



HAL
open science

Rôle du cortex piriforme dans la mémoire olfactive: une étude comportementale et anatomo-fonctionnelle à l'aide de la détection immunohistochimique de la protéine Fos

Florence Iris Roulet

► To cite this version:

Florence Iris Roulet. Rôle du cortex piriforme dans la mémoire olfactive: une étude comportementale et anatomo-fonctionnelle à l'aide de la détection immunohistochimique de la protéine Fos. domain_other. Université de Bourgogne, 2006. Français. NNT: . tel-00012088

HAL Id: tel-00012088

<https://theses.hal.science/tel-00012088>

Submitted on 5 Apr 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bourgogne
Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

- Neurosciences -

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Florence Iris ROULLET

Rôle du cortex piriforme dans la mémoire olfactive : une étude comportementale et anatomo-fonctionnelle à l'aide de la détection immunohistochimique de la protéine Fos

Soutenue publiquement le 18 janvier 2006

MEMBRES DU JURY

MMES	Susan SARA - Rapporteur
	Françoise SCHENK - Rapporteur
	Frédérique DATICHE - Co-directrice de thèse
	Martine CATTARELLI - Co-directrice de thèse
M.	Bernard SOUMIREU-MOURAT - Président du jury

RESUME

Le cortex piriforme (CP), de par ses caractéristiques anatomiques et fonctionnelles pourrait jouer un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire olfactifs. Nous étudions l'implication de ce paléocortex dans les processus mnésiques olfactifs, chez le Rat, à l'aide de la détection immunohistochimique de la protéine Fos. Nous conditionnons les rats dans un labyrinthe à quatre branches, les rats étant entraînés à associer l'une des odeurs d'une paire à une récompense hydrique. Nous analysons l'expression de la protéine Fos dans le CP et dans les structures limbiques (hippocampe et néocortex) à la suite, au cours même de la mise en place et lors de la réactivation d'un apprentissage olfactif. Dans le CP, nous mettons en évidence une expression de Fos différente selon la vitesse d'apprentissage des rats conditionnés, et nous confirmons l'hétérogénéité fonctionnelle de ses subdivisions. Nous montrons également l'implication des structures néocorticales et hippocampales dans la mémoire olfactive.

ABSTRACT

Because of its anatomical and functional features, the piriform cortex (PC) could play a crucial role in olfactory learning and memory. We studied its implication in mnesic processes using the immunodetection of Fos protein in rat. A water-rewarded olfactory discrimination task in a four-arms maze was used for conditioning. We analysed Fos expression in PC as well as in neocortex and hippocampus, after completion of the discrimination task, at different time-points throughout learning and following its reactivation. In PC, we showed that Fos expression was different depending of the velocity to learning of the conditioned rat. Furthermore, we confirmed the functional heterogeneity of the PC subdivisions and observed the implication of hippocampal and neocortical areas in the olfactory memory processes.

A mes grands-pères Jean Roullet et Maurice Li-Woung-Ki

A mes enfants Markus et Antoine

« -Mais alors, aurais-tu l'obligeance de me dire quelle odeur a donc un nourrisson quand il a l'odeur que tu crois qu'il doit avoir? [...]

- Prenez leurs pieds, par exemple, eh bien, là ils sentent comme un caillou lisse et chaud; ou bien non, plutôt comme du fromage blanc...ou comme du beurre, comme du beurre frais, oui, c'est ça : ils sentent le beurre frais. Et le reste du corps sent comme ... comme une galette qu'on a laissé tremper dans le lait. Et la tête, là, l'arrière de la tête où les cheveux font un rond, [...] c'est là, très précisément qu'ils sentent le plus bon. Là, ils sentent le caramel, cela sent si bon, c'est une odeur si merveilleuse, mon père, vous n'avez pas idée! ».

Extrait du roman de Patrick Suskin : « Le parfum »

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Centre Européen des Sciences du Goût de l'Université de Bourgogne sous la double direction de Martine Cattarelli, directeur de recherche au CNRS et de Frédérique Datiche, maître de conférence.

J'ai eu la chance de bénéficier, pendant ces années de thèse, d'un financement permanent ; les premières années (septembre 2000 à septembre 2003) par une allocation de recherche et par l'obtention d'un poste de monitrice d'enseignement (septembre 2001 à septembre 2003) attribués par le Ministère National de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie. Pendant la quatrième année (septembre 2003 à juin 2004), j'ai bénéficié d'un contrat à mi-temps d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche (ATER) avec l'Université de Bourgogne. De janvier 2005 à janvier 2006, date de la soutenance, mes revenus ont été assurés par un contrat de «post-doctorant» avec l'Université McMaster (Hamilton, Canada).

Je souhaite remercier Monsieur le Professeur Bernard Soumireu-Mourat de m'avoir fait l'honneur de s'être déplacé jusqu'à Dijon afin d'y présider le jury de ma thèse. Je le remercie de m'avoir fait profiter de ses remarques et commentaires scientifiques montrant l'intérêt qu'il avait apporté à mon travail. Merci également très sincèrement à Madame le Professeur Françoise Schenk et Madame le Docteur Susan Sara pour avoir assuré, malgré leurs nombreuses obligations, le rôle de rapporteur de mon manuscrit de thèse. Par ailleurs, je remercie Madame le Docteur Susan Sara pour son soutien et ses encouragements.

La réalisation d'une thèse est une expérience particulièrement enrichissante, avec ses moments agréables et ses épisodes plus difficiles. Réfléchissant à la façon de présenter mes remerciements, l'image d'un grand bâtiment maritime, embarqué sur les flots houleux de la recherche, riche de la grande diversité de ses navigants, s'est naturellement imposée. Ainsi, j'aimerais faire la lumière sur les personnages marquants de ces années de doctorat en utilisant, pour leur description, quelques métaphores empruntées au monde marin.

Dr. Martine Cattarelli

*« Le capitaine est le chef de l'expédition maritime.[] Il est responsable du navire, de sa cargaison et/ou ses passagers. Il s'occupe des tâches administratives, de l'ambiance à bord, etc. »**

Je tiens à remercier Madame Cattarelli de m'avoir accueillie dans son équipe, de m'avoir donné la direction scientifique de ce travail de thèse, d'avoir apporté un soin rigoureux et appliqué à son enseignement des règles de base de la recherche scientifique, et d'avoir porté une attention sincère à mes questionnements.

Dr. Frédérique Datiche

*« Le second capitaine est désigné comme capitaine en cas d'indisponibilité de ce dernier. Il est responsable du chargement et de la sécurité. »**

Merci à Frédérique d'avoir également assuré la direction scientifique de mon travail, de m'avoir fait bénéficier de son sens affûté de l'organisation, de m'avoir aidée de multiples façons et surtout de m'avoir soutenue pendant les années de manipulations et pendant le travail de rédaction.

* définitions issues de l'encyclopédie « Wikipédia »

Ced, Francis, Mimiche

*«Le chef mécanicien est responsable des machines, de leur bon fonctionnement et de leur maintenance ; les officiers mécaniciens [] gèrent la maintenance et les réparations. »**

Merci d'avoir été des collègues puis des amis fidèles et efficaces. Je sais que je peux en toute circonstance compter sur vous.

Merci aussi à tout le personnel du CESG, technicien (Sylvie, Sylviane, Oliv, Matthieu, Sabine, Véro...) ou chercheur (Dr. Alain Robichon, Dr. Dominique Valentin, ...) pour leur écoute, leurs conseils et leurs sourires.

Dr. Paul Laffort

C'est avec une grande joie que je saisis l'occasion qui m'est ici donnée de remercier Paul Laffort pour ses enseignements et son amitié durant ces années de doctorat. Encore aujourd'hui, il me gratifie de ses précieux conseils, et de ses vastes connaissances. Merci d'avoir partagé votre passion pour le monde de l'olfaction et votre immense enthousiasme.

Au cours de la thèse, notre navire à croisé, pour ma plus grande chance, la route des pirates de l'Experimentarium. J'ai ainsi activement participé à de nombreuses sessions de présentation de vulgarisation de mon travail de recherche auprès des écoliers, lycéens et du grand public. L'Experimentarium a été la plus enrichissante de mes découvertes en terre dijonnaise. Pour plus de détails, veuillez visiter l'excellent site internet de l'Experimentarium indiqué ci-après.

<http://www.u-bourgogne.fr/experimentarium/pageshtm/chercheurs/odeurs.htm>



Lionel Maillot dit « Lio » ou « Jack Rackam »

*« Le capitaine d'un bateau pirate était souvent un combattant féroce en qui l'équipage avait confiance, plutôt qu'un chef autoritaire issu d'une élite aristocratique. »**

Les pirates de l'Experimentarium

Momo dit « Le Sarrasin », Chacha dite « La Belle », Yannick dit « Jambe de bois », Goeff dit « La frite », Olivier dit « Le Matheu », Grégoire dit « Chemise qui tue », Davy dit « Mulholand drive », Marie-Amandine dite « Future Maman », Philippe dit « Le curé ou Futur papa », Alexis dit « Hein? », Isabelle dite « Copine! », Barbara dite « Barbi ou La poulposité ou Amica mia ».

Les femmes pirates indépendantes

Mariam dite «Vaillante Maman-Chercheuse Touareg », Fabienne dite « Brouillard de Londres ou Mary Red», Blandine dite « Blanc » et Delphine dite «Tortue ou 007 ».

Merci au capitaine et à tous ces pirates, anciens « gabiers de poulaines » reconvertis, par les armes, « héros des temps modernes », d'avoir créé l'indispensable bouée de survie : l'Amitié, et de m'avoir inspirée et soutenue contre vents et marée!

Ma famille

Mes parents

*« Dans les navires construits en bois, la quille était (et est encore) la pièce maîtresse de la charpente d'un navire [].La quille d'un bateau désigne la partie la plus basse du navire dit quillard. Elle permet de maintenir ce dernier en équilibre[.]. »**

Il est difficile de remercier justement et suffisamment mes merveilleux parents pour leur soutien, leurs encouragements constants, mais aussi leur bonne humeur sans limite, leur curiosité et la passion de la

science qu'ils ont su me transmettre. Merci à mon frère Stéphane, à mes sœurs Elodie et Alexia, à mes grands-parents « de Nantes », à ma tante Josy, à ma famille « de la Réunion », pour leur vivifiante présence, leur humour, leur indispensable esprit de dérision, et leur chaleur.

Kjetil

*« Le safran est une partie du gouvernail d'un navire, constitué d'un plan vertical pouvant pivoter afin de dévier le flux d'eau [] et donc de changer la direction du navire. »**

*« Le sextant est un instrument permettant de relever la hauteur angulaire du soleil au-dessus de l'horizon. Il est utilisé pour se situer sur la planète Terre. Avec un sextant, l'horizon et l'objet à relever restent stables, même sur un bateau en mouvement []. »**

Tu vaux bien au moins l'équivalent d'un safran et d'un sextant mon cher et exceptionnel partenaire-ami-papa de mes enfants! « Takk skal du ha » pour ton courageux et inlassable soutien dans cette bataille et quelle chance de t'avoir à mes côtés pour la suite de l'Aventure. « Jeg elsker Norge og Vikinger! ».

Markus et Antoine

Mes embruns revigorants, la figure de proue de mon navire, mes gémeaux Castor et Polux brillants dans le ciel immense, merci de me guider sur l'océan, de me donner tant de bonheur et de m'insuffler une force nouvelle pour maintenir mon cap dans les eaux parfois troubles de la recherche et de la vie.

“Embrun : L'embrun est une poussière liquide arrachée par le vent de la crête des lames.”



Tsunami par Hokusai (19th siècle)

SOMMAIRE

Chapitre I – Introduction générale	1
Chapitre II – Données Bibliographiques	7
A – Le Cortex Piriforme.....	9
A1 – Organisation anatomique	9
♦ Structure histologique et cellulaire	9
♦ Les systèmes de fibres.....	11
• Fibres intrinsèques d’association.....	11
• Fibres extrinsèques d’association	12
• Fibres commissurales	12
♦ Neuromodulation	12
• Acétylcholine.....	13
• Monoamines	13
♦ Connexions centrales	13
• Connexions avec l’amygdale.....	14
• Connexions avec le cortex entorhinal et l’hippocampe.....	14
• Relation avec le thalamus	15
• Relation avec le néocortex.....	15
♦ Subdivisions du CP	15
A2 – Données fonctionnelles	17
♦ Le codage de l’information olfactive	17
♦ Réponse des cellules pyramidales aux odeurs	19
B – Le système olfactif comme modèle d’étude de la mémoire.....	19
B1 – Rôle du CP dans la mémoire olfactive	20
♦ Données de la modélisation	20
♦ Données issues des expériences de lésions	22
♦ Données issues des études électrophysiologiques	22
♦ Modifications structurales du CP et apprentissage	23
♦ Rôle des subdivisions CPa et CPp dans les processus mnésiques ?	23
B2 – Implication des aires cérébrales interconnectées avec le CP dans la mémoire olfactive	24
♦ Le bulbe olfactif.....	24
♦ L’amygdale	26
♦ Le cortex entorhinal	27

♦ L'hippocampe	27
♦ Le striatum ventral	29
♦ Le néocortex frontal	29
B3- Les neuromédiateurs impliqués dans la mémoire olfactive	30
♦ Acétylcholine (ACh)	30
♦ Acide gamma-aminobutyrique (GABA).....	31
♦ Noradrénaline (Nad)	32
♦ Glutamate : les récepteurs NMDA.....	33
♦ Sérotonine	33
C – Le proto-oncogène <i>c-fos</i>	33
C1 – <i>c-fos</i> : un gène de la famille des gènes précoces immédiats	33
C2 – Le proto-oncogène <i>c-fos</i> code un facteur de transcription inductible	34
C3 – Conditions d'expression de Fos	35
♦ Second messenger	35
♦ Cinétique - décours temporel	35
C4 – Fos : un marqueur d'activité et de plasticité.....	35
♦ Marqueur d'activité cellulaire	35
♦ Marqueur de plasticité.....	36
♦ L'outil Fos et la mémoire olfactive.....	38
Chapitre III- Position du problème.....	41
Chapitre IV - Méthodologie.....	45
A - Les animaux.....	47
B - Le test d'apprentissage discriminatif olfactif	47
C - Dispositif expérimental.....	47
D - Immunocytochimie de la protéine Fos	48
♦ Perfusion et coupes histologiques	48
♦ Immunohistochimie	48
♦ Analyse des résultats et statistiques	50
Chapitre V – Données originales	51
A – Effet de l'apprentissage de la tâche de discrimination olfactive sur l'expression de la protéine Fos dans le CP	55
B – Influence de la valeur du stimulus odorant sur l'expression de Fos.....	67
C – Etude de l'expression cérébrale de Fos à différents stades de l'acquisition de la tâche de discrimination olfactive	81

D – Expression de Fos après un apprentissage discriminatif olfactif et après sa réactivation .	101
Chapitre VI – Discussion générale	121
A – Résumés des résultats	123
B – Considérations méthodologiques	124
B1 – Expression de Fos après réactivation mnésique : choix du test de conditionnement.....	124
B2 – Choix des groupes de rats témoins	125
B3 – La protéine Fos : outil de cartographie des processus mnésiques ?	127
C – Le CP et les processus mnésiques	128
Les CP antérieur et postérieur jouent-ils un rôle similaire dans les processus d’apprentissage et de mémoire olfactifs ?.....	131
D – Implication des autres structures dans les processus mnésiques olfactifs	133
D1 – Expression de Fos dans l’hippocampe dans l’étude des processus mnésiques olfactifs... ..	133
♦ L’aire CA3.....	133
♦ L’aire CA1.	134
D2 – Expression de Fos dans les régions corticales	136
♦ Le cortex infralimbique.....	136
♦ Le cortex orbitofrontal ventrolatéral et latéral	136
♦ Relation entre l’hippocampe et le néocortex	138
Chapitre VII – Conclusion générale et perspectives	139
A – Rôle du CP dans la mémoire olfactive: approche utilisant la détection de la protéine Fos	141
B – Implication d’un réseau pirifo-hippocampo-néocortical dans les processus mnésiques olfactifs	141
En perspective	142
Bibliographie.....	145
Annexes	163
Abréviations générales.....	165
Abréviations concernant les groupes de rats.....	166
Liste des illustrations	167

Chapitre I – Introduction générale

Introduction

L'apprentissage et la mémoire sont des fonctions cognitives très complexes. Dès l'Antiquité, les grecs illustrent leur intérêt pour la mémoire en la représentant sous les traits d'une déesse, la Titanide Mnemosyne. Depuis des siècles, philosophes et psychologues ont étudié la question de la trace mnésique. Les grands concepts philosophiques sont amorcés avec Hippocrate (460-379) qui localise l'organe de la mémoire au niveau de l'encéphale, en lien avec la pensée et les émotions. Plus tard,



“Mnemosyne au banquet” : Mnemosyne touche la tête d'un homme et le gratifie ainsi de mémoire
Mosaïque romane, Musée Antakya (Turquie)

Platon (429-348) propose, dans le *Théétète*, le modèle de l’empreinte d’un cachet dans la cire pour représenter l’engramme en comparant la grande malléabilité de l’âme, et sa capacité à garder une trace, à celles de la cire. Or, des siècles plus tard, le concept de *plasticité cérébrale*, sur lequel repose les processus mnésiques, sera avancé pour expliquer la capacité du système nerveux à se modifier et à garder une trace de cette déformation. Pour Platon, il n’y a pas d’apprentissage réel mais

uniquement une capacité à se ressouvenir : nous retrouvons par l’instruction une connaissance acquise dans une vie antérieure et perdue à la naissance. Succédant à Platon, Aristote (384-322), dans *De memoria et reminiscentia*, reprend la métaphore du cachet de cire, mais ne retient pas l’idée du « ressouvenir ». Il s’interroge plus particulièrement sur la nature du souvenir. Est-il le souvenir d’une trace ou d’un objet ayant laissé une trace? Il sépare alors le modèle (*pathos* provoqué par l’expérience de l’objet) de la trace. Aristote distingue les notions de mémoire (*mnémé*) et de réminiscence (*anamnésis*) comme étant le processus d’appréhension des traces, et l’acte de remémoration respectivement. Il est là encore intéressant de constater que cette distinction, à la fois temporelle et fonctionnelle, sera longuement étudiée des siècles plus tard.

Suite aux grands principes de pensée établis par les philosophes, ce n’est qu’à partir du 19^{ème} siècle que des nouveaux concepts, basés sur l’expérimentation, feront progresser la connaissance des bases neuropsychologiques et neurophysiologiques à l’origine des processus mnésiques. Dans les années 1900, le psychologue William James, s’intéresse dans ses « *Principes de psychologie* » à la mémoire dans sa dimension temporelle : « *a state of mind to survive in memory it must have endured for a certain length of time* ». Au début du XXI^{ème} siècle, Müller et Pilzecker décrivent un phénomène

Introduction

encore très étudié aujourd'hui : la consolidation mnésique. On sait en effet qu'une information récemment acquise est dans un état labile et peut disparaître sous l'influence de manipulations comportementales ou pharmacologiques. Le processus de consolidation permet de stabiliser cette information dans le temps et de la maintenir à long-terme. La consolidation semble basée sur des processus de réorganisation spatio-temporelle dans des réseaux neuronaux distribués. D'ailleurs, à la fin des années 40, le neuropsychologue Hebb émet la théorie des assemblées cellulaires selon laquelle la mémorisation reposerait sur la mise en jeu d'ensemble neuronaux dont la connectivité serait modifiée. En concordance avec cette théorie, Bliss et Lomo (1973) mettent en évidence le phénomène de potentialisation à long terme (PLT) qui traduit l'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique entre deux neurones stimulés conjointement. La PLT est actuellement le seul modèle du processus cellulaire qui pourrait sous-tendre la mise en mémoire de l'information. A l'échelle des systèmes neuroanatomiques, la consolidation reposerait sur une réorganisation progressive de certaines régions cérébrales. Ainsi, vers 1950, la psychologue Brenda Milner étudie le « célèbre » patient HM et démontre non seulement que la mémoire des faits et celle des habiletés sensorimotrices sont représentées par des circuits nerveux différents dans le cerveau, mais que la lésion de la région cérébrale temporale (et plus précisément la lésion hippocampale) induit une incapacité à former de nouveaux souvenirs déclaratifs. Plus tard, les études menées sur l'animal confirmeront l'hypothèse selon laquelle les informations initialement acquises dépendent de l'hippocampe avant d'être traitées par d'autres régions corticales pour être conservées de façon durable (Frankland et Bontempi 2005).

Si longtemps l'Homme a constitué le principal sujet d'investigation, le domaine expérimental s'enrichit du modèle animal comme l'illustrent les travaux d'Ivan Pavlov et d'Edgar Thorndike. Ce modèle s'est avéré très puissant, permettant notamment l'étude des processus mnésiques à l'échelle cellulaire et moléculaire, constituant ainsi une voie d'accès aux mécanismes également présents chez l'Homme. Dans le règne animal, la survie de l'individu dépend essentiellement de la perception et de l'intégration des signaux sensoriels issus de son environnement. Parmi ces signaux, les odeurs occupent une place de choix, puisqu'elles sont à la base de comportements vitaux et sociaux (recherche d'aliments, reproduction, défense du territoire...) (Engelman et al., 1995). Les molécules odorantes déclenchent, au niveau de la muqueuse olfactive, un message qui gagne le bulbe olfactif principal. Celui-ci traite ces informations et les transmet directement aux aires cérébrales qui forment le cortex olfactif primaire (**figure 1**), en particulier au cortex piriforme (CP) qui en reçoit la majorité. Ce cortex, de par ses caractéristiques structurales et fonctionnelles et sa position privilégiée vis-à-vis des

Introduction

structures clefs du système limbique, pourrait être l'une des étapes importantes du processus de mémorisation olfactive.

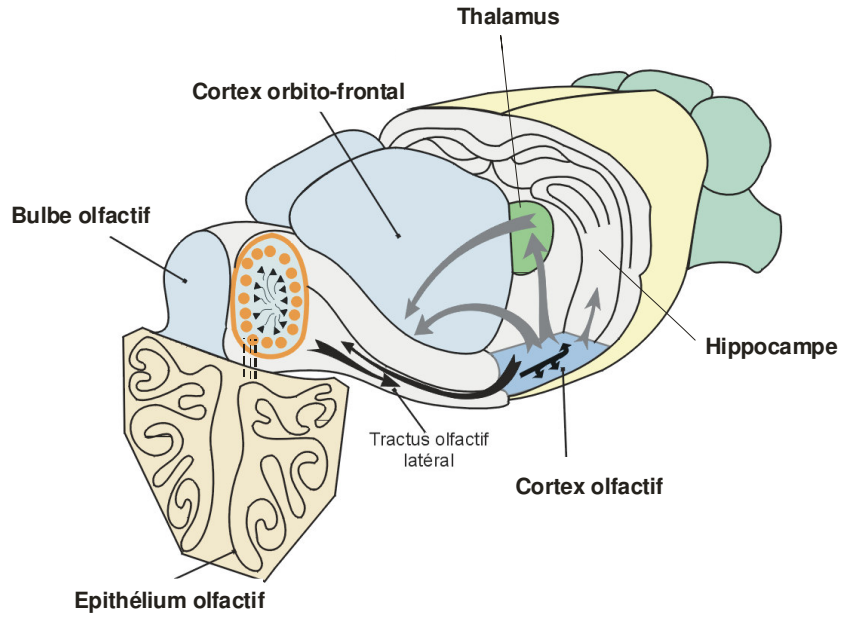


Figure 1 : Représentation schématique des voies olfactives chez le rongeur (D'après Holley et Sicard, 1994)

Chapitre II – Données Bibliographiques

A – Le Cortex Piriforme

Dans le système olfactif, contrairement aux autres voies sensorielles, les messages gagnent les régions corticales sans transiter par un relais thalamique. En effet, les axones des deutoneurones du bulbe olfactif (BO) forment le tractus olfactif latéral (TOL) qui projette directement sur le cortex olfactif primaire constitué de plusieurs structures : le noyau olfactif antérieur (NOA), la partie ventrale de la tenia tecta (TTv), le tubercule olfactif (TO), le noyau du TOL (NTOL), le CP, le cortex entorhinal (CE), le cortex amygdalien (noyaux corticaux antérieur (Aco) et postéro-latéral (PLCo)) (Price, 1973; Holley et Mac Leod, 1977; Haberly et Price, 1978a; Haberly, 1985).

Le CP est l'aire la plus étendue du cortex olfactif primaire et constitue la cible principale des afférences bulbaires (Heimer, 1968) (**Figure 2**).

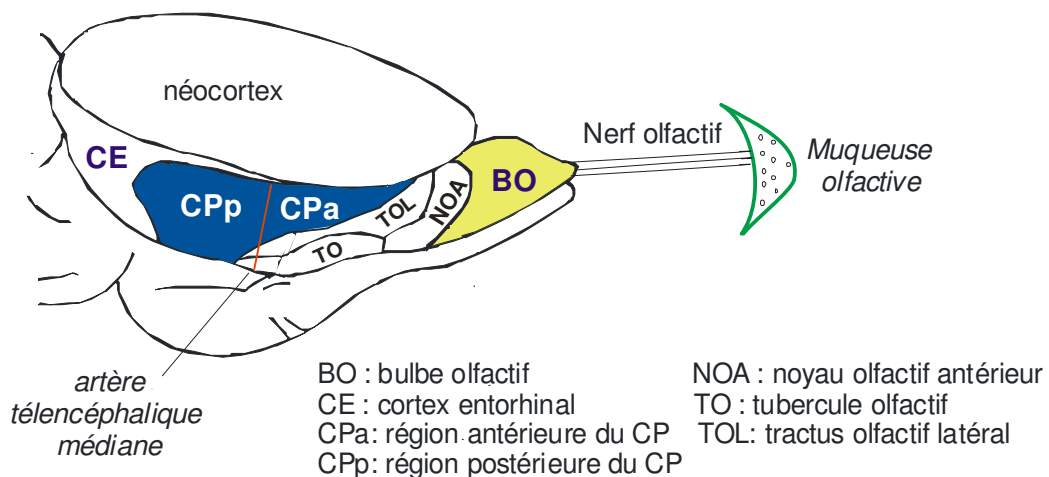


Figure 2: schéma des structures olfactives sur une vue latéro-ventrale d'encéphale de Rat.

A 1 – Organisation anatomique

◆ Structure histologique et cellulaire

Le CP, particulièrement développé chez le Rat, est situé en position latéro-ventrale dans l'encéphale. D'une longueur de 7 mm, il est limité dans le sens rostro-caudal par le NOA à l'avant et le CE à l'arrière, et, dans le sens dorso-ventral, par le sulcus rhinal, le TO et le cortex amygdalien respectivement (Haberly, 1985). Il s'agit d'un paléocortex constitué de trois couches cellulaires. La structure histologique du CP a d'abord été décrite chez l'Opossum par Haberly et Price (1978a).

Données Bibliographiques

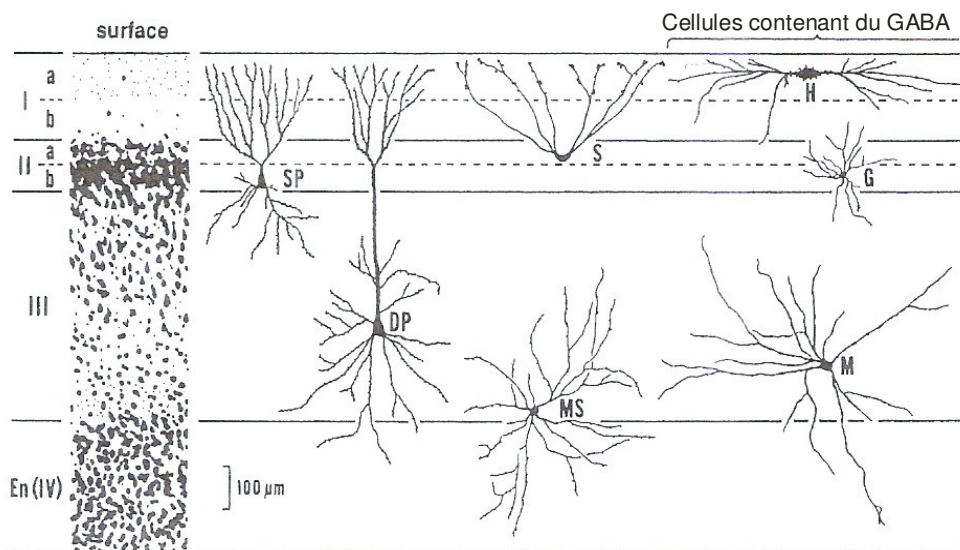
- ◆ *La couche I* ou couche plexiforme est subdivisée en une partie superficielle (Ia) contenant les axones myélinisés du TOL et en une partie profonde (Ib) où cheminent principalement des fibres d'association surtout intrinsèques mais aussi extrinsèques, issues d'autres structures du cortex olfactif primaire (Price, 1973; Martinez et al., 1987).
- ◆ *La couche II* ou cellulaire compacte contient les cellules pyramidales superficielles qui constituent les principaux neurones-relais de l'information sensorielle. On distingue deux sous-couches, IIa et IIb, selon leur densité cellulaire. Les axones provenant des cellules de la couche IIb, plus dense, se dirigent principalement en direction caudale (Haberly et Price, 1978a).
- ◆ *La couche III* ou cellulaire profonde se compose essentiellement de cellules pyramidales profondes plus dispersées et de fibres d'association intrinsèques. Les axones de ces cellules s'orientent plutôt rostralement (Haberly et Price 1978a, Luskin et Price, 1983a,b).

En profondeur de cette couche se trouve le noyau endopiriforme ventral parfois considéré comme une éventuelle *couche IV* (Valverde, 1965).

Mis à part les cellules pyramidales, il existe, dans le CP, d'autres variétés cellulaires. Chez le Rat, Martinez et al. (1987) en décrivent 7 types qui se différencient par des morphologies particulières. Ainsi ils distinguent dans la couche I des **cellules ovoïdes** et des **cellules horizontales**. La couche II contient des **cellules fusiformes**, **bipolaires**, **semilunaires** ou **stellaires** et la couche III, des **cellules**

multipolaires (Figure 3).

Parmi ces cellules, certaines seraient des interneurons ayant un rôle inhibiteur dans le CP. En effet des études immunocytochimiques ont montré l'existence de neurones gabaergiques principalement localisés dans sa couche II (Frassoni et al., 1998; Löscher et al., 1998).



SP: cellule pyramidale superficielle MS: cellule multipolaire (dendrites épineuses)
 DP: cellule pyramidale profonde H: cellule horizontale
 S: cellule semilunaire G: cellule granulaire (cellule ovoïde)
 M: cellule multipolaire (dendrites lisses) EN : noyau endopiriforme considéré comme une couche IV

Figure 3: Illustrations des principaux types cellulaires dans le CP (d'après Haberly 1998).

Données Bibliographiques

On distingue deux principaux circuits d'inhibition : des boucles de **rétroaction** (feed-back) impliquant des interneurons inhibiteurs de la couche III stimulés par des collatérales de cellules pyramidales et des boucles de **proaction** (feed-forward) via des interneurons inhibiteurs localisés dans la couche Ia et recevant des afférences directes du TOL (Haberly et Bower 1984) (**Figure 4B**).

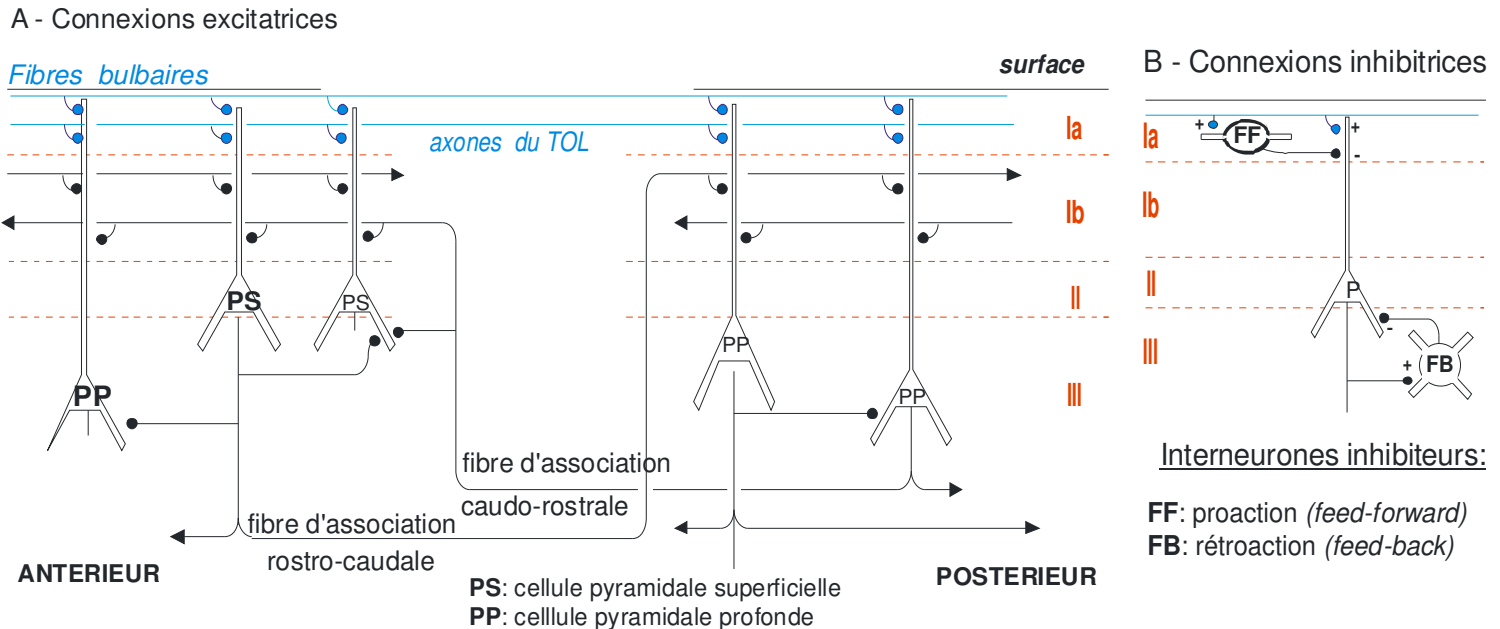
◆ Les systèmes de fibres

Outre les axones afférents issus du BO et cheminant en surface, le CP comporte plusieurs systèmes de fibres. Il existe les **fibres intrinsèques d'association** qui interconnectent ses régions antérieure et postérieure, et les **fibres extrinsèques d'association** qui relient entre elles les différentes aires qui forment le cortex olfactif primaire.

- **Fibres intrinsèques d'association**

Le CP, possède un important réseau de collatérales d'axones des cellules pyramidales qui constituent les fibres intrinsèques d'association (**figure 4 A**).

Figure 4 : schéma de l'organisation synaptique du CP (d'après Haberly, 1985)



Ce réseau se distribue dans l'ensemble de cette structure et les fibres cheminent dans les couches Ib et III. Il permet d'interconnecter chaque point du CP, en particulier ses régions rostrale et caudale. Il existe deux sens de projection de ces fibres : rostro-caudal et caudo-rostral. D'après Haberly (1985), les

Données Bibliographiques

fibres intrinsèques d'association issues de la région rostrale projettent majoritairement dans la partie superficielle de la couche Ib tandis que celles originaires de la région caudale demeurent dans la partie plus profonde de la couche Ib et la couche III. Plusieurs études anatomiques, utilisant des traçages rétro- et antérograde, ont montré une prédominance quantitative des fibres intrinsèques d'association dans le sens rostro-caudal par rapport au système caudo-rostral (Haberly et Price, 1978a; Luskin et Price, 1983b; Haberly, 1985; Datiche et al., 1996). Notons enfin qu'il existe également en couche III des collatérales d'axones courtes formant des circuits locaux, et que les fibres intrinsèques d'association portent sur toute leur longueur des boutons synaptiques qui permettent d'établir de nombreuses synapses *en passant* (Haberly et Bower, 1984).

- **Fibres extrinsèques d'association**

Un système complexe de fibres extrinsèques d'association relie les différentes structures composant le cortex olfactif primaire (Haberly et Price, 1978a; Luskin et Price, 1983a,b). On distingue deux systèmes majeurs en fonction de la couche cellulaire où les fibres se terminent : « le système Ib » qui aboutit principalement dans la couche Ib et « le système Ib-II » qui atteint principalement les couches Ib et II (Luskin et Price, 1983b).

- **Fibres commissurales**

Il existe un transfert de l'information entre le BO et le CP controlatéral par la branche antérieure de la CA (ACA), tandis que la branche postérieure de la CA assure la liaison entre les deux aires piriformes droite et gauche (Haberly et Price, 1978a).

- ◆ **Neuromodulation**

Le CP est la cible de nombreuses afférences neuromodulatrices, cholinergiques (Hasselmo et Bower, 1992, 1993) et monoaminergiques (Datiche et Cattarelli, 1996a). De multiples travaux témoignent de l'importance fonctionnelle de la neuromodulation dans le système olfactif comme nous le verrons dans le paragraphe B3. Les études utilisant le traçage de voies nerveuses ou l'immunohistochimie des neuromédiateurs, et de leurs enzymes associées, permettent d'établir l'organisation anatomique des afférences neuromodulatrices au CP.

- **Acétylcholine**

La majorité des neurones du télencéphale basal, immunoréactifs à la choline-acétyltransférase (Luiten et al., 1987), projettent dans les trois couches du CP (Woolf et al., 1984). En particulier, le CP reçoit une innervation cholinergique dense issue de la bande diagonale de Broca (Hasselmo et Bower, 1992, 1993). Notons que les fibres immunoréactives à la choline-acétyltransférase sont plus nombreuses dans la subdivision antérieure que dans la subdivision postérieure (Datiche, 1995).

- **Monoamines**

Des études de traçage montrent que le CP reçoit des projections noradrénergiques du locus coeruleus (LC) (Haberly et Price, 1978a), en particulier de sa région dorsale (Datiche et Cattarelli, 1996a), des projections dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale et de la substance noire (Loughlin et Fallon, 1984 ; Datiche et Cattarelli, 1996a) et des projections sérotoninergiques issues du raphé dorsal (Datiche et al., 1995).

D'autre part, des études menées *in vitro*, sur tranches de CP, indiquent que les cellules pyramidales de la couche II, répondent à l'action de la sérotonine (5-HT), la noradrénaline et la dopamine en émettant des potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSI) (Gellman et Aghajanian, 1993).

Précisons que, si la distribution des fibres noradrénergiques dans le CP est homogène dans la couche Ia, celle des fibres dopaminergiques présente des différences rostro-caudale et médio-latérale (Datiche et Cattarelli, 1996a). Cette hétérogénéité pourrait étayer l'hypothèse d'une modulation différentielle lors du traitement de l'information dans le CP.

- ◆ **Connexions centrales**

Le CP est connecté avec diverses régions centrales comme des structures limbiques (amygdale et hippocampe), le diencephale ou le néocortex (**Figure 5**).

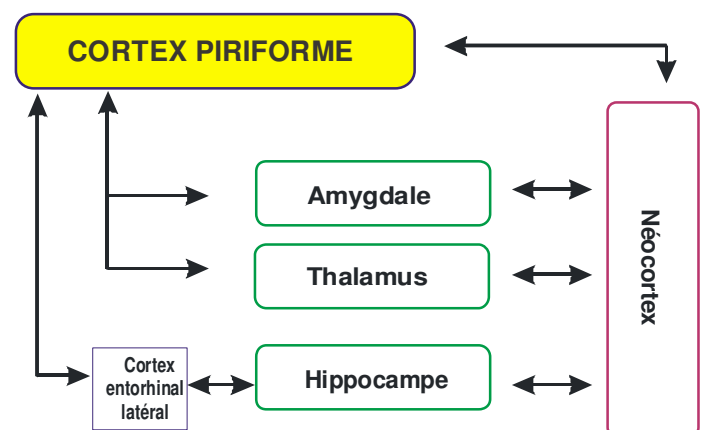


Figure 5: Connexions du CP avec les structures nerveuses centrales

Données Bibliographiques

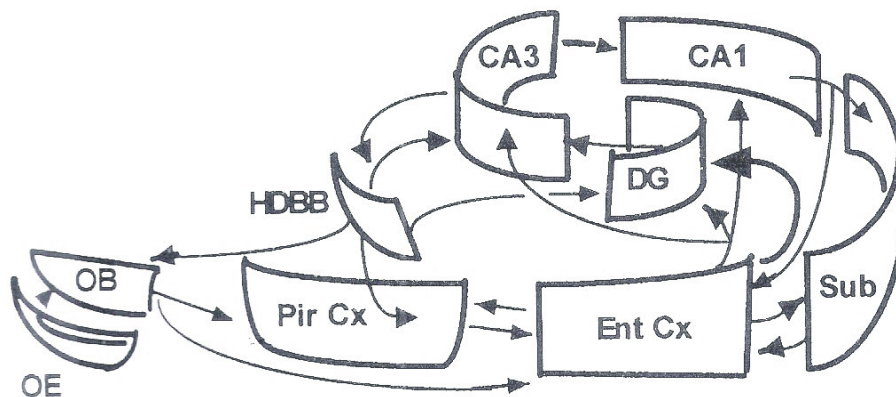
- **Connexions avec l'amygdale**

Utilisant l'autoradiographie, Price (1973) montre que le CP dans son ensemble est connecté aux noyaux corticaux de la région antéro-latérale de l'amygdale (AMYG). Les principales projections piriformes sur cette structure proviennent de neurones des couches cellulaires II et III. Les cibles privilégiées sont les noyaux amygdaliens qui reçoivent également des projections du BO (Price, 1973). Ainsi le CP projette sur la subdivision ventrale de l'aire antérieure, la subdivision antérieure du noyau cortical, ainsi que sur le cortex périamygdalien (Price, 1973; Luskin et Price, 1983b; McDonald, 1998). Il envoie aussi des projections vers les noyaux amygdaliens central, latéral, basal, basal accessoire et cortical postérieur (McDonald, 1998). La plupart de ces connexions sont réciproques. Le CP projette aussi sur l'AMYG via le cortex infralimbique (IL) et les parties ventrales des cortex agrulaire insulaire (AI) et périrhinal (Luskin et Price, 1983b).

- **Connexions avec le cortex entorhinal et l'hippocampe**

Des études de traçage antéro- et rétrogrades montrent que le CP est connecté au CE via des collatérales d'axones de cellules pyramidales (Haberly et Price, 1978a,b ; Witter et al., 1989b). Le CE latéral projette d'une part sur l'ensemble de l'axe rostro-caudal du CP, principalement dans les couches IIa et IIb (Haberly et Price, 1978a) d'autre part sur le gyrus dentelé (GD), voie d'entrée vers les subdivisions hippocampiques (Witter et al., 1989a; Witter, 1993). Il constitue ainsi un relais entre le CP et l'HC (Vanderwolf, 2001) (**Figure 6**).

Figure 6 : Connexions du CP avec le système hippocampique (d'après Roman et al. 2004)



CA1, 2, 3 : sous-régions hippocampiques 1, 2 et 3
DG : gyrus dentelé
Ent Cx : cortex entorhinal
HDB : bande diagonale de Broca

OB : bulbe olfactif
OE : épithélium olfactif
Pir Cx : cortex piriforme
Sub : subiculum

Données Bibliographiques

- **Relation avec le thalamus**

Dès 1965, Powell (cité dans (Giachetti et MacLeod, 1977)) décrit des connexions entre le cortex prépiriforme et les noyaux thalamiques médians dorsal et ventral. Une étude anatomo-fonctionnelle montre que le CP projette sur le noyau ventro-postéro-médian du thalamus (Giachetti et MacLeod, 1977). Enfin, le segment central du noyau médiadorsal reçoit des projections directes (Groenewegen, 1988), probablement de nature excitatrice (Ray et Price, 1992), des cellules profondes du CP.

- **Relation avec le néocortex**

Le néocortex frontal comprend plusieurs aires localisées selon les axes ventral, dorsal, latéral ou médian. La région médiane du cortex frontal comprend le cortex orbito-médian, l'IL et le cortex prélimbique. Latéralement on distingue les cortex orbito-frontaux ventrolatéral et latéral (VLO et LO respectivement). Enfin, le cortex insulaire se situe dorsalement au sillon rhinal et se divise, selon des critères architectoniques, en aires agranulaire, disgranulaire et granulaire insulaires (AI, DI, GI respectivement) (Paxinos et Watson, 1986).

Price (1985), montre que le CP est en relation avec les aires LO et VLO. Utilisant des traçages rétro- et antérograde à l'aide de la toxine cholérique, Datiche et Cattarelli (1996b) précisent que ces projections sont ipsi- mais aussi contralatérales et montrent une organisation topographique des connexions du CP avec les régions frontales. Ainsi le CPa est principalement connecté au VLO. Le CP est également relié à la partie postérieure de l'aire ventrale AI (Price, 1985; Datiche et Cattarelli, 1996b). D'autre part, Sesack et al. (1989), par la méthode du transport antérograde de la leuco-agglutinine de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), indiquent que les cortex infra- et prélimbique projettent sur le CP.

Par injection intracellulaire *in vivo* d'amine dextran biotinylée, Johnson et al. (2000) observent que les cellules du CP présentent une arborisation vaste, très distribuée et dirigée vers les aires corticales telles que l'aire préfrontale laquelle, en retour, projette massivement vers le CP.

- ◆ **Subdivisions du CP**

Le long de son axe antéro-postérieur, le CP présente une hétérogénéité anatomique mise en évidence par Haberly et Price (1978a) et confirmée ensuite par d'autres auteurs (Haberly, 1985; Datiche, 1995; Datiche et al., 1996). On peut ainsi distinguer dans ce cortex deux subdivisions

Données Bibliographiques

antérieure (CPa) et postérieure (CPp). Leur limite est matérialisée par le passage de l'artère médiane télencéphalique et par l'extrémité caudale du TOL. Par ailleurs, le CPp se distingue du CPa par une couche II peu épaisse et une couche III bien développée (Haberly et Price, 1978a). Notons que certains auteurs (Löscher et al., 1998; Schwabe et al., 2000) définissent également une région de transition centrale, entre ses deux subdivisions, située au niveau - 0,8 / - 0,5 mm par rapport au bregma (Paxinos et Watson, 1986).

Les subdivisions CPa et CPp se distinguent essentiellement par les projections qu'elles reçoivent du TOL qui se projette plus dans la région antérieure (Haberly, 2001). Grâce aux fibres intrinsèques d'association, majoritaires dans le sens rostro-caudal, l'information bulbaire afférente est toutefois largement redistribuée de l'avant vers l'arrière (Luskin et Price, 1983a, b; Datiche et al., 1996). On peut noter que ces fibres n'aboutissent pas dans les mêmes couches du CP selon qu'elles prennent naissance à l'avant ou à l'arrière de ce cortex.

Outre le système de fibres intrinsèques, d'autres caractéristiques anatomiques différencient les deux subdivisions. Tout d'abord, sur le plan de la composition cellulaire de la couche II, seul le CPa possède des cellules ovoïdes alors que le CPp contient des cellules semilunaires (Martinez et al., 1987). Par ailleurs, si le CPa est la cible majoritaire des afférences du bulbe et du NOA, la région postérieure reçoit, elle, des projections du cortex olfactif médian constitué d'après Haberly (2001) de la TTV et du pédoncule olfactif dorsal. Elle est également la cible principale des projections du noyau endopiriforme. Enfin, le CPa est principalement connecté avec les aires néocorticales ventrolatérale et latérale tandis que le CPp est plutôt en relation avec l'AI (Datiche et Cattarelli, 1996b).

Finalement, on note une distribution hétérogène des afférences neuromodulatrices selon l'axe antéro-postérieur : par exemple, les afférences dopaminergiques prédominent dans le CPp (Datiche et al., 1995).

Les différences anatomiques entre les CPa et CPp pourraient sous-tendre les différences fonctionnelles : Litaudon et Cattarelli (1995;1996) montrent, chez le Rat *in vivo*, que les réponses à la stimulation bulbaire diffèrent entre les deux subdivisions. Notamment, une onde tardive est observée surtout dans le CPp. De plus, la mesure des potentiels, évoqués par une stimulation de type olfacto-mimétique, indique une variation entre ces deux sous-régions (Litaudon et al., 2003). En effet, le nombre de cellules « non-réactives » à la stimulation augmente de l'avant vers l'arrière du CP. D'autre

Données Bibliographiques

part, les réponses des subdivisions antérieure et postérieure ne sont pas synchronisées de façon identique avec les cycles d'inspiration et d'expiration respiratoires : les potentiels évoqués dans le CPA sont synchrones avec les périodes de transition inspiration/expiration, ceux du CPp surviennent dans les phases d'inspiration ou d'expiration.

A2 – Données fonctionnelles

◆ Le codage de l'information olfactive

Les récepteurs olfactifs (RO) ont été mis en évidence en 1991 chez la Souris par Buck et Axel, récemment nobélisés pour cette découverte. Dans l'épithélium olfactif, on observe une distribution spatiale des récepteurs olfactifs sur quatre zones (Vassar et al., 1993; Strotmann et al., 1994). Il est communément admis qu'un neurone olfactif n'exprime qu'un seul type de RO. A l'intérieur d'une zone donnée de l'épithélium, les neurones qui expriment le même type de RO sont distribués aléatoirement (Mori et Yoshihara, 1995). On considère actuellement qu'un motif topographique code l'odeur en périphérie (**figure 7**), chaque stimulation olfactive entraînant l'activation d'une population de neurorécepteurs spatialement distribués (Vassar et al 1994).

Au niveau du BO, les axones issus des neurorécepteurs exprimant un même type de RO convergent vers un même glomérule (Ressler et al., 1994a,b; Vassar et al., 1994). On retrouverait donc à l'étage bulbaire une représentation topographique de l'image olfactive issue de l'épithélium. Si le codage de l'information olfactive au niveau périphérique repose sur l'activation d'un motif plurineuronale, on peut

s'interroger sur le devenir de l'image bulbaire au niveau cortical compte tenu de l'organisation des projections. En effet, le nombre de cellules pyramidales du CP serait approximativement 100 fois supérieur à celui des cellules mitrales du BO (Holley et MacLeod, 1977) et nous savons que les projections bulbo-corticales sont convergentes et divergentes. Toutefois, ces projections ne semblent pas complètement diffuses. En effet, des injections de leucoagglutinine du *Phaseolus vulgaris* (PHA-L)

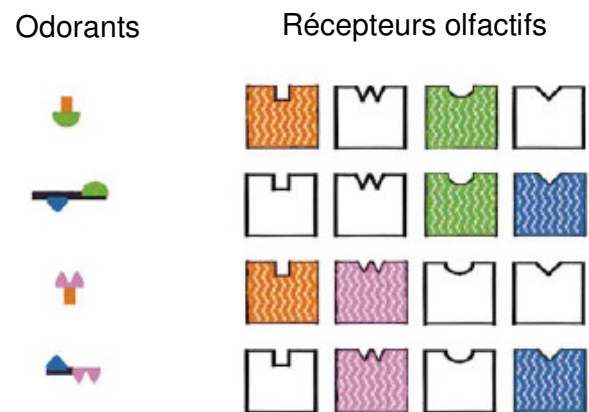


Figure 7 : Codage combinatoire des odeurs (d'après Malnic et al. 1999).
Dans ce modèle, les récepteurs activés par les odorants apparaissent colorés. Un récepteur peut être activé par plusieurs odeurs, une odeur peut activer plusieurs récepteurs.

Données Bibliographiques

dans des cellules mitrales voisines sont à l'origine d'un marquage de petits groupes séparés de fibres dans le CP (Buonviso et al., 1991a, b). Les cellules mitrales voisines dans le BO auraient donc des motifs de projections similaires dans le CP.

Cependant, utilisant la méthode de marquage métabolique à l'aide du 2 desoxy-glucose dans le CP, Cattarelli et al. (1988) ne mettent pas en évidence de motifs d'activation tels qu'ils ont été observés à l'étage bulbaire lors d'une stimulation olfactive. L'utilisation de la technique de traçage génétique (Zou et al., 2001) apporte de nouvelles données concernant l'existence de « carte » olfactive au niveau cortical. En effet, une organisation spatiale serait également présente au niveau du cortex. Zou et al. (2001) indiquent que les afférences convergent au niveau du CPa dans des zones bien définies, même si celles-ci sont plus étendues et recouvrantes qu'au niveau bulbaire. A l'aide d'un immunomarquage de la protéine Fos, Illig et Haberly (2003) montrent qu'en réponse à une stimulation olfactive, la plupart des cellules immunoréactives sont distribuées dans le Cpp mais semblent regroupées dans des zones plus précises dans le CPa. Cependant, ces auteurs n'observent pas d'expression de Fos spécifique en réponse à la stimulation par une odeur donnée. D'après ces auteurs, ces zones reflèteraient plutôt des sous-régions du CPa, qui se distingueraient par leur cytoarchitecture et leur connectivité. Chez la Souris, la stimulation par des odeurs différentes entraîne des motifs d'activation de la protéine Fos partiellement recouvrants mais différents au niveau du CPa (**figure 8**) (Zou et al., 2005). Ces motifs d'activation suggèrent l'existence d'une représentation qualitative de l'odeur au niveau cortical.

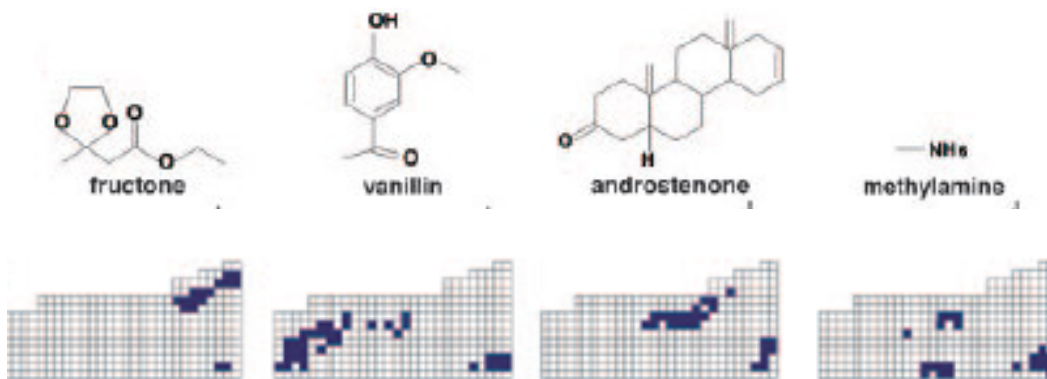


Figure 8 – Motifs d'activation de la protéine Fos dans le Cpa après stimulation par quatre odorants, distincts mais partiellement recouvrants. D'après Zou et al. (2005)

◆ Réponse des cellules pyramidales aux odeurs

Haberly (1969) enregistre, chez l'animal anesthésié, une majorité de réponses inhibitrices aux odeurs par les cellules pyramidales. Nemitz et Goldberg (1983), par des enregistrements extra-, intra-cellulaires et multi-unitaires, montrent, en accord avec des études précédentes (Giachetti et MacLeod, 1975; Tanabe et al., 1975), que les cellules pyramidales du CP répondent en majorité de façon excitatrice à une stimulation olfactive. Toutefois, le nombre de cellules qui ne réagissent pas au stimulus reste élevé. Mc Collum et al. (1991), grâce à des enregistrements unitaires, observent également que la plupart des cellules du CP ne sont pas réactives aux odeurs à la suite d'un apprentissage discriminatif. Récemment, Litaudon et al. (2003) enregistrent chez le Rat anesthésié l'activité de cellules pyramidales de l'avant à l'arrière du CP et constatent qu'un grand nombre de cellules ne sont pas excitées par la stimulation odorante, ce nombre augmentant le long de l'axe rostro-caudal.

Cependant, même si la proportion de cellules qui répondent aux odeurs s'avère faible, des enregistrements extracellulaires réalisés dans le CP au cours d'une tâche de discrimination olfactive préalablement apprise montrent que 30% des cellules enregistrées déchargent sélectivement pendant un ou plusieurs événements comme l'échantillonnage des odeurs ou la consommation d'eau (Schoenbaum et Eichenbaum, 1995). D'autre part, les cellules pyramidales du CP sont sensibles à la valeur récompensante ou non de l'odeur. Dans le CPa, les réponses électriques extracellulaires de cellules pyramidales individuelles, enregistrées au cours d'un apprentissage de discrimination olfactive, répondent à différentes tâches telle que le « nose-poke », le renforcement, l'échantillonnage des odeurs ou encore la discrimination olfactive ; la moitié des réponses sont de type inhibiteur (Zinyuk et al., 2001).

Ces études étayaient la notion de multimodalité des réponses des cellules pyramidales. Ainsi, des informations diverses - et non seulement olfactives- sont traitées dans le CP. Ce point s'avère important pour l'étude du rôle du CP dans la mémoire olfactive, comme nous l'aborderons dans le paragraphe B1.

B – Le système olfactif comme modèle d'étude de la mémoire

De nombreux auteurs ont souligné l'importance du système olfactif comme modèle d'étude des processus mnésiques (Staübli et al., 1987a; Brennan et Keverne, 1997; Eichenbaum, 1998; Slotnick,

Données Bibliographiques

2001). Il présente un grand intérêt dans la compréhension des phénomènes d'apprentissage et de mémoire pour des études du comportement et/ou des processus neurochimiques sous-jacents. En effet, le Rat, animal macrosmate, possède une remarquable capacité d'apprentissage et de mémorisation de tâches associatives complexes fondées sur la détection et la discrimination de signaux olfactifs (Slotnick et al., 1991; Slotnick, 2001). Les études menées chez le Rat, permettraient ainsi d'aborder les processus de mémorisation, notamment à l'échelle cellulaire, et constituerait un modèle pour la compréhension de la mémoire humaine (Eichenbaum, 1998).

B1 – Rôle du CP dans la mémoire olfactive

◆ Données de la modélisation

Une **mémoire auto-associative**, définie selon Hasselmo et al. (1990), est capable de reconstruire un motif appris au préalable en réponse au stimulus afférent, même si ce dernier est partiellement dégradé ou présenté dans un contexte différent. Les modèles développés pour appréhender les processus mnésiques au niveau du système olfactif reposent sur l'analogie entre certaines caractéristiques structurales et fonctionnelles du CP et ceux d'une mémoire associative (Haberly, 1985; Haberly et Bower, 1989) (**Figure 9**) :

1) On observe un système d'afférences bulbaires largement distribué spatialement sur le CP, semblable à celui d'un réseau neuronal artificiel.

2) Il existe dans le CP un faible rapport entre le nombre d'afférences arrivant sur une cellule et le nombre important d'efférences émises depuis cette même cellule. Ce trait particulier est typique des modèles de mémoire associative.

3) Le CP possède un réseau dense de fibres intrinsèques d'association qui interconnectent les cellules pyramidales. Ce réseau permet ainsi une rétroaction excitatrice (feedback positif) récurrente. Or le pouvoir discriminatif de la plupart des réseaux associatifs repose sur ce processus.

4) Les réseaux artificiels de mémoire associative supposent des modifications, dépendantes de l'activité, de la transmission au niveau des synapses excitatrices. Or une modification de l'efficacité synaptique excitatrice a été mise en évidence dans le CP chez des animaux entraînés à une tâche de discrimination olfactive (Roman et al., 1987; Saar et al., 1998).

Données Bibliographiques

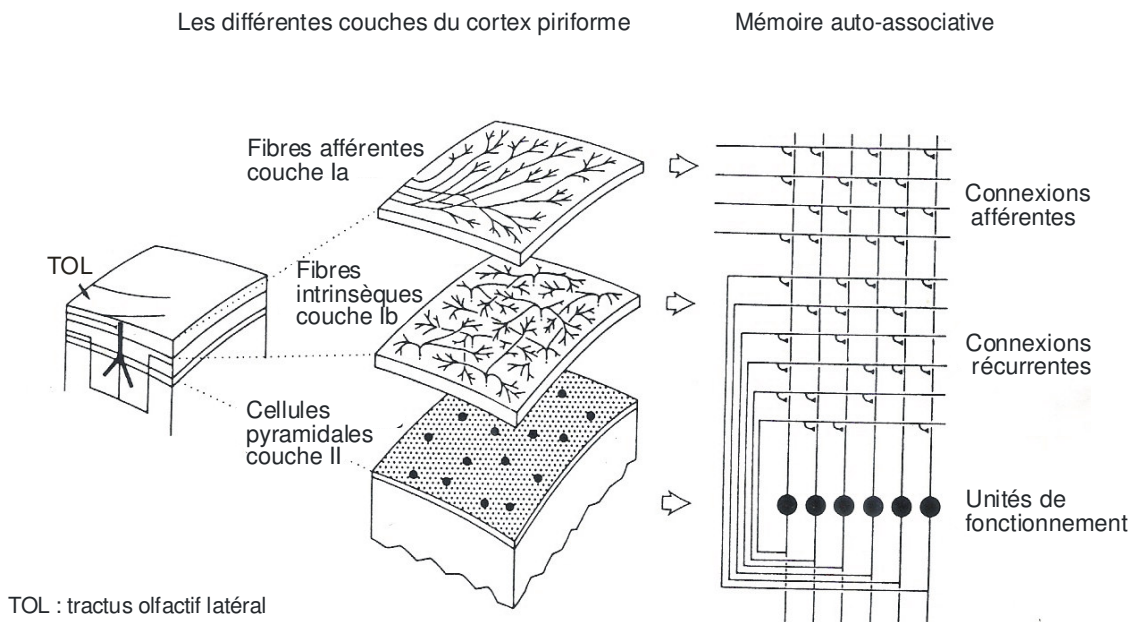


Figure 9 : Comparaison de la structure anatomique du CP avec une matrice de mémoire auto-associative (d'après Hasselmo, 1990)

De plus, le CP occupe une position centrale entre la périphérie sensorielle et des structures cérébrales telles le CE ou l'HC (Hasselmo et al., 1990). Des lésions du CP affectent d'ailleurs la capacité de mémorisation ou de rétention des informations olfactives lors d'une tâche de discrimination (Stäubli et al., 1987b).

Selon un autre modèle, développé par Lynch et Granger (1989), le CPp serait plus particulièrement impliqué dans la reconnaissance et la mémorisation des odeurs, alors que le CPa jouerait un rôle dans la détection et le codage de la qualité olfactive.

Nous avons déjà évoqué que les cellules pyramidales du CP sont de type plurimodal (Schoenbaum et Eichenbaum, 1995; Zinyuk et al., 2001). D'autre part, les réponses des cellules pyramidales présentent un certain degré de similitude avec celles des neurones du cortex frontal (Schoenbaum et Eichenbaum, 1995). Ceci pourrait conférer à ce cortex des fonctions associatives. Il jouerait ainsi un rôle similaire à celui des aires néocorticales plutôt que celui attribué aux aires sensorielles primaires (Schoenbaum et Eichenbaum, 1995).

◆ **Données issues des expériences de lésions**

La lésion du TOL entraîne un déficit dans l'apprentissage et la rétention d'une tâche de discrimination olfactive bien que les animaux ne soient pas anosmiques (Slotnick et Risser, 1990). L'intégrité des afférences bulbaires au CP semble donc requise lors des processus mnésiques des informations olfactives. Par ailleurs, des rats dont le CP est lésé présentent un déficit comportemental plus marqué lors d'une tâche de discrimination si celle-ci implique des stimulus odorants complexes. Toutefois, si les animaux lésés sont entraînés avant la lésion, leur déficit post-opératoire reste plus limité (Staubli et al., 1987b). Ainsi, les expériences de lésion ne permettent pas de préciser le rôle du CP dans la mémoire olfactive.

◆ **Données issues des études électrophysiologiques**

A ce jour, on considère la potentialisation à long-terme (PLT), mise en évidence par Bliss et Lomo (1973), comme le modèle de mémorisation au niveau cellulaire; ce phénomène est basé sur des modifications de l'efficacité de la transmission synaptique. Selon la théorie des assemblées neuronales proposée par Hebb (1947), des réseaux de neurones voient leur efficacité synaptique accrue et les connexions inter-cellulaires renforcées à la suite d'un apprentissage. Dans le CP, la PLT impliquant des récepteurs NMDA a été observée *in vitro*, par stimulation des fibres afférentes ou intrinsèques (Stripling et al., 1988; Jung et al., 1990; Kanter et Haberly, 1990; Stripling et al., 1991; Kanter et Haberly, 1993).

Chez le Rat *in vivo*, la seule stimulation olfactive de l'animal ne suffit pas à déclencher une PLT dans le CP. Toutefois, il est le siège d'une potentialisation synaptique lors d'un apprentissage, lors de l'association entre un stimulus et une récompense (Roman et al., 1987; 1993a; Chaillan et al., 1996; Truchet et al., 2002).

Chez l'animal anesthésié, Litaudon et al. (1997b), par enregistrement optique de l'activité neuronale à l'aide de colorants potentiel-dépendants, montrent que les réponses du CP sont modifiées durablement à la suite d'un conditionnement discriminatif olfacto-mimétique. D'autre part, après un tel apprentissage, Mouly et Gervais (2002) constatent que le composant polysynaptique tardif des potentiels évoqués est modifié dans le CPP.

Données Bibliographiques

Des études *in vitro* démontrent que l'amplitude de la post-hyperpolarisation diminue dans les neurones du CP après acquisition d'un conditionnement opérant olfactif, ce qui aurait une influence facilitatrice sur la transmission synaptique (Saar et al., 1999; Saar et Barkai, 2003).

◆ **Modifications structurales du CP et apprentissage**

Le CP est le siège d'une plasticité structurale lorsque l'animal est soumis à une tâche de conditionnement discriminatif olfactif. Ainsi, le nombre d'épines dendritiques des cellules pyramidales augmente chez des rats conditionnés par rapport aux animaux pseudo-conditionnés et témoins (Knafo et al., 2001). D'autre part, une injection i.p. d'un antagoniste des récepteurs NMDA augmente de façon significative le nombre de cellules exprimant la PSA-NCAM, molécule d'adhésion cellulaire, et la double cortine, molécule impliquée dans la migration cellulaire dans les couches profondes du CP (Nacher et al., 2002). Ainsi, certains neurones du CP pourraient être le siège de modifications liées à des événements tels que la croissance axonale, la synaptogénèse ou encore la migration axonale. De plus, Knafo et al. (2005) montrent que l'expression des molécules de PSA-NCAM est corrélée à la performance individuelle de rats lors de l'acquisition d'une tâche de discrimination olfactive.

◆ **Rôle des subdivisions CPa et CPp dans les processus mnésiques ?**

On peut s'interroger sur le rôle joué par ces deux subdivisions dans l'apprentissage et la mémoire des informations olfactives.

Tout d'abord, chez l'animal anesthésié, les changements à long-terme des réponses électrophysiologiques du CP après acquisition d'un apprentissage olfacto-mimétique sont restreints au CPp et ne sont pas observés dans le CPa (Litaudon et al., 1997). Dans la subdivision antérieure Zinyuk et al. (2001) n'observent d'ailleurs pas de modification de l'activité extracellulaire induite par un apprentissage olfactif de type Go-No Go.

Ensuite, plusieurs travaux étayaient l'idée que la subdivision postérieure et le CE seraient proches d'un point de vue fonctionnel. En effet, Chabaud et al. (1999) enregistrent des potentiels de champs locaux dans diverses structures olfactives et constatent que l'activité évoquée dans le CPp et le CE est particulièrement synchrone. D'autres études fonctionnelles confirment ce résultat et indiquent que le CPp répond de façon similaire au CE (augmentation de l'amplitude des potentiels évoqués) au cours

Données Bibliographiques

d'un apprentissage renforcé positivement (Mouly et al., 2001; Mouly et Gervais, 2002). On note aussi une connectivité importante entre ces deux structures (Haberly et Price 1978a ; Luskin et Price 1983a ; Witter et al. 1989b). Le CE constitue, pour les informations olfactives, une structure « relais » vers la formation hippocampique dont le rôle mnésique est crucial. Le CPP, via le CE, pourrait interagir avec l'HC et participer ainsi aux processus d'apprentissage et de mémoire olfactive.

Enfin, lors de la stimulation du LC *in vivo*, les cellules du CPP répondent majoritairement par une augmentation du nombre de potentiels de pointe, alors que celles du CPA répondent indifféremment par une augmentation ou par une diminution (Bouret et Sara, 2002). Ceci reflèterait l'hétérogénéité des récepteurs noradrénergiques dans le CP, le CPA seul possédant des récepteurs alpha1 impliqués dans l'activation des interneurons GABA (Bouret et Sara, 2002). Ainsi, la Nad pourrait modifier l'activité du réseau de fibres intrinsèques au niveau du CPA et participer au traitement mnésique des odeurs. Enfin, Sevelinges et al. (2004) observent une modification transitoire du potentiel de champ dans le CPP seulement pendant la présentation du stimulus conditionnel lors d'une tâche de conditionnement olfactif aversif.

B2 – Implication des aires cérébrales interconnectées avec le CP dans la mémoire olfactive

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe A1, le CP, est interconnecté avec diverses aires cérébrales comme le BO, l'HC, l'AMYG ou le néocortex frontal. Or, nombre d'études montrent que ces structures sont impliquées lors de l'apprentissage et de la mémorisation des signaux olfactifs.

◆ Le bulbe olfactif

Le BO, premier relais central des messages olfactifs, ne transfère pas seulement l'information arrivant de la muqueuse mais semble déjà impliqué dans les processus mnésiques (Mouly et al., 1990; 1993). Des études fonctionnelles indiquent que les circuits neuronaux bulbaires peuvent être modifiés par l'expérience olfactive : si, à ce niveau, les motifs d'activité suscités par une odeur neutre sont stables, ils se modifient lorsque celle-ci est associée à un renforcement négatif ou positif et ne deviennent stables que lorsque l'apprentissage associatif est achevé (Gervais et al., 1988). D'autre part, Johnson et al. (1995) décrivent une augmentation de 80% de la densité de cellules immunoréactives à

Données Bibliographiques

la protéine Fos dans la région médio-latérale du BO lorsqu'une odeur est associée au préalable à une stimulation tactile chez le jeune Rat.

Les expériences de lésions, réalisées sur les afférences bulbaires ou sur le BO lui-même pour déterminer son implication lors de tâches comportementales olfactives, donnent des résultats assez disparates. Ainsi, Slotnick et Berman (1980) conditionnent des rats à une tâche de type « Go/No Go » puis pratiquent une lésion bilatérale de TOL et de la CA bloquant le passage des informations entre le BO et le CP. Les rats lésés présentent un déficit de rétention et de réapprentissage des informations olfactives bien qu'ils ne soient pas anosmiques. En effet, toujours capables de détecter les odeurs, ils ne peuvent pas les utiliser dans le cadre d'une tâche discriminative. Les auteurs concluent qu'aucune voie efférente du BO en particulier n'est nécessaire pour la simple détection olfactive. Cattarelli (1982 a et b) analyse également les effets d'une lésion bilatérale soit du TOL, soit de l'ACA, ou encore du TOL et de l'ACA, sur les réponses à des odeurs biologiques chez le Rat lors d'une étude comportementale et électrophysiologique. La lésion du TOL associée ou non à celle de l'ACA provoque un déficit comportemental, accru dans le cas de la lésion combinée. D'autre part, Slotnick et Schoonover (1992) montrent que la lésion du TOL, de la CA et du TO provoque un déficit sévère de la détection ou de la discrimination des odeurs lors d'un conditionnement opérant. Thanos et Slotnick (1997), après bulbectomie unilatérale couplée à la lésion du TOL postérieur controlatéral, constatent une perturbation de la mémoire olfactive à court-terme. Notons que le BO semble impliqué dans la mémorisation à long-terme des informations olfactives. Lors d'une étude pharmacologique, Mouly et al. (1990) montrent que l'infusion intrabulbaire de propranolol, antagoniste noradrénergique, ou de solution saline contenant de l'ascorbate, induit un déficit dans la rétention à long-terme (au-delà de 5 jours) de la tâche, si l'infusion a lieu pendant l'apprentissage et non à la fin de cet apprentissage.

Ainsi, de ces études, pouvons-nous supposer que les projections du bulbe vers le CP semblent nécessaires à la détection et au traitement mnésique de l'information olfactive.

Toutefois, les résultats issus des lésions bulbaires sur la mémoire olfactive sont à considérer avec prudence puisqu'il est aussi montré qu'une lésion des afférences du TOL au cortex olfactif postérieur ne perturbe ni la rétention d'une tâche olfactive acquise préalablement, ni l'acquisition d'une nouvelle discrimination (Slotnick, 1985; Slotnick et Risser, 1990). D'autre part, l'ablation d'une partie du BO chez le lapereau (Hudson et Distel, 1987), ou la lésion bulbaire chez le Rat (Lu et Slotnick, 1998) autorise tout de même le bon fonctionnement du système olfactif. D'après ces résultats, la perception et

Données Bibliographiques

la reconnaissance des signaux olfactifs ne nécessiteraient donc pas l'intégralité du BO. Il pourrait donc exister une forte redondance de l'information olfactive au niveau bulbaire.

◆ L'amygdale

L'AMYG, structure limbique, apparaît très impliquée lors d'apprentissages où les stimulus mis en jeu ont une valeur émotionnelle forte comme lors d'une tâche de peur conditionnée (Otto et al., 2000; McGaugh, 2002). Chez le Rat, les neurones amygdaliens répondent aux odeurs (Cain et Bindra, 1972; McDonald, 1998). D'autre part, si Slotnick (1985), constate que la lésion des afférences bulbaires à l'AMYG ne perturbe ni la rétention d'une tâche simple de détection, ni l'acquisition d'une, plus complexe, de discrimination olfactive, la lésion bilatérale de l'AMYG, en revanche, perturbe l'apprentissage d'une association entre une odeur et une stimulation tactile chez des rats (Sullivan et Wilson, 1993). De plus, Hess et al. (1997) montrent que l'expression de l'ARNm *c-fos* varie dans les noyaux amygdaliens basolatéral (Bla) et médian lors de l'acquisition d'une tâche de discrimination olfactive. Ainsi, lors de l'exploration initiale du contexte expérimental ou lorsque le «nose poke» est bien établi, le marquage augmente dans ces noyaux. Après apprentissage olfactif associatif rapidement acquis, Tronel et Sara (2002) observent aussi une augmentation de l'immunoréactivité à la protéine Fos dans le Bla chez les animaux conditionnés. De plus, une lésion bilatérale du Bla provoque un déficit lors de l'apprentissage d'une tâche de discrimination olfactive de type «Go - No go» et lorsque la règle de l'apprentissage est inversée (Schoenbaum et al., 2003a).

L'AMYG serait impliquée dans l'acquisition et le stockage d'informations permettant à l'animal de reconnaître et d'évaluer la signification biologique d'un stimulus (Ono et al., 1995). Schoenbaum et al. (1999) montrent que certaines cellules du Bla déchargent de façon sélective très tôt au cours de l'apprentissage d'une tâche de discrimination olfactive et paraissent sensibles à la valeur de récompense du stimulus. L'activité neuronale du Bla reflèterait donc la dimension motivationnelle du stimulus olfactif résultant de l'association de l'odeur initialement neutre avec le renforcement.

L'activité de l'AMYG semble également sensible au facteur émotionnel, notamment lors de conditionnements olfacto-gustatifs où l'animal apprend à éviter une odeur associée à un malaise viscéral. Ainsi, le Bla est fortement impliqué dans l'acquisition de l'aversion olfactive potentialisée par la saveur (Ferry et al., 1995). Des récepteurs NMDA du Bla dépendraient l'acquisition et non le maintien de cette mémoire (Ferry et Di Scala, 2000). De plus, l'AMYG participe, de façon déterminante, à l'acquisition et à l'expression d'une tâche de peur conditionnée olfactive (Otto et al.,

Données Bibliographiques

2000; Schettino et Otto, 2001). L'inactivation de l'AMYG par injection de tétrotoxine, montre que cette structure est cruciale pour l'apprentissage d'un conditionnement associant une odeur à un choc électrique (Kilpatrick et Cahill, 2003). Récemment, Sevelinges et al. (2004) montrent que les réponses électrophysiologiques des neurones amygdaliens se modifient durablement après un apprentissage associant une odeur à un choc électrique.

◆ Le cortex entorhinal

Des études électrophysiologiques indiquent que le CE jouerait un rôle dans l'apprentissage associatif olfactif. La stimulation olfacto-mimétique du BO associée à un renforcement positif augmente de façon durable l'amplitude de la réponse évoquée dans le CE (Mouly et al., 2001; Mouly et Gervais, 2002).

Staubli et al. (1984), après lésions électrolytiques du CE latéral, observent des effets variables sur la performance de rats entraînés à une tâche de discrimination olfactive selon l'intervalle entre les essais. Si cette lésion n'affecte pas la performance de l'animal pour un délai court (de 30 secondes à 2 minutes), le comportement est perturbé lorsque le délai est plus long (3 à 10 minutes). Il en est de même lors d'une tâche de conditionnement de non appariement différé (Otto et Eichenbaum, 1992a). Il faut noter que la lésion du CE induirait une amnésie plutôt de type antérograde (Kaut et Bunsey, 2001). Après avoir étudié l'influence du CE lors d'une aversion olfactive conditionnée, Ferry et al. (1999) proposent une hypothèse fonctionnelle selon laquelle ce cortex modifierait la mémoire à court-terme des informations olfactives. En effet, ils ont constaté que sa lésion, lorsqu'elle est suivie d'une stimulation du Bla, rend l'apprentissage conditionné tolérant aux longs intervalles de temps entre la présentation de l'odeur et le malaise viscéral (Ferry et al., 1996).

Toutefois, une étude récente (Kaut et al., 2003) montre que, chez le Rat, des lésions entorhinales provoquent aussi un déficit à plus long-terme de la rétention de l'information olfactive, c'est à dire vingt-quatre heures ou cinq jours après l'opération.

◆ L'hippocampe

Si l'HC s'avère crucial dans les tâches de mémoire spatiale, son rôle dans les processus mnésiques olfactifs reste controversé dans la littérature.

Otto et Eichenbaum (1992b) montrent qu'une lésion du fornix n'empêche pas l'acquisition d'une tâche olfactive complexe de non appariement avec reconnaissance différée (cDNMS), résultat confirmé

Données Bibliographiques

par Hudon et al. (2002 ; 2003) qui précisent que l'effet de la lésion dépend du délai utilisé entre la présentation des stimulus et la phase de reconnaissance, ainsi que du degré de difficulté de la tâche. D'autre part, Li et al. (1999), ne constatent aucun déficit lors d'une tâche olfactive associative après lésions uni- ou bilatérale de l'HC, même si la mémoire spatiale est affectée. Kaut et Bunsey (2001) n'observent pas, non plus, de déficit majeur lors d'une tâche de discrimination olfactive après lésions neurotoxiques de cette structure. Enfin, Tronel et Sara (2002) ne mettent pas en évidence de modification de l'immunoréactivité à la protéine Fos dans l'HC après un apprentissage olfactif rapidement acquis ou son rappel. Ces travaux semblent donc indiquer une participation mineure de l'HC dans la mémoire olfactive.

Cependant, d'autres expérimentations apportent des données contradictoires. Ainsi, Hess et al. (1995a,b) observent une hétérogénéité du marquage *c-fos* par hybridation *in situ* dans les subdivisions CA1 et CA3 de l'HC à la suite d'une tâche de discrimination olfactive. D'autre part, dans le GD, l'analyse des potentiels évoqués polysynaptiques, à la suite d'un apprentissage de discrimination olfactive associant une odeur à une récompense hydrique, révèle une corrélation positive entre les changements de potentiels et la performance comportementale (Chaillan et al., 1999). En effet, la réponse monosynaptique du GD augmente immédiatement après la première session d'apprentissage puis disparaît rapidement en 24h. A l'inverse, une dépression synaptique dans cette structure devient significative seulement lors de la dernière session d'entraînement alors que l'apprentissage est bien consolidé (Truchet et al., 2002).

Vanderwolf (2001) souligne le fait que la réponse du GD, sous forme d'onde bêta, lors d'un comportement de flairage est spécifique des stimulus olfactifs et n'est pas induite par des signaux sensoriels visuel, auditif ou somesthésique. D'autre part, l'HC semble sensible à la valeur biologique du stimulus olfactif puisque, lors d'une tâche de discrimination olfactive, seul le stimulus olfacto-mimétique renforcé négativement entraîne une diminution de l'amplitude du potentiel de champ évoqué dans le GD (Mouly et al., 2001; Mouly et Gervais, 2002). Récemment, Knafo et al. (2004a) notent que la densité des épines dendritiques dans la subdivision CA1 augmente à la suite d'un apprentissage olfactif.

Desmukh et Bhalla (2003) constatent que les neurones hippocampiques des aires CA1 et CA3 répondraient de façon sélective à certains intervalles de temps séparant deux présentations d'une même odeur. L'HC garderait donc une trace du temps et interviendrait ainsi dans le phénomène d'habituation

Données Bibliographiques

olfactive. Précisons que les intervalles de temps ne dépassaient pas 160 secondes et qu'il s'agit donc de processus à court-terme. Ceci pourrait néanmoins conforter l'hypothèse avancée par Otto et Eichenbaum (1992b) selon laquelle l'HC contribuerait à une « mémoire de reconnaissance » en réalisant des comparaisons entre l'information courante et la représentation des stimulus stockés préalablement dans des structures parahippocampales et néocorticales. Ainsi, l'implication de l'HC dans les processus mnésiques olfactifs semble dépendre fortement du type de tâche à effectuer et des méthodes d'investigation employées, mais cette structure pourrait être importante dans les aspects temporels de l'apprentissage et de la mémorisation.

◆ **Le striatum ventral**

Le striatum ventral est une structure impliquée dans le circuit neuronal de la récompense; il intégrerait la valeur gratifiante d'un stimulus (Schultz et al., 2000; Carelli, 2002). Lors d'une expérience de discrimination olfactive de type « Go/No Go », Setlow et al. (2003) constatent que des neurones du striatum ventral répondent de façon sélective aux odeurs conditionnées, renforcées positivement ou négativement.

◆ **Le Néocortex frontal**

Tanabe et al. (1975), par enregistrement dans la région latéro-postérieure du COF chez le Singe vigile, montrent que la majorité des cellules répondent de façon sélective à une seule odeur. Chez le Rat, Eichenbaum et al. (1983) constatent qu'une lésion du cortex préfrontal (CPF) au niveau du sulcus rhinal provoque un déficit sélectif lors d'une tâche de discrimination olfactive type « Go/No Go ». Chez le macaque, l'enregistrement dans le COF pendant une discrimination olfactive, et au cours de l'inversion de cette tâche, indique que 68% des neurones modifient leur réponse après des changements d'association « odeur-récompense » (Rolls et al., 1996; Rolls, 2001). Ainsi, à la suite d'une tâche d'inversion, 25% d'entre eux inversent totalement leur réponse, mais dans 43% des cas on observe un phénomène d'extinction.

Des lésions du COF affectent l'acquisition d'une tâche olfactive de non appariement avec reconnaissance différée et cette structure serait surtout impliquée dans l'acquisition de la règle d'apprentissage (Otto et Eichenbaum, 1992a). Des lésions neurotoxiques bilatérales du COF provoquent un déficit de l'acquisition d'une tâche de discrimination olfactive de type « Go/No Go » ainsi que de son inversion (Schoenbaum et al., 2003a). Ce cortex semble donc principalement impliqué dans la mise en place de stratégies comportementales et participerait aux processus de prise de décision

Données Bibliographiques

et au traitement de l'information olfactive selon sa valeur de récompense (Schoenbaum et al., 1999). Yonemori et al. (2000) suggèrent en outre que les neurones de l'aire orbito-frontale jouent un rôle dans la manifestation comportementale d'une préférence olfactive en relation avec la dimension motivationnelle du stimulus.

A ce jour, peu d'études se sont penchées sur le rôle de la région infralimbique du cortex frontal dans la mémoire olfactive. Notons que, chez le Mouton, des expériences portant sur la reconnaissance olfactive mère-petit indiquent que le CPF médian serait plutôt impliqué dans la manifestation motrice du comportement de rejet d'un agneau étranger et n'interviendrait pas dans la formation de cette mémoire olfactive (Broad et al., 2002). Tronel et Sara (2003) soulignent l'implication des récepteurs NMDA du cortex prélimbique dans la phase précoce de consolidation d'une tâche de discrimination olfactive rapidement acquise.

B3- Les neuromédiateurs impliqués dans la mémoire olfactive

◆ Acétylcholine (ACh)

La mise en jeu des afférences cholinergiques inhiberait l'activité électrique au niveau des réseaux de fibres intrinsèques dans le CP (Hasselmo et Bower, 1990, 1992, 1993). Plusieurs études semblent indiquer que l'ACh interviendrait plutôt lors de l'acquisition de la tâche olfactive et serait moins impliquée ultérieurement. Ainsi, la scopolamine, antagoniste cholinergique, injectée en *i.p.* avant chaque session d'entraînement retarde l'acquisition de la règle d'apprentissage mais reste sans effet pour les apprentissages discriminatifs ultérieurs impliquant d'autres paires d'odeurs (Saar et al., 2001). De plus, son administration sous-cutanée suscite un déficit de l'habituation ou de la reconnaissance sociale basée sur les odeurs (Hunter et Murray, 1989). D'autre part, chez le Rat, un déficit de la mémoire à court-terme des odeurs est observé, que cette drogue soit appliquée en *i.p.* ou directement au niveau du BO (Ravel et al., 1992). Des études électrophysiologiques suggèrent que la neuromodulation cholinergique pourrait réduire des interférences entre les odeurs au cours d'une discrimination et éviterait que des souvenirs antérieurs ne perturbent l'acquisition de nouvelles informations (Hasselmo et Bower, 1992, 1993). Les données de De Rosa et Hasselmo (2000) confortent cette hypothèse. Des rats entraînés initialement à discriminer une paire (A vs B) d'odeurs reçoivent une injection de scopolamine et sont soumis à une nouvelle tâche discriminative avec une nouvelle paire partiellement recouvrante à la première (A vs C) ou non (C vs D). Ils présentent alors un déficit d'acquisition de la

Données Bibliographiques

tâche plus important dans le premier cas que dans le second. Wilson (2001) précise que l'administration systémique ou intrabulbaire de scopolamine n'affecte ni l'activité spontanée ni l'activité évoquée par des odeurs dans le CPa, mais augmente significativement l'habituation croisée entre des alcanes différents de deux à quatre carbones. La scopolamine pourrait donc affecter, de façon sélective, la discrimination entre des odeurs structurellement proches. D'autre part, la lésion de la bande diagonale de Broca (Roman et al., 1993b) ou des injections pharmacologiques d'antagonistes cholinergiques (Ravel et al., 1994) montrent que l'ACh influence la performance d'un conditionnement olfactif avec appariement différé chez le Rat. Ainsi, les performances des rats diminuent après lésion lorsque le délai entre les essais dépasse les 15 secondes. Pour des délais plus courts, les animaux réussissent mieux la tâche de discrimination olfactive mais oublient rapidement. Par application systémique de physostigmine, inhibiteur de la cholinestérase, la discrimination entre deux odeurs de structures voisines s'améliore (Doty et al., 1999). A l'inverse, la lésion des afférences cholinergiques bulbaires ou piriformes par l'utilisation des IgG-saporines, affecte la capacité de discrimination des odeurs de structure chimique voisine sans que celle des odeurs de structure différente ne soit modifiée (Linster et al., 2001). L'ensemble de ces travaux souligne bien l'influence de la neuromodulation cholinergique sur la capacité de discrimination olfactive.

D'autres études portent sur l'importance de la neuromodulation cholinergique de la PLT dans le CP. L'addition *in vitro* d'un agoniste cholinergique, le carbachol, induit une PLT associative dans le CP par suppression, semble-t-il, de l'inhibition intrinsèque (Patil et al., 1998). Zimmer et al. (1999) enregistrent, *in vivo*, les réponses des cellules pyramidales du CP à des stimulations simultanées du TOL et de la bande diagonale de Broca. L'activation des afférences cholinergiques augmente l'excitabilité directe des cellules pyramidales probablement par un mécanisme désinhibiteur, puisque la stimulation de la bande diagonale de Broca diminue l'inhibition GABAergique. Par la méthode des colorants potentiel-dépendants, Rosin et al. (1999) montrent que la stimulation électrique préalable du télencéphale basal induit une inhibition de l'activité du CP en réponse à la stimulation du BO qui suit. Cet effet est surtout marqué au niveau des fibres intrinsèques.

◆ Acide gamma-aminobutyrique (GABA)

Kanter et Haberly (1993) montrent que la PLT associative, induite *in vitro* dans le CP par stimulation simultanée des fibres afférentes et intrinsèques, ne peut apparaître qu'après blocage de la transmission gabaergique par la bicuculline. Le CP contient des interneurons gabaergiques qui

Données Bibliographiques

pourraient participer à des circuits locaux inhibiteurs, régulant ainsi la propagation de l'activité olfactive afférente et sa redistribution via les fibres d'association (Ekstrand et al., 2001).

◆ **Noradrénaline (Nad)**

Dans le BO, les afférences noradrénergiques issues du locus coeruleus (LC) semblent nécessaires à l'apprentissage olfactif (Gervais et al., 1988). Une injection intrabulbaire de propranolol, antagoniste noradrénergique, induit de façon spécifique un déficit dans la rétention à long-terme des informations olfactives sans affecter l'acquisition d'une nouvelle tâche (Mouly et al., 1990). D'autre part, la stimulation intrabulbaire des récepteurs bêta-noradrénergiques ou celle du LC lors de la présentation d'une odeur, induirait une préférence pour cette odeur chez des rats (Sullivan et al., 2000). Notons que, Mouly et al. (1990) montrent que l'infusion intrabulbaire de propranolol, antagoniste noradrénergique, lors d'un conditionnement olfactif induit un déficit sévère de la mémoire à long-terme de la tâche. Cependant, dans cette étude, l'effet neuromodulateur de la Nad sur la mémoire ne peut être attribué à un blocage sélectif des récepteurs bêta-noradrénergiques puisque l'infusion intrabulbaire d'une solution saline contenant de l'ascorbate, solution véhicule du propranolol, provoque les mêmes déficits tandis qu'une solution saline sans ascorbate reste, elle, sans effet. Dans cette expérimentation, l'effet de la Nad sur la mémoire olfactive reste à préciser.

Hasselmo et al. (1997) montrent, sur tranches de CP de Rat que la Nad supprime les potentiels post-synaptiques excitateurs intrinsèques dans la couche Ib. L'élévation du niveau de Nad par le LC permettrait, d'après les auteurs, d'augmenter l'influence des afférences extrinsèques sur la trace mnésique. Sara (1985) avait d'ailleurs déjà indiqué que la Nad augmenterait le rapport signal/bruit lors du traitement de l'information au niveau cérébral. Chez le Rat anesthésié, Bouret et Sara (2002) stimulent le LC et constatent que la Nad augmente les réponses des neurones du CP à une stimulation olfactive, en particulier lorsque les odeurs acquièrent une valeur de récompense. En permettant un traitement des odeurs plus efficace, l'activation des neurones du LC participerait ainsi à l'apprentissage olfactif.

◆ **Glutamate : les récepteurs NMDA**

Kanter et Haberly (1990) montrent que la PLT associative induite dans le CP est dépendante des récepteurs NMDA. Or, ceux-ci joueraient un rôle dans le processus de consolidation et permettraient la formation de la mémoire olfactive à long-terme (Barkai et Saar, 2001). Plus récemment, par administration d'antagoniste de ces récepteurs dans le CP, il apparaît qu'ils seraient impliqués dans les

Données Bibliographiques

phénomènes de plasticité neuronale chez l'adulte (Nacher et al., 2002). Enfin, Tronel et Sara (2003), en les bloquant au niveau du cortex prélimbique, constatent qu'ils interviendraient dans la phase précoce de consolidation d'une tâche de discrimination olfactive.

◆ **Sérotonine**

Selon Marchetti et al. (2000), la sérotonine jouerait un rôle important dans les processus d'apprentissage et de mémorisation lors d'une tâche de discrimination olfactive de type « Go/No Go » chez le Rat. En effet, si l'injection i.p. d'un agoniste sérotoninergique, au début de la troisième session d'entraînement, améliore la performance de l'animal dans les sessions suivantes, celle d'un antagoniste perturbe la mise en place de l'apprentissage.

En conclusion de ce premier chapitre, le CP possède des caractéristiques anatomiques et fonctionnelles qui soutiennent l'hypothèse d'un rôle important de ce dernier dans les processus mnésiques. Cependant les mécanismes précis et l'étendue de son implication dans l'apprentissage et la mémoire olfactifs restent encore aujourd'hui méconnus.

C – Le proto-oncogène *c-fos*

C1 – *c-fos* : un gène de la famille des gènes précoces immédiats

La mémorisation implique des modifications fonctionnelles et structurales des réseaux neuronaux, basées sur l'activation de gènes et la synthèse de protéines. La stimulation d'un neurone peut mettre en jeu certains récepteurs (NMDA par exemple) qui activent les cascades de signalisation intracellulaire (**Figure 10**) : un second messager tel le calcium ou l'AMP cyclique (AMPC) va agir sur une protéine kinase, capable de phosphoryler des facteurs de transcription constitutifs (FTC) comme la protéine « cAMP-response-element-binding » (CREB).

A la suite d'une stimulation, les FTC initient la transcription, rapide et transitoire, de gènes précoces immédiats (IEGs), efficaces même en l'absence de synthèse *de novo* de protéine (Sheng et Greenberg, 1990; Herdegen et Leah, 1998).

Les IEGs sont divisés en deux classes principales : les gènes effecteurs, codant des protéines structurales (comme la protéine Arc « activity-regulated cytoskeletal associated gene »), et les gènes codant des facteurs de transcription inductibles (FTI) qui vont agir sur des gènes qualifiés de « tardifs »

Données Bibliographiques

(Platenik et al., 2000). Parmi les IEGs, le gène *c-fos* code un FTI : la protéine Fos (Herdegen et Leah, 1998).

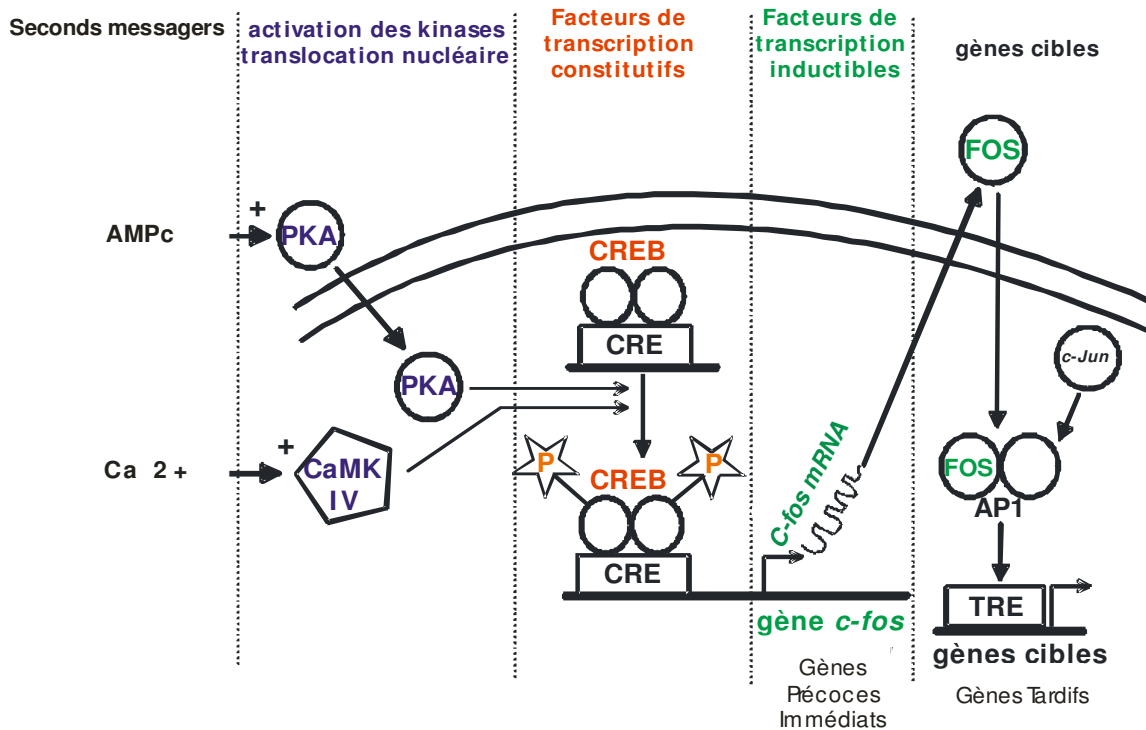


Figure 10 : Schéma représentant la cascade de signalisation conduisant à l'expression de la protéine Fos (d'après Platenik et al., 2000)

C2 - Le proto-oncogène *c-fos* code un facteur de transcription inducible

Le gène *c-fos*, caractérisé en 1984 (Curran et Verma, 1984), est un proto-oncogène ; il représente l'équivalent cellulaire du gène viral « *v-fos* », identifié comme l'oncogène du virus de l'ostéosarcome murin Finkel-Biskis-Jenkins (FBJ-MSV) (Curran et Teich, 1982). Il code la protéine Fos, constituée de 380 acides aminés de 55 à 62 KDa, qui ne peut se lier à l'ADN que sous la forme d'un hétérodimère. Les protéines Fos et Jun vont se dimériser pour former le complexe AP-1 (« protéine activatrice 1 »). Ce complexe reconnaît et se lie à une séquence particulière de l'ADN, la séquence TRE, régulant ainsi l'expression de gènes cibles dits « tardifs » (Herdegen et Leah, 1998 ; Chaudhuri et al., 2000).

C3 - Conditions d'expression de Fos

- Second messenger

Dans la cascade intracellulaire déclenchée à la suite d'une stimulation, plusieurs seconds messagers sont capables d'induire l'expression de *c-fos* (Morgan et Curran, 1990). Trois catégories de messagers ont été identifiées impliquant : l'AMPc (Greenberg et al., 1985), la protéine kinase C (PKC) (Greenberg et al., 1986a) ou la calmoduline dépendante du calcium (Morgan et Curran, 1986; Morgan et Curran, 1991). Morgan et Curran (1991) précisent que d'autres voies de signalisation peuvent être mises en jeu puisque certains ligands, notamment les facteurs de croissance, n'utilisent pas exclusivement les seconds messagers classiques.

- Cinétique - décours temporel:

L'activation de la transcription de *c-fos* débute 5 à 10 minutes après la stimulation cellulaire (Greenberg et Ziff, 1984; Greenberg et al., 1985). La quantité d'ARN messenger est maximale au bout de 30 à 40 minutes, celle de la protéine autour de 90 minutes selon Müller et al. (1984). La demi-vie de l'ARN messenger est de 12 minutes, alors que celle de la protéine est de 2 heures environ (Chaudhuri et al., 2000).

C4 – Fos : un marqueur d'activité et de plasticité

◆ Marqueur d'activité cellulaire

La détection de l'ARNm *c-fos* par hybridation *in situ* ou l'immunohistochimie de la protéine Fos sont des outils permettant de cartographier l'activité cérébrale (Hunt et al., 1987; Morgan et al., 1987; Sagar et al., 1988; Dragunow et Faull, 1989; Herrera et Robertson, 1996). Après une stimulation électrique délivrée dans le cortex sensori-moteur du Rat on observe une bonne corrélation entre les motifs de marquage métabolique obtenus par l'utilisation du 2-désoxyglucose (2-DG) et l'immunoréactivité de Fos (Sagar et al., 1988; Sharp et al., 1989). L'immunocytochimie de Fos présente toutefois un avantage par rapport au marquage métabolique puisque la résolution est nucléaire.

In vitro, de nombreux types de stimulus comme des neurotransmetteurs (Greenberg et al., 1986b), des facteurs de croissance (Curran et Morgan, 1985; Ferhat et al., 1993) ou encore une dépolarisation induite par du KCl (Bartel et al., 1989) peuvent induire l'expression de Fos.

Données Bibliographiques

In vivo, si le taux basal de Fos reste relativement limité dans le système nerveux adulte (Herdegen et Leah, 1998), de nombreux stimulus d'origines très diverses vont entraîner son expression (Herrera et Robertson, 1996). Par exemple, un traumatisme cérébral mécanique entraîne une augmentation significative de l'immunoréactivité « Fos-like » au niveau des cortex cingulaire et piriforme (Dragunow et Robertson, 1988). D'autre part, une ischémie cérébrale, globale (Jorgensen et al., 1989) ou locale (Herrera et Robertson, 1989), se traduit aussi par une induction de *c-fos* dans ces mêmes régions corticales ainsi que dans la subdivision CA1 de l'HC. Une crise d'épilepsie induite chimiquement provoque une expression massive de Fos dans ces mêmes cortex ainsi que dans les cellules granulaires du GD (Dragunow et Robertson, 1987). D'autres études, menées sur le stress (Smith et al., 1992) ou le cycle circadien (Schwartz et al., 1994) utilisent également *c-fos* comme outil de cartographie. Enfin, Chaudhuri et al. (2000) constatent que, lors de l'exposition à la lumière, l'expression de la protéine Fos dans le système visuel du Rat augmente avec le degré d'intensité lumineuse. Cette expression semble donc modulable et très sensible aux variations du stimulus.

◆ Marqueur de plasticité

Kaczmarek et al. (1988), Sonnenberg et al. (1989) et Platenik et al. (2000) montrent que l'activation des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, impliqués dans la PLT, suscite une entrée de calcium à l'origine de l'expression de Fos. De plus, la PLT déclenche une augmentation transitoire de l'expression de *c-fos* dans le GD (Abraham et al., 1991). Des études portant sur le comportement animal semblent indiquer que ce proto-oncogène serait nécessaire aux processus d'apprentissage et de mémorisation et serait impliqué dans la formation de la mémoire à long-terme (Robertson, 1992; Kaczmarek, 1993; Tischmeyer et Grimm, 1999; Kaczmarek, 2000). Il faut toutefois noter que chez des animaux anesthésiés, l'induction d'une PLT dans le GD n'entraîne pas d'activation de *c-fos* (Douglas et al., 1988). L'aversion gustative conditionnée acquise entraîne une expression de Fos dans plusieurs aires cérébrales comme le noyau du tractus solitaire, l'hypothalamus ou le système limbique (Houpt et al., 1994; Sakai et Yamamoto, 1997). Il faut noter que la peur, qu'elle soit associée (peur conditionnée) ou non à un contexte, conduit également à une forte expression de *c-fos* dans l'AMYG (Campeau et al., 1991).

Dans la majorité des cas, l'apprentissage d'une tâche entraîne une synthèse accrue de Fos. Chez le Poulet, lors d'une tâche d'évitement passif consistant à distinguer des graines mangeables de graviers

Données Bibliographiques

non comestibles, on observe une augmentation de 4 à 5 fois de la quantité de *c-fos/c-jun* et de leur protéine correspondante dans l'hyperstriatum. Cette augmentation est plus importante chez les animaux qui apprennent rapidement mais n'apparaît pas chez les animaux qui ne consolident pas la tâche (Freeman et Rose, 1995). Chez ce même animal, une exposition d'une heure dans un environnement enrichi induit une augmentation significative de l'ARNm de *c-fos* au niveau du cervelet et de l'hyperstriatum ventral. Après plus de deux jours d'adaptation à cet environnement, cette augmentation n'est plus observée. Ceci indique que l'induction du *c-fos* est particulièrement sensible à la nouveauté du stimulus (Anokhin et Rose, 1991). Montag-Sallaz et al. (1999) retrouvent des résultats similaires chez la Souris. Chez le Rat, l'apprentissage d'une tâche d'évitement actif élève l'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'HC chez des animaux conditionnés mais aussi pseudo-conditionnés (Tischmeyer et al., 1990 ; Nikolaev et al., 1992).

Il faut souligner que le conditionnement peut également réduire la quantité de protéine Fos. Lors de l'apprentissage du réflexe de la membrane nictitante chez le Lapin, les animaux conditionnés présentent un marquage du noyau trigéminale plus faible par rapport aux animaux pseudo-conditionnés (Irwin et al., 1992). Par ailleurs, le nombre de cellules marquées dans le LC est moins important lorsqu'un son (stimulus conditionnel) est apparié à une stimulation tactile de l'œil (stimulus inconditionnel) que lors d'une présentation non appariée des deux stimulus (Carrive et al., 1997).

L'utilisation de la méthode d'oligonucléotides modifiés (ODNs) anti-*c-fos*, a permis de mettre en évidence chez le Rat l'implication de ce proto-oncogène dans les processus mnésiques. En effet, une micro-injection de ODNs anti-*c-fos* dans l'AMYG, effectuée plusieurs heures avant l'acquisition d'une aversion gustative, altère sa rétention lorsque l'animal est testé 3 à 5 jours plus tard (Lamprecht et Dudai, 1996). Dans une expérience où un choc électrique est associé à un stimulus visuel, Grimm et al. (1997) constatent que l'injection intrahippocampale de ces ODNs anti *c-fos*, 2 à 10 heures avant le conditionnement, réduit de façon très importante l'immunoréactivité de Fos dans les régions limbiques. De plus, ceci ne perturbe pas l'acquisition de la tâche mais affecte la rétention mnésique testée 24 heures plus tard. De même, une injection dans les régions infra- et pré- limbiques de ces mêmes ODNs 12 heures avant l'acquisition d'un conditionnement associatif « son/choc » supprime l'induction de l'immunoréactivité de Fos mesurée à la fin de l'apprentissage sans affecter le comportement au cours de l'acquisition du test. La réponse comportementale est perturbée lors du test de rétention effectué 3 jours plus tard (Morrow et al., 1999). Ainsi une injection de ODNs anti *c-fos* quelques heures avant la phase d'acquisition affecterait la consolidation de la mémoire. Ceci est confirmé par l'administration

Données Bibliographiques

intrahippocampale d'ODNs anti *c-fos*, qui perturbe la formation de la mémoire à long-terme sans affecter l'acquisition et la mémoire à court-terme (Guzowski, 2002).

Enfin, notons que l'un des gènes cibles de la protéine Fos est la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme de synthèse des neurotransmetteurs catécholaminergiques comme la Nad, dont nous avons décrit l'importance dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire (paragraphe B3). Or, Sun et Tank (2003) signalent que l'induction *in vitro* de *c-fos* est nécessaire pour une stimulation maximale du gène de la TH en réponse à de nombreux stimulus. Ceci pourrait constituer un argument de plus en faveur de l'implication de ce proto-oncogène dans les processus mnésiques.

Ainsi les études comportementales ou à l'échelle cellulaire semblent indiquer que *c-fos* est un outil pertinent pour cartographier l'activité cérébrale (Herrera et Robertson, 1996) au cours des processus d'apprentissage et de mémoire.

◆ L'outil Fos et la mémoire olfactive

Dans de nombreuses études, la mémorisation des signaux olfactifs provoque une forte induction de *c-fos* au niveau cérébral. Ainsi, chez les Souris femelles, pendant les 4 heures suivant l'accouplement, période durant laquelle se met en place, une mémoire pour les phéromones du mâle, la protéine Fos est présente en quantité plus importante dans les cellules du bulbe olfactif accessoire (Brennan et al., 1992). D'autre part, l'association d'une odeur à une stimulation tactile chez de jeunes rats, entraîne une expression de Fos dans la couche glomérulaire du BO (Johnson et al., 1995). Hess et al. (1995a et b) examinent chez le Rat le taux d'expression de l'ARNm de *c-fos* par hybridation *in situ* lors d'une tâche de discrimination olfactive à renforcement positif. Ils observent, au niveau de l'HC, une modification de l'expression de *c-fos* dans l'hippocampe en fonction du niveau d'entraînement (depuis la seule exploration du contexte expérimental jusqu'au conditionnement) des animaux. D'autre part, l'hybridation *in situ* de ce même ARNm a permis de mettre en évidence des changements liés à la formation d'une mémoire olfactive dans la reconnaissance mère-petit chez la brebis (Da Costa et al., 1997). En effet, chez les brebis ayant eu un contact avec leur agneau après la naissance, les auteurs observent une augmentation significative de l'expression de *c-fos* dans le cortex cingulaire, le BO, le CP et le COF.

Données Bibliographiques

Funk et Amir (2000) montrent qu'à la suite d'un apprentissage associant une odeur et un choc électrique, la présentation du stimulus conditionnel olfactif induit une augmentation de l'expression de la protéine Fos dans diverses structures olfactives. Montag-Sallaz et Buonviso (2002) montrent que le taux d'ARNm de *c-fos* augmente dans certaines régions du BO à la suite d'une première exposition à l'odeur. Toutefois, l'exposition répétée (familiarisation) à cette odeur induit une diminution du marquage. Enfin, après un apprentissage olfactif associatif renforcé positivement par de la nourriture et acquis en quelques essais seulement, Tronel et Sara (2002) observent que l'immunoréactivité de Fos augmente dans le cortex frontal et le Bla. Les auteurs constatent que cette augmentation est spécifiquement induite par l'apprentissage associatif. Le rappel de la tâche olfactive 24h plus tard n'engendre pas de modifications de l'expression de Fos dans ces structures.

A l'évidence, le proto-oncogène *c-fos* est induit rapidement et transitoirement en réponse à de nombreux stimuli. La détection immunohistochimique de la protéine Fos est couramment utilisée comme outil de cartographie de l'activité cérébrale mais elle pourrait également rendre compte de phénomènes de plasticité cérébrale qui sous-tendent la mémoire olfactive.

Chapitre III - Position du problème

Position du problème

Le but de notre étude est de mieux appréhender l'implication fonctionnelle du CP dans les processus d'apprentissage et de mémoire olfactifs. En effet, si certains éléments anatomiques (Haberly, 1985; Haberly et Bower, 1989) et fonctionnels (Litaudon et al., 1997a) permettent de désigner le CP comme un candidat privilégié dans le traitement de l'information olfactive lors des processus mnésiques, son rôle précis demeure encore mal connu. Jusqu'alors, les études fonctionnelles, principalement électrophysiologiques, montrent, dans le CP, des modifications induites par un apprentissage olfactif et une hétérogénéité fonctionnelle antéro-postérieure (Roman et al., 1987; Roman et al., 1993a; Litaudon et al., 1997a; Saar et Barkai, 2003). Le CPp apparaît plus particulièrement impliqué dans le processus de mémorisation (Litaudon et al., 1997a).

Nous voulons, d'une part, examiner si les subdivisions du CP sont mises en jeu différemment dans le traitement mnésique de l'information olfactive et, d'autre part, comprendre l'implication de ce cortex au cours des différentes phases d'apprentissage et de mémorisation.

Pour ce faire, nous combinons une approche comportementale, un test de conditionnement opérant olfactif, avec une méthode de neuroanatomie fonctionnelle, la détection immunocytochimique de la protéine Fos qui permet d'analyser les phénomènes d'activation neuronale et de plasticité relatifs à l'apprentissage et la mémoire (Herrera et Robertson, 1996; Herdegen et Leah, 1998) (voir le chapitre II -C).

Tout d'abord, nous avons observé l'expression de Fos dans le CP lorsque des animaux ont acquis une tâche de discrimination olfactive dans un labyrinthe à quatre branches afin de vérifier si un tel apprentissage modifie le motif d'activation cérébral chez les animaux conditionnés par rapport à des animaux témoins, pseudo-conditionnés ou contrôles de base.

Puis, nous avons choisi d'observer le marquage induit par la stimulation odorante seule, celle-ci ayant, ou non, acquis une valeur de récompense. Il a en effet été montré que la signification des odeurs pouvait induire des réponses électrophysiologiques différentes au niveau bulbaire, certainement sous l'influence d'une modulation centrale (Cattarelli et al., 1977).

La tâche comportementale que nous employons nécessite plusieurs jours successifs d'entraînement pour être maîtrisée par les rats. Nous avons donc décidé de prendre en compte le caractère progressif de cet apprentissage et avons cartographié l'activation cérébrale de Fos à l'issue de la première, de la quatrième session d'entraînement et à la suite de l'acquisition de la tâche. Parce qu'il a été proposé une

Position du problème

mise en jeu transitoire de l'HC et du néocortex au cours du phénomène de consolidation (Bontempi et al., 1999), l'observation du marquage dans ces structures est importante dans cette étude.

Enfin, après s'être intéressé aux modifications cellulaires induites à la suite et au cours de la mise en place de l'apprentissage nous avons mené une expérimentation portant sur le rappel de la tâche de discrimination olfactive. Nous avons comparé alors les immunoréactivités Fos suscitées par l'apprentissage olfactif ou par sa réactivation à la suite d'une session dans le labyrinthe après un arrêt de 10 jours. Là encore, il était nécessaire d'analyser le marquage Fos dans l'HC et le néocortex frontal, structures impliquées dans les phénomènes de rappel (Sara, 2000; Nader, 2003).

Chapitre IV - Méthodologie

A - Les animaux

Nous utilisons des rats mâles Wistar IOPS (indemnes d'organismes pathogènes spécifiques) pesant 200 à 220 g à leur arrivée au laboratoire. L'expérimentateur les place dans des cages individuelles, puis les manipule chaque jour pendant deux semaines avant le début du conditionnement afin de les acclimater à leur nouvel environnement et de limiter le stress. L'utilisation des signaux olfactifs dans le choix explicite de l'orientation spatiale du Rat dépend de la présence ou de l'absence de lumière (Lavenex et Schenk, 1996). D'autre part, l'expression de Fos suit le cycle circadien, avec un taux d'expression plus important pendant la nuit lors de la phase d'activité des rats (Grassi-Zucconi et al., 1993). Nous avons donc décidé de soumettre ces animaux à un cycle nyctéméral jour/nuit inversé dès leur arrivée. Ainsi, nous conditionnons puis sacrifions les animaux pendant la phase nocturne.

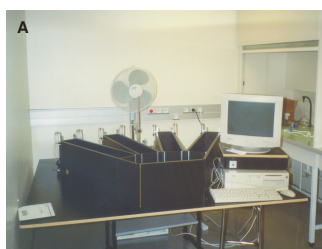
B - Le test d'apprentissage discriminatif olfactif

Nous utilisons une tâche de discrimination olfactive. Une odeur et une récompense hydrique constituent les stimulus conditionnel et inconditionnel respectivement.

Les rats, placés en restriction hydrique deux jours avant le conditionnement et pendant toute sa durée, n'ont accès à un biberon d'eau que 10 minutes par jour.

C - Dispositif expérimental

Il s'agit d'une labyrinthe constitué de quatre branches, chacune étant munie d'une porte d'entrée à guillotine (**Figure**



11). A l'extrémité de chaque branche, deux tuyaux délivrent chacun l'une des deux odeurs d'une paire A, B. Lors d'un essai de conditionnement, à chaque essai, on délivre l'odeur A et l'odeur B de façon aléatoire dans deux des quatre branches du labyrinthe afin d'éviter que l'animal ne se repère spatialement. Les rats effectuent 20 essais quotidiens successifs. Un essai dure 17

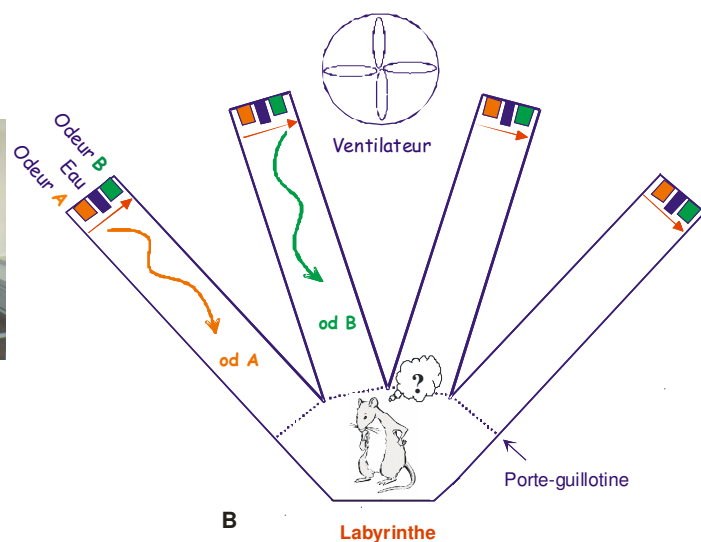


Figure 11 : Photographie (A) et schéma (B) du dispositif expérimental

Méthodologie

secondes. Nous plaçons le rat dans la salle de départ pendant 7 secondes puis nous ouvrons les portes des deux branches où sont délivrées les odeurs A et B. Il reste alors 10 secondes à l'animal pour effectuer son choix et atteindre l'extrémité d'une branche. Au bout de chaque branche, une cellule photoélectrique permet d'interrompre l'essai lors du passage de l'animal et de délivrer ou non une récompense hydrique (Saar et al., 1998). Seule l'odeur A est récompensée. On considère qu'un rat a acquis la tâche de discrimination lorsqu'il atteint un score de 80% de choix correctes sur une session de 20 essais. Entre chaque essai, le ventilateur se déclenche afin d'éliminer les odeurs. Excepté l'ouverture des portes à guillotine, le fonctionnement du labyrinthe (choix des branches et des odeurs, arrivée des odeurs à l'aide d'un compresseur, délivrance de la récompense hydrique, ventilation, enregistrement du score) est automatisé (logiciel Labview).

D- Immunocytochimie de la protéine Fos

◆ Perfusion et coupes histologiques

Nous anesthésions les rats profondément avec de l'équithésine (4 ml/kg, i.p) 90 minutes après le début du conditionnement, ce délai étant nécessaire à l'expression optimale de Fos (Chaudhuri et al., 2000). Nous les perfusions à l'aide d'une canule intracardiaque avec 100 ml de Ringer lactate hépariné, afin de chasser le sang, puis avec 500 ml d'une solution de fixateur (paraformaldéhyde 4 %, glutaraldéhyde 0,1 %, acide picrique 0,2 %). Après avoir prélevé le cerveau, nous le plaçons dans une solution de post-fixateur (paraformaldéhyde 2%, acide picrique 0.2%) pendant 12 heures à 4° C puis dans une solution de cryoprotection (tampon phosphate contenant 30 % de sucrose) pendant 48 heures. Après ce délai, nous congelons le cerveau dans de l'isopentane refroidi à -55° C grâce à de l'azote liquide et le coupons à une épaisseur de 25 µm. Nous récupérons les coupes sériées dans les puits d'une boîte de microtitration et les rinçons 3 fois 10 minutes dans une solution de tampon phosphate afin d'éliminer le fixateur. Elles sont ensuite stockées dans du tampon phosphate contenant de l'azide (PBST-Azide).

◆ Immunohistochimie

Nous avons opté pour l'immunocytochimie indirecte avec une étape d'amplification afin d'augmenter la sensibilité de notre méthode (**Figure 12**). La détection de la protéine Fos comporte plusieurs étapes successives :

Méthodologie

1-Blocage de l'activité des peroxydases endogènes en ajoutant un excès de substrat, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

2-Blocage des sites non spécifiques d'adsorption passive des anticorps primaires par incubation des coupes pendant deux heures dans du sérum de chèvre (Normal goat serum, référence n° S1000;Vector).

3-Reconnaissance de la protéine Fos par un anticorps primaire polyclonal spécifique fabriqué chez le lapin (AB-5 ; Oncogène Science) (dilution 1/5000^{ème}, incubation 2 jours, 4°C excepté dans l'article « Datiche et al. 2001 » : dilution 1/10000^{ème}, incubation 4 jours, 4°C). Notons qu'un certain nombre de protéines dites FRAs (pour « Fos Related Antigen ») partagent des épitopes avec Fos. Pour s'assurer d'une détection spécifique de la protéine Fos et non d'une protéine voisine (Fos-like) par immunodétection, il est important de choisir un anticorps adéquat. L'anticorps que nous utilisons est dirigé contre la région N terminale, au niveau des résidus 2 à 16 qui sont spécifiques (Herrera et Robertson, 1996).

4-Addition d'un anticorps secondaire biotinylé, fabriqué chez la chèvre et dirigé contre l'anticorps primaire, sur lequel une molécule de biotine est fixée (Vector Laboratories) (dilution 1/1000^{ème}, incubation 24 heures, 4°C).

5-Fixation, par l'intermédiaire de la biotine du complexe ABC (mélange de molécules d'avidine et de peroxydases de raifort biotinylées) (kit ABC Elite ; Vector Laboratories) sur l'anticorps secondaire. Ce système amplificateur permet d'augmenter la sensibilité de la méthode.

6-Révélation de la peroxydase du raifort par son action sur son substrat, le peroxyde d'hydrogène, en présence d'un chromogène, la diaminobenzidine (DAB) couplée au nickel afin de donner un précipité noir.

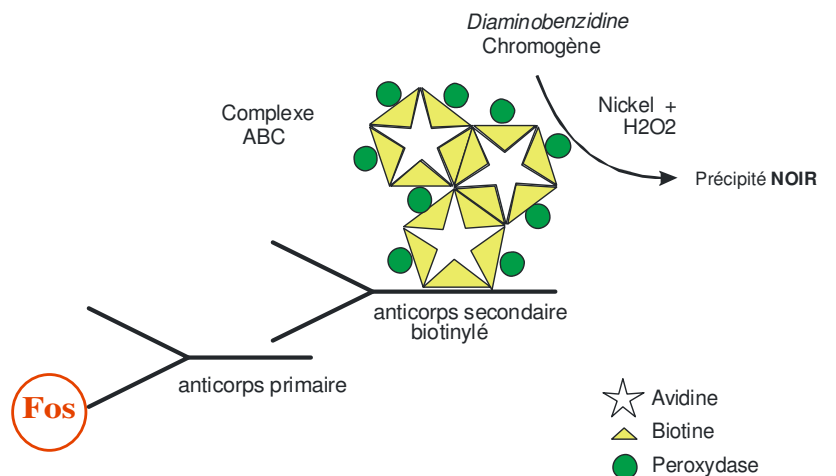
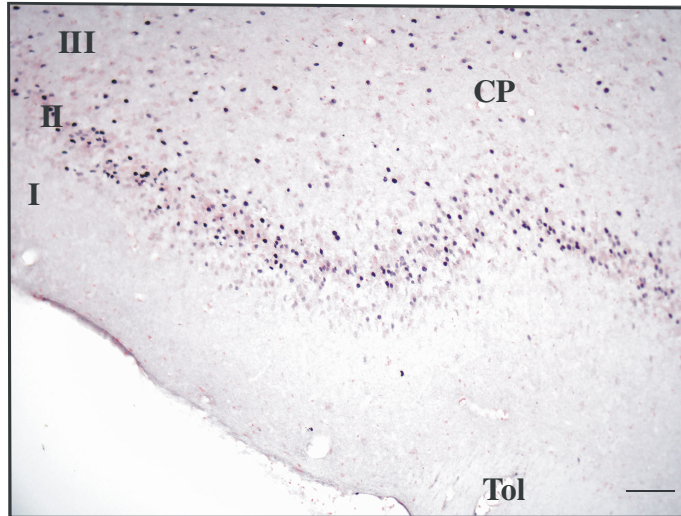


Figure 12 : Principe de la détection immunohistochimique de la protéine Fos

Méthodologie

Nous montons ensuite les coupes sur des lames gélatinées. Après coloration au rouge neutre, déshydratation dans plusieurs bains d'alcool (70, 90, 100°) et éclaircissement dans deux bains de xylène, nous les recouvrons d'un milieu de montage et d'une lamelle. Nous les observons ensuite à l'aide d'un microscope photonique (**Photographie 2**).



I,II,III: couches du cortex piriforme (CP)
Tol: tractus olfactif latéral
— : 100µm

Photographie 2 : Illustration de l'immunoréactivité à la protéine Fos dans le CP de Rat - coupe colorée au rouge neutre-

◆ Analyse des résultats et statistiques

Nous déterminons les différentes régions cérébrales d'intérêt présentant une immunoréactivité à la protéine Fos à l'aide de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (1986). Grâce à une caméra fixée sur le microscope et à l'aide du logiciel Photoshop, nous acquérons les images des coupes cérébrales.

Nous effectuons ensuite une analyse quantitative du marquage Fos à l'aide du logiciel Optilab (Graftek) qui permet un comptage automatique des cellules immunoréactives. Pour chaque rat, l'étude de l'expression de Fos dans le CP porte sur huit niveaux antéro-postérieurs de coupes coronales répartis sur toute la longueur de cette aire (+12.7mm, +11.7mm, +10.7mm, +9.7mm, +8.7mm, +7.7mm, +6.7mm, +5.7mm par rapport à la ligne interaurale choisie comme origine). Le CP est divisé en deux régions antérieure (CPa) et postérieure (CPp), qui correspondent aux 4 premiers et aux 4 derniers niveaux de coupe respectivement. Les comptages des cellules immunoréactives dans l'HC, l'habenula

Méthodologie

latérale, l'IL et le VLO/LO s'effectuent aux niveaux +5.7mm, +6.7 mm, +11.7 mm et 12.7mm respectivement.

Nous effectuons une étude statistique de nos résultats en réalisant une analyse de variance à une ou deux voies selon la nature des données suivie d'un test de Student-Newmann-Keuls à l'aide du logiciel SAS (version 6.12). Le degré de significativité utilisé est $p < 0.05$.

Chapitre V – Données originales

Données originales

A- Effet de l'apprentissage de la tâche de discrimination olfactive sur l'expression de la protéine Fos dans le CP

Données originales

Résumé :

Notre but est d'examiner si un apprentissage discriminatif olfactif peut induire des modifications de l'activation cellulaire dans le CP. Nous conditionnons des rats (T) à une tâche de discrimination olfactive dans le labyrinthe à quatre branches. Ces animaux, préalablement placés en restriction hydrique, sont entraînés tous les jours à associer une des odeurs d'une paire à une récompense hydrique. Nous utilisons également des animaux pseudo-conditionnés (P), soumis à une restriction hydrique, et récompensés de façon aléatoire pour l'une ou l'autre des deux odeurs dans le labyrinthe. Nous examinons l'expression de Fos chez des rats naïfs (N), non assoiffés et placés chaque jour dans le labyrinthe, sans aucune stimulation olfactive. Enfin, des rats contrôle de base (C), soumis (C-) ou non(C+) à une restriction hydrique et ne quittant jamais leur cage, nous permettent de déterminer le niveau basal d'expression de Fos.

Lorsque les rats atteignent un score de 80% de choix corrects, ils effectuent le jour suivant une session de 20 essais dans le labyrinthe et sont sacrifiés une heure plus tard pour procéder à la détection immunohistochimique de la protéine Fos. Un rat de chaque groupe (T, P et N) sont sacrifiés le même jour.

Nous n'observons pas de différence d'immunoréactivité entre les deux groupes de contrôles (C+ et C-) qu'ils soient en restriction hydrique ou pas. Dans le CP, les animaux T, P et N présentent une immunoréactivité plus importante par rapport aux rats C ainsi qu'une diminution antéro-postérieure de l'expression de Fos. Sur le plan comportemental, 2 groupes de rats T se distinguent selon leur vitesse d'acquisition de la tâche de discrimination olfactive. Ainsi, certains rats que nous qualifions de « rapides » acquièrent la tâche de discrimination en 7 à 8 jours, d'autres dits « lents » en 12 à 13 jours. L'expression de Fos dans le CP ainsi que la diminution antéro-postérieure de l'immunoréactivité sont significativement plus importantes chez les rats « lents » par rapport aux « rapides ». Nous pouvons faire l'hypothèse que ce marquage Fos moins abondant traduirait un réseau neuronal plus focalisé chez les rats T « rapides », résultant peut-être d'un niveau d'attention plus élevé et plus sélectif par rapport aux rats « lents ». L'hétérogénéité antéro-postérieure de l'immunoréactivité Fos observée dans le CP, reflet de l'hétérogénéité des afférences bulbaires au CP, semble influencée par le comportement (caractère plus ou moins véloce) du rat conditionné. Par ailleurs, la forte expression de Fos que nous mettons en évidence dans le CP chez les rats N serait due au flairage lors de l'exploration du labyrinthe. Ce dernier représente en effet un environnement enrichi capable de susciter un fort marquage chez les animaux N n'étant pourtant soumis à aucune stimulation odorante particulière.

Données originales

L'absence de différence de marquage entre les rats T, P et N souligne l'implication du CP dans le traitement sensoriel olfactif. L'immunoréactivité induite plus spécifiquement par les processus mnésiques chez les animaux T pourrait être ainsi masquée par le simple flairage des signaux odorants.

En perspectives à cette étude, il apparaît nécessaire d'analyser l'immunoréactivité de Fos engendrée liée à la valeur acquise de l'odeur, en plaçant l'animal dans un contexte plus simple que celui du labyrinthe.

Données originales

Article 1 :

Datiche, F., Roullet, F. & Cattarelli, M. (2001). Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: an immunohistochemical study in the rat. *Brain Res Bull* 55, 95-99.

Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: An immunohistochemical study in the rat

Frédérique Datiche,^{1*} Florence Rouillet^{1,2} and Martine Cattarelli¹

¹Centre Européen des Sciences du Goût—CNRS FRE 2049, Dijon, France; and ²Université de Bourgogne, Dijon, France

[Received 11 December 2000; Revised 29 March 2001; Accepted 2 April 2001]

ABSTRACT: The piriform cortex (PCx), the main area of the primary olfactory cortex, is assumed to play a role in olfactory memory. Involvement of this paleocortex in mnemonic processes was investigated by using Fos immunocytochemistry after acquisition of a two-odor discrimination task. Trained rats had to associate one odor of a pair with water reward while pseudo-trained rats were randomly rewarded. We further used non-trained rats and home cage control animals to determine the effect of manipulation and basal Fos level respectively. Except in control rats, Fos immunoreactivity was mainly distributed in brain areas involved in olfactory processing, learning and arousal. The trained, pseudo-trained, and non-trained rats showed a high Fos labeling in the entire PCx. However, quantitative analysis demonstrated a statistically higher Fos immunoreactivity in the anterior PCx in comparison with the posterior PCx for these rats. Furthermore, behavioral data allowed us to distinguish two groups of trained rats according to the number of days required to acquire the task. Rats with slow acquisition showed a higher Fos immunoreactivity in the whole PCx in comparison with the rats exhibiting a fast acquisition. Our findings support the assumption of a PCx rostro-caudal heterogeneity which could sustain differential information processing. © 2001 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS: Olfactory cortex, Learning, Fos, Immunocytochemistry, Rat.

INTRODUCTION

In the olfactory system, odor information initially processed by the olfactory bulb is sent directly via the lateral olfactory tract (LOT) to the piriform cortex (PCx), which is the main area of the primary olfactory cortex. According to its anatomical organization and its functional features, this paleocortical area has been considered as a good model of content-addressable memory [8,9]. Moreover, the PCx has close and reciprocal connections with many limbic areas [22] and could subsequently be part of a network sustaining mnemonic processes [6]. Several lines of evidence suggest that the PCx is involved in olfactory memory. Thus, stimulation of the LOT has been reported to produce long-term potentiation in the *in vitro* PCx [14]. Long-term potentiation also occurs in the *in vivo*

PCx during olfactory learning [19]. Moreover, Saar et al. [20] showed that the rule learning of an olfactory discrimination task reduces after-hyperpolarization on PCx slices preparation. By means of optical recordings with voltage-sensitive dye, it has been further demonstrated that associative learning between an olfactory bulb electrical stimulation and positive or negative reinforcement induces synaptic changes in the posterior region of the PCx [16]. In a recent work, Mouly et al. [17] also reported an increase in evoked field potential amplitude in the posterior PCx following such an associative learning. Thus, a differential involvement of the PCx parts in olfactory learning can be assumed.

In the present study, we decided to investigate further the PCx involvement in mnemonic processes with special attention to its subdivisions. One way to identify brain areas exhibiting learning-related changes in neuronal activity is to determine the expression of the immediate early genes such as the proto-oncogene *c-fos*. Indeed, *c-fos* and its protein product Fos are widely used as markers of cell activation and they are further related to neuronal processes underlying memory [2,11]. Thus, enhanced *c-fos* expression has been reported in sheep brain during the formation of olfactory memory sustaining maternal behavior [4]. It has also been demonstrated that a learned odor can induce Fos-like immunoreactivity in the olfactory bulb of young rats [13]. Furthermore, changes in *c-fos* mRNA expression have been noticed in the different subfields of hippocampus during an olfactory discrimination task [12].

We used Fos immunocytochemical detection to assess the relative levels of neuronal activation in the PCx subfields after complete acquisition of a two-odor discrimination task. Thus, we carried out a quantitative analysis of the Fos immunoreactive cell pattern in both anterior and posterior parts of the PCx.

MATERIAL AND METHODS

The present study was carried out on 36 male SPF Wistar rats weighing 200–220 g at the beginning of the experiments. All rats were treated in accordance with the European Communities council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). They were handled before the onset of experiments in order to acclimate them

* Address for correspondence: Frédérique Datiche, Centre Européen des Sciences du Goût—CNRS FRE 2049, 15 rue H. Picardet, 21000 Dijon, France. Fax: +(33)-3-80-68-16-01; E-mail: datiche@cesg.cnrs.fr

to the environment. The animals were housed in individual cages, under a 12-h light/dark cycle. Food was given *ad libitum*. Except some home-cage controls, rats were water deprived and allowed to drink for 10 min per day only.

Odor Training Procedure and Animal Groups

We trained rats by operant conditioning. They had to discriminate between positive and negative odor cues of one pair in a four-arm radial maze as described by Saar et al. [20]. The rat was placed in the starting compartment of the maze. For each trial, the odors of one pair were randomly assigned to two of the four arms. After 7 s, the two guillotine doors were lifted and the animal had 10 s to choose an arm. An infra-red beam located at the end of each arm allowed to interrupt the trial. Olfactory training consisted in 20 trials per day. Experiments were performed in a ventilated room and a fan was activated to remove odors between each trial. Ten rats were trained («T» group) to discriminate between two odors of a pair (odor A: jasmine; odor B: green mint). They were rewarded by a drop of water only when they chose the arm containing the positive-cue odor (A). In order to assess the acquisition of the associative learning, 10 rats were pseudo-trained («P» group): they were randomly rewarded for either the odor A or the odor B. To examine the effect of both manipulation by the experimenter and training apparatus, seven non-trained rats («N» group) were placed in the maze for 10 min daily and never received olfactory stimulation. We also used home-cage control rats («C» group) to determine baseline levels of Fos expression. Thus, nine rats were sacrificed without undergoing any type of experimental manipulation. Among this group, five were water-deprived («C-» group) and four could drink *ad libitum* in order to investigate the effect of water deprivation («C+» group).

The discrimination task was considered as acquired when the trained rats chose the positive odor in 80% of the trials at least. In order to ascertain that the task was well learned, the rats were required to maintain such a level of performance for an additional day. They were sacrificed 1 h after the end of this last session (20 trials) because this delay is adequate to reach a high concentration of Fos protein [3]. We always sacrificed a trained rat and a pseudo-trained rat at the same moment.

Fos Immunocytochemistry

The rats were deeply anesthetized with a mixture of chloral hydrate and pentobarbital (4 ml/kg) and then perfused transcardially with 200 ml of Ringer lactate containing 0.1% of heparin followed by 500 ml of ice-cold fixative (4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer [PB] at pH 7.4). The brains were removed from the skull and transferred in post-fixative (2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid in 0.1 M PB, pH 7.4) for 12 h. After cryoprotection in PB containing 30% sucrose for 48 h, the brains were cut coronally (25 μ m) with a cryostat and the sections were collected in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.3% Triton X-100 (PBST) and 0.1% sodium azide (PBST-Az). Briefly, after elimination of endogenous peroxidase activity (by means of incubation with 3% hydrogen peroxide), the floating sections were incubated for 4 days at 4°C with a rabbit anti-*c-fos* antibody (AB-5; Oncogene Science) diluted at 1:10 000 in 0.1 M PBST-Az. They were placed for 24 h at 4°C in biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1:1000 in PBST. Then, the sections were incubated for 1 h in avidin-biotin-horse-radish peroxidase complex reagent from an ABC Elite kit (Vector Laboratories). Between all steps, sections were rinsed several times with PBST. Lastly, sections were reacted with 3-3'-diaminobenzidine (0.02%) and H₂O₂ (0.003%) in 0.05 M Tris-HCl

solution (pH 7.6) for 5 min. The reaction was enhanced by adding nickel ammonium sulfate (0.6%) which provides a black staining. Then, the brain sections were rinsed in PBST-Az, mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated, and coverslipped with DePeX for light microscopy. Adjacent sections were counterstained with neutral red in order to identify the brain structures.

Data Analysis

The nomenclature of Paxinos and Watson atlas [18] was used to identify brain areas. The PCx extends from +12.7 mm to +5.7 mm according to the interaural line. It is divided in anterior (PCx-a) and posterior (PCx-p) parts [10]. The boundary between them is located at the level of the anterior commissure (+8.7 mm from interaural line). Automatic countings of Fos labeled cells were performed by using the Optilab software. In each animal, we analyzed eight sections taken every 1000 μ m along the whole rostro-caudal PCx extent. Fos positive cells were identified on the basis of a black reaction product that was confined to the nucleus of PCx cells.

Analysis of variance and Student-Newmann-Keuls test were used for statistical analysis. We considered differences as significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Behavioral Data

All the pseudo-trained rats provided a score around 50% because the water reward was randomly delivered for either odor A or B. Conversely, for the trained group, the daily number of choice of the positive odor cue increased as training progressed. Nevertheless, the progression of performance was not similar for all the rats used in the present experiments and two subgroups of trained animals could be considered. Indeed, four rats reached the score of 80% of correct choices in 7 or 8 days whereas 12 or 13 days were required to reach such a learning criterion for 6 rats.

Cerebral Distribution of Fos Immunoreactivity

In the home-cage control groups with or without water restriction, a low level of Fos expression was observed in all the brain regions examined. We only noted a few labeled cells in some hypothalamic regions such as the suprachiasmatic nucleus. In contrast, the trained, the pseudo-trained as well as the non-trained, rats showed a substantial Fos immunoreactivity in various brain regions. The pattern of Fos labeling was similar in these three groups. A moderate number of Fos cells was noted in the granular layer of the olfactory bulb. Numerous Fos immunoreactive cells were observed in the olfactory cortical areas receiving direct inputs from the olfactory bulb such as the anterior olfactory nucleus, the tenia tecta, the olfactory tubercle, and the entorhinal cortex (Fig. 1). Among these areas, the PCx exhibited the greatest labeling. The hippocampus contained a moderate number of Fos immunopositive cells. We observed a dense Fos labeling in the endopiriform nucleus and the claustrum. The ventral, lateral orbito-frontal, and cingulate cortices also exhibited a substantial Fos labeling (Fig. 1). Lastly, a sparse Fos expression was noticed in several hypothalamic nuclei.

Fos Immunoreactivity in the PCx

In home-cage control rats, the PCx Fos immunoreactivity was very low (Fig. 2A). This Fos pattern was similar in both control groups. In the T, P, and N rats, we observed a high number of Fos immunopositive cells which were mainly located in layer II while the labeling was slightly lower in layer III. Quantitative analysis

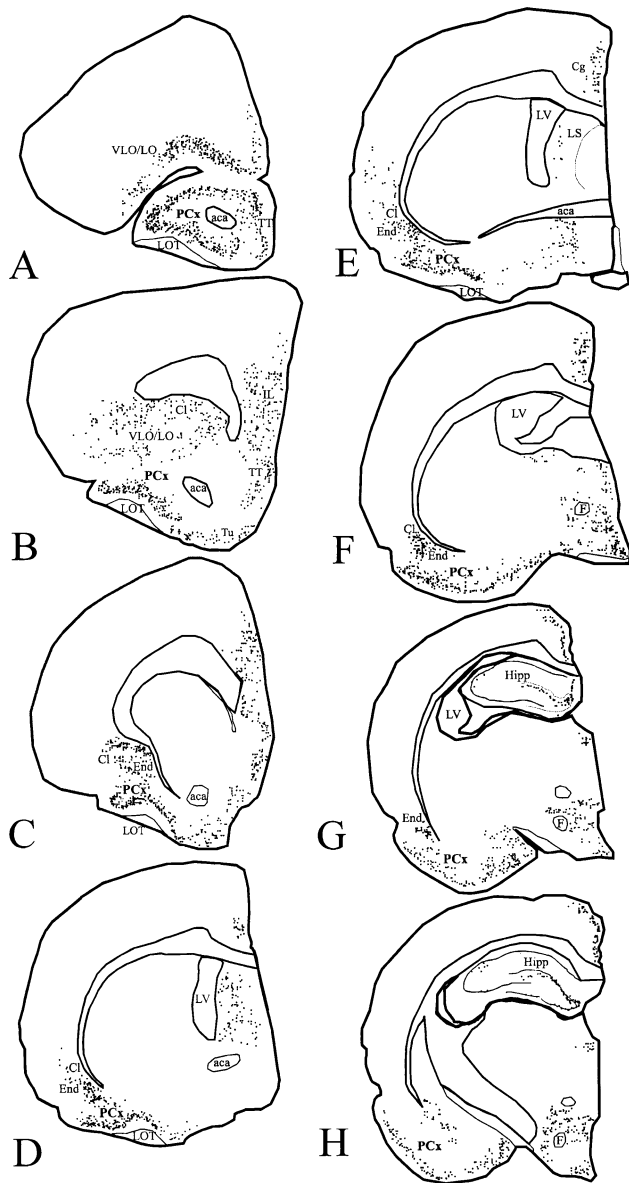


FIG. 1. Chartings illustrating the distribution of the Fos labeled cells in eight coronal brain sections from rostral to caudal (A: +12.7; B: +11.7, C: +10.7; D: +9.7; E: +8.7; F: +7.7; G: +6.7; H: +5.7 mm from the interaural line according to the Paxinos and Watson atlas [18]). Abbreviations: aca, anterior commissure, anterior; Cg, cingulate cortex; Cl, claustrum; End, endopiriform nucleus; F, fornix; Hipp, hippocampus; IL, infralimbic cortex; LOT, lateral olfactory tract; LS, lateral septal nucleus; LV, lateral ventricle; PCx, piriform cortex; TT, tenia tecta; Tu, olfactory tubercle; VLO/LO, ventrolateral, lateral orbital cortex.

did not show statistical difference between Fos expression in the right and left PCx. Thus, we focussed the present analysis on the right PCx.

In the whole PCx as well as in its anterior and posterior subdivisions, the mean number of Fos immunoreactive cells was significantly greater in T (Figs. 2B,C), P and N rats in comparison with the control groups. The Fos labeling in T and N animals was slightly higher in comparison with the P group but this difference was not statistically significant. The T, P, and N groups exhibited

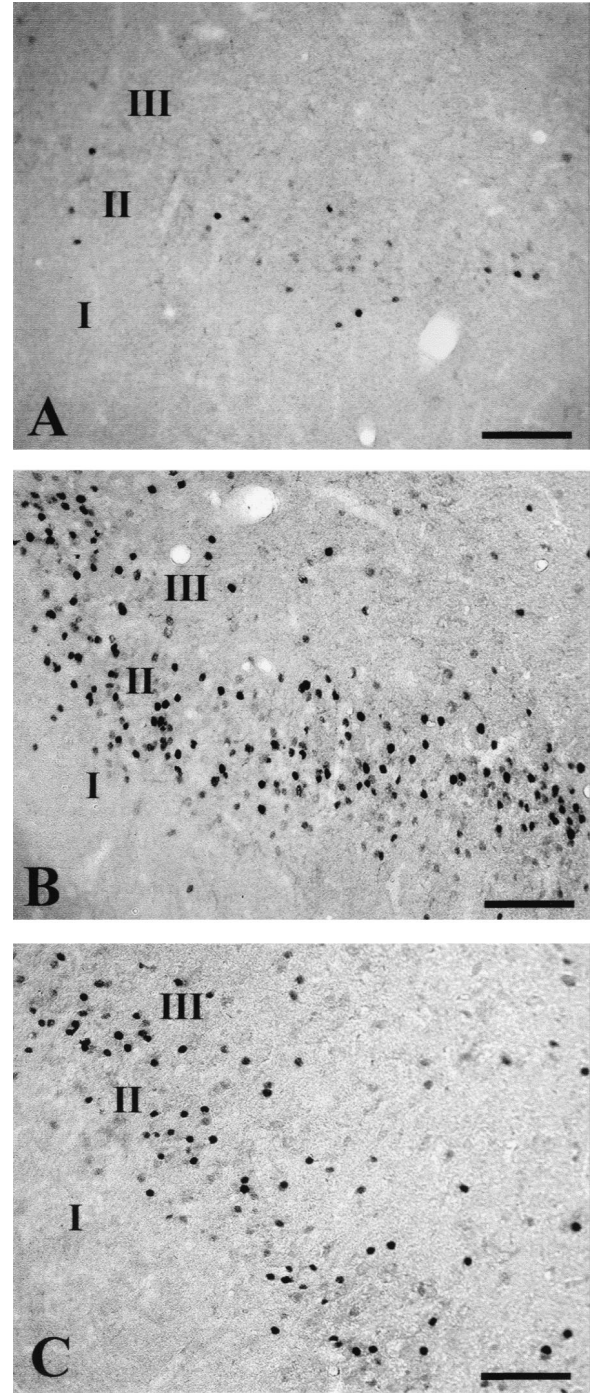


FIG. 2. Photomicrographs showing Fos immunoreactivity in: (A), anterior piriform cortex (PCx) of a control rat; anterior (B) and posterior (C) PCx of a trained rat. Note the largest labeling in PCx-a for the animal which performed the olfactory learning task. Bar = 100 μ m.

a significant rostral to caudal decrease in the Fos immunoreactivity whereas the home-cage control animals showed an homogeneous labeling pattern. Then, the proportion of Fos immunopositive cells located in the anterior PCx was of 65%, 67%, and 64% for the T, P, and N rats, respectively (Fig. 3). For these three groups, the

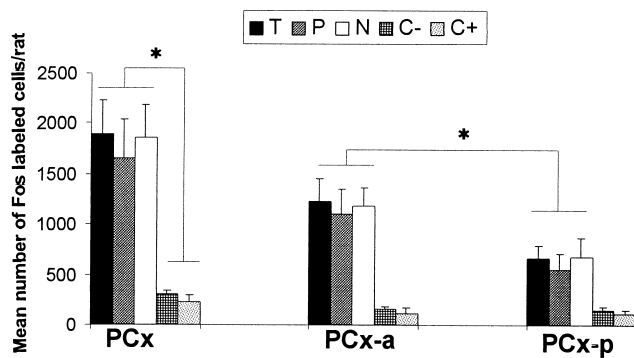


FIG. 3. Distribution of the Fos immunoreactivity in the whole piriform cortex (PCx) and its anterior (PCx-a) and posterior (PCx-p) regions. Significantly more Fos labeled cells were observed in the PCx-a in the trained (T), pseudo-trained (P), and non-trained rats (N) ($*p < 0.05$).

mean number of labeled cells was significantly higher in the PCx-a than in the PCx-p ($p < 0.05$).

Behavioral data showed that the trained rats could be separated in two groups regarding to the number of days required to acquire the olfactory association task. In the whole PCx, the mean number of Fos immunoreactive cells was significantly ($p < 0.05$) greater in the rats that performed a slow acquisition of the task in comparison with the rats that reached the learning criterion quickly (Fig. 4). Both groups of trained rats provided a rostral to caudal decrease in the Fos labeling and the mean number of Fos cells was significantly higher in the PCx-a than in the PCx-p ($p < 0.05$). Nevertheless, such a differential distribution of the labeled cells within the PCx was significantly larger for the rats which acquired the task slowly ($p < 0.05$).

DISCUSSION

By means of Fos immunocytochemistry, we attempt to determine if learning related changes occurred in the PCx following acquisition of an olfactory discrimination task. In the present experiments, home-cage control rats exhibited a weak Fos immunoreactivity. No significant effect of water deprivation was further noticed because both groups of home-cage rats showed a similar

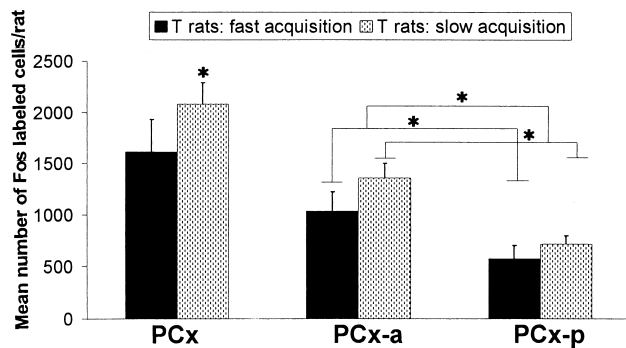


FIG. 4. Distribution of the Fos immunoreactivity in the whole piriform cortex (PCx) and its anterior (PCx-a) and posterior (PCx-p) regions regarding to the velocity of learning acquisition. Note that the Fos labeling was significantly higher in the whole PCx in the rats showing a slow acquisition of the associative task ($*p < 0.05$).

Fos expression. In comparison with these control animals, the trained, pseudo-trained, and non-trained rats showed a large Fos production. The cerebral distribution of the labelled cells was similar in the three groups. Fos immunoreactivity was noted in some brain areas known to be involved in memory processes, such as the hippocampus [6]. Moreover, the orbital cortex which is believed to encode the motivational significance of cues [7] showed a substantial Fos immunoreactivity. Increased Fos expression was also noted in olfactory structures. Particularly, the PCx exhibited the largest number of Fos immunopositive cells.

Our findings showed a similar degree and pattern of Fos response throughout the entire PCx in the trained, pseudo-trained, and non-trained rats. The immunoreactivity elicited in the non-trained rats suggests a strong influence of arousal and exploration behavior on the PCx Fos expression. No obvious Fos pattern difference was noted between the rats trained to associate one olfactory cue to water reward and the pseudo-trained rats which were randomly rewarded. Such a result is consistent with the study of Hess et al. [12]. The failure to find evidence of Fos changes between trained and pseudo-trained rats may be due to the fact that odorant stimulation could have been sufficient to obscure the learning effect. Thus, the Fos pattern might reflect the continuous sniffing and sampling of the odors delivered. It can also be taken into account the fact that some PCx cells have been shown to respond either to rewarded odors or non-rewarded odors [21]. Moreover, we have to underline that the present study focussed on Fos expression after completion of the learning task. Some brain regions have been shown to participate in memory formation in a differential time-dependent way [1,2]. Thus, analysis of Fos expression at different stages of learning acquisition as well as at various retention intervals could be of importance in future experiments in order to determine the role of the PCx in mnemonic processes.

Nevertheless, it is of interest to note that the trained rats that exhibited a slow acquisition of the associative task displayed a higher Fos labeling in the whole PCx in comparison with the animals that showed a faster acquisition. Such a result might indicate differences in the neuronal circuitry involved when the olfactory stimulus becomes a significant cue through conditioning in these two groups of rats.

The present study provided evidence of a rostro-caudal heterogeneity of the Fos pattern in the PCx. Indeed, the trained, pseudo-trained, and non-trained rats showed a Fos response pattern which was markedly higher in the PCx-a in comparison with the PCx-p. The rostro-caudal heterogeneous distribution of Fos labeling was also more pronounced in the trained rats showing a slow task acquisition. First, the PCx-a is known to receive more afferent activity than the posterior part because the density of bulbar afferent fibers decreases from rostral to caudal [8]. The sniffing behavior elicits a strong activity in the olfactory bulb. Subsequently, dense bulbar messages reach the PCx-a and could account for the high Fos immunoreactivity observed within this area. Second, the afferent bulbar activity is redistributed to the whole PCx and particularly to the PCx-p via a rostro-caudal association fiber system [10]. Thus, a high Fos expression could be expected in the PCx-p because it is strongly reactivated by the intrinsic fibers. Furthermore, the PCx-p is assumed to be mainly involved in memory [16,17]. However, centrifugal inputs could likely account for the present data: the PCx-p is the target of dopaminergic [5] and cholinergic fibers [23] that could modulate the properties of its circuitry and the subsequent Fos pattern elicited. Our finding strongly supports the assumption that the PCx could be a functionally heterogeneous structure [15,16]. It leads to assume that the two subdivisions of the PCx, differentiated with regard to anatomy [10] and physiology [15] could provide distinctly different infor-

mation processing and therefore may differentially contribute to olfactory guided behavior. Nevertheless, their respective roles remain to be determined.

In conclusion, the present study demonstrated a PCx rostro-caudal heterogeneity and sustained the assumption of a differential involvement of the PCx in sensory information processing. We further noticed that a different Fos expression regarding to the velocity to acquire the associative task. Nevertheless, further experiments are required to examine the relative effect of olfactory stimulation, exploration behavior, and of the operant conditioning because no obvious difference was noted between the trained and pseudo-trained rats. Moreover, to further analyze the contribution of the PCx to mnemonic processes, future experiments should take into account the temporal aspect of learning acquisition and of memory retention.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the expert assistance of Christèle Mathonière and Dominique Valentin regarding the statistical analysis. We also acknowledge Edı Barkai and his collaborators (Ben Gurion University, Israel) for their invaluable assistance with the maze elaboration. F. Rouillet is a recipient of a Ministère de l'éducation nationale, de la recherche et de la technologie (MNERT) grant.

REFERENCES

- Bontempi, B.; Laurent-Demir, C.; Destrade, C.; Jaffard, R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400:671–675; 2000.
- Bertaina-Anglade, V.; Tramu, G.; Destrade, C. Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *Eur. J. Neurosci.* 12:3803–3812; 2000.
- Chaudhuri, A.; Zangenehpour, S.; Rahbar-Dehgan, R.; Ye, F. Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol. Exp.* 60:403–410; 2000.
- Da Costa, A. P. C.; Broad, K. D.; Kendrick, K. M. Olfactory memory and maternal behaviour-induced changes in *c-fos* and *zif*mRNA expression in the sheep brain. *Mol. Brain Res.* 46:63–76; 1997.
- Datiche, F.; Cattarelli, M. Catecholamine innervation of the piriform cortex: A tracing and immunohistochemical study in the rat. *Brain Res.* 710:69–78; 1996.
- Eichenbaum, H.; Schoenbaum, G.; Young, B.; Bunsey, M. Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13500–13507; 1996.
- Gallagher, M.; McMahan, R. W.; Schoenbaum, G. Orbitofrontal representation of incentive value in associative learning. *J. Neurosci.* 19:6610–6614; 1999.
- Haberly, L. B. Neuronal circuitry in olfactory cortex: Anatomy and functional implications. *Chem. Senses* 10:219–238; 1985.
- Haberly, L. B.; Bower, J. Olfactory cortex: Model circuit for study of associative memory? *TINS* 12:258–264; 1989.
- Haberly, L. B.; Price, J. L. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I-Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J. Comp. Neurol.* 178:711–740; 1978.
- Herrera, D. G.; Robertson, H. A. Activation of *c-fos* in the brain. *Prog. Neurobiol.* 83:83–107; 1996.
- Hess, U. S.; Lynch, G.; Gall, C. M. Changes in *c-fos* mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning: Differential involvement of hippocampal subfields CA1 and CA3. *J. Neurosci.* 15:4786–4795; 1995.
- Johnson, B. A.; Woo, C. C.; Duong, H.; Nguyen, V.; Leon, M. A learned odor evokes an enhanced Fos-like glomerular response in the olfactory bulb of young rats. *Brain Res.* 699:192–200; 1995.
- Kanter, E. D.; Haberly, L. B. NMDA-dependent induction of long-term potentiation in afferent and association fiber systems of piriform cortex *in vitro*. *Brain Res.* 525:175–179; 1990.
- Litaudon, P.; Datiche, F.; Cattarelli, M. Optical recording of the rat piriform cortex activity. *Prog. Neurobiol.* 52:485–510; 1997.
- Litaudon, P.; Mouly, A.-M.; Sullivan, R.; Gervais, R.; Cattarelli, M. Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. *Eur. J. Neurosci.* 9:1593–1602; 1997.
- Mouly, A. M.; Fort, A.; Ben-Boutayab, N.; Gervais, R. Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. *Neuroscience* 102:11–21; 2001.
- Paxinos, G.; Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press; 1986.
- Roman, F. S.; Chaillan, F. A.; Soumireu-Mourat, B. Long-term potentiation in rat piriform cortex following discrimination learning. *Brain Res.* 601:265–272; 1993.
- Saar, D.; Grossman, Y.; Barkai, E. Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *Eur. J. Neurosci.* 10:1518–1523; 1998.
- Schoenbaum, G.; Eichenbaum, H. Information coding in the rodent prefrontal cortex. I-Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex. *J. Neurophysiol.* 74:733–750; 1995.
- Witter, M. P.; Groenewegen, H. J.; Lopes Da Silva, F. H.; Lohman, A. H. M. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog. Neurobiol.* 33:161–253; 1989.
- Wolf, N. J. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog. Neurobiol.* 37:475–524; 1991.

Données originales

B- Influence de la valeur du stimulus odorant sur l'expression de Fos

Données originales

Résumé :

Dans cette étude, nous choisissons d'observer le motif d'activité cérébrale induit par une stimulation odorante ayant acquis, au cours du conditionnement, une valeur de récompense ou non. Puisque le CP possède de nombreuses connexions centrales, notamment avec les aires hippocampales (via le cortex entorhinal) (Vanderwolf, 2001) et avec les aires néocorticales (Datiche et Cattarelli, 1996b), et que ces structures pourraient être impliquées dans la mémoire olfactive (Hess et al., 1995a et b ; Eichenbaum et al., 1983 ; Schoenbaum et al., 1999), nous examinons le marquage dans l'HC ainsi que dans le VLO et l'IL.

Nous utilisons un groupe d'animaux conditionnés, placés en restriction hydrique, entraînés à associer l'odeur du géraniol à la récompense hydrique (T+), un groupe de rats conditionnés associant le limonène à la récompense hydrique (T-) et deux types de rats témoins: des rats pseudo-conditionnés (P), soumis à une restriction hydrique et récompensés de façon aléatoire pour le géraniol ou le limonène, et des animaux « témoins olfactifs » (O), non assoiffés, stimulés chaque jour par le géraniol dans une cage similaire à leur cage d'hébergement. Ces derniers ne sont pas introduits dans le labyrinthe et permettent de mesurer l'expression de Fos induite par la seule stimulation olfactive. Enfin, nous utilisons un groupe de rat « contrôle de base » (C) qui ne sont soumis à aucun type de manipulation expérimentale. La tâche est acquise lorsque les rats T atteignent un score de 80% de choix corrects sur l'ensemble de la session d'entraînement. Le jour suivant, nous stimulons l'ensemble des animaux manipulés (T, P et O) pendant 3,5 minutes (durée moyenne de la stimulation odorante pendant une session) par le géraniol dans une cage semblable à leur cage d'hébergement. En effet, nos résultats précédents indiquent que le seul flairage dans le dispositif expérimental pourrait susciter une forte expression de Fos susceptible de masquer les modifications liées aux processus mnésiques olfactifs (Datiche et al 2001). C'est pourquoi dans cette étude, nous décidons de modifier le mode de stimulation le jour du sacrifice et de soumettre les rats à la stimulation odorante en dehors du labyrinthe. Au cours de la stimulation par le géraniol, certains rats T+ reçoivent une récompense hydrique (T+/w+), d'autres pas (T+/w-). Nous voulons ainsi étudier si l'obtention de la récompense attendue au moment de la présentation d'une odeur ayant acquis une valeur peut influencer l'expression de Fos au niveau cérébral. De plus, la comparaison des motifs d'activation de Fos entre les rats T+/w+ et T+/w- permet d'observer si un phénomène d'extinction se met en place lorsque la récompense n'est pas associée à la stimulation par le géraniol.

Données originales

Nous n'observons pas de différence d'expression de Fos dans le CP, entre les animaux T et témoins (P et O). Ceci pourrait provenir du fait que les cellules pyramidales sont multimodales et répondent à diverses stimulations au cours d'un apprentissage (Schoenbaum et Eichenbaum, 1995; Zinyuk et al., 2001). Dans l'HC, nous n'avons remarqué qu'une faible expression de Fos. Au niveau néocortical le VLO est plus immunoréactif chez les rats P comparés aux rats T, O et C. Les rats P sont incapables de construire une stratégie comportementale sur la base de la reconnaissance de l'odeur ce qui expliquerait, peut-être, cette différence. Dans l'IL, la stimulation par l'odeur récompensante associée à l'obtention de la récompense induit une augmentation de l'expression de Fos chez les animaux T+ /w- par rapport aux P.

Ainsi, nous n'avons pas pu mettre en évidence une expression différente de Fos dans le CP selon la valeur acquise, récompensante ou non, d'un stimulus olfactif. Ce résultat pourrait tenir du fait que les cellules pyramidales du CP sont plurimodales. En revanche, le néocortex jouerait un rôle dans l'élaboration d'une stratégie de comportement (VLO), dans l'intégration du statut émotionnel et s'active à l'obtention de la récompense attendue (IL) dans le cadre de l'apprentissage associatif olfactif. Ceci confirme l'implication fonctionnelle des aires néocorticales dans le traitement mnésique des informations olfactives.

Données originales

Article 2 :

Roullet, F., Datiche, F., Lienard, F. & Cattarelli, M. (2004). Cue valence representation studied by Fos immunocytochemistry after acquisition of a discrimination learning task. *Brain Res Bull* **64**, 31-38.

Cue valence representation studied by Fos immunocytochemistry after acquisition of a discrimination learning task

Florence Roulet^{a,b}, Frédérique Datiche^{a,b,*}, Fabienne Liénard^a, Martine Cattarelli^a

^a Centre Européen des Sciences du Goût, CNRS UMR 5170, 15 rue H. Picardet, 21000 Dijon, France

^b Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

Received 10 December 2003; received in revised form 7 April 2004; accepted 27 April 2004

Available online 7 June 2004

Abstract

The piriform cortex (PCx) and related structures such as hippocampus and frontal cortex could play an important role in olfactory memory. We investigated their involvement in learning the biological value of an odor cue, i.e. predicting reward or non-reward in a two-odor discrimination task. Rats were sacrificed after stimulation by either rewarded or non-rewarded odor and Fos immunocytochemistry was performed. The different experimental groups of rats did not show strongly differentiated Fos expression pattern in either the PCx or the hippocampus. A few differences were noted in frontal areas. In the ventro-lateral orbital cortex, rats, randomly rewarded during the conditioning had a higher Fos level in comparison with other groups. In infralimbic cortex, rats, which learned the reward value of the olfactory cue and were water-reinforced the day of sacrifice, showed a higher Fos expression. Data are discussed in view of the olfactory learning paradigm and of the accuracy of the control groups used in the present experimental design. The behavioural conditions leading to Fos expression are further discussed since Fos is a marker of learning-induced plasticity as well as a general activity marker which can be activated by a wide range of stimuli not directly linked to memory.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Olfactory-related areas; Learning; Fos; Reinforcement; Rat

1. Introduction

After conditioning, an initially neutral stimulus which has been associated with reward becomes meaningful to an animal. In the present study, we used an olfactory associative learning task to determine the brain areas involved in stimulus processing according to its acquired biological significance. The olfactory system is well-suited for studying memory processes because rats trained with odorous stimuli can efficiently acquire learning sets [27]. Our aim was to investigate if a differential activation in olfactory-related brain areas would occur when rats are stimulated by an odor which predicts reward or not. In a previous report, we observed that events not directly related to learning and memory, such as sniffing and locomotor activities in the training apparatus can induce a substantial cerebral Fos

expression [4]. Consequently, we chose to stimulate rats by the significant odor out of the initial training context.

As the olfactory bulb could play a role in memory processes [19], we focussed our investigation on cortical areas. The main target of the olfactory bulb is the piriform cortex (PCx) [9]. Several range of evidence suggest that this paleocortex is a site of learning-induced plasticity and could be involved in olfactory learning [8,10]. Long-term potentiation was observed in the PCx both in vitro [13] and in vivo during an olfactory discrimination task [23]. Olfactory conditioning also modified neuronal excitability on PCx slices [24]. Furthermore, it has been demonstrated that olfactory learning induced differential electrical responses between the anterior (PCx-a) and the posterior (PCx-p), subdivisions of the PCx [15,18]. It has also been shown that acquisition of an olfactory discrimination induces a differential Fos expression within the PCx according to the learning rate of the animal [4].

Several other brain areas could be involved in olfactory memory. PCx is a source of projections to the lateral entorhinal cortex which densely innervates the hippocampus

* Corresponding author. Tel.: +33-3-80-68-16-81; fax: +33-3-80-68-16-01.

E-mail address: datiche@cesg.cnrs.fr (F. Datiche).

which is known to be implicated in memory processes [5]. PCx is also reciprocally connected to cortical areas such as the ventro-lateral orbitofrontal (VLO) and infralimbic (IL) cortices [3]. It has been shown that the orbitofrontal cortex could play a role in stimulus–reinforcer association [7]. Moreover, the infralimbic region could also sustain integration of reward cues in motivated animals performing a memory task [22].

Since increased *c-fos* expression is linked to neural activity [11], including that associated with learning [12,14,28], we performed a quantitative analysis of Fos immunoreactivity induced by olfactory stimulation which acquired, or not, a reward value after learning of a discrimination task.

2. Materials and methods

Fifty-five male SPF Wistar rats weighing 200–220 g at the beginning of the experiment were used. The present experimental procedures followed the guidelines of the European Communities council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and efforts were made to reduce the number of rats employed. Rats were individually housed under a 12 h:12 h inverted light:dark cycle and had food ad libitum. Rats were daily handled by the experimenter for approximately 2 weeks prior to training initiation.

2.1. Training apparatus

The odor training discrimination apparatus was a four-arm radial maze [24]. For each trial, the rat was placed in the starting area of the maze and the odors (geraniol and limonene) were randomly assigned to two of the four arms. After 7 s, the guillotine doors were lifted and the rat had to choose an arm. Rats reached the end of the arm and breaking an infra-red beam interrupted the trial. Olfactory training consisted of 20 trials per day. Conditioning was performed in a ventilated room and a fan was activated between each trial.

2.2. Groups of rats

2.2.1. Control rats (C, 3 rats)

The C rats were the home-cage group i.e. without any type of experimental manipulation. They allowed us to determine the baseline level of Fos expression.

2.2.2. Trained rats (T, 25 rats)

The T rats were water-deprived and allowed to drink for 10 min per day only. They were submitted to the olfactory conditioning. Thus, they had to discriminate between rewarded and non-rewarded odors of the pair delivered in the maze. Since our aim was to investigate brain activation induced by an odor cue which acquired different significance through conditioning, we used two experimental groups. In one group of trained rats (T+, 18 rats), geraniol was rewarded by water delivery whereas limonene was

non-rewarded. In another experimental group of trained rats (T–, 7 rats), geraniol was non-rewarded whereas limonene was rewarded. The discrimination task was considered as acquired when rats chose the rewarded odor, i.e. geraniol or limonene for T+ and T– rats respectively, in 80% of trials.

2.2.3. Pseudo-trained (P, 15 rats)

The P rats were water-deprived and allowed to drink for 10 min per day only. The P rats were submitted to a pseudo-training. The P rats were daily introduced in the maze for 20 trials sessions but they were always randomly water-rewarded. Thus, they were unable to associate one odor of the pair with reward.

2.2.4. Odor-only (O, 12 rats)

In order to determine the effect of daily stimulation with a neutral odor upon Fos expression, we further used O rats which had no behavioural training. The O rats had water ad libitum. They were only daily stimulated by geraniol for 3.5 min in a stimulation cage identical to their home-cage. This duration corresponded to the daily odor exposure for a rat during a 20 trial session into the maze.

2.3. Olfactory test before the sacrifice

The day after they had acquired the discrimination task within the maze, i.e. when the criterion of 80% of correct choices of the rewarded odor was reached, T+ and T– rats were stimulated by geraniol for 3.5 min in their individual home-cages. This duration corresponded to the daily odor exposure during a twenty trial session in the maze. The concentration and the flow rate of the odor stream were similar to the ones used during a training session in the maze. T– rats did not received water in their home-cages during geraniol stimulation as geraniol was the non-rewarded odor in this group. In contrast, two conditions were used for the T+ rats: half of T+ received water in their home-cages during the stimulation by geraniol (9 T+/w+ rats) whereas the other half (9 T+/w– rats) were not water-rewarded. We wanted to examine if a differential cerebral Fos expression could occur when the expected outcome is delivered or not during stimulation by a relevant odor which had previously acquired a positive value of reward. Moreover, Fos expression comparison between T+/w+ and T+/w– groups allowed us to ensure that extinction would not account for a change in cerebral activation when the reward is not delivered during stimulation by geraniol.

In parallel to all the T rats, P and O rats were stimulated by geraniol for 3.5 min in their individual home-cages. They did not received water during olfactory stimulation.

Ninety minutes after the olfactory stimulation by geraniol, T–, T+/w+, T+/w–, P and O rats were deeply anaesthetised with Equithesine (4 ml/kg i.p). This delay has been shown to be adequate to reach a high concentration of Fos protein [2]. We further sacrificed C rats in parallel to the other experimental groups. These rats remained in their

home-cages and were sacrificed without undergoing any type of manipulation.

2.4. Fos immunocytochemistry

Following deep anaesthesia, rats were perfused transcardially with 200 ml of Ringer lactate containing 0.1% of heparin followed by 500 ml of ice-cold fixative (4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4). Brains were removed and post-fixed (2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid in 0.1 M PB, pH 7.4) for 12 h at 4 °C. Brains were cryoprotected in a 30% sucrose PB solution for 48 h. The brains were then cut coronally (25 µm) with a cryostat and free-floating sections were collected in 0.1 M phosphate buffer saline containing 0.3% Triton X-100 and 0.1% sodium azide (PBST-Az; pH 7.4) to perform Fos immunohistochemistry.

Brain sections were placed in a 3% hydrogen peroxide solution for 30 min and incubated in PBST containing 3% normal goat serum for 2 h. Subsequently, sections were incubated for 2 days at 4 °C with a rabbit anti-*c-fos* antibody (AB-5; Oncogene Science) diluted at 1:5000 in 0.1 M PBST-Az. They were transferred into biotinylated anti-rabbit IgG (1:1000 in PBST; 24 h at 4 °C; Vector Laboratories). Then, the sections were incubated for 1 h

in avidin–biotin–horseradish peroxidase complex reagent from an ABC Elite kit (Vector Laboratories). Between all steps, sections were rinsed several times with PBST. Peroxidase activity was revealed by using 3-3'-diaminobenzidine (0.02%) and H₂O₂ (0.003%) in a 0.05 M Tris-HCl solution (pH 7.6). The reaction was enhanced by adding nickel ammonium sulfate (0.6%) which provided a black stain. The nickel-intensified diaminobenzidine reaction was controlled by inspecting sections under the microscope and stopped by rinses in PBST-Az.

Finally, brain sections were mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated and coverslipped with DePeX for light microscopy.

2.5. Data analysis

The nomenclature of Paxinos and Watson atlas [21] for the rat brain was used for delimitation of cerebral regions. The PCx extends from +12.7 mm to +5.7 mm according to the interaural line. This paleocortex is divided in PCx-a and PCx-p parts (Fig. 1). The boundary between them is located at the level of the anterior commissure (+8.7 mm from interaural line). In each rat, we analyzed 8 sections taken every 1000 µm from +12.7 to +5.7 mm, along the whole rostro-caudal PCx extent. On three of the same sections, i.e. +12.7, +11.7 and +6.7 mm, we further counted Fos labeled

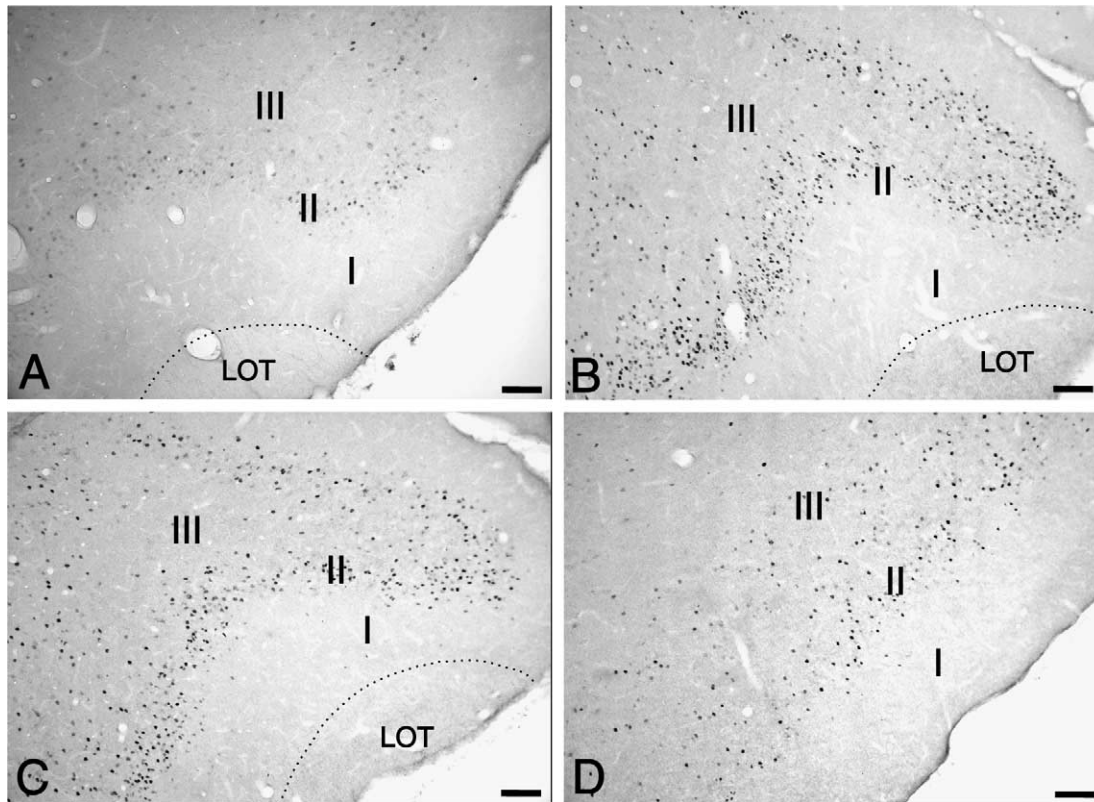


Fig. 1. Photomicrographs showing Fos immunoreactivity in the anterior PCx of a home-cage control rat on a coronal section at +11.7 mm from the interaural line (A); the anterior PCx of an odor-only rat, +12.7 mm from the interaural line (B); the anterior PCx of a T+/w- rat, +12.7 mm from the interaural line (C); the posterior PCx of a T+/w- rat, +6.7 mm from the interaural line (D). Bar = 100 µm.

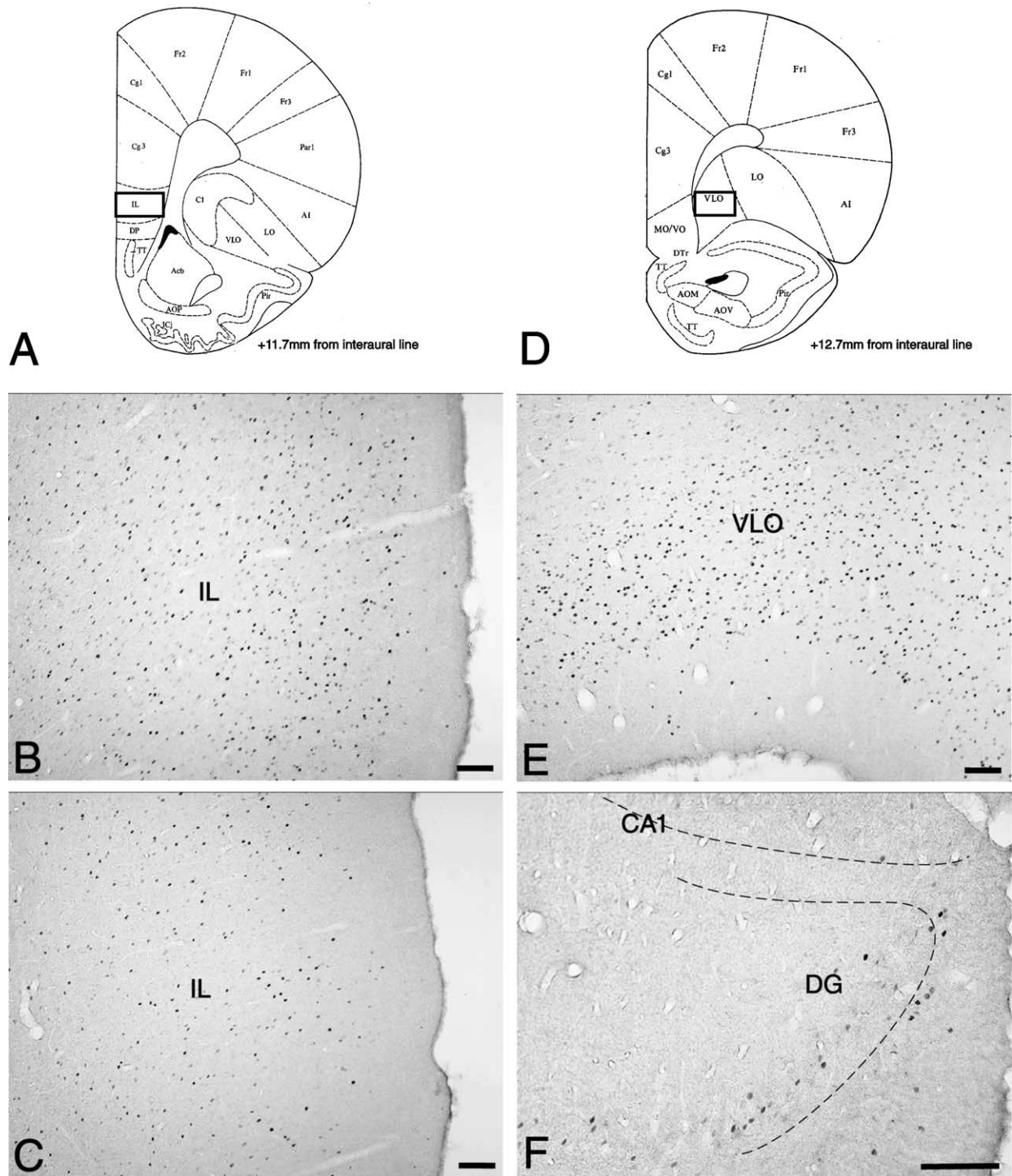


Fig. 2. (A, D) Schematic drawings of sections taken from Paxinos and Watson [21] illustrating the sampling regions in infralimbic (IL) and ventro-lateral orbitofrontal (VLO) cortices, respectively. Photomicrographs showing Fos immunoreactivity in IL (B), VLO (E), dentate gyrus (F) in a T+/w+ rat and in the IL in a P rat (C). Dentate gyrus (DG). Bar = 100 μ m.

nuclei in IL (Fig. 2A–C), VLO (Fig. 2D and E) and dorsal hippocampus (CA1, CA3 subfields and dentate gyrus) (Fig. 2F), respectively. Fos positive cells were identified on the basis of a black reaction product that was confined to the cell nucleus. Fos staining was subsequently analyzed automatically by using the Outilab software. We counted all

the cells darker than the surrounding background. Because of well-delineation of PCx and hippocampus, labeled cells could be counted on the entire extent of these target regions within the selected coronal sections and the data were expressed as mean number of labeled cells per rat. As the borders of neocortical areas are less easily determined, labeled

cells were counted in a sample region of 0.07 and 0.1 mm² for VLO and IL, respectively (Fig. 2A and D). The sample areas were chosen according to the Paxinos and Watson atlas [21] and the data were expressed as a number of Fos-positive cells per mm².

For PCx data, a two-way analysis of variance was used for statistical analysis: one factor was the experimental condition and the other was the location of the immunoreactive cells in both subdivisions considered. In other brain areas, one-way analysis of variance was performed. Post hoc pairwise group comparisons were made by a LSD (Least Significant Difference) procedure. We considered differences as significant when $P < 0.05$. All statistical analysis were achieved by using the software SAS 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results

All the trained rats used in the present study had a similar learning rate of the discrimination task: they acquired the olfactory association in 6–8 days.

3.1. Brain distribution of Fos immunoreactivity

Whatever the brain area considered, we noticed a low basal level of Fos expression in the C rats. Besides the brain regions quantitatively analyzed, it was noticed that in the T, P, and O groups, a moderate number of Fos labeled cells were observed in the granular layer of the olfactory bulb. Fos immunoreactivity was also noted in olfactory structures receiving bulbar afferents such as the anterior olfactory nucleus, the tenia tecta and the olfactory tubercle. In the T, P, and O groups, the PCx showed a high Fos immunoreactivity (Fig. 1). A substantial Fos expression was also observed in frontal regions (Fig. 2B, C and E), the endopiriform-claustrum nucleus and the medio-dorsal thalamic nucleus. A moderate Fos labeling in the entorhinal cortex, the lateral habenula, and the lateral septum was also observed. Sparse Fos immunoreactivity was also observed in hippocampus, amygdala, and hypothalamic areas.

3.2. Quantitative analysis of Fos immunoreactivity

3.2.1. Fos expression in the PCx

The Fos labeled cells were mainly located in PCx layer II whereas layer III showed less immunoreactivity (Fig. 1). Statistical analyses was performed on 51 rats (9 T+/w+; 9 T+/w-; 7 T-; 13 P; 10 O; and 3 C). There was a significant effect of the experimental conditions ($F[5,45] = 7.27$; $P < 0.0001$) and a significant effect of anterior or posterior location ($F[1,45] = 384.35$; $P < 0.0001$). LSD pairwise comparisons showed that the C rats had a significant ($P < 0.05$) lower Fos immunoreactivity (Fig. 1A) than the T+/w-, T+ /w+, T-, P, and O rats in the whole PCx as well as in PCx-a and PCx-p (Fig. 3).

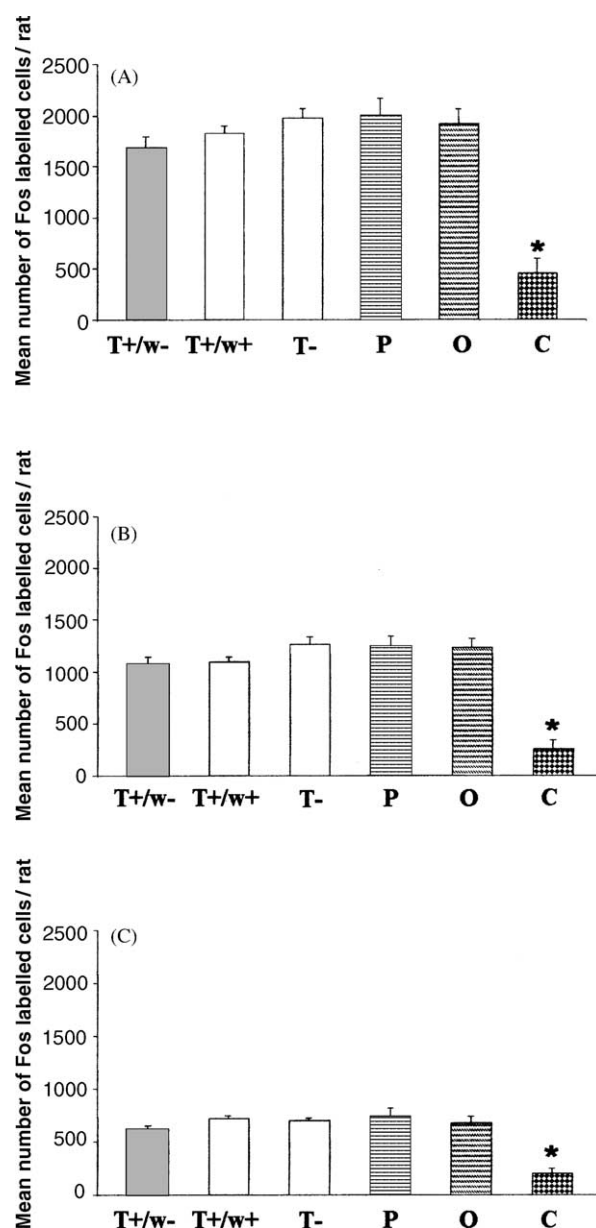


Fig. 3. Means \pm S.E.M. of Fos positive cells per rat in the whole PCx (A) and its anterior (B) and posterior (C) subdivisions. Fos expression was significantly lower in home-cage animals compared with the other groups ($*P < 0.05$). In the T+/w+, T+/w-, T-, P and O rats, the number of Fos labeled nuclei was higher in the PCx-a compared to the PCx-p.

As illustrated in Fig. 3 no statistical difference of Fos immunoreactivity was found between the T+/w-, T+/w+, T-, P, and O rats in the whole PCx as well as in its subdivisions. Except for the C rats, all groups showed a rostro-caudal decrease in Fos immunoreactivity. In T+/w-, T+/w+, T-, P, and O groups, we observed a significant ($P < 0.05$) difference in Fos immunoreactivity between PCx-a and PCx-p (Fig. 1C and D). However, the rostro-caudal distribution of Fos labeling through both PCx subdivisions was similar in T+/w-, T+/w+, T-, P, and O groups.

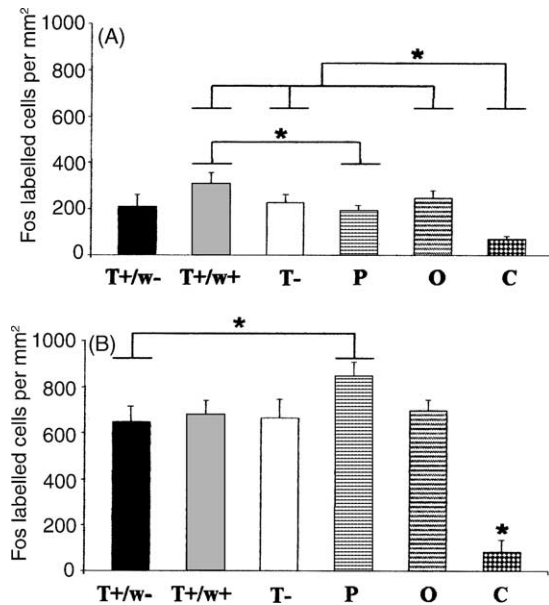


Fig. 4. Fos immunoreactivity in the infralimbic cortex (A) and the ventro-lateral orbitofrontal cortex (B). Data are plotted as means \pm S.E.M. of numbers of Fos positive cells per mm² (* $P < 0.05$).

3.2.2. Fos expression in hippocampus

Whatever the experimental group the dorsal hippocampus showed a moderate Fos labeling in the dentate gyrus (Fig. 2F) and only a few scattered Fos immunoreactive cells in CA1 and CA3.

3.2.3. Fos expression in frontal areas

We observed a substantial Fos immunoreactivity in the IL (Fig. 2B and C). Statistical analysis were performed on 51 rats (8 T+/w+; 8 T+/w-; 7 T-; 14 P; 11 O and 3 C). There was a significant effect of the experimental conditions ($F[5,45] = 2.76$; $P < 0.05$). The C rats showed a significantly lower number of labeled cells in comparison with T+/w+, T- and O rats. LSD comparisons showed that Fos expression in T+/w+ rats was significantly different from the P group ($P < 0.05$) (Fig. 4A).

The VLO showed a dense Fos labeling (Fig. 2E). Statistical analysis were performed on 53 rats (8 T+/w+; 9 T+/w-; 7 T-; 14 P; 12 O and 3 C). There was a significant effect of the experimental conditions ($F[5,47] = 7.74$; $P < 0.0001$). LSD comparisons showed that the mean number of Fos labeled cells was significantly greater in T+/w-, T+/w+, T-, P, and O rats compared to the C group ($P < 0.05$). LSD comparisons showed that the Fos expression in P rats was significantly higher than in the T+/w- group (Fig. 4B).

4. Discussion

Using Fos mapping we attempted to examine the cerebral activation induced by an olfactory cue (i.e geraniol) which

acquired different significance via conditioning. In contrast to the C animals which showed a low immunoreactivity, the T+/w-, T+/w+, T-, P and O rats exhibited a large cerebral Fos expression.

In the PCx we observed a significant rostro-caudal Fos expression decrease in T+/w-, T+/w+, T-, P and O rats compared to C group as previously described [4]. Rostrally numerous inputs from the olfactory bulb [9] could account for the highest Fos immunoreactivity observed in the PCx-a in the present experimental groups. In the PCx we did not find significant differences between the T+/w-, T+/w+, T-, P and O rats. The lack of difference between the present experimental groups could be due to the plurimodal characteristics of PCx neurons. Indeed, PCx cells have been shown to respond to rewarded and/or unrewarded odor cues and to other events during a learning trial [26,31]. Thus, it cannot be excluded that PCx neuronal activity subserving olfactory cue processing could have masked possible learning-related Fos expression in trained rats.

In O rats, the substantial Fos expression could be linked to odor processing. One could expect that the Fos labelling should decrease after repeated exposure to the stimulus since a decrease in *c-fos* mRNA labelling and of arg3.1 mRNA expression was described by Montag-Sallaz and Buonviso [17] in the olfactory bulb and in the PCx-a respectively of rats daily familiarised to an odour. However, several differences could account for this discrepancy: odor exposure was much longer in this experiment than in ours, mRNA expression was analyzed instead of protein expression, and *c-fos* expression in PCx was not examined.

In the present study, we observed only a few Fos labeled cells in CA1, CA3 hippocampal subfields and dentate gyrus in accordance with Tronel and Sara [29] who described only a few scattered Fos immunoreactive cells in hippocampus after acquisition of an olfactory task. Nevertheless, hippocampus is known to receive and further encode olfactory information [5]. In contrast to the present data, Hess et al. [12] showed a substantial hippocampal *c-fos* mRNA expression following an olfactory discrimination learning. Such a discrepancy could be due to the method employed. Thus, as underlined by Lukasiuk et al. [16], the level of Fos protein does not necessarily follow the mRNA level. The role of hippocampus in olfactory memory is complex and remains unclear. It might depend on the behavioral requirements related to each kind of training procedure. Moreover, it cannot be ruled out that hippocampus could be mainly involved in earlier stages of the behavioral conditioning [30].

A substantial Fos immunoreactivity was observed in VLO and IL. These frontal areas have close reciprocal connections with the PCx and can be considered as higher areas for olfactory information processing [3]. In IL, the T+/w+ rats showed the highest Fos immunoreactivity in comparison with the other groups. Significance level was reached between T+/w+ and P rats. It could be underlined that geraniol was randomly rewarded for P rats. For T- and O rats, geraniol had no rewarding value. On the other hand, T+/w-

rats which learned the rewarding value of geraniol were not rewarded on the day of sacrifice. Thus, it could be assumed that the higher Fos expression in T+/w+ could reflect integration of both their motivational status and the delivery of the expected reward. It has been shown that infralimbic cortex seems to be involved in complex integrative processes of cue-reward association in a spatial memory task [22]. Our data are in accordance with this and further add to this finding by showing an involvement of IL in non-spatial odor-reward association task.

In VLO, Fos labeling was similar in T+/w–, T+/w+, T–, and O rats. However, significantly higher Fos immunoreactivity was observed in P rats compared to T+/w– rats. As P animals were randomly rewarded during conditioning, they were unable to associate one odor with the reinforcement and to elaborate an adapted behavior in response to the olfactory stimuli. Thus, the higher Fos expression observed in these animals could be related to a less selective activation pattern in VLO. In the trained groups, the rats should have a tuned attention since they learned to associate the stimulus with either reward or non-reward. It could induce a focussed and selective activation pattern and consequently, a lower Fos expression. Our results are consistent with data showing that the orbito-frontal cortex is involved in selection and execution of appropriate behavioral strategy [25]. Moreover, Anokhin et al. [1] also demonstrated cortical changes in Fos expression according to the learning status and the achievement of conditioning.

As we observed little differences in Fos expression between the different experimental groups our data raise several methodological comments. In order to examine the neuronal activity related to odor acquired significance, rats were not placed in the maze but remained in their cages where they were stimulated by geraniol. We choose such a procedure before sacrifice to reduce Fos expression elicited by contextual events not directly related to olfactory memory. Indeed, we previously showed [4] that naive rats, daily placed in a maze without any kind of stimulation, exhibited a high Fos expression. However, in the present study, by using the sole odor stimulation before sacrifice, we failed to find significant differences between our experimental groups. A possible explanation is that geraniol presented alone is not sufficiently relevant to elicit a differentiated Fos expression. It is noteworthy that during conditioning sessions, trained rats had to discriminate geraniol and limonene delivered simultaneously in two arms of the maze. It can be hypothesised that geraniol might be of relevance only if presented with limonene at the same time. On the other hand, we sought to avoid Fos expression linked to the maze contextual cues by stimulating rats in home-cages before sacrifice. However, it cannot be ruled out that geraniol delivery out of the initial training context might represent a new learning situation. Memory of odor significance might be studied only through presentation of relevant cue in the training context.

It can also be underlined that strongly aversive reinforcement was not used in the present study: geraniol was

only unrewarded for the T– rats during learning. An enhancement of Fos expression has been described in various olfactory regions when the odor is predictive of an aversive event such as footshock [6]. Thus, it can be assumed that stimulation by geraniol the day of sacrifice was not sufficiently relevant to elicit obvious differential Fos changes between T– and T+ groups.

Another comment is about *c-fos* expression, which is one of many immediate early genes that respond with relatively low threshold to changes in neuronal activity. The Fos protein seems to act as a transcriptional regulator by mediating the expression of late genes involved in long-term changes in cellular functioning subserving learning and memory formation [28]. However, its precise role is not known and interpretation of Fos expression in view of the behavioral training conditions is not yet clearly defined. It should be kept in mind that Fos is also well-known as a marker of brain activity [11]. Motivation, attention and olfactory processing which are required in learning processes can induce a Fos expression. In the present study, it cannot be ruled out that Fos expression could be partly due to neuronal activity not specifically related to the associative learning “odor-reward”. A substantial Fos expression linked to olfactory stimulation itself was also observed in O rats as well as in P rats. It has been reported that pseudoconditioned animals can learn the lack of association between conditioned and unconditioned stimuli [20]. Our data raised the essential question of what could constitute an accurate control group when studying olfactory memory. The present study underlined the difficulty to design an experimental paradigm able to demonstrate a learning-specific-induced activity by using Fos mapping.

In summary, the cerebral patterns of Fos immunoreactivity following stimulation with an odor that gained different significances through learning were not strongly differentiated. Differences in Fos expression were found in frontal areas. Taken together, the present data led us to question the behavioral conditions inducing Fos expression. Since increased *c-fos* activation could result from a wide range of stimuli, we might hypothesise that it was not the most accurate tool to investigate learning-induced changes in view of the present paradigm. In future experiments, it would be interesting to examine the expression of another immediate-early genes which could be more directly involved in plasticity. Thus, *arg3.1* gene is believed to play a role in stabilising activity-dependent changes in synaptic efficacy and could be more sensitive to cellular changes related to learning conditions. It would be also of relevance to use aversive reinforcement in order to determine whether more differentiated patterns of brain activation could be elicited.

Acknowledgements

We would like to thank Dominique Valentin for her helpful comments on the statistical analysis and Ben Lawler for English improvement of the manuscript. We also gratefully

acknowledge Edi Barkai and his collaborators (Ben Gurion University, Israël) for their invaluable assistance with the maze elaboration. F. Rouillet is a recipient of a Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MNERT) grant.

References

- [1] K.V. Anokhin, A.E. Ryabinin, K.V. Sudakov, Expression of the *c-fos* gene in the mouse brain during the acquisition of defensive behavior habits, *Neurosci. Behav. Physiol.* 31 (2001) 139–143.
- [2] A. Chaudhuri, S. Zangenehpour, R. Rahbar-Dehgan, F. Ye, Molecular maps of neural activity and quiescence, *Acta Neurobiol. Exp.* 60 (2000) 403–410.
- [3] F. Datiche, M. Cattarelli, Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin, *Brain Res. Bull.* 6 (1996) 391–398.
- [4] F. Datiche, F. Rouillet, M. Cattarelli, Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: an immunohistochemical study in the rat, *Brain Res. Bull.* 55 (2001) 95–99.
- [5] H. Eichenbaum, G. Schoenbaum, B. Young, M. Bunsey, Functional organization of the hippocampal memory system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 13500–13507.
- [6] D. Funk, S. Amir, Enhanced Fos expression within the primary olfactory and limbic pathways induced by an aversive conditioned odor stimulus, *Neuroscience* 98 (2000) 403–406.
- [7] M. Gallagher, R.W. McMahan, G. Schoenbaum, Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning, *J. Neurosci.* 19 (1999) 6610–6614.
- [8] L.B. Haberly, Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry, *Chem. Senses* 26 (2001) 551–576.
- [9] L.B. Haberly, J.L. Price, Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I-Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas, *J. Comp. Neurol.* 178 (1978) 711–740.
- [10] M.E. Hasselmo, Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior, *Behav. Brain Res.* 67 (1995) 1–27.
- [11] D.G. Herrera, H.A. Robertson, Activation of *c-fos* in the brain, *Prog. Neurobiol.* 83 (1996) 83–107.
- [12] U.S. Hess, G. Lynch, C.M. Gall, Changes in *c-fos* mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning: differential involvement of hippocampal subfields CA1 and CA3, *J. Neurosci.* 15 (1995) 4786–4795.
- [13] M.W. Jung, J. Larson, G. Lynch, Long-term potentiation of monosynaptic EPSPs in rat piriform cortex in vitro, *Synapse* 6 (1990) 279–283.
- [14] L. Kaczmarek, Gene expression in learning processes, *Acta Neurobiol. Exp.* 60 (2000) 419–424.
- [15] P. Litaudon, A.-M. Mouly, R. Sullivan, R. Gervais, M. Cattarelli, Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye, *Eur. J. Neurosci.* 9 (1997) 1593–1602.
- [16] K. Lukasiuk, A. Savonenko, E. Nikolaev, M. Rydz, L. Kaczmarek, Defensive conditioning-related increase in AP-1 transcription factor in the rat cortex, *Mol. Brain Res.* 67 (1999) 64–73.
- [17] M. Montag-Sallaz, N. Buonviso, Altered odor-induced expression of *c-fos* and *arg3.1* immediate early-genes in the olfactory system after familiarization with odor, *J. Neurobiol.* 52 (2002) 61–72.
- [18] A.M. Mouly, R. Gervais, Polysynaptic potentiation at different levels of rat olfactory pathways following learning, *Learn. Mem.* 9 (2002) 66–75.
- [19] A.M. Mouly, R. Gervais, A. Holley, Evidence for the involvement of rat olfactory bulb in processes supporting long-term olfactory memory, *Eur. J. Neurosci.* 2 (1990) 978–984.
- [20] E. Nikolaev, B. Kaminska, W. Tischmeyer, H. Matties, L. Kaczmarek, Induction of expression of genes encoding transcription factors in the rat brain elicited by behavioral training, *Brain Res. Bull.* 28 (1992) 479–484.
- [21] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Sydney, 1986.
- [22] W.E. Pratt, J.Y. Mizumori, Neurons in rat medial prefrontal cortex show anticipatory rate changes to predictable differential rewards in a spatial memory task, *Behav. Brain Res.* 123 (2001) 165–183.
- [23] F.S. Roman, F.A. Chaillan, B. Soumireu-Mourat, Long-term potentiation in rat piriform cortex following discrimination learning, *Brain Res.* 601 (1993) 265–272.
- [24] D. Saar, Y. Grossman, E. Barkai, Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 1518–1523.
- [25] G. Schoenbaum, A.A. Chiba, M. Gallagher, Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning, *J. Neurosci.* 19 (1999) 1876–1884.
- [26] G. Schoenbaum, H. Eichenbaum, Information coding in the rodent prefrontal cortex. I-Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in piriform cortex, *J. Neurophysiol.* 74 (1995) 733–750.
- [27] B. Slotnick, Animal cognition and the rat olfactory system, *TICS* 5 (2001) 216–222.
- [28] W. Tischmeyer, R. Grimm, Activation of immediate early genes and memory formation, *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 564–574.
- [29] S. Tronel, S. Sara, Mapping of olfactory memory circuits: region-specific *c-fos* activation after odor-reward associative learning or after its retrieval, *Learn. Mem.* 9 (2002) 105–111.
- [30] B. Truchet, F.A. Chaillan, B. Soumireu-Mourat, F.S. Roman, Learning and memory of cue-reward association meaning by modifications of synaptic efficacy in dentate gyrus and piriform cortex, *Hippocampus* 12 (2002) 600–608.
- [31] L.E. Zinyuk, F. Datiche, M. Cattarelli, Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat, *Behav. Brain Res.* 124 (2001) 29–32.

Données originales

C- Etude de l'expression cérébrale de Fos à différents stades de l'acquisition de la tâche de discrimination olfactive

Données originales

Résumé :

Les études concernant les phénomènes d'apprentissage et de mémoire olfactifs ont étudié l'activation cérébrale à la suite d'un conditionnement (Roman et al., 1993a) ou lors de différentes étapes comportementales, de l'exploration initiale à la phase de discrimination (Hess et al., 1995a; Hess et al., 1997). Néanmoins, l'activation cérébrale au cours même de l'acquisition progressive d'une tâche de discrimination olfactive n'a pas été analysée.

Alors que certaines études utilisent des tâches rapidement acquises par l'animal (Tronel et Sara, 2002), le conditionnement que nous avons choisi ne s'acquiert qu'après plusieurs jours d'un entraînement quotidien. Nous avons donc décidé d'analyser l'expression de Fos dans le CP ainsi que dans l'hippocampe et le néocortex, à différents stades de cet apprentissage. Nous choisissons d'observer l'immunoréactivité cérébrale après la première (J1), et la quatrième (J4) session d'apprentissage ainsi que le jour où l'animal atteint le critère de réussite (Acquisition), correspondant à un score de 80% de choix corrects sur l'ensemble des 20 essais ou sur les 10 derniers essais de la session d'entraînement. Nous utilisons trois groupes de rats conditionnés, entraînés à associer le géraniol à la récompense hydrique et sacrifiés aux stades J1, J4 et Acquisition (groupes T1, T4 et Tacq respectivement). Nous analysons également l'expression de Fos chez des animaux pseudo-conditionnés, recevant de l'eau *ad libitum* et placés tous les jours dans le labyrinthe où ils sont stimulés par les deux odeurs. Ces animaux, associés aux rats T1, T4 et Tacq, constituent les groupes P1, P4 et Pacq. Enfin, des rats « contrôles de base » C1, C4 et Cacq sont sacrifiés en parallèle aux rats T et P.

D'un point de vue comportemental, les rats qui sont placés dans le labyrinthe ont 3 choix possibles:

1- choix « géraniol » : le rat choisit de pénétrer dans la branche du labyrinthe odorisée avec le géraniol.

2- choix « limonène » : le rat choisit la branche odorisée avec le limonène.

3- « non choix » : le rat reste dans la salle de départ.

L'analyse comportementale montre des différences entre les rats T et P au fur et à mesure des sessions. A l'issue de la première séance d'apprentissage, les rats T et P font autant de choix « géraniol » que « limonène » (score moyen de 52% et 41% de choix « géraniol » pour les rats T et P respectivement). Notons que les rats P restent dans la salle de départ dans 12% des cas. Entre les stades

Données originales

J1 et J4 le score moyen des sujets T augmente et atteint 58% de choix « géraniole » au stade J4. En revanche, le score moyen des rats P reste stable et le pourcentage de « non choix » augmente progressivement ; au stade J4 il atteint 20%. Ceci indique que l'activité exploratoire des rats P se restreint au cours des sessions dans le labyrinthe. Le niveau d'attention, lié au faible niveau motivationnel (absence de restriction hydrique), pourrait expliquer ce résultat. Les rats T en revanche voient leur performance s'améliorer et les animaux atteignent le critère de réussite en 6 jours environ.

Au niveau de l'expression de Fos, nous observons une diminution du marquage entre les stades J1 et Acquisition dans le CPp pour l'ensemble des animaux T et P. Néanmoins, il faut souligner que nous ne mettons pas en évidence de différence entre les rats T1 et P1. Cette diminution ne semble donc pas être liée à l'apprentissage spécifique de la tâche de discrimination. En revanche, la forte activation cérébrale observée au stade J1 pourrait être due à une attention accrue des animaux T et P liée à la nouveauté de la situation expérimentale. La diminution relative de l'expression de Fos aux stades ultérieurs serait due à l'habituation progressive des rats au dispositif expérimental.

Quel que soit le stade d'entraînement, nous n'observons aucune différence de marquage entre les rats T et P dans le CP. L'expression de Fos induite par la présentation des deux odeurs dans le labyrinthe pourrait masquer les modifications d'activation cérébrale liées plus spécifiquement aux processus mnésiques. Une telle hypothèse est confortée par la nature plurimodale des cellules du CP (Schoenbaum et Eichenbaum 1985 ; Zinyuk et al. 2001).

Dans la CA1, au stade J1, les rats T1 sont plus immunomarqués que les rats P1. Ceci pourrait être lié à une différence de motivation entre les rats puisque seuls les rats T sont soumis à une restriction hydrique. Notons d'ailleurs que dès le stade J1, les rats P présentent un pourcentage important de « non choix » dans le labyrinthe. Le niveau d'attention des rats T en relation avec l'état de motivation pourrait donc être à l'origine de la différence observée.

Au niveau de la CA3, les rats P4 présentent une augmentation de l'immunoréactivité par rapport aux rats T4. Là encore, il faut noter que le niveau de motivation des rats P et T est différent et les données observées résulteraient à la fois d'une modification du statut motivationnel et d'une diminution progressive des déplacements dans le labyrinthe. En effet, l'HC pourrait jouer un rôle dans les mécanismes olfacto-moteurs (Vanderwolf, 2001).

Données originales

Dans le VLO, au stade de l'acquisition, nous observons une expression de Fos plus importante chez les rats T que chez les rats P. Cette différence suggère un rôle tardif du VLO, lorsque l'animal maîtrise la tâche.

Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence d'une part, une hétérogénéité fonctionnelle entre les deux sous-régions hippocampales CA1 et CA3, et d'autre part, une activation séquentielle de l'hippocampe puis du néocortex au cours de la mise en place de l'apprentissage olfactif. Notre étude soutiendrait l'hypothèse d'une collaboration hippocampo-néocorticale dans laquelle l'HC effectuerait un traitement précoce de l'information tandis que le néocortex serait impliqué à plus long-terme. La subdivision postérieure du CP est mise en jeu lors de la découverte du dispositif expérimental par le rat au cours de la première session dans le labyrinthe.

Données originales

Article 3:

Roullet, F., Datiche, F., Lienard, F. & Cattarelli, M. (2005). Learning-stage dependent Fos expression in the rat brain during acquisition of an olfactory discrimination task. *Behav Brain Res* **157**, 127-137.

Research report

Learning-stage dependent Fos expression in the rat brain during acquisition of an olfactory discrimination task

Florence Rouillet, Frédérique Datiche*, Fabienne Liénard, Martine Cattarelli

CESG-CNRS UMR 5170 – 15 rue H. Picardet, 21000 Dijon, France

Received 26 April 2004; received in revised form 15 June 2004; accepted 21 June 2004

Available online 5 August 2004

Abstract

By using Fos immunocytochemistry, we investigated the activation in olfactory-related areas at three stages (the first and fourth days of conditioning and complete acquisition) of an olfactory discrimination learning task. The trained rats (T) had to associate one odour of a pair with water-reward within a four-arm maze whereas pseudo-trained (P) rats were only submitted to the olfactory cues without any reinforcement. In the piriform cortex, both T and P rats exhibited a higher immunoreactivity on the first day, which seemed to indicate a novelty-related Fos expression in this area, but whatever the learning-stage, no significant difference in Fos expression between T and P rats was observed. In hippocampus, Fos expression was significantly different between T and P rats in CA1 and CA3 on the first and fourth days respectively. Thus we showed a differential activation of CA1 and CA3 subfields which might support a possible functional heterogeneity. In the orbitofrontal cortex, Fos immunoreactivity was significantly higher in T rats compared to P rats when mastery of the discrimination task was complete. In contrast, no learning-related Fos expression was found in infralimbic and prelimbic cortices. The present data suggest an early implication of the hippocampal formation and a later involvement of neocortical areas throughout different stages of a progressively acquired olfactory learning task.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Olfaction; Learning stages; Immunocytochemistry; Fos

1. Introduction

Number of experiments studying mnemonic processes are based on olfaction. Macrosmate animals, such as rats, have a high capacity to memorize and to recognize odourants to solve complex tasks [40]. Various studies examined brain neuronal modifications after either learning task acquisition [33,36] or retrieval [43]. Even if some authors examined the cerebral activation at different phases of an olfactory discrimination task, i.e. initial exploration of the experimental apparatus (nose-poke without reinforcement), discrimination for water-reward and overtraining [19,20], the chronological involvement of brain regions during progressive mastery of an associative olfactory learning task remains not well known. Such an approach could bring out interesting insights about

the temporal modifications of neural brain networks through progressive conditioning. Thus, a major question is whether the same brain areas remain similarly involved throughout the different stages of learning or if they play a time-dependent role. By using a Skinner box, Destrade et al. [7] hypothesized that during the acquisition of an appetitive task, the progressive daily increase in performance level might reflect the temporal kinetics of the achievement of consolidation. Bertaina-Anglade et al. [1] further examined Fos expression after one, two or five days of appetitive conditioning. They showed a differential activation of some brain structures such as hippocampus, during the first and the second days of training whereas no task-dependent increased Fos immunoreactivity was observed when acquisition was complete.

In the present study, we investigated if a differential cerebral activation would occur during progressive consolidation of an olfactory discrimination learning in the rat. To this aim, the level of activity in some olfactory-related brain areas was

* Corresponding author. Tel.: +33 3 806 816 81; fax: +33 3 806 816 01.
E-mail address: datiche@cesg.cnrs.fr (F. Datiche).

examined at three learning-stages: initial (day 1), intermediate (day 4) and final (day of acquisition).

Since the immediate early gene *c-fos* is believed to be involved in the long-term changes in cellular functioning linked to plasticity [17,18], Fos protein immunocytochemistry was used. We previously showed a differential level of Fos expression in the piriform cortex (PCx) in trained rats regarding their velocity to acquire a discrimination olfactory learning task [6]. In the present study, mapping of activity in olfactory-related areas such as PCx, hippocampus and some prefrontal areas was performed. These brain areas are interconnected and are known to play a role in olfactory memory. On an anatomical point of view, PCx is connected via the lateral entorhinal cortex to hippocampus [15]. The PCx is also reciprocally connected to ventro-lateral (VLO), lateral (LO) orbitofrontal and infralimbic (IL) cortices [5]. Moreover, the temporal CA1/subiculum region innervates the pre- and infralimbic areas in the rat [23]. On a functional point of view, PCx is not only involved in olfactory coding [47] but also in olfactory memory [14] and several studies showed electrophysiological modifications in this area either *in vitro* [24] or after a discrimination task learning [26,34]. The hippocampus plays a role in odour discrimination learning as rats with hippocampal system damage are impaired in discrimination learning and acquisition of learning set [8,9]. Moreover by using electrophysiological recordings, Truchet et al. [44] recorded a LTP-like phenomenon in the dentate gyrus (DG) immediately after the first learning session of an olfactory discrimination task. The prefrontal cortex is also involved in olfactory stimulus processing. It has been shown that lesion of the rat medial prefrontal area impaired the reversal of an olfactory Go/NoGo task [10]. The orbitofrontal cortex seems critical in stimulus-reinforcer association in order to guide goal-directed behaviour [12] and the infralimbic region could sustain integration of rewarded cue in motivated rats performing a memory task [32].

Thus, PCx, hippocampus and prefrontal areas might constitute a neuronal network involved in memory trace formation. By means of Fos mapping, the present experiment was undertaken to examine at three learning-stages if a chronological activation of these brain areas occurred during progressive mastery of an olfactory discrimination task.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Fifty-five male SPF Wistar rats weighing 200–220 g at the beginning of the experiments were used. The present experimental procedures followed the guidelines of the European Communities council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and efforts were made to reduce the number of animals employed. Rats were individually housed under a 12 h/12 h inverted light/dark cycle and had food *ad libitum*.

Rats were daily handled by the experimenter for approximately 2 weeks prior to training initiation.

We used trained (T, $n = 22$), pseudo-trained (P, $n = 22$) and home-cage control (C, $n = 11$) rats.

2.2. Water deprived schedule

Three days before the beginning and during the training, T rats were water-deprived and received water 10 min per day in their home-cage. P and C rats had always *ad libitum* access to water.

2.3. Experimental maze

The day before the beginning of conditioning and in order to habituate the animals to the experimental environment, T and P rats were individually placed for 10 min in the maze without any odour and could freely explore it.

The T rats were conditioned to an olfactory discrimination task [36]. They had to associate one odour of a pair with a water-reward in a four-arm maze. Geraniol was the water-reinforced cue whereas limonene was never rewarded. The T rats were trained for 20 trials per day. A trial began when the rat was placed in the starting chamber, isolated from the arms by four doors. Each odour was randomly delivered in one of the arms. After 7 s, time necessary for the odours to reach the starting chamber, the two corresponding doors were opened and the rat had to choose the geraniol-odourised arm to obtain water-reward. Cutting an infra-red beam located at the end of each arm allowed the rat to interrupt the trial. The duration of each trial was of 20 s. Between each trial the odours were evacuated out of the maze by a fan. The rats had to come back to the starting chamber on their own. The whole session had a duration of 20 min. The P rats were daily placed into the maze and were submitted to the two odours randomly delivered in two of the four arms. However, they never got water in the maze.

2.4. Groups of rats

Trained rats were divided in three groups, according to three learning-stages. The T1 rats ($n = 6$) were trained for one day only (day 1), T4 rats ($n = 9$) were trained for four days (day 4) and Tacq ($n = 7$) rats had to perform a complete acquisition of the task (day of acquisition). The learning-criterion was reached when rats performed 80% of correct choice on 20 trials, or chose the rewarded odour in at least 80% of the last 10 trials as described by Saar et al. [36].

The P rats were sacrificed in parallel to T rats. Thus, P1 ($n = 6$), P4 ($n = 9$) and Pacq ($n = 7$) rats were used to examine the expression of Fos due to the experimental context and to the odour stimulation in the maze without any association with a reinforcement.

In parallel to T and P rats we also used C rats to evaluate the basal Fos expression as these home-cage control rats were not submitted to any experimental manipulation. According

to the three stages considered, they were named C1 ($n = 4$), C4 ($n = 4$) and Cacq ($n = 3$).

All animals were sacrificed 90 min. after the beginning of the task as this delay allows to reach a high level of Fos protein [4].

2.5. Fos immunocytochemistry

Following deep anaesthesia, the rats were perfused transcardially with 200 ml of Ringer lactate containing 0.1% of heparin followed by 500 ml of ice-cold fixative (4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4). The brains were removed and post-fixed (2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid in 0.1 M PB, pH 7.4) for 12 h at 4 °C. They were cryoprotected in a 30% sucrose PB solution for 48 h. Then, the brains were cut coronally (25 μ m) with a cryostat and free-floating sections were collected in 0.1 M phosphate buffer saline containing 0.3% Triton X-100 (PBST; pH 7.4) to perform Fos immunohistochemistry.

Brain sections were placed in a 3% hydrogen peroxide solution for 30 min and incubated in PBST containing 3% normal goat serum for 2 h. Subsequently, sections were incubated for two days at 4 °C with a rabbit anti-c-fos antibody (AB-5; Oncogene Science) diluted at 1:5000 in 0.1 M PBST with 0.1% sodium azide (PBST-Az). They were transferred into biotinylated anti-rabbit IgG (1:1000 in PBST; 24 h at 4 °C; Vector Laboratories). Then, the sections were incubated for 1 h in avidin–biotin–horseradish peroxidase complex reagent from an ABC Elite kit (Vector Laboratories). Between all steps, sections were rinsed several times with PBST. Peroxidase activity was revealed by using 3,3'-diaminobenzidine (0.02%) and H₂O₂ (0.003%) in a 0.05 M Tris–HCl solution (pH 7.6). The reaction was enhanced by adding nickel ammonium sulfate (0.6%) which provides a black staining. The nickel-intensified diaminobenzidine reaction was controlled by inspecting sections under the microscope and stopped by rinses in PBST-Az.

Finally, the brain sections were mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated and coverslipped with DePeX for light microscopy. Fos positive cells were identified on the basis of a black reaction product confined to the cell nucleus.

2.6. Data analysis

The nomenclature of Paxinos and Watson atlas [31] for the rat brain was used for delimitation of cerebral regions. The PCx extends from +12.7 mm to +5.7 mm according to the interaural line. This paleocortex can be divided in PCx-a and PCx-p subdivisions. The boundary between them is located at the level of the anterior commissure (+8.7 mm from interaural line). In each animal, we analysed eight sections taken every 1000 μ m from level +12.7 mm to level +5.7 mm, along the whole rostro-caudal PCx extent. Some of the same sections were used to analyse Fos expression in other brain areas. We counted labelled cells at +12.7 mm from interau-

ral line, in VLO, at +11.7 mm in IL and in prelimbic region (Cg3), and at +5.7 mm in dorsal hippocampal subdivisions (DG, CA3, CA1) (Fig. 2D). Fos staining was analysed automatically by using the Optilab software. We counted all the cells darker than the surrounding background. As previously described [35], the well-delineation of PCx and hippocampus allowed us to count the labelled cells on the entire extent of these target regions within the selected coronal sections and the data were expressed as mean number of labelled cells per rat. As the borders of neocortical areas are less easily determined, immunoreactive cells were counted in a sample region (0.1 mm²) (Fig. 2G) and the data were expressed as a number of Fos-positive cells per mm².

2.7. Statistical analysis

Behavioural data in T and P rats were compared using a Chi square test.

Fos expression in PCx was statistically analysed using a two-way analysis of variance: one factor was the experimental condition and the other was the location of the immunoreactive cells in both subdivisions considered. In other brain areas, one-way ANOVA was performed. Post hoc pairwise group comparisons were made by a least significant difference (LSD) procedure. We considered differences as significant when $P < 0.05$. All statistical analysis were achieved by using the software SAS 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

LSD pairwise comparison in each area analysed was used to examine the chronological evolution of Fos expression, between T1, T4 and Tacq rats and between P1, P4 and Pacq rats.

3. Results

3.1. Behavioural data

On each trial in the maze, T and P rats had three possibilities: to choose to enter in the arm where geraniol was delivered (“geraniol choice”), to choose the arm where limonene was delivered (“limonene choice”) or to stay in the starting chamber (“no choice”). The Chi square test, which took into account these three behavioural possibilities, showed that choices of T and P rats were significantly different ($P < 0.001$) whatever the day of training.

The Fig. 1A illustrates the evolution of the mean number of “geraniol choice” for T and P rats through the daily sessions in the maze. During the first training session the score of the T rats was of 52% of “geraniol choice” whereas the score of P rats was of 41%. Both T and P rats chose as much the arm odourised with geraniol as the one odourised with limonene. It can be underlined that P rats (Fig. 1B) remained quiet in the starting chamber in 12% of the trials in contrast to T rats (Fig. 1C). From day 1 to day 4, the mean score of T rats increased to reach 58% of “geraniol choice” on day 4.

Contrarily, the score of P rats remained almost stable from day 1 to day 4. On day 4, P rats had a score of 38%. It could be noticed that, from day 1 to day 4, the number of “no choice” trials increased for P rats (Fig. 1B). From day 4 the score of T rats increased progressively to reach the learning criterion. The final mean score was about 78% of geraniol choice on day of acquisition. An average geraniol preference index was calculated as the number of geraniol choices/number of geraniol + limonen choices. According to the learning-stage considered (day 1, day 4 and day of

acquisition), the index was equal to 50 (± 11), 56 (± 10) and 76 (± 4) in T1, T4 and Tacq rats, respectively. It indicated the progressive learning of the geraniol-reward association. In contrast, the index remained almost constant in P rats and it was equal to 52 (± 15), 46 (± 17) and 47 (± 15) in P1, P4 and Pacq rats, respectively.

On average, T rats mastered the task in 6 days (± 1.15). One rat acquired the task in 4 days, 1 rat in 5 days, 2 in 6 days and 3 in 7 days. It must be underlined that the Tacq rat which performed the task in four days had a final score of 70% on 20 trials and of 90% on the 10 last trials, whereas the mean score of T4 rats was of 58% and none of them reached the learning criterion. P rats, during the last four experimental days, exhibited an increase in the number of “no choice” responses (Fig. 1B).

3.2. Fos immunoreactivity

Whatever the learning-stage and the brain area considered, the basal level of Fos expression was always low and LSD pairwise comparisons showed no significant difference in the labelling between the three groups of C rats (see *F* values in each brain area as indicated below).

3.2.1. Piriform cortex

The T and P rats exhibited a large Fos expression in the PCx and in its two subdivisions on the three learning-stages.

There was a significant effect of the group of rats in the whole PCx [$F_{8,41} = 60.79$, $P < 0.0001$], in PCx-a [$F_{8,41} = 48.7$, $P < 0.0001$] and in PCx-p [$F_{8,41} = 46.03$, $P < 0.0001$].

LSD pairwise comparisons showed that C1, C4 and Cacq rats had a significantly lower Fos immunoreactivity than T1 and P1 rats ($P < 0.05$), T4 and P4 ($P < 0.05$) and Tacq and Pacq rats ($P < 0.05$), respectively. Whatever the learning-stage, no significant difference was observed between T and P rats. Except for C rats, we observed a significant effect of the PCx subdivision (PCx-a versus PCx-p) [$F_{1,41} = 181.30$, $P < 0.0001$] (Fig. 2A–C). In T and P rats, Fos expression

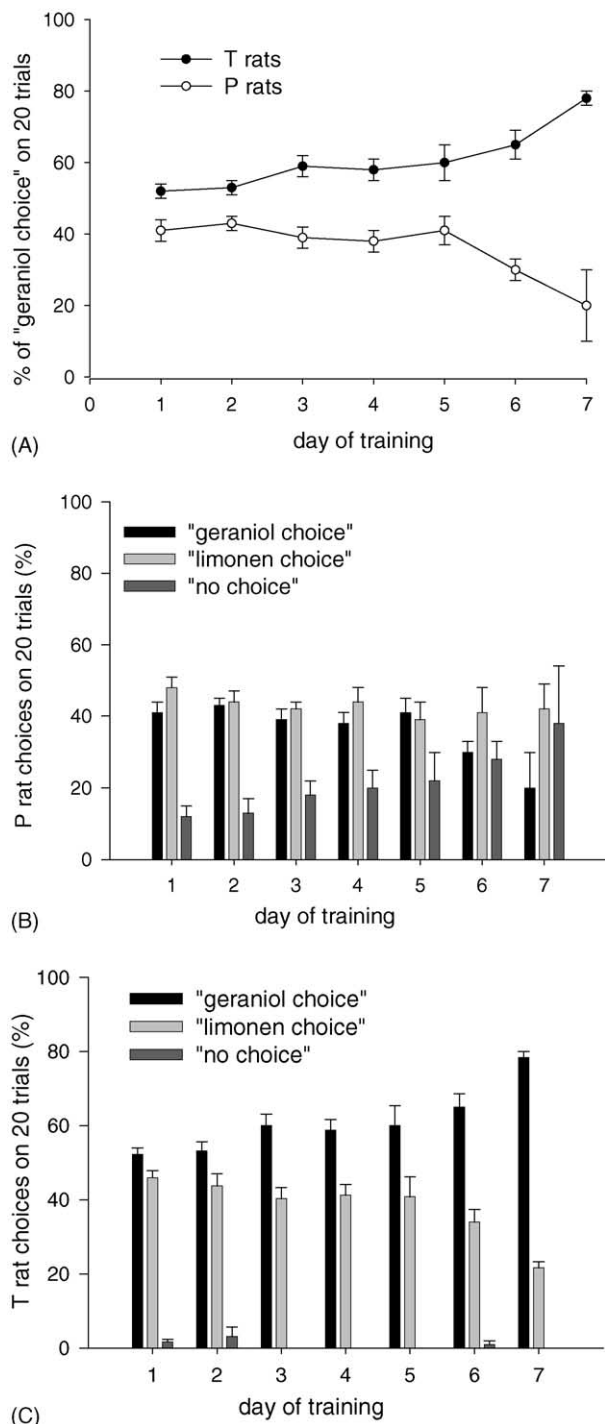


Fig. 1. Behavioural data. (A) Curves illustrating the evolution of the “geraniol choice” throughout the 20-trial daily sessions in either T ($n = 22$) and P rats ($n = 22$). The T rats progressively improved their performance and reached the learning-criterion in 6 days (± 1.15) on average. (B) Histograms showing the evolution of P rats behaviour throughout the daily sessions in the maze. On each trial, these rats which were not water-deprived could choose either the geraniol-odourized arm (“geraniol choice”), the limonene-odourized arm (“limonene choice”) or to stay quiet in the starting chamber (“no choice”) of the maze. The choices are expressed as percentages of the 20-trial daily sessions. It can be noted that the number of “no choice” progressively increased through the daily sessions in the maze. (C) Histograms showing the evolution of T rats behaviour throughout the daily sessions in the maze. On each trial, these rats which were water-deprived could choose either the geraniol-odourized arm for water-reward (“geraniol choice”), the limonene-odourized arm (“limonene choice”) with no reward or to stay in the starting chamber (“no choice”) of the maze. Choices are expressed as indicated in B. The number of “geraniol choice” progressively increased through the daily sessions in the maze.

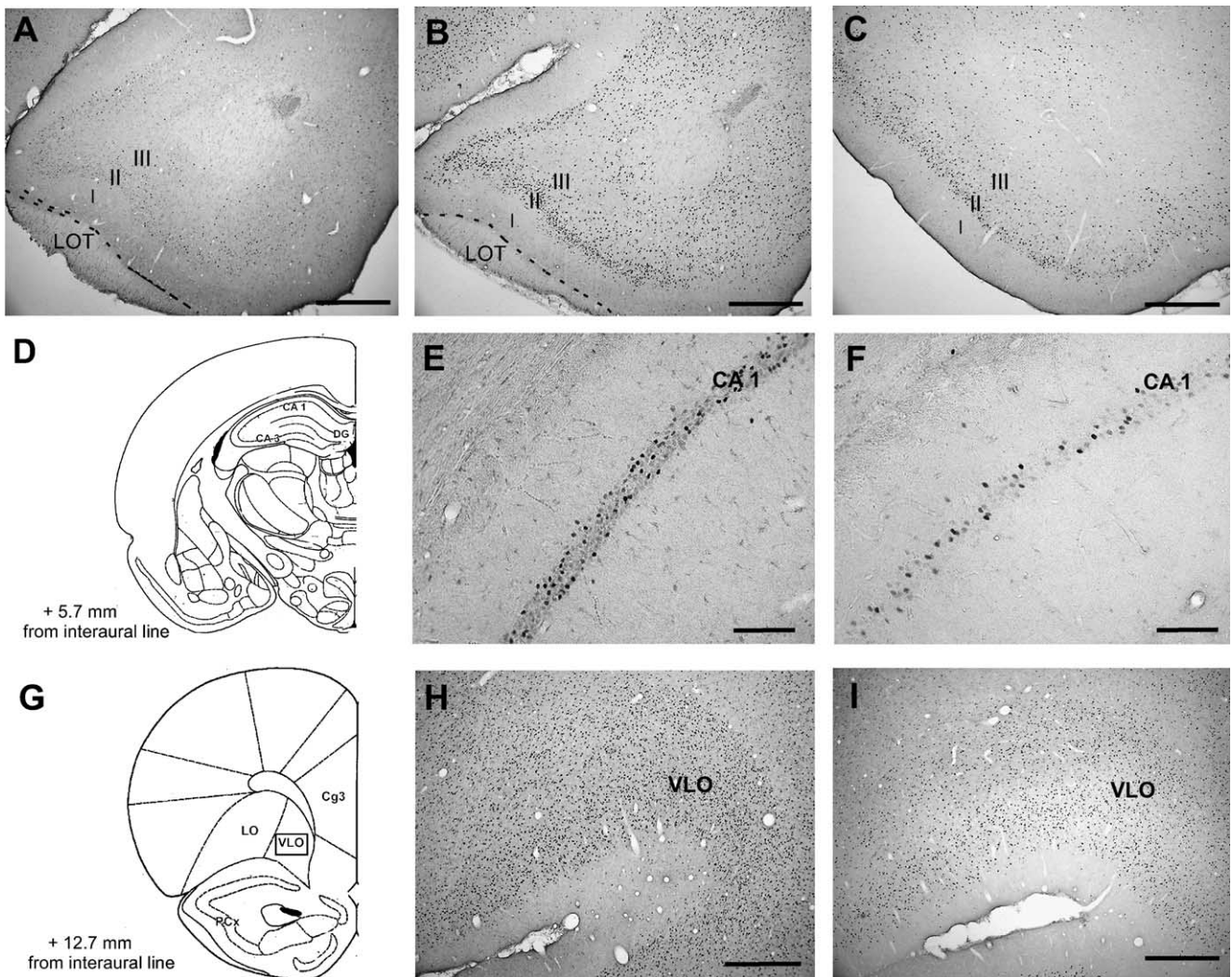


Fig. 2. Photomicrographs of Fos expression in different brain areas. (A and B) Photomicrographs showing Fos immunoreactivity in the three layers (I, II and III) of PCx-a from C4 and T4 rats, respectively on coronal sections taken at +12.7 mm from interaural line. Scale bar = 500 μ m (LOT: lateral olfactory tract). (C) Photomicrograph on a coronal section taken at +5.7 mm from interaural line illustrating the Fos expression in PCx-p from a T4 rat. Scale bar = 500 μ m. (D) Schematic drawing taken from the Paxinos and Watson atlas [31] showing a coronal section taken at +5.7 mm from interaural line. At this level, the labelled cells were counted throughout the entire extent of hippocampal subfields (DG, CA3 and CA1). (E and F) Photomicrographs of CA1 subfield in T1 and P1 rats respectively at level +5.7 mm from interaural line. Scale bar = 100 μ m. (G) Schematic drawing taken from the Paxinos and Watson atlas [31] of a coronal section taken +12.7 mm from interaural line. The rectangle illustrates the location of the sample region in which labelled cells were counted in VLO. (H and I) Photomicrographs illustrating the Fos expression in VLO in Tacq and Pacq rats respectively at level +12.7 mm from interaural line. Scale bar = 500 μ m.

was significantly higher in the PCx-a than in the PCx-p ($P < 0.05$) whatever the learning-stage (Fig. 3A and B). There was a significant interaction between the group of rats and the PCx subdivision [$F_{8,41} = 5.5$, $P < 0.0001$].

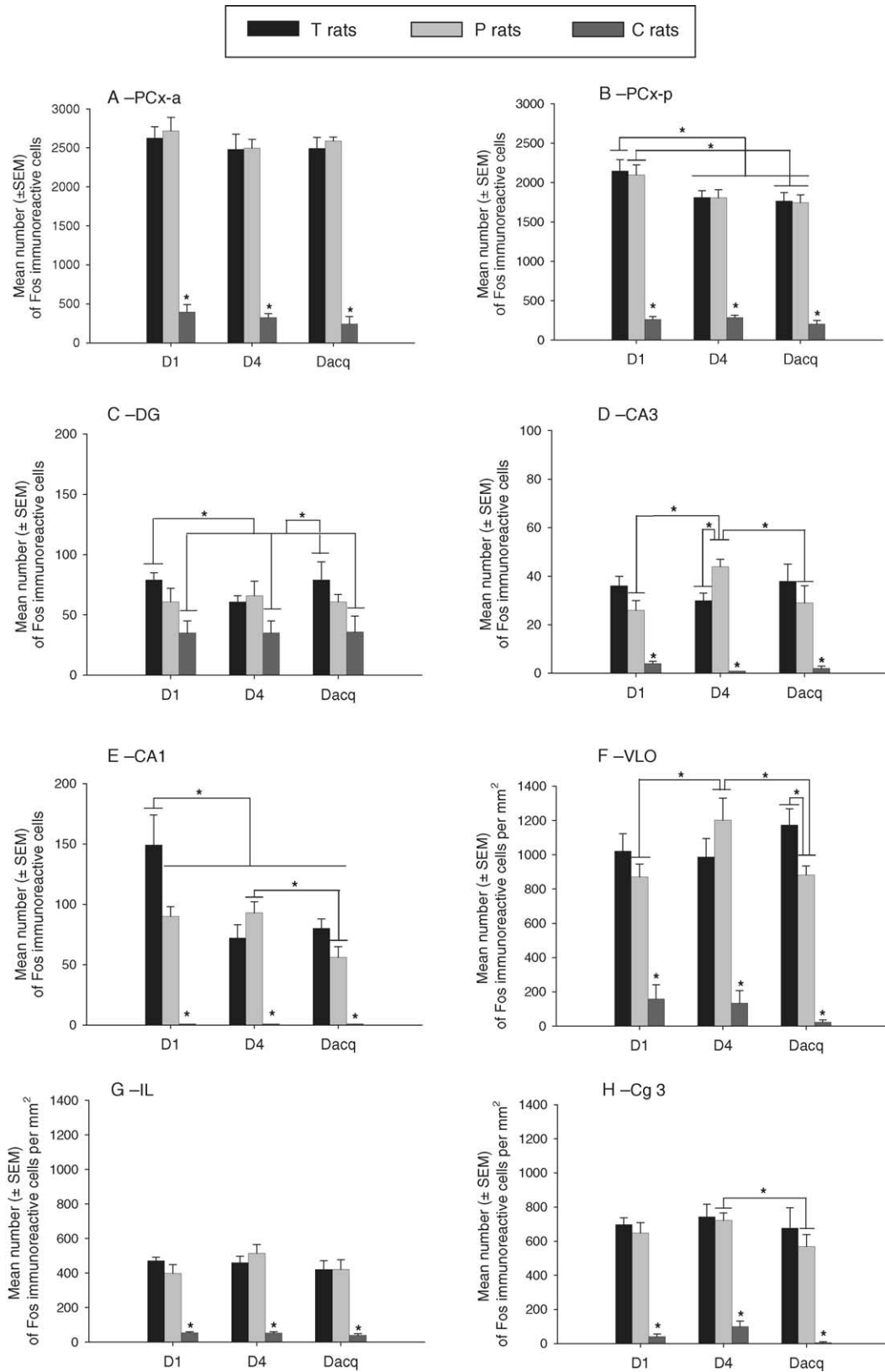
In PCx-p, LSD pairwise comparisons showed that T1 rats were significantly more labelled than T4 and Tacq rats ($P < 0.05$). The P1 rats also had a significantly higher Fos expression than Pacq rats ($P < 0.05$).

3.2.2. Hippocampus

In the DG (Fig. 3C) there was a significant effect of the group of rats [$F_{8,41} = 2.31$, $P < 0.05$]. On day 1, pairwise

comparisons showed that T1 rats exhibited a significantly higher number of immunoreactive cells compared to C1 rats ($P < 0.05$). On day 4, no difference was observed between T4 and P4 rats compared to C4 rats. On day of acquisition, only Tacq rats had a higher immunolabelling than Cacq rats ($P < 0.05$). Whatever the learning-stage, no difference was observed between T and P rats. The chronological analysis of Fos expression through the learning-stages did not show any significant difference between T1, T4 and Tacq rats as well as between P1, P4 and Pacq rats.

In CA3 (Fig. 3D), whatever the learning-stage there was a significant effect of the group of rats [$F_{8,41} = 7.46$, $P <$



0.0001]. C rats had a lower immunolabelling compared to T and P rats ($P < 0.05$). P4 rats had a significantly higher number of Fos reactive cells than T4 rats ($P < 0.05$). The Fos expression was not different between T1, T4 and Tacq rats. In contrast, pairwise comparison showed that P4 rats exhibited a higher number of cells than P1 ($P < 0.05$) and Pacq rats ($P < 0.05$).

In CA1 (Fig. 3E), on the three learning-stages a significant effect of the group of rats [$F_{8,41} = 14.05$, $P < 0.0001$] was noted. The immunoreactivity in C rats was significantly lower compared to both T and P rats ($P < 0.05$). The T1 rats were significantly more labelled than P1 rats ($P < 0.05$) (Fig. 2E and F). Pairwise comparisons pointed out that Fos expression was not similar in T rats through the learning-stages. Thus T1 rats had a significantly higher number of labelled cells compared to T4 and Tacq rats ($P < 0.05$) and P4 rats were more labelled than Pacq rats ($P < 0.05$).

3.2.3. Neocortex

In VLO (Fig. 3F), a significant effect of the group of rats [$F_{8,38} = 16.10$, $P < 0.0001$] was observed. Whatever the learning-stage, LSD pairwise comparisons showed that the C rats were significantly less immunolabelled than T and P rats ($P < 0.05$).

The Tacq rats had a significantly higher Fos immunoreactivity compared to Pacq rats ($P < 0.05$) (Fig. 2H and I). No significant difference was observed between T1, T4 and Tacq. P4 rats were significantly more labelled than P1 ($P < 0.05$) and Pacq rats ($P < 0.05$).

In IL (Fig. 3G), a significant effect of the group of rats [$F_{8,39} = 16.54$, $P < 0.0001$] was noted. There was a significantly lower Fos expression in C rats compared to T and P rats ($P < 0.05$). Whatever the learning-stage, T rats were not significantly different compared to P rats. No significant change in Fos immunoreactivity was found between T1, T4 and Tacq rats, and between P1, P4 and Pacq rats.

In Cg3 (Fig. 3H), a significant effect of the group of rats [$F_{8,38} = 18.56$, $P < 0.0001$] was found. Pairwise comparisons showed that C rats were always significantly less immunolabelled than T and P rats ($P < 0.05$). However, the number of labelled cells was not different between T and P rats, whatever the learning-stage. No statistical difference was observed between T1, T4 and Tacq rats whereas P4 rats exhibited a higher number of immunoreactive cells than Pacq rats ($P < 0.05$).

4. Discussion

The present study was undertaken to investigate the possible evolution of the neural activity in some olfactory-related areas at three learning-stages during an olfactory conditioning requiring several days for completion. The learning task was an olfactory discrimination and T rats had to associate one odour of a pair with water. Negative reinforcement was not used when rat did not choose the correct odour. Throughout training sessions, we observed a progressive increase in T rat performance. In contrast, the time spent in the starting chamber of the maze increased in P rats, which could indicate a lack of motivation.

By using Fos immunocytochemistry as a mapping tool, we provided evidence that some olfactory-related areas were not similarly involved through the three learning-stages. Fos expression showed that on day 1 and on day of acquisition, T rats were significantly more labelled than P rats in CA1 and in VLO respectively. On day 4 we noticed that P rats were significantly more labelled than T rats in CA3. In contrast, no learning-related change was found in PCx.

4.1. Piriform cortex

Whatever the learning-stage we observed a significantly higher Fos labelling in PCx-a compared to PCx-p, in both T and P rats. As previously hypothesized [6], this finding could be due to the anatomical difference between the two areas since the PCx-a receives the majority of bulbar inputs [13].

The chronological analysis showed a significantly higher Fos immunoreactivity in both T and P rats on day 1 compared to the other stages within PCx-p. Such data support a functional heterogeneity of PCx as described in some other studies which showed that electrophysiological responses were different between its anterior and posterior parts [25,26,28].

Since the higher Fos expression on day 1 was observed in both T and P rats, it was probably not due to the specific learning task, i.e. association between odour and water-reward. It can be underlined that even if the rats were allowed to explore the maze one day before the onset of the experiment, T and P rats were submitted to the protocol itself (opening of the doors, olfactory stimulations, ...) on day 1. It can be supposed that the novelty of the experimental protocol could account for the higher Fos labelling on the first day. Our finding is in

Fig. 3. Chronological analysis of Fos expression. Histograms illustrating the number of Fos immunoreactive cells (mean \pm S.E.M.) in the olfactory-related areas analysed in trained rats (T, $n = 22$), pseudo-trained rats (P, $n = 22$) and control rats (C, $n = 11$) on day 1 (D1), day 4 (D4), and day of acquisition (Dacq). (A and B) Fos expression in the PCx-a and PCx-p. In PCx-p the number of labelled cells was significantly higher ($*P < 0.05$) in T1 rats compared to T4 and Tacq rats, whereas P1 rats exhibited a significantly ($*P < 0.05$) higher Fos expression compared to Pacq rats. (C–E) Fos immunoreactivity in the hippocampus subfields: DG, CA3 and CA1, respectively. In DG, only T1 and Tacq were significantly more labelled than C rats ($*P < 0.05$). The number of labelled cells was significantly higher in T rats compared to P rats in CA1 on the first session in the maze. In contrast, Fos expression was significantly higher in P rats compared to T rats in CA3 on the fourth day ($*P < 0.05$). (F–H) Fos immunoreactivity in the VLO, IL and Cg3 regions, respectively. In all these prefrontal cortical areas C rats exhibited a significantly lower number of Fos positive cells compared to both T and P rats ($*P < 0.05$). In VLO, the Fos expression was significantly higher in T compared to P rats when the acquisition of the olfactory discrimination task was complete ($*P < 0.05$). In Cg3, P4 rats had a significantly higher number of immunoreactive cells compared to Pacq rats ($*P < 0.05$).

accordance with a significantly higher PCx activation in rats exploring the olfactory training apparatus compared to over-trained rats observed in a *c-fos* mRNA in situ hybridization study [21].

The lower Fos level on day 4 and day of acquisition compared to day 1 could be due to the progressive habituation to the experimental context. A decreased Fos expression has been reported in either visual [48] or olfactory regions [27] when familiarization to the stimuli occurs. Montag-Sallaz and Buonviso [27] noted a decreased expression of *arg3.1* after odour familiarization in the PCx-a only. Such a discrepancy with the present data showing a lower Fos level in PCx-p could be due to the immediate-early gene examined (*c-fos* versus *arg3.1*) and to the fact that these authors used in situ hybridization method.

No statistical difference was observed between T and P rats in the PCx and its two subdivisions, whatever the learning-stage. Even if several studies reported a role of PCx in olfactory mnemonic processes [26,33,34], we did not show any learning-related Fos expression in this area. As both T and P rats smelt the two odours in the maze, the sensory stimulation of the PCx could have hidden the Fos labelling specifically linked to learning. It can also be noticed that PCx cells exhibit plurimodal responses since they are activated by different kinds of stimuli (odour sampling, olfactory discrimination, water consumption) [38,49]. Lastly the specific implication of PCx in olfactory memory was demonstrated by using electrophysiological approaches [24,26,33,34]. In the present study, Fos immunodetection reflected cell activation without giving any information about the specific nature of individual cellular responses. During conditioning, several steps from odour sampling to odour-reward association could have activated Fos expression without any possibility to distinguish between them.

4.2. Hippocampus

In the DG, CA1 and CA3, Fos immunoreactivity was significantly higher in T and P rats compared to C rats whatever the learning-stage considered.

In DG we did not observe Fos labelling difference between T and P rats, whatever the learning-stage. In contrast to electrophysiological experiments performed by Truchet et al. [44], we did not find a learning-related Fos expression in DG. We observed a substantial activation in the different experimental groups, including C rat group. It might be underlined that DG receives olfactory inputs from entorhinal cortex [16] and the sensory afferent stimulation might account for the present data.

In CA1, Fos expression was significantly higher in T rats compared to P rats on day 1. Using *c-fos* mRNA detection, a pattern of “CA1 dominance” has been described in rats exploring a novel field [21]. However, in the present experiment novelty should have induced a similar labelling in T and P rats since both groups were submitted to their first experimental session. It was not the case since T rat Fos la-

bellung was significantly higher than the P rats one. It can be underlined that the motivational states of T and P rats were different. Since T rats only were thirsty, their arousal and/or attention levels should be increased in comparison with the P rats which were not water-deprived. It was sustained by the behavioural data indicating a high number of “no choice” in P rats within the maze. On the contrary, the internal state of thirst in T rats should elicit an enhanced exploration in the maze. It is interesting to note that in the olfactory bulb, information processing is modulated by the internal state of hunger [30] or fear [3]. Such a mechanism might be also involved at the hippocampal level. Indeed, it has been shown that neuronal activity in hippocampus was modulated according to the presence of food bait or not in maze arms [22].

A striking finding was that the differential Fos expression between T and P rats appeared on the first day. This very early implication of CA1 during conditioning is in accordance with the Fos immunocytochemical study of Bertaina-Anglade et al. [1] which showed an early activation of CA1 during acquisition of an appetitive operant task in mice.

In CA3, P rats had a significantly higher number of immunoreactive cells compared to T rats on day 4. Then this number significantly decreased on the acquisition day. Such a data is not easy to explain since Fos expression in P rats was increased on day 4 compared to the other stages. It could be underlined that, in P rats, the number of “no choice” responses was slowly increasing through the three stages considered, indicating an increasing lack of motivation and/or an enhanced familiarization through conditioning. Interactions between motivational state and familiarization might be involved in the data observed. Moreover, it cannot be ruled out that the higher Fos expression in P4 rats could be in relation with a modification of their locomotor activity after several daily sessions, as hippocampus has been hypothesized to sustain olfacto-motor mechanisms [45].

In contrast with the results obtained by Gall et al. [11] in CA3 we did not observe a specific activation linked to initial learning of the odour pair. However, these authors did not use protein immunodetection, and the olfactory discrimination task was different. Rats had to discriminate between a positive odour which was water rewarded and a negative odour which was reinforced by a strobe flash whereas we used a positive reinforcement only.

The chronological analysis showed a specific time-window for functional implication of the hippocampal subfields CA1 and CA3 during progressive acquisition of the olfactory discrimination task. In CA3, P4 rats exhibited a significantly higher Fos labelling compared to P1 and Pacq rats. In CA1, T1 rats had a significantly higher number of labelled cells compared to T4 and Tacq rats whereas P4 rats were significantly more labelled than Pacq rats only. These results provided additional data for hippocampal functional heterogeneity. It is consistent with earlier findings which conferred to CA1 and CA3 a specific function in the processing of the olfactory information [20]. It might be underlined that the involvement of hippocampus in mnemonic processes might

depend not only on the learning task but also on a specific time-window during the learning process. Lesion study [41] indicated a transient role of hippocampus in memory of a set of olfactory tasks. In contrast, an olfactory discrimination task rapidly acquired did not induce any specific hippocampal activation after acquisition [43].

4.3. Neocortex

In VLO, we demonstrated a significantly higher Fos expression in T rats compared to P rats when acquisition is completed. It is in agreement with a significant increase in Fos immunoreactivity in trained rats after acquisition of an olfactory learning as reported by Tronel and Sara [43] on the basis of a discrimination task acquired in one training session. We further extend their result by showing that even in a learning task acquired after several days of training, VLO is activated. It might suggest an involvement of VLO in memory consolidation process when the odour-reward association is mastered. This area could play a role in stimulus-reinforcer association and could sustain the selection and execution of appropriate behavioural strategy [12]. The VLO seems also critical in the adaptive and decision making behaviours [37,39]. It is sustained by the behavioural data showing that P rats did not move often in the maze and did not look motivated whereas T rats were very active in the maze. In VLO, Fos expression increased on the day of acquisition in T rats when they reached the learning-criterion. The behavioural performance on that day resulted from the progressive consolidation of the learning through progressive conditioning sessions. As underlined by Sutherland and McNaughton [42], the interactions between hippocampus and neocortex seem essential for memory trace formation. Such a hippocampo-cortical relation might participate to the remodelling of memory trace over progressive training session.

In IL, no difference was found between T and P rats whatever the learning-stage. It is consistent with the results obtained by Tronel and Sara [43]. One can hypothesize that IL might be similarly activated through training. In our study the lack of differentiated pattern of activation could be due to the olfactory task. An aversive paradigm might have been more efficient to elicit a different Fos expression in IL as it has been demonstrated that this subfield could be involved in the control of visceral activity [46].

In Cg3, we found a decreased Fos labelling in P rats between day 4 and day of acquisition. It could be due to habituation and/or familiarization to the experimental context and to the decreasing motivation of P rats through daily sessions in the maze. Tronel and Sara [43] indicated a higher Fos immunoreactivity in trained rats after learning of a rapidly acquired task. In the present study, T rats exhibited no Fos expression difference compared to P rats whatever the stage of training. Such a discrepancy might be due to the difference between the experimental designs, since in contrast to these authors, we used a task that required several days for completion.

The chronological analysis of Fos expression showed a differential timing in the implication of CA1 and VLO during acquisition of olfactory learning. A differential Fos expression was observed between T and P rats at the first and fourth stages of training in CA1 and CA3, respectively, and in VLO on the day of acquisition. We can hypothesize that a chronological organisation of information and/or memory processings occurs between hippocampus and neocortex through the training session. It is well-known that interactions between VLO and hippocampus are crucial for memory formation [29]. Memory is considered as a fundamentally dynamic process and a dialogue between the hippocampal formation and neocortex seems to support consolidation of mnemonic trace [42]. Moreover, a time-dependent reorganisation has been shown in hippocampo-neocortical circuitry when testing different retention intervals in a spatial discrimination task [2]. Hippocampus could be involved in the early consolidation of the information whereas the neocortical information processing would be necessary for long-term memory storage.

Since we demonstrated a sequential activation of CA1 and VLO during acquisition of olfactory learning, the present study provides additional supports to the hypothesis that neural networks might be reorganised over time. This is in agreement with the hypothesis of time-dependent changes during memory processing as proposed by Destrade et al. [7].

In conclusion, our paradigm indicated that the hippocampo-cortical network was differentially activated as the rat performance increased throughout training sessions. It underlines the relevance of a slowly-acquired olfactory learning task which implied a progressive consolidation to study brain modifications underlying mnemonic processes. In future experiments it would be of interest to analyse Fos expression after retrieval of this same discrimination olfactory task.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dominique Valentin for her helpful comments on the statistical analysis. We also gratefully acknowledge Edi Barkai and his collaborators (Ben Gurion University, Israël) for their invaluable assistance with the maze elaboration. F. Rouillet is a recipient of a Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MNERT) grant.

References

- [1] Bertaina-Anglade V, Tramu G, Destrade C. Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *Eur J Neurosci* 2000;12:3803–12.
- [2] Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 1999;400:671–5.

- [3] Cattarelli M, Pager J, Chanel J. Modulation of the multiunit responses of the olfactory bulb and respiratory activity as a function of the significance of odors in freely moving rats. *J Physiol (Paris)* 1977;73:963–84.
- [4] Chaudhuri A, Zangenehpour S, Rahbar-Dehgan F, Ye F. Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 2000;60:403–10.
- [5] Datiche F, Cattarelli M. Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin. *Brain Res Bull* 1996;41:391–8.
- [6] Datiche F, Rouillet F, Cattarelli M. Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: an immunohistochemical study in the rat. *Brain Res Bull* 2001;55:95–9.
- [7] Destraide C, Messier C, Bontempi B, Sif J, Jaffard R. Investigations into time-dependent metabolic changes during memory processing in the mouse brain using (14C)-deoxyglucose and (14C)-glucose. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1992.
- [8] Eichenbaum H, Mathews P, Cohen NJ. Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. *Behav Neurosci* 1989;103:1207–16.
- [9] Eichenbaum H, Schoenbaum G, Young B, Bunsey M. Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13500–7.
- [10] Ferry AT, Lu XC, Price JL. Effects of excitotoxic lesions in the ventral striatopallidum–thalamocortical pathway on odor reversal learning: inability to extinguish an incorrect response. *Exp Brain Res* 2000;131:320–35.
- [11] Gall CM, Hess US, Lynch G. Mapping brain networks engaged by, and changed by, learning. *Neurobiol Learn Mem* 1998;70:14–36.
- [12] Gallagher M, McMahan RW, Schoenbaum G. Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning. *J Neurosci* 1999;19:6610–4.
- [13] Haberly LB. Neuronal circuitry in olfactory cortex: anatomy and functional implications. *Chem Senses* 1985;10:219–38.
- [14] Haberly LB, Bower JM. Olfactory cortex: model circuit for study of associative memory? *TINS* 1989;12:258–64.
- [15] Haberly LB, Price JL. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. II. Systems originating in the olfactory peduncle. *J Comp Neurol* 1978;181:781–807.
- [16] Hasselmo ME, McClelland JL. Neural models of memory. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:184–8.
- [17] Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev* 1998;28:370–490.
- [18] Herrera DG, Robertson HA. Activation of *c-fos* in the brain. *Prog Neurobiol* 1996;50:83–107.
- [19] Hess US, Gall CM, Granger R, Lynch G. Differential patterns of *c-fos* mRNA expression in amygdala during successive stages of odor discrimination learning. *Learn Mem* 1997;4:262–83.
- [20] Hess US, Lynch G, Gall CM. Changes in *c-fos* mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning: differential involvement of hippocampal subfields CA1 and CA3. *J Neurosci* 1995;15:4786–95.
- [21] Hess US, Lynch G, Gall CM. Regional patterns of *c-fos* mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *J Neurosci* 1995;15:7796–809.
- [22] Hölscher C, Jacob W, Mallot HA. Reward modulates neuronal activity in the hippocampus of the rat. *Behav Brain Res* 2003;142:181–91.
- [23] Jay TM, Witter MP. 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* 1991;313:574–86.
- [24] Jung MW, Larson J, Lynch G. Long-term potentiation of monosynaptic EPSPs in rat piriform cortex in vitro. *Synapse* 1990;6:279–83.
- [25] Litaudon P, Datiche F, Cattarelli M. Optical recording of the rat piriform cortex activity. *Prog Neurobiol* 1997;52:485–510.
- [26] Litaudon P, Mouly AM, Sullivan R, Gervais R, Cattarelli M. Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. *Eur J Neurosci* 1997;9:1593–602.
- [27] Montag-Sallaz M, Buonviso N. Altered odor-induced expression of *c-fos* and *arg 3.1* immediate early genes in the olfactory system after familiarization with an odor. *J Neurobiol* 2002;52:61–72.
- [28] Mouly AM, Fort A, Ben-Boutayab N, Gervais R. Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. *Neuroscience* 2001;102:11–21.
- [29] Nader K. Memory traces unbound. *TINS* 2003;26:65–72.
- [30] Pager J, Giachetti I, Holley A, Le Magnen J. A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol Behav* 1972;9:573–9.
- [31] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press; 1986.
- [32] Pratt WE, Mizumori SJ. Neurons in rat medial prefrontal cortex show anticipatory rate changes to predictable differential rewards in a spatial memory task. *Behav Brain Res* 2001;123:165–83.
- [33] Roman FS, Chaillan FA, Soumireu-Mourat B. Long-term potentiation in rat piriform cortex following discrimination learning. *Brain Res* 1993;601:265–72.
- [34] Roman F, Staubli U, Lynch G. Evidence for synaptic potentiation in a cortical network during learning. *Brain Res* 1987;418:221–6.
- [35] Rouillet F, Datiche F, Liénard F, and Cattarelli M. Cue valence representation studied by Fos immunocytochemistry after acquisition of a discrimination learning task. *Brain Res Bull*, in press.
- [36] Saar D, Grossman Y, Barkai E. Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *Eur J Neurosci* 1998;10:1518–23.
- [37] Schoenbaum G, Chiba AA, Gallagher M. Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. *J Neurosci* 1999;19:1876–84.
- [38] Schoenbaum G, Eichenbaum H. Information coding in the rodent prefrontal cortex. I. Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex. *J Neurophysiol* 1995;74:733–50.
- [39] Schoenbaum G, Setlow B, Nugent SL, Saddoris MP, Gallagher M. Lesions of orbitofrontal cortex and basolateral amygdala complex disrupt acquisition of odor-guided discriminations and reversals. *Learn Mem* 2003;10:129–40.
- [40] Staubli U, Fraser D, Faraday R, Lynch G. Olfaction and the “data” memory system in rats. *Behav Neurosci* 1987;101:757–65.
- [41] Staubli U, Le TT, Lynch G. Variants of olfactory memory and their dependencies on the hippocampal formation. *J Neurosci* 1995;15:1162–71.
- [42] Sutherland GR, McNaughton B. Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:180–6.
- [43] Tronel S, Sara SJ. Mapping of olfactory memory circuits: region-specific *c-fos* activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn Mem* 2002;9:105–11.
- [44] Truchet B, Chaillan FA, Soumireu-Mourat B, Roman FS. Learning and memory of cue-reward association meaning by modifications of synaptic efficacy in dentate gyrus and piriform cortex. *Hippocampus* 2002;12:600–8.
- [45] Vanderwolf CH. The hippocampus as an olfacto-motor mechanism: were the classical anatomists right after all? *Behav Brain Res* 2001;127:25–47.

- [46] Vertes RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 2004;51:32–58.
- [47] Wilson DA. Receptive fields in the rat piriform cortex. *Chem Senses* 2001;26:577–84.
- [48] Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ, Aggleton JP. Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain. *Neuroscience* 1995;69:821–9.
- [49] Zinyuk LE, Datiche F, Cattarelli M. Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat. *Behav Brain Res* 2001;124:29–32.

Données originales

D- Expression de Fos après un apprentissage discriminatif olfactif et après sa réactivation

Données originales

Résumé :

Après avoir abordé la mise en place de l'apprentissage olfactif, nous avons décidé d'examiner l'implication du CP après la réactivation de la tâche de discrimination. Dans cette étude nous comparons l'expression de Fos après l'acquisition de la tâche de discrimination olfactive et lorsque celle-ci est réactivée 10 jours plus tard.

Nous utilisons des rats conditionnés (T), placés en restriction hydrique, entraînés à associer une odeur à la récompense hydrique. Le critère de réussite (80% de choix corrects sur l'ensemble de la session d'entraînement) doit être maintenu pendant deux jours consécutifs afin de s'assurer que l'apprentissage est bien acquis.

Nous utilisons en parallèle aux rats T des rats pseudo-conditionnés : les uns, dits « contrôles olfactifs » (rats PO), non assoiffés, sont stimulés par les deux odeurs dans le labyrinthe mais sans être récompensés, tandis que d'autres (rats PW), placés en restriction hydrique, sont systématiquement récompensés sans être soumis à aucune des deux odeurs dans le labyrinthe. Des rats « contrôles de base » (C), reçoivent eau et nourriture *ad libitum* dans leur cage, et ne sont pas manipulés. De plus, un groupe de rats (TR) acquiert la tâche de discrimination mais reste au repos sans conditionnement additionnel pendant 10 jours. Le 11^{ième} jour, nous remplaçons les rats TR dans le labyrinthe pour une session de réactivation. Cette dernière consiste en 20 essais dont les choix corrects sont récompensés. Les rats sont sacrifiés 90 minutes après le début de la session. En parallèle aux rats TR, après un délai de 10 jours, des rats pseudoconditionnés sont stimulés par les deux odeurs (rats POR) ou reçoivent uniquement de l'eau dans le labyrinthe (PWR). Des rats « contrôles de base » (CR) sont sacrifiés à l'issue d'une période de repos de 10 jours;

Sur le plan comportemental, il faut en moyenne 8 jours pour que les rats T atteignent le critère de réussite. Les rats PO présentent un score d'environ 40% et ne choisissent pas plus le géranjol que le limonène. Au fil des sessions, ces rats, qui ne sont pas en restriction hydrique, restent de plus en plus fréquemment dans la salle de départ du labyrinthe. Lors des trois premiers essais de la session de réactivation, le score des rats TR et POR (64% et 48% respectivement) n'est pas significativement différent. Lors des 17 essais suivants le score est de 89% et 30% pour les rats TR et POR respectivement. Nous constatons que sur l'ensemble de la session de réactivation, les animaux TR obtiennent un score semblable au critère de réussite. Nous vérifions ainsi que l'apprentissage est

Données originales

maintenu. Par ailleurs, nous constatons que les rats POR à l'issue de la session de réactivation présentent un pourcentage important de « non choix » (21 % indiqué par la flèche **figure 13a**).

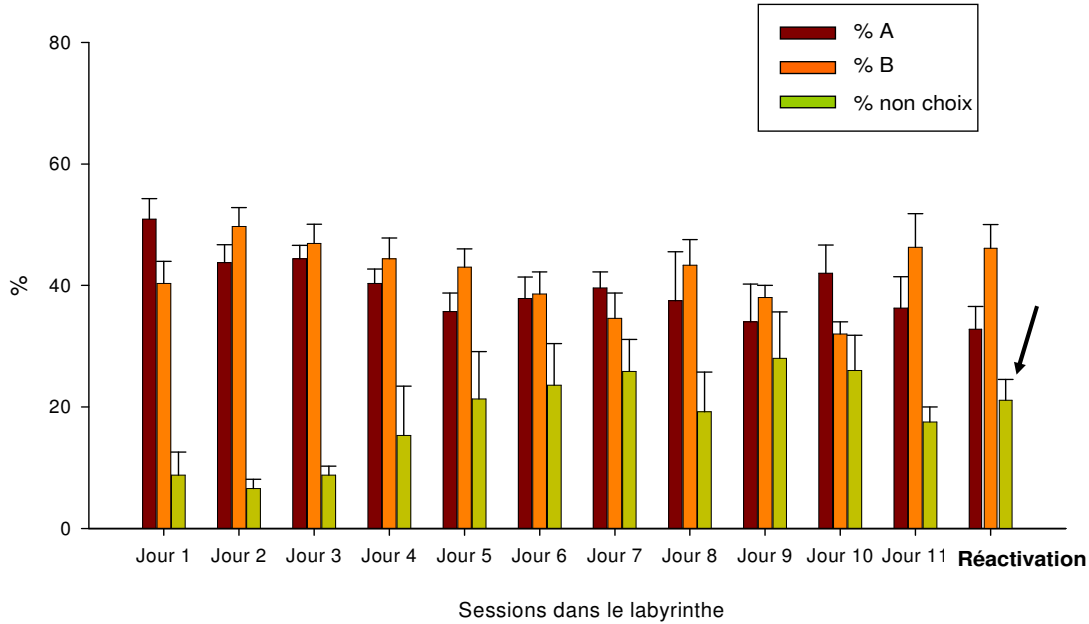


Figure 13 (a) – Evolution du comportement des rats PO et POR sur l'ensemble des sessions (Roulet et al. 2005b) Moyennes (\pm SEM) calculées sur l'ensemble des rats P+POR du jour 1 au jour 11 et sur l'ensemble des rats POR le jour de la réactivation

De plus, en analysant l'évolution de leur comportement sur les 20 essais, nous constatons que les « non choix » apparaissent progressivement au cours de la session de réactivation (voir flèche **figure 13b**). Ce point apparaîtra

important et nous y reviendrons plus en détails dans la partie discussion de la thèse (chapitre V – *Expression de Fos dans l'hippocampe dans l'étude des processus mnésiques olfactifs*).

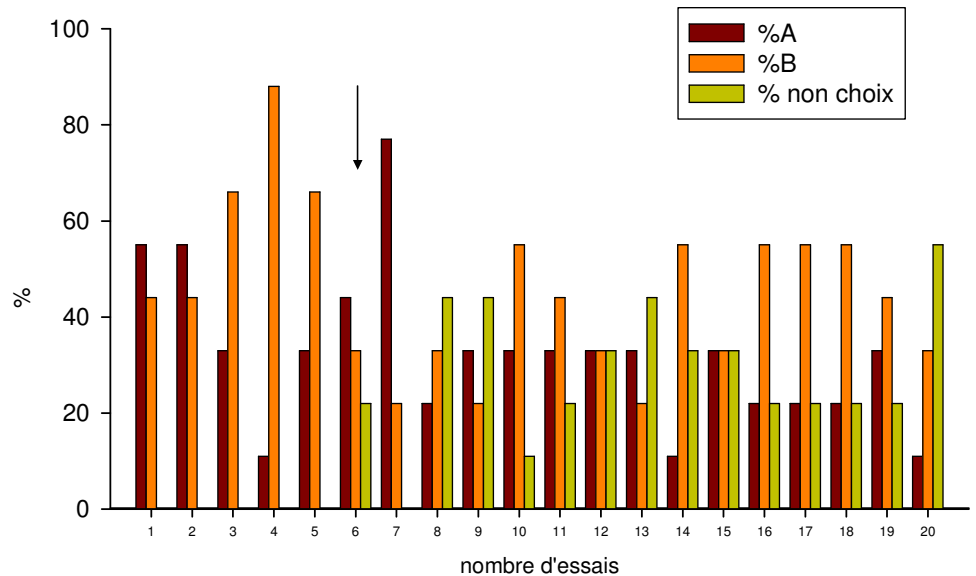


Figure 13 (b) – Evolution du comportement des rats POR sur les 20 essais de la session de réactivation (Roulet et al. 2005b). Moyennes calculées sur l'ensemble des rats POR le jour de la réactivation

Données originales

Dans le CP et la plupart des structures analysées, l'immunoréactivité de Fos est significativement plus faible chez les rats T comparée aux animaux témoins PW et PO lorsque l'apprentissage est achevé.

Dans la majorité des aires analysées, excepté la CA3 et l'habenula latérale l'expression de Fos est significativement moins importante chez les rats T par rapport aux rats TR. Ceci pourrait refléter un état attentionnel plus élevé des rats TR puisqu'ils sont soumis à une session dans le labyrinthe après 10 jours d'arrêt.

Lors de la réactivation de la tâche, nous observons que l'expression de Fos est significativement plus faible chez les rats TR par rapport aux rats POR dans la CA3 et le CPa et significativement plus forte chez les rats TR par rapport aux rats PWR dans le VLO/LO. Notons que, dans le CP, nos données soulignent une hétérogénéité fonctionnelle puisque une modification de l'expression de Fos n'est observée que dans le CPa. Il faut souligner que, si le CPa pourrait jouer un rôle dans le traitement sensoriel (détection et discrimination olfactive) (Litaudon et Cattarelli, 1996), ce dernier possède également des caractéristiques anatomiques telles qu'il pourrait être impliqué dans l'activité récurrente et les processus auto-associatifs (Haberly, 2001). Ces caractéristiques permettent d'envisager l'implication du CPa dans le rappel mnésique.

En ce qui concerne la CA3, elle semble donc aussi jouer un rôle dans le processus de réactivation de la tâche olfactive. Cette aire qui possède de nombreuses collatérales d'axones, est considérée comme un bon modèle de réseau neuronal auto-associatif et serait impliquée dans le rappel de l'information (Treves and Rolls 1992; Bertaina et Destrade, 1995). Soulignons que, dans la région hippocampique, seule la CA3 présente une modification de l'immunoréactivité de Fos chez les rats T par rapport aux rats P après la réactivation. Dans la CA1, nous observons une différence d'expression de Fos entre les rats T et P lorsque l'apprentissage est achevé et non lors de la réactivation. Confirmant les travaux de Hess et al. (1995 a, b) qui font état d'une hétérogénéité fonctionnelle entre les régions CA1 et CA3, nous montrons que la CA1 serait impliquée dans la phase de consolidation de l'apprentissage olfactif tandis que la CA3 participerait lors d'une réactivation ultérieure.

Dans le VLO/LO, la réactivation des odeurs apprises ne suscite pas de modifications de l'expression de Fos puisque nous ne mettons pas en évidence de différence de marquage entre les rats TR et POR. Cependant, les rats TR sont plus fortement immunoréactifs comparés aux rats PWR. Les rats TR et PWR reçoivent une récompense hydrique dans le labyrinthe mais pour les rats TR seulement, la récompense est associée à une odeur. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que

Données originales

l'augmentation du marquage chez les rats TR dans le VLO/LO serait liée à l'intégration des deux paramètres « odeur » et « récompense ».

Soulignons que le CPa est connecté au VLO/LO (Datiche et Cattarelli 1996b) et que le VLO/LO jouerait un rôle dans la mémorisation des odeurs et dans l'orientation des choix comportementaux (Schoenbaum et al., 1998). Nous pouvons avancer l'hypothèse d'une collaboration entre ces deux structures, permettant la reconnaissance de l'odeur et le choix d'une stratégie comportementale adaptée.

L'ensemble de ces résultats indique que les motifs d'activation cérébrale diffèrent lorsque la tâche de discrimination olfactive est bien maîtrisée et lorsqu'elle est réactivée. Le CPa, la CA3 et le VLO/LO semblent former un circuit mis en jeu lors de sa réactivation. Nos travaux sont en accord avec la réorganisation spatiale des circuits neuronaux en fonction du temps, décrite chez la Souris lors du rappel d'une tâche spatiale par Bontempi et al. (1999).

Données originales

Article 4 :

Roullet, F., Lienard, F., Datiche, F. & Cattarelli, M. (2005). Fos protein expression in olfactory-related brain areas after learning and after reactivation of a slowly acquired olfactory discrimination task in the rat. *Learn Mem* **12**, 307-317.

Données originales

Fos protein expression in olfactory-related brain areas after learning and after reactivation of a slowly acquired olfactory discrimination task in the rat

Florence Roulet, Fabienne Liénard, Frédérique Datiche,¹ and Martine Cattarelli

Centre Européen des Sciences du Goût, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5170, 21000 Dijon, France

Fos protein immunodetection was used to investigate the neuronal activation elicited in some olfactory-related areas after either learning of an olfactory discrimination task or its reactivation 10 d later. Trained rats (T) progressively acquired the association between one odor of a pair and water-reward in a four-arm maze. Two groups of pseudotrained rats were used: PO rats were not water restricted and were submitted to the olfactory stimuli in the maze without any reinforcement, whereas PW rats were water-deprived and systematically received water in the maze without any odorous stimulation. When the discrimination task was well mastered, a significantly lower Fos immunoreactivity was observed in T rats compared to PW and PO rats in most of the analyzed brain areas, which could reflect the post-acquisition consolidation process. Following memory reactivation, differences in Fos immunoreactivity between trained and some pseudotrained rats were found in the anterior part of piriform cortex, CA3, and orbitofrontal cortex. We also observed that Fos labeling was significantly higher in trained rats after memory reactivation than after acquisition of the olfactory task in most of the brain areas examined. Our results support the assumption of a differential involvement of neuronal networks after either learning or reactivation of an olfactory discrimination task.

The delineation of the neuronal circuits involved in learning and memory of a defined task and in its reactivation amidst the various brain areas remains an unsettled question. For a long time, it was assumed that once consolidated, long-term memory of newly learned information was insensitive to disruption and that the neuronal network sustaining this process remained stable over time. However, several studies support the notion that memory can be considered a dynamic process with permanent reorganization related to the experiences of the animal (Przybylski and Sara 1997; Nader 2003; Dudai 2004). Thus, recalled memories seem to become labile again and to require subsequent reconsolidation via protein synthesis (Sara 2000; Nader 2003). In addition to the brain network sustaining initial acquisition of memories, a new network could be involved, since the events occurring during retrieval must also be memorized (Squire and Alvarez 1995; Sara 2000; Abel and Lattal 2001). A transitory interaction between hippocampal formation and neocortex is assumed to mediate the establishment of long-term cortical memory representations (Squire and Alvarez 1995), and some memories initially hippocampus-dependent become progressively insensitive to hippocampal lesion over time (Anagnostaras et al. 1999). Bontempi et al. (1999) showed a time-dependent reorganization of the neuronal circuitry underlying long-term storage of a spatial task in mice submitted to memory retrieval. In the rat, a differential involvement of various brain structures such as amygdala, lateral habenula, and neocortical areas was described after either learning or retrieval of a rapidly learned, appetitively motivated odor-discrimination task (Tronel and Sara 2002). It is notable that most of the studies of retrieval reported in the literature are based on rapidly learned tasks and especially on fear conditioning, which induces a high emotional level (for review, see Nader 2003). However, it has been emphasized that

the brain areas involved in learning and reactivation could differ according to the task used (Berman and Dudai 2001). The issue of the brain networks involved in reactivation of a slowly learned task remains unresolved.

Using a slowly acquired odor-discrimination task in the rat, we previously observed that some olfactory-related brain areas exhibited a different pattern of Fos expression according to the learning stage (at the initial and intermediate learning stages or when the task was just acquired) (Roulet et al. 2005). The aim of the present study was to determine whether the same neuronal networks are involved after either learning or reactivation of such a task. The discrimination task was based on the association in a four-arm maze of one odor of a pair with water-reward, the other odor of the pair being nonrewarded but never punished (Saar et al. 1998). On average, rats needed 1 wk to master this task, although their olfactory system is a powerful model for studying memory (Slotnick 2001). Olfactory learning leads to stable memory formation that can be recalled over a long period of time (Staubli et al. 1987). In the present experiment, the neuronal networks involved after either learning or reactivation of an olfactory discrimination task were investigated using Fos immunohistochemistry. This method has been shown to be a useful tool for determining the rat brain areas involved in learning (Kaczmarek 2000; Datiche et al. 2001; Roulet et al. 2004, 2005) and memory retrieval (Tronel and Sara 2002). As a marker of brain activity and of plasticity, Fos expression allows the mapping of neuronal networks. The immediate-early gene *c-fos* is thought to control long-term changes in cellular functioning linked to memory processes (Herrera and Robertson 1996; Kaczmarek 2000). Here, rats were sacrificed either after learning when the olfactory discrimination task was well mastered or after a retention delay of 10 d. On the 11th day, the rats were submitted to a session in the maze (in the presence of both unconditioned and conditioned stimuli), in order to reactivate the memory of the discrimination task previously learned.

The analysis reported here focused on various central olfac-

¹Corresponding author.

E-mail datiche@cesg.cnrs.fr; fax 33 3 806 816 01.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.89605>.

tory-related brain areas which might play a role in olfactory memory formation and/or retrieval. The piriform cortex (PCx), the main target of olfactory bulb projections, is assumed to be involved in learning and memory (Haberly 1985; Haberly and Bower 1989; Hasselmo 1995). In this area, long-term potentiation was described both *in vitro* (Jung et al. 1990) and *in vivo* during learning of an olfactory discrimination task (Roman et al. 1993). Changes in electrical piriform cell properties after an olfactory discrimination task (Saar et al. 1998) and in electrical responses of piriform cortex after an olfacto-mimetic learning task (Litaudon et al. 1997; Mouly and Gervais 2002) were described. Moreover, a modification in Fos expression was noted in the PCx according to the rate at which the rats learned the olfactory discrimination task (Datiche et al. 2001). Piriform outputs are relayed to the hippocampal area via the entorhinal cortex (Haberly and Price 1978). Several experiments demonstrated the role of hippocampus in olfactory learning (Hess et al. 1995a,b). Its lesion impaired olfactory discrimination learning and acquisition of an olfactory learning set in rats (Eichenbaum et al. 1989, 1996). Some hippocampal subfields seem to be involved in early memory processes, and a long-term potentiation (LTP)-like phenomenon was recorded in the dentate gyrus (DG) immediately after the first learning session of an olfactory discrimination task (Truchet et al. 2002). Moreover, by using an olfactory discrimination task, we observed that Fos expression was transiently increased in CA1 on the first day of conditioning (Roullet et al. 2005). Beside its involvement in olfactory information processing, the role of the hippocampus in consolidation and reactivation of memory has been studied extensively (Eichenbaum 2001; Debiec et al. 2002), and this area could have a time-limited role in memory storage (Bontempi et al. 1999). Lastly, a differential spatiotemporal pattern of *c-fos* mRNA expression was described in hippocampal subfields after either acquisition or recall of an appetitive conditioning task in mice (Bertaina and Destrade 1995).

The PCx is also interconnected to the medial and orbital frontal cortices (Datiche and Cattarelli 1996). Neocortical areas have been assumed to be crucial in long-term storage of remote memories (Squire and Alvarez 1995; Maviel et al. 2004). The orbitofrontal cortex seems critical in stimulus-reinforcer association in order to guide goal-directed behavior (Gallagher et al. 1999; Schoenbaum et al. 2003; Roullet et al. 2004). It seems to be specifically involved when an olfactory learning task is acquired by rats (Roullet et al. 2005). In monkeys, neuronal activity in the orbitofrontal cortex corresponds to the value of the expected reward (Roesch and Olson 2004). In rats, the orbitofrontal cortex neurons exhibit odor-specific firing patterns before odor stimulation when the animal arrives at the odor-associated location, and these neurons might sustain long-term memory of cross-modal associations between odors and locations (Lipton et al. 1999). The infralimbic region could be involved in the integration of rewarded cue in motivated animals performing a memory task (Pratt and Mizumori 2001). Lastly, we also analyzed the Fos expression in the lateral habenula, since this area has been shown to be involved in the retrieval of an olfactory discrimination task (Tronel and Sara 2002).

In the present experiment, the activation of these brain regions was examined when the positively reinforced and slowly acquired olfactory discrimination task was well mastered by the rats and after memory reactivation 10 d later.

Results

Behavioral data

The group of rats labeled "PW" were water-deprived and systematically received water in the maze without any odorous stimu-

lation. When placed in the maze, they could either enter in any arm to obtain water-reward or stay in the starting chamber. Since they were thirst-motivated, these rats did not often stay in the starting chamber. Trained rats ("T" group) progressively acquired the association between one odor of a pair and water-reward in the maze. "PO" rats were not water restricted and were submitted to the olfactory stimuli in the maze without any reinforcement. The T and PO rats had three possibilities on each trial in the maze: to enter the limonene-odorized arm ("limonene choice"), to enter in the geraniol-odorized arm ("geraniol choice"), or to stay in the starting chamber ("no choice"). The χ^2 test which took into account these three behavioral possibilities showed that the choices of the T and PO rats were different whatever the day of conditioning. Figure 1A,B illustrates the evolution of the mean number of limonene choices for T and PO rats through the daily sessions in the maze. On the first training session, the score of the T rats was 50% of "limonene choice," and the corresponding score of the PO rats was 51%. Over the training sessions, the T rats' scores increased progressively to reach the learning criterion of 80% "limonene choice." On average, the T rats reached the learning criterion of 80% correct choices in 8.32 (± 1.99) d. One rat mastered the olfactory discrimination task in 5 d, two rats in 6 d, 7 rats in 7 d, four rats in 8 d, one rat in 9 d, two rats in 10 d, four rats in 11 d, and one rat in 12 d. In contrast, the percentage of limonene choices in the PO rats remained ~40% over the daily sessions in the maze. As illustrated in Figure 1B, the PO rats, which were not thirst-motivated, progressively increased their time spent in the starting chamber.

Rats in the "TR" group were conditioned to learn the olfactory discrimination task and returned to their home cages for a resting period of 10 d. "POR" rats were olfactory-stimulated without getting water, and then returned to their home cages for a 10-d resting period. After the 10-d resting period, the limonene-choice scores for the entire reactivation session of 20 trials were 85% and 33% for the TR and POR rats, respectively. The POR rats' percentage of "no choice" was 21% for the entire reactivation session.

Figure 1C illustrates the evolution of the percentage of limonene choices over the 20 trials of the reactivation session. The χ^2 test indicated that the scores of TR and POR rats were not significantly different on trials 1, 2, 3, 6, and 7. Of interest was the observation of the choices at the beginning of the session. Thus, the mean percentage of correct choices on the first three trials was 64% in the TR rats. After the third trial, the percentage of correct choices increased. On the 17 other trials of the session, it was 89% (Fig. 1D). Conversely, in the POR rats, the correct/limonene-choice score was 48% on the first three trials of the session and 30% on the 17 other trials (Fig. 1D).

Fos expression after learning and after reactivation

Piriform cortex

The ANOVA indicated an effect of the experimental group ($F_{[7,53]} = 24.54$; $P < 0.0001$), an effect of the PCx subdivision ($F_{[1,53]} = 280.60$; $P < 0.0001$), and a significant interaction ($F_{[7,53]} = 12.04$; $P < 0.0001$). Thus, except for the home-cage control rats, all experimental groups showed a higher Fos immunoreactivity in the anterior PCx (PCx-a) compared to the posterior PCx (PCx-p) (Fig. 2A,B), after either learning or reactivation.

In the PCx-a, there was a significant effect of the experimental group ($F_{[3,53]} = 51.52$; $P < 0.0001$), no significant effect of the mnesic stage, and a significant interaction ($F_{[3,53]} = 7.16$; $P < 0.001$). Pairwise comparisons indicated that the home-cage rats ("C" group) exhibited a significantly lower Fos expression compared to the T, PO, and PW rats. After a resting period of 10 d, Fos immunoreactivity was also significantly lower in home-

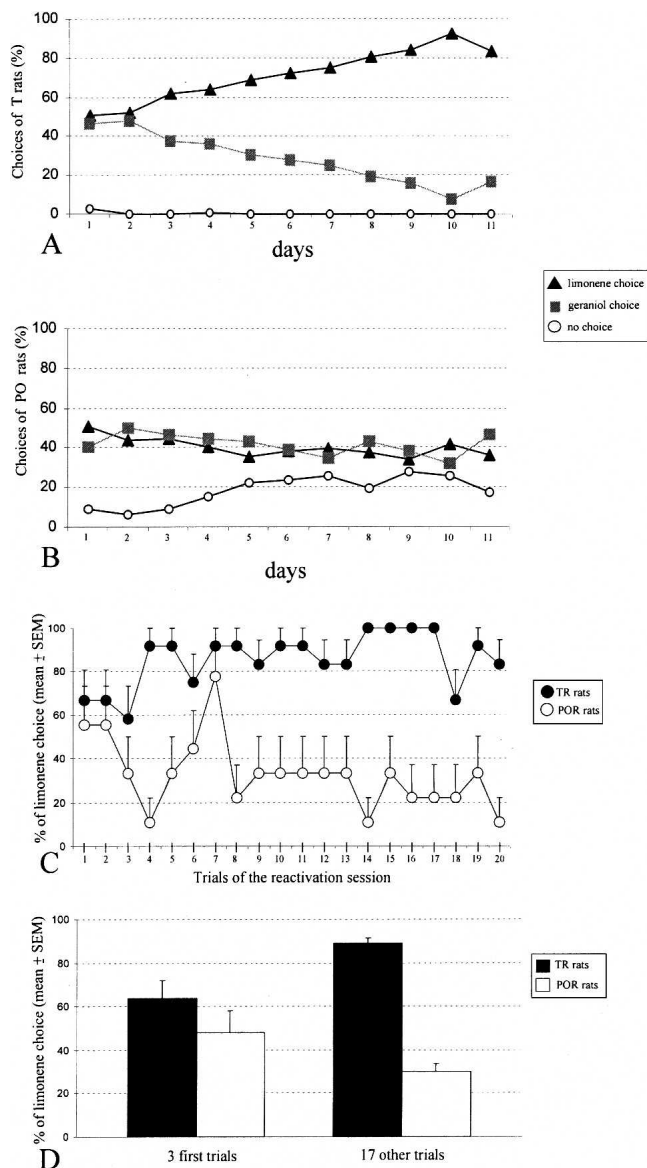


Figure 1. Behavioral data. (A) The evolution of the T rats' behavior throughout the daily sessions in the maze. On each trial, these rats could choose the geraniol-odorized arm ("geraniol choice"), the limonene-odorized arm ("limonene choice"), or to stay in the starting chamber ("no choice") of the maze. The choices are expressed as percentages of the 20-trial daily sessions. Note that the trained rats progressively improved their performance and reached the learning criterion of 80% correct choices. (B) The evolution of PO rats' behavior throughout the daily sessions in the maze. For these rats, which were not water-deprived, the number of "no choice" responses progressively increased through the daily sessions in the maze. (C) The evolution of the percentage of "limonene choices" through the 20 trials of the reactivation session. (D) The percentage of "limonene choices" in TR and POR rats in the three first trials and the last 17 trials of the 20-trial reactivation session in the maze.

cage rats ("CR" group) compared to the TR, POR, and PWR rats. Fos immunoreactivity in the T rats was significantly lower compared to both the PO and PW rats (Fig. 2A). No difference was found between the PO and PW rats.

When memory reactivation occurred, pairwise comparisons showed that Fos expression in the TR group was significantly decreased compared to the POR rats (Figs. 2A,D, 3F). No significant difference was observed between the POR and PWR rats.

Comparison of Fos patterns after learning and after reactivation showed a significantly higher expression in the TR and PW rats compared to the T and PWR rats, respectively (Fig. 2A, Table 1).

In the PCx-p, we observed a significant effect of the experimental group ($F_{[3,53]} = 23.70$; $P < 0.0001$), no effect of the mnemonic stage, and a significant interaction ($F_{[3,53]} = 4.40$; $P < 0.01$). Pairwise comparisons indicated that the C and CR rats exhibited a significantly lower Fos expression compared to the T, PO, PW rats and the TR, POR, and PWR rats, respectively. In the T rats, Fos expression was significantly lower compared to both the PO and PW rats (Fig. 2B). After memory reactivation, no significant difference was noted among the TR, POR, and PWR rats. Fos immunoreactivity was significantly lower in the PO and PW rats compared to the POR and PWR rats, respectively. No difference was found between the T and TR rats (Table 1).

Hippocampus

In the DG, there was a significant effect of the experimental group ($F_{[3,41]} = 32.22$; $P < 0.0001$), a significant effect of the mnemonic stage ($F_{[1,41]} = 24.18$; $P < 0.0001$), and a significant interaction ($F_{[3,41]} = 11.77$; $P < 0.0001$). Pairwise comparisons indicated that the C rats had significantly less labeling than the PO and PW rats. Furthermore, Fos immunoreactivity in the T rats was significantly lower compared to both the PO and PW groups (Fig. 2C).

Pairwise comparisons indicated that the CR rats were significantly less immunoreactive than the TR, POR and PWR rats. No difference was found among the TR, PWR and POR groups.

Fos expression was significantly increased in the TR and POR rats compared to the T and PO rats, respectively (Table 1).

In the CA3 subdivision of the hippocampus, the ANOVA showed only a significant effect of the experimental group ($F_{[3,41]} = 6.65$; $P < 0.001$). Pairwise comparisons indicated that the C and CR rats showed significantly lower Fos expression than the T, PO, and PW rats and the TR, POR, and PWR rats, respectively. Fos expression was significantly higher in the POR group compared to the TR group (Fig. 2D). No other significant difference was found between trained or pseudotrained groups.

In the CA1 subdivision, there was only a significant effect of the experimental group ($F_{[3,41]} = 6.55$; $P < 0.01$). Pairwise comparisons indicated that the C and CR rats showed a significantly lower Fos expression than the T, PO, and PW rats and the TR, POR, and PWR rats, respectively. A significantly lower Fos immunoreactivity was further observed in the T rats compared to both the PO and PW rats (Fig. 2E). In contrast, no difference was found among the TR, PWR, and POR groups.

Comparisons of Fos patterns after learning and after reactivation showed a significantly higher immunoreactivity in TR compared to T rats (Fig. 4, Table 1).

Lateral habenula

In the lateral habenula (LHAb), a significant effect of the experimental group ($F_{[3,41]} = 24.91$; $P < 0.0001$), a significant effect of the mnemonic stage ($F_{[1,41]} = 22.19$; $P < 0.0001$), and a significant interaction ($F_{[3,41]} = 6.06$; $P < 0.01$) were found. As illustrated in the Figure 2F, both the C and CR rats exhibited significantly lower Fos expression compared to the T, PO, and PW rats and the TR, POR, and PWR rats, respectively. No difference was found among the T, PO, and PW groups. After memory reactivation, pairwise comparisons indicated only a higher Fos expression in the POR rats compared to the PWR rats.

In the lateral habenula, the number of Fos-labeled cells was significantly increased in the TR and POR rats compared to the T and PO rats, respectively (Table 1).

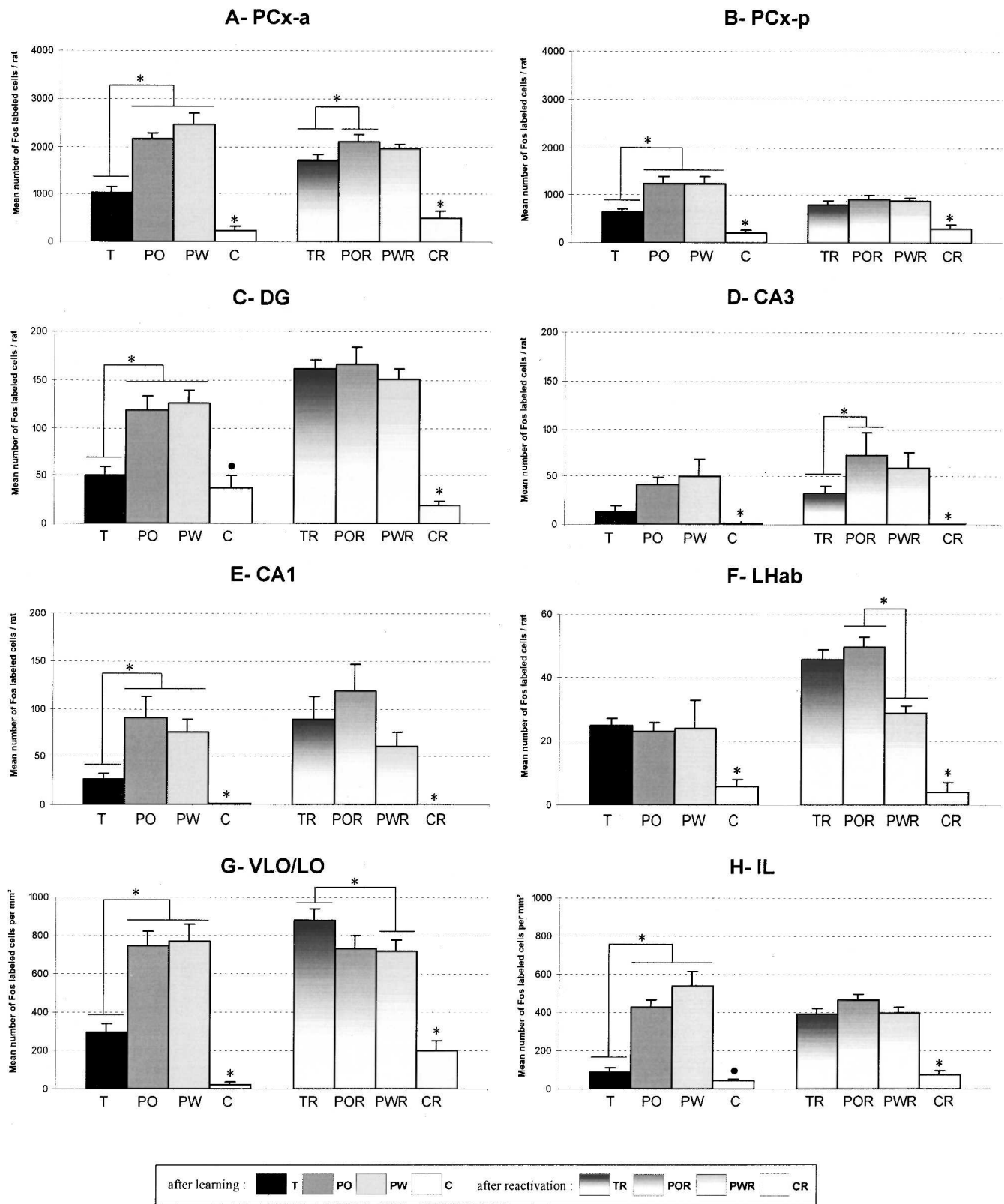


Figure 2. The number of Fos-immunoreactive cells (mean \pm SEM) in the brain areas analyzed in all the experimental groups after either initial conditioning in the maze or mnemonic reactivation. Asterisks (*) indicate a significant difference ($P < 0.05$). Note that, except in LHab, Fos expression was higher in the PO and PW compared to the T rats. (A,B) Fos expression in the PCx-a and PCx-p. In all experimental groups except home-cage controls, the number of labeled cells in the PCx-a was significantly higher than in the PCx-p. In the PCx-a, the number of immunoreactive cells was significantly decreased in the TR rats compared to POR rats. (C-E) Fos immunoreactivity in the hippocampus subfields DG, CA3, and CA1, respectively. In the DG, as indicated by the circle (●), the C rats were significantly different from the PO and PW rats but not from the T rats. In the DG and CA1, no difference was found among the TR, POR, and PWR rats. In contrast, the number of immunoreactive cells in CA3 was significantly decreased in the TR rats compared to the POR rats. (F) Fos expression in the LHab. (G,H) Fos immunoreactivity in the frontal regions VLO/LO and IL, respectively. In the VLO/LO, Fos immunoreactivity was significantly increased in the TR rats compared to POR, PWR, and T rats. In the IL, as indicated by the circle (●), the C rats exhibited a significantly lower number of Fos-positive cells compared to the PO and PW rats but were not different from the T rats.

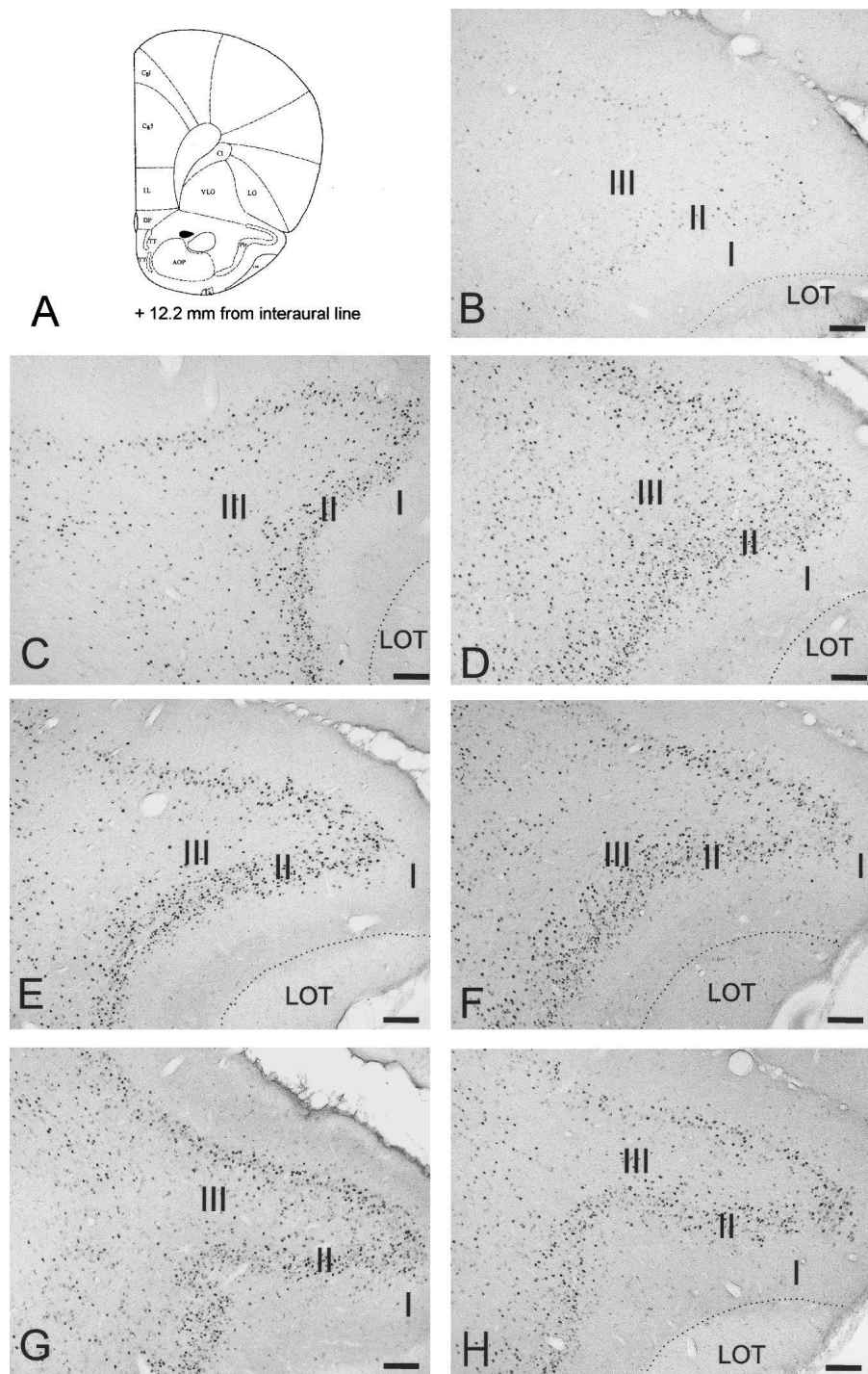


Figure 3. (A) Schematic drawing (Paxinos and Watson 1986) of a coronal section taken at +12.2 mm from the interaural line, illustrating the location of the PCx-a. (B–H) Photomicrographs illustrating the Fos immunoreactivity in the three layers (I, II, III) of the PCx-a in a C rat, a T rat, a TR rat, a PO rat, a POR rat, a PW rat, and a PWR rat, respectively. LOT: lateral olfactory tract. Scale bar, 100 μ m.

Ventrolateral/lateral orbitofrontal cortex

In the ventrolateral/lateral orbitofrontal cortex (VLO/LO), we observed a significant effect of the experimental group ($F_{[3,50]} = 28.07$; $P < 0.0001$), a significant effect of the mnemonic stage ($F_{[1,50]} = 12.36$; $P < 0.001$), and a significant interaction ($F_{[3,50]} = 12.24$; $P < 0.0001$). Pairwise comparisons indicated that the C and CR rats exhibited significantly lower Fos expression

compared to the T, PO, and PW rats and the TR, POR, and PWR rats, respectively.

Pairwise comparisons further revealed that Fos immunoreactivity in T rats was significantly lower compared to both PO and PW rats (Fig. 5). No difference was found between the PO and PW rats. As illustrated in Figure 2G, Fos expression was significantly increased in the TR rats compared to the PWR rats. The number of labeled cells was also higher in the TR rats compared to the POR group, but the level of significance was not reached. No difference was found between the POR and PWR rats.

Comparisons of Fos patterns after learning and after reactivation showed that, in contrast to the pseudotrained rats, the immunoreactivity was significantly higher in the TR rats compared to the T rats (Table 1).

Infralimbic cortex

In the infralimbic cortex (IL), we observed a significant effect of the experimental group ($F_{[3,48]} = 50.63$; $P < 0.0001$), a significant effect of the mnemonic stage ($F_{[1,48]} = 5.22$; $P < 0.05$), and a significant interaction ($F_{[3,48]} = 17.31$; $P < 0.0001$).

Pairwise comparisons showed that Fos immunoreactivity was significantly lower in the C rats compared to the PO and PW rats. In the T rats, the number of Fos-labeled cells was significantly lower compared to both the PO and PW rats (Fig. 2H). Pairwise comparisons showed that Fos immunoreactivity was significantly lower in the CR rats compared to the TR, POR, and PWR rats. However, no difference was observed among the TR, POR, and PWR rats.

Pairwise comparisons further indicated that Fos expression was significantly lower in the T rats compared to the TR rats (Table 1). We also observed that Fos immunoreactivity was significantly higher in the PW rats than in the PWR rats (Fig. 2H).

Discussion

We used Fos immunocytochemistry to examine neuronal activation in some olfactory-related areas after learning of and reactivation of an olfactory discrimination task. In contrast to most of the studies carried out on memory retrieval and which relied on behavioral procedures with rapid acquisition

such as fear conditioning (Nader 2003), we used a positively reinforced olfactory task that required several daily training sessions to be acquired and then well mastered by the rats.

In all the brain areas analyzed (PCx-a, PCx-p, DG, CA1, IL, VLO/LO) except in the lateral habenula and CA3, we observed that the Fos expression in T rats which mastered the olfactory

Table 1. Statistical comparison of Fos expression after learning and after memory reactivation

Groups	Brain regions							IL
	PCx-a	PCx-p	DG	CA3	CA1	LHab	VLO/LO	
T vs. TR	*	NS	*	NS	*	*	*	*
PO vs. POR	NS	*	*	NS	NS	*	NS	NS
PW vs. PWR	*	*	NS	NS	NS	NS	NS	*
C vs. CR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

For each brain region analyzed, the number of Fos immunoreactive cells in T, PO, PW, and C rats was compared with the Fos immunoreactivity in TR, POR, PWR, and CR rats, respectively. *: significantly different at $P < 0.05$; NS: no significant difference.

discrimination task was significantly lower compared to PO and PW rats.

In some previous studies (Datiche et al. 2001; Roullet et al. 2004), we did not observe any significant changes in Fos expression between trained and pseudotrained rats. Some methodological discrepancies could explain this difference with the present findings. First, it should be noted that in Roullet et al. (2004), trained rats were sacrificed after presentation of the relevant olfactory cue in an environment different from the maze. Second, we used pseudotrained rats that were thirst-motivated and received water-reward randomly for either one or the other odor of the pair (Datiche et al. 2001; Roullet et al. 2004).

In the present paradigm, the T rats had to maintain a performance level of 80% of correct choices for 2 d to ensure that the task was well mastered. They showed a lower number of Fos-labeled cells compared to the P rats in most of the brain regions examined. It cannot be ruled out that the lower Fos expression observed in the T rats could result from a familiarization phenomenon (Montag-Sallaz and Buonviso 2002). However, since PO and PW rats were placed daily in the maze, we should also expect a decreased Fos expression in these experimental groups. Therefore, a more likely explanation can be put forward to explain the present data. The pseudotrained rats did not have to discriminate odors and did not make any decision based on detection of relevant odor cues. In these rats, Fos expression could reflect the attentional level linked to sensory stimulation, sniffing activity, and/or water-reward. Conversely, it can be assumed that since the T rats performed the task with proficiency, they should have tuned attention toward odor discrimination in order to choose the rewarded cue. In these rats, mastery of the task could result in activation of a more focused network of cells. Moreover, because the T rats, once they had reached the score of 80% correct choices, were submitted to two additional daily sessions in the maze, it can be hypothesized that the lower Fos immunoreactivity might reflect that the consolidation process either ends or is in some way terminated. Such an assumption seems in accordance with the data from a previous experiment (Roullet et al. 2005) investigating the brain Fos expression according to the learning stage. Except in the hippocampus, the Fos

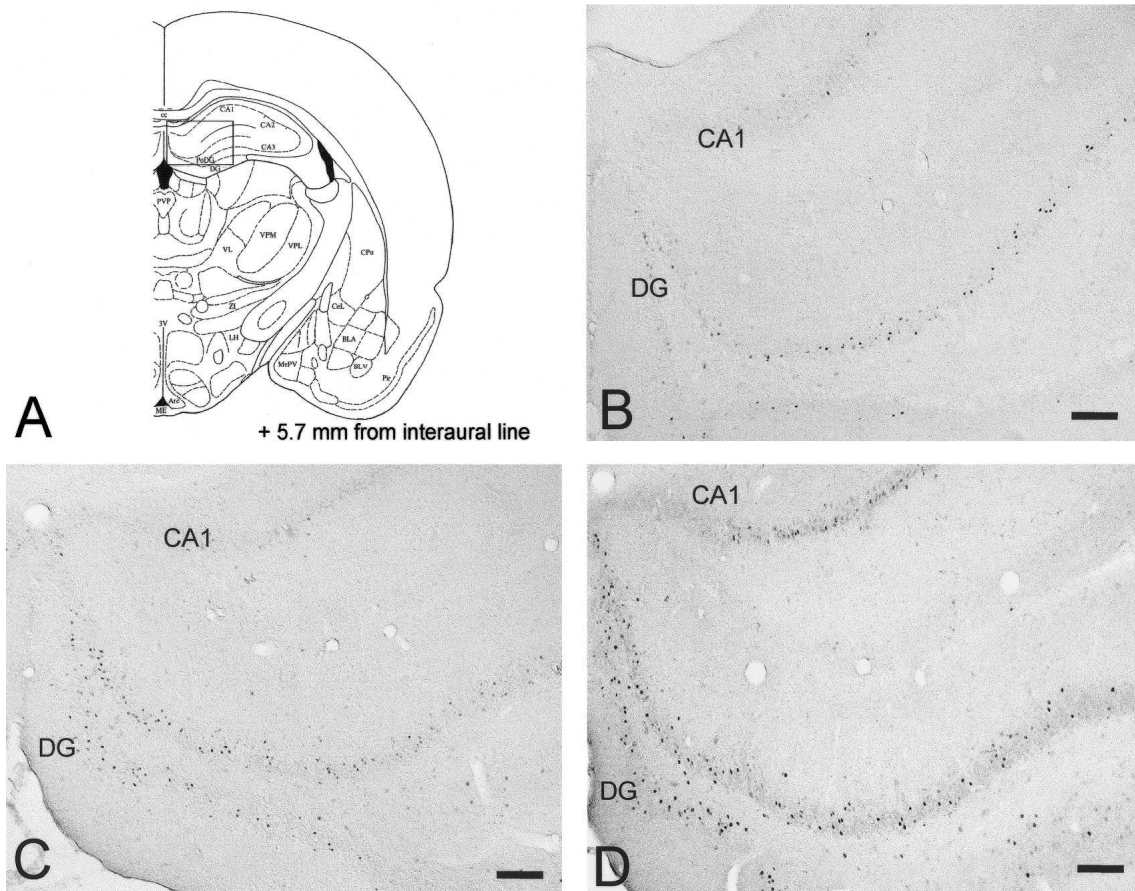


Figure 4. (A) Schematic drawing (Paxinos and Watson 1986) of a coronal section taken at +5.7 mm from the interaural line. The rectangle indicates the location of the hippocampal region illustrated by the photomicrographs. (B–D) Fos immunoreactivity in the hippocampus in a T rat, a TR rat, and a PO rat, respectively. Scale bar, 100 μ m.

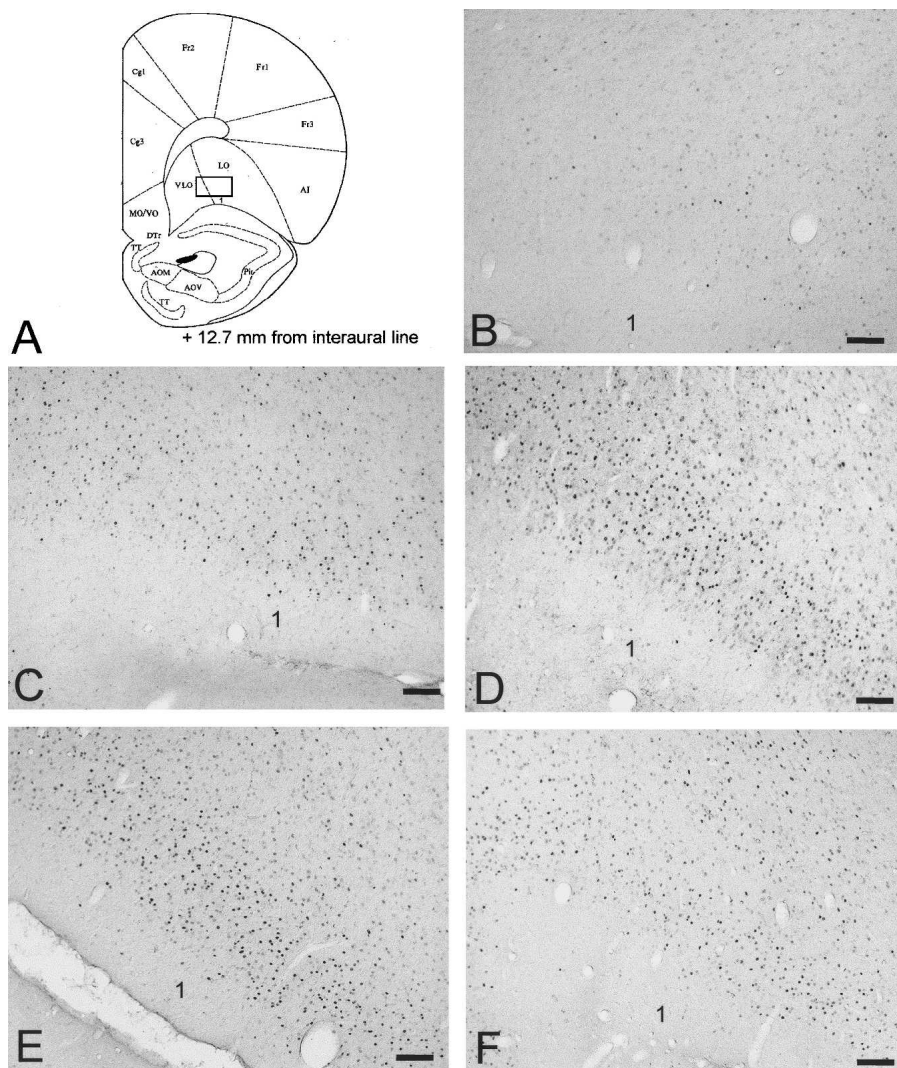


Figure 5. (A) Schematic (Paxinos and Watson 1986) of a coronal section taken +12.7 mm from the interaural line. The rectangle illustrates the location of the sample region in which labeled cells were counted in the VLO/LO. (B–F) Photomicrographs illustrating Fos labeling in the VLO/LO in C, T, PO, TR, and PWR rats, respectively. Scale bar, 100 μ m; 1, neocortical layer 1.

labeling was not significantly different between T and P rats at the initial (first day of conditioning) and at the intermediate (fourth day of conditioning) stages of learning. Moreover, when the T rats were sacrificed just after reaching the criterion of 80% correct choices, the Fos expression was not significantly different compared to P rats in most of the brain areas analyzed. However, in the VLO only, the T rats, which had just acquired the olfactory discrimination task, showed higher Fos labeling compared to the P rats (Rouillet et al. 2005). Thus, it seems that the decreased Fos immunoreactivity we observed in the present study in most of the brain areas of the T rats could be linked to the two additional daily sessions in the maze they underwent after having reached the 80% correct score and to the subsequent ending of the consolidation process.

On the other hand, it is notable that the Fos expression in the T rats compared to the home-cage controls was not different in some areas, such as the DG and IL. The Fos immunoreactivity in the T rats might not reflect the plasticity underlying acquisition of the task but rather a return to a basal level of activity after learning consolidation. The present finding is in agreement with

experiments showing that the repetition of an already learned task by chicks (Anokhin and Rose 1991) and a well mastered appetitive task in mice (Bertaina and Destrade 1995) induced a decrease in Fos expression.

In the present study, Fos expression elicited by memory reactivation 10 d after learning of the olfactory discrimination task was investigated. After memory reactivation, we observed significant differences between trained and some pseudotrained rats in only three of the brain areas analyzed: PCx-a, CA3, and VLO/LO. Thus, Fos immunoreactivity in PCx-a and CA3 was significantly lower in the TR rats compared to the POR rats. In contrast, Fos expression in the VLO/LO was significantly increased in the TR rats compared to the PWR rats.

Memory reactivation in the TR rats was assessed by a session that consisted of 20 reinforced trials. Retrieval seems to be more efficient when attempted in the presence of cues that were present during the acquisition (Dudai 2002). Since the T rats were sacrificed after a 20th reinforced trial session, we submitted the TR rats to a similar 20 reinforced trial sessions. Such an experimental design was used to ensure that the test session could reactivate all the neuronal networks sustaining memory of the previously learned task. In an experiment carried out on memory retrieval of a positively reinforced olfactory discrimination, Tronel and Sara (2002) did not find any marked Fos expression. Those authors assumed that it might be due to the reactivation which was not of sufficient amplitude or duration, since the rats received only a single reinforced retrieval trial. On the other hand, in a *c-fos* mapping study, Bertaina and Destrade (1995) assessed memory retrieval of an appetitive conditioning by submitting

mice to five reinforced trials, and they observed modifications in Fos expression. In conditioning procedures based on getting a reward, it seems that the retrieval session should consist of several trials. Moreover, the reactivation trials must be reinforced in order to avoid an extinction phenomenon. This is in marked contrast with studies using negative reinforcement such as fear conditioning in which only a few trials are required for learning and retrieval is assessed by a single presentation of the sole conditioned stimulus (Nader 2003).

From a behavioral point of view, memory of the olfactory discrimination task was well retrieved by the TR rats in the present study, since they reached a mean score of 85% correct choices on the whole reactivation session of 20 trials. This is in accordance with data (Staubli et al. 1987) showing that rats can recall olfactory memories over a long period of time. Nevertheless, it should be noted that on the three first trials of the reactivation session in our study, the mean score of the TR rats was only 64%. Since we used reinforced trials, a possible relearning phenomenon cannot be ruled out. However, if the rats had forgotten which odor of the pair was associated with water-reward, it can

be expected that their performance would be lower than 80% for the whole session. Therefore, in our experiment the process of relearning the odor value, if occurring, should remain minor. Nevertheless, since the present olfactory discrimination task within the maze is complex, a relearning of the task procedure by itself cannot be ruled out.

To some extent, memory reactivation might also occur in POR and PWR rats after 10 d. The POR rats became familiar with the odors and could memorize them. The PWR rats could learn the systematic presence of water-reward in the maze, and they could also memorize contextual signals. However, in contrast to the T rats, neither the PO nor the PW rats learned to discriminate between two odors of a pair in order to obtain water-reward. Even if memory reactivation could occur in all groups of rats, it remains that the nature of the information retrieved was not similar.

We also found that in most of the brain areas analyzed, except PCx-p and CA3, the Fos expression in the T rats was significantly lower compared to the TR rats. This could reflect an increased arousal level in the TR rats. After a resting period of 10 d, it can be assumed that these rats needed a high attention level to remember what was the correct odor to get the water-reward. Moreover, the reactivation session might result not only in retrieving the previously acquired memories but also in establishing new ones regarding events occurring during the session itself (Sara 2000). Such a phenomenon might also lead to increased arousal.

In both subdivisions of the PCx, we showed that Fos expression was significantly lower in the T rats compared to the PO and PW rats. It indicates a role of both the PCx-a and PCx-p in the olfactory task learning. No difference was found between the PO and PW rats in both the PCx-a and PCx-p. The PW rats showed a substantial Fos expression in the PCx, but they were not olfactory-stimulated. Such a finding is in accord with a previous study (Datiche et al. 2001) that described a noticeable Fos immunoreactivity linked to the spontaneous exploratory sniffing activity without any specific odor cue.

After memory reactivation, the TR rats showed significantly lower Fos labeling in the PCx-a compared to the POR group. In contrast, no difference in Fos expression in the PCx-p was found among the TR, POR, and PWR rats. This might indicate a differential involvement of the PCx-a and the PCx-p when an olfactory memory is reactivated. Our data support the hypothesis of a functional heterogeneity of the PCx subdivisions (Litaudon et al. 1997; Mouly and Gervais 2002). In view of its anatomic and functional features, the PCx is considered a model of associative memory (Haberly and Bower 1989). Several studies suggest its involvement in olfactory memory. Long-term potentiation has been recorded in the *in vivo* PCx following olfactory learning (Roman et al. 1993). Olfactory learning was also shown to elicit electrophysiological modifications such as a decreased after-hyperpolarization in PCx slices (Saar et al. 1998) and increased evoked-field potential amplitudes in the rat PCx-p (Mouly et al. 2001). From an anatomical point of view, the PCx is characterized by a dense network of intrinsic association fibers (Haberly and Price 1978). The organization of these association fibers is different in the PCx-a and the PCx-p. The association axons are caudally directed in the PCx-p, whereas long association fibers are both rostrally and caudally directed in the PCx-a (Haberly and Price 1978; Datiche et al. 2001). Such an organization could sustain recurrent activity and subsequent autoassociative processes within the PCx-a (Haberly 2001). Moreover, the PCx-a receives dense afferents from the olfactory bulb. Hasselmo (1995) hypothesized that neuromodulatory inputs might differentially influence the synapses from afferent bulbar fibers relative to the synapses of intrinsic association fibers. Thus, the relative activation of the network of intrinsic fibers versus external olfactory

afferents might be involved in memory recall. It can be also underlined that the PCx-a is involved in odor detection and information transmission to other brain areas, whereas the PCx-p could be involved in odor recognition (Litaudon and Cattarelli 1996). Taken together, our study agrees with and further extends the data showing a role of the PCx in olfactory memory.

In the hippocampal DG, the number of Fos-labeled cells was not significantly different in the present study's T rats after learning compared to the home-cage controls. Moreover, no difference in Fos expression after memory reactivation was found among the TR, POR, and PWR rats. In the CA1 hippocampal subfield, Fos expression was significantly decreased in the T rats after learning compared to both the PO and PW rats. In contrast, no difference was found between the T rats and either PO or PW rats in the CA3 subfield. After memory reactivation, no difference was observed between the TR rats and either POR or PWR rats in CA1, whereas Fos immunoreactivity in CA3 was significantly decreased in the TR rats compared to the POR rats. In accordance with Hess et al. (1995a,b) who showed that CA1 and CA3 become differentially active according to behavioral circumstances, the present data support the hypothesis of a functional heterogeneity of the hippocampal subfields. The CA1 seemed involved when the task was mastered, whereas CA3 might play a role in memory reactivation. In contrast, Tronel and Sara (2002) found no significant change in Fos expression in the hippocampus after either acquisition or retrieval of a positively reinforced olfactory discrimination task. Such a discrepancy could be due to differences between the olfactory tasks (rapidly acquired vs. slowly acquired task) as well as between the retention delays (24 h versus 10 d) used in the two studies. It is notable that some authors (Kaut and Bunsey 2001) demonstrated an absence of retrograde amnesia for recently acquired olfactory discrimination after a hippocampal lesion. The role of the hippocampus in memory consolidation may depend not only on the learning task but also on the temporal aspects of mnemonic processes. Thus, a differential involvement of the hippocampus might be expected after reactivation of either recent or older memories.

Our data support a role of the CA1 in learning rather than in reactivation of the olfactory task. In a previous experiment (Roullet et al. 2005) investigating brain activation with respect to learning stage, we observed higher Fos expression in the CA1 of trained rats compared to pseudotrained rats on the first day of conditioning. In contrast, when the task was just acquired, no difference between trained and pseudotrained rats was found. However, in that previous study, the rats had only to reach a criterion of 80% correct choices or to choose the water-rewarded odor in at least 80% of the last 10 trials of the conditioning session. Conversely, in the present behavioral procedure, the rats had not only to reach a score of 80% but also to maintain it for two additional days. It can be assumed that the consolidation process either ends or is in some way terminated, and this might account for the significant decrease in Fos immunoreactivity observed in the T rats.

The present data also indicate an involvement of the CA3 after reactivation. As CA3 pyramidal cells have numerous recurrent collaterals, this area is considered in some computational models as an auto-associative network for storage and retrieval of information in memory processes (Treves and Rolls 1992). Bertaina and Destrade (1995), using *in situ* hybridization of *c-fos* mRNA and an appetitive conditioning paradigm, further reported an involvement of the CA3 after memory retrieval.

In the LHab, no difference was found between trained and pseudotrained rats after either learning or retrieval in the present study. Although the LHab seems to be involved in olfaction, ingestion, and endocrine functions, its role in mnemonic processes is not yet clearly defined. Vale-Martinez et al. (1997) showed no

effect of an electrolytic lesion of the LHab on two-way avoidance conditioning in rats. In contrast, Tronel and Sara (2002) reported activation of the LHab after memory retrieval of a rapidly acquired olfactory task. Differences in behavioral procedures could explain why no obvious involvement of the LHab was found after reactivation in the present study. We noted only a significant increase in Fos expression in the POR rats compared to the PWR rats. This might be due to odor processing, since the LHab receives olfactory inputs (Sutherland 1982).

In the VLO/LO, a significant decrease in Fos immunoreactivity was observed in the T rats after learning compared to the PO and PW rats. After memory reactivation, Fos expression was significantly increased in the TR rats compared to the PWR rats. Fos immunoreