors: activity and applications in the CNS. *J Neurosci Methods*. Jun 1;98(2):95-104. doi: 10.1016/s0165-0270(00)00183-7.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Pépin, G., Ferrand, J., Höning, K., Jayasekara, W.S.N., Cain, J.E., Behlke, M.A., Gough, D.J., G. Williams, B.R., Hornung, V., Gantier, M.P., 2016. Cre-dependent DNA recombination activates a STING-dependent innate immune response. *Nucleic Acids Res.* 44, 5356–5364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw405>
- Pereira De Vasconcelos, A., Cassel, J.-C., 2015. The nonspecific thalamus: A place in a wedding bed for making memories last? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54, 175–196. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.021>
- Persson, A., Fan, X., Widegren, B., Englund, E., 2006. Cell type- and region- dependent coxsackie adenovirus receptor expression in the central nervous system. *J. Neurooncol.* 78, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11060-005-9055-3>
- Pfeifer, A., Brandon, E.P., Kootstra, N., Gage, F.H., Verma, I.M., 2001. Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: Efficient gene targeting *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 11450–11455. <https://doi.org/10.1073/pnas.201415498>
- Pinault, D., 2004. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res. Rev.* 46, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.008>
- Pol-Bodetto, S., Jeltsch-David, H., Lecourtier, L., Rusnac, N., Mam-Lam-Fook, C., Cosquer, B., Geiger, K., 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. *Behav. Brain Res.* 218, 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.043>
- Prado, V.F., Janickova, H., Al-Onaizi, M.A., Prado, M.A.M., 2017. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience* 345, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.013>
- Pugach, E.K., Richmond, P.A., Azofeifa, J.G., Dowell, R.D., Leinwand, L.A., 2015. Prolonged Cre expression driven by the α -myosin heavy chain promoter can be cardiotoxic. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 86, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.06.019>
- Quet, E., Majchrzak, M., Cosquer, B., Morvan, T., Wolff, M., Cassel, J.-C., Pereira De Vasconcelos, A., Stéphan, A., 2020. The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats. *Brain Struct. Funct.* 225, 955–968. <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02048-z>
- Ragozzino, M.E., Kim, J., Hassert, D., Minniti, N., Kiang, C., 2003. The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behav. Neurosci.* 117, 1054–1065. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.5.1054>
- Rajasethupathy, P., Sankaran, S., Marshel, J.H., Kim, C.K., Ferenczi, E., Lee, S.Y., Berndt, A., Ramakrishnan, C., Jaffe, A., Lo, M., Liston, C., Deisseroth, K., 2015. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* 526, 653–659. <https://doi.org/10.1038/nature15389>
- Ramanathan, K.R., Jin, J., Giustino, T.F., Payne, M.R., Maren, S., 2018. Prefrontal projections to the thalamic nucleus reuniens mediate fear extinction. *Nat. Commun.* 9, 4527. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06970-z>
- Reeders PC, Rivera N. MV, Vertes RP, Mattfeld AT, Allen TA, 2023. Identifying the midline thalamus in humans *in vivo*. *Neuroscience*.
- Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Domínguez-Salazar, E., Martínez-García, R., Velázquez-Moctezuma, J., 2003. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone

- changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 28, 207–227. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(02\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(02)00017-3)
- Rezai Amin S, Gruszczynski C, Guiard BP, Callebert J, Launay J, Louis F, Betancur C, Vialou V, Gautron S, 2019. Viral vector-mediated Cre recombinase expression in substantia nigra induces lesions of the nigrostriatal pathway associated with perturbations of dopamine-related behaviors and hallmarks of programmed cell death. *J Neurochem* 150:330–340
- Rondi-Reig, L., Petit, G.H., Tobin, C., Tonegawa, S., Mariani, J., Berthoz, A., 2006. Impaired Sequential Egocentric and Allocentric Memories in Forebrain-Specific–NMDA Receptor Knock-Out Mice during a New Task Dissociating Strategies of Navigation. *J. Neurosci.* 26, 4071–4081. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3408-05.2006>
- Rose, J.E., Woolsey, C.N., 1948. The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 27 (1 vol.), 210–232.
- Roy, A., Svensson, F.P., Mazeh, A., 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. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1374-6>
- Sahasrabudde, V., Ghosh, H.S., 2022. Cx3Cr1-Cre induction leads to microglial activation and IFN-1 signaling caused by DNA damage in early postnatal brain. *Cell Rep.* 38, 110252. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110252>
- Sauer, B., 1998. Inducible Gene Targeting in Mice Using the Cre/loxSystem. *Methods* 14, 381–392. <https://doi.org/10.1006/meth.1998.0593>
- Sauer, B., Henderson, N., 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5166–5170. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5166>
- Savani, R., Park, E., Busanagari, N., Lu, Y., Kwon, H., Wang, L., Pang, Z.P., 2024. Metabolic and behavioral alterations associated with viral vector-mediated toxicity in the paraventricular hypothalamic nucleus. *Biosci. Rep.* 44, BSR20231846. <https://doi.org/10.1042/BSR20231846>
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S., Capecchi, M.R., 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13702–13707. <https://doi.org/10.1073/pnas.240471297>
- Schnepf, B.C., Clark, K.R., Klemanski, D.L., Pacak, C.A., Johnson, P.R., 2003. Genetic Fate of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes in Muscle. *J. Virol.* 77, 3495–3504. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.6.3495-3504.2003>
- Scoville, W.B., Milner, B., 1957. LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS.
- Seamans, J.K., Laphis, C.C., Durstewitz, D., 2008. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotox. Res.* 14 (2-3), 249–262. <https://doi.org/10.1007/BF03033814>.
- Semprini, S., Troup, T.J., Kotelevtseva, N., King, K., Davis, J.R.E., Mullins, L.J., Chapman, K.E., Dunbar, D.R., Mullins, J.J., 2007. Cryptic loxP sites in mammalian genomes: genome-wide distribution and relevance for the efficiency of BAC/PAC recombineering techniques. *Nucleic Acids Res.* 35, 1402–1410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1108>
- Sesack, S.R., Deutch, A.Y., Roth, R.H., 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. *J. Comp. Neurol.* 290, 213–242. <https://doi.org/10.1002/cne.902900205>
- Silver, D.P., Livingston, D.M., 2001. Self-Excising Retroviral Vectors Encoding the Cre Recombinase Overcome Cre-Mediated Cellular Toxicity. *Mol. Cell* 8, 233–243. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00295-7)
- Soudais, C., Laplace-Builhe, C., Kissa, K., Kremer, E.J., 2001. Preferential transduction of neurons by canine adenovirus vectors and their efficient retrograde transport *in vivo*. *FASEB J.* 15, 1–23. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0321fje>
- Spiegel, E. A., Wycis H. T., 1950. «pallidothalamotomy in chorea.» *Arch Neurol Psychiatry* 64(2): 295-6.

- Spiegel EA, Wycis HT, Marks M, Lee AJ, 1947. Stereotactic apparatus for operations on the human brain. *Science* 106 :349-350, 1947
- Squire, L.R., Zola-Morgan, A.J.O., 2015. Conscious and Unconscious Memory Systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a021667. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021667>
- Sullivan, K.F., 1988 Structure and Utilization of Tubulin Isoforms.
- Takehara-Nishiuchi K, Morrissey MD, Pilkiw M. 2020. Prefrontal Neural Ensembles Develop Selective Code for Stimulus Associations within Minutes of Novel Experiences. *J Neurosci.* Oct 21;40(43):8355-8366. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1503-20.2020. Epub 2020 Sep 28.
- Taube, J., Muller, R., Ranck, J., 1990. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J. Neurosci.* 10, 420–435. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-02-00420.1990>
- Tervo, D.G.R., Hwang, B.-Y., Viswanathan, S., Gaj, T., Lavzin, M., Ritola, K.D., Lindo, S., Michael, S., Kuleshova, E., Ojala, D., Huang, C.-C., Gerfen, C.R., Schiller, J., Dudman, J.T., Hantman, A.W., Looger, L.L., Schaffer, D.V., Karpova, A.Y., 2016. A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* 92, 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.021>
- Thanos, A., Morizane, Y., Murakami, Y., Giani, A., Mantopoulos, D., Kayama, M., Roh, M.I., Michaud, N., Pawlyk, B., Sandberg, M., Young, L.H., Miller, J.W., Vavvas, D.G., 2012. Evidence for Baseline Retinal Pigment Epithelium Pathology in the Trp1-Cre Mouse. *Am. J. Pathol.* 180, 1917–1927. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.017>
- Thielen, J.-W., Takashima, A., Rutters, F., Tendolkar, I., Fernández, G., 2015. Transient relay function of midline thalamic nuclei during long-term memory consolidation in humans. *Learn. Mem.* 22, 527–531. <https://doi.org/10.1101/lm.038372.115>
- Thinus-Blanc, C. 1988. Animal spatial cognition. In *Thought without Language* (ed. L. Weiskrantz), pp. 371–395. Oxford: Oxford University Press.
- Thyagarajan, B., Guimarães, M.J., Groth, A.C., Calos, M.P., 2000. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244, 47–54. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00008-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00008-1)
- Tolman, E.C., 1948. COGNITIVE MAPS IN RATS AND MEN.
- Van Der Werf, Y.D., Witter, M.P., 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. Rev.* 39, 107–140. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00181-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00181-9)
- Varela, C., Kumar, S., Yang, J.Y., 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. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0543-5>
- Venkataraman, A., Hunter, S.C., Dhinojwala, M., Ghebrezadik, D., Guo, J., Inoue, K., Young, L.J., Dias, B.G., 2021. Incerto-thalamic modulation of fear via GABA and dopamine. *Neuropsychopharmacology* 46, 1658–1668. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01006-5>
- Verma, S., Moreno, I.Y., Gesteira, T.F., Coulson-Thomas, V.J., 2024. Toxicity of nuclear-localized GFP in reporter mice. *Sci. Rep.* 14, 24642. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75741-2>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.027>
- Vertes, R.P., 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51, 32–58. <https://doi.org/10.1002/syn.10279>
- Vertes, R.P., 2002. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J. Comp. Neurol.* 442, 163–187. <https://doi.org/10.1002/cne.10083>
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Do Valle, A.C., Sherman, A., Rodriguez, J.J., 2006. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 499, 768–796. <https://doi.org/10.1002/cne.21135>

- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Szigeti-Buck, K., Leranth, C., 2007. Nucleus reuniens of the midline thalamus: Link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res. Bull.* 71, 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.12.002>
- Viena, T.D., Rasch, G.E., Silva, D., Allen, T.A., 2020. Calretinin and calbindin architecture of the midline thalamus associated with prefrontal–hippocampal circuitry. *Hippocampus* 31, 770–789. <https://doi.org/10.1002/hipo.23271>
- Vogt, B.A., Paxinos, G., 2014. Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. *Brain Struct. Funct.* 219, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0493-3>
- Waltz, J.A., 2017. The neural underpinnings of cognitive flexibility and their disruption in psychotic illness. *Neuroscience* 345, 203–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.005>
- Watson JB, Lashley KS. 1915. *Homing and Related Activities of Birds*. Washington, DC: Carnegie Institution of Washington.
- Weible AP, McEchron MD, Disterhoft JF. 2000. Cortical involvement in acquisition and extinction of trace eyeblink conditioning. *Behav Neurosci.* Dec;114(6):1058-67. doi: 10.1037//0735-7044.114.6.1058.
- Weigert M., Schmidt U., Haase R., Sugawara K., Myers G. 2020. Star-convex Polyhedra for 3D Object Detection and Segmentation in Microscopy. in: 2020 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV), pp 3655–3662.
- Wilmot, C.A., 1988. Effects of diet and obesity on brain α 1- and α 2-noradrenergic receptors in the rat.
- Winocur, G., Moscovitch, M., Bontempi, B., 2010. Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48, 2339–2356. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2010.04.016>
- Wouterlood, F.G., Saldana, E., Witter, M.P., 1990. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: Light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* -leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 296, 179–203. <https://doi.org/10.1002/cne.902960202>
- Wu, Z., Yang, H., Colosi, P., 2010. Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Mol. Ther.* 18, 80–86. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.255>
- Xu, W., Südhof, T.C., 2013. A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science* 339, 1290–1295. <https://doi.org/10.1126/science.1229534>
- Yang, C.F., Chiang, M.C., Gray, D.C., Prabhakaran, M., Alvarado, M., Juntti, S.A., Unger, E.K., Wells, J.A., Shah, N.M., 2013. Sexually Dimorphic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus Govern Mating in Both Sexes and Aggression in Males. *Cell* 153, 896–909. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.017>
- Yu, X., Jembere, F., Takehara-Nishiuchi, K., 2022. Prefrontal projections to the nucleus reuniens signal behavioral relevance of stimuli during associative learning. *Sci. Rep.* 12, 11995. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15886-0>
- Zaiss, A.-K., Liu, Q., Bowen, G.P., Wong, N.C.W., Bartlett, J.S., Muruve, D.A., 2002. Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *J VIROL* 76.
- Zhu, J., Nguyen, M., Nakamura, E., Yang, J., Mackem, S., 2012. Cre-mediated recombination can induce apoptosis in vivo by activating the p53 DNA damage-induced pathway. *genesis* 50, 102–111. <https://doi.org/10.1002/dvg.20799>
- Zimmerman, E.C., Grace, A.A., 2018. Prefrontal cortex modulates firing pattern in the nucleus reuniens of the midline thalamus via distinct corticothalamic pathways. *Eur. J. Neurosci.* 48, 3255–3272. <https://doi.org/10.1111/ejn.14111>
- Zingg, B., Dong, H., Tao, H.W., Zhang, L.I., 2022. Application of AAV1 for Anterograde Transsynaptic Circuit Mapping and Input-Dependent Neuronal Cataloging. *Curr. Protoc.* 2, e339. <https://doi.org/10.1002/cpz1.339>

Zwart, F.S., Vissers, C.Th.W.M., Kessels, R.P.C., Maes, J.H.R., 2019. Procedural learning across the lifespan: A systematic review with implications for atypical development. *J. Neuropsychol.* 13, 149–182. <https://doi.org/10.1111/jnp.12139>

Etude de l'implication des projections préfrontales vers le thalamus ventro-médian dans la flexibilité cognitive spatiale chez le rat

Résumé : Ma thèse porte sur le rôle des projections préfrontales vers les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) du thalamus dans la flexibilité cognitive, la capacité à adapter son comportement aux modifications de l'environnement. Dans un contexte spatial, cette fonction est soutenue par un réseau cortico-thalamo-hippocampique reliant le cortex préfrontal médian (CPFm), les ReRh et l'hippocampe. Nous avons induit une lésion spécifique de la projection CPFm → ReRh chez le rat, grâce à l'expression conditionnelle d'une caspase. Après la mise au point du protocole, nous avons montré une perte d'environ 70% des neurones du CPFm rétromarqués, projetant vers les ReRh. L'analyse comportementale a révélé que les rats lésés peuvent toujours consolider un souvenir spatial, mais perdent la capacité à passer d'une stratégie de navigation égocentrique à une stratégie allocentrique lorsque des contraintes le nécessitent, indiquant un déficit de flexibilité cognitive. Ces résultats montrent que la projection du CPFm vers les ReRh joue un rôle majeur dans la flexibilité cognitive, remettant en question la vision du réseau cortico-thalamo-hippocampique comme une boucle fermée.

Mots clés : Cortex préfrontal médian ; Noyaux Reuniens et Rhomboïde du thalamus ; Flexibilité cognitive ; Cognition spatiale

Abstract : My thesis focuses on the role of prefrontal projections to the reuniens and rhomboid nuclei (ReRh) of the thalamus in cognitive flexibility, the ability to appropriately adapt one's behavior in response to environmental changes. In a spatial context, this function is supported by a cortico-thalamo-hippocampal network linking the medial prefrontal cortex (mPFC), the ReRh, and the hippocampus. We induced a projection-specific lesion of the mPFC → ReRh pathway in rats using conditional caspase expression. After optimizing the protocol, we demonstrated a disruption of about 70% of the retrogradely labelled mPFC neurons projecting to ReRh. Behavioral analysis revealed that lesioned rats are still able to consolidate a spatial memory, but they lost the capacity to switch from an egocentric to an allocentric navigation strategy when task constraints required it, indicating a deficit in cognitive flexibility. These findings demonstrate that the mPFC-to-ReRh projection plays a major role in cognitive flexibility, challenging the view of the cortico-thalamo-hippocampal network as a closed-loop system.

Keywords : Medial prefrontal cortex; Reuniens and Rhomboid thalamic nuclei; Cognitive flexibility; Spatial cognition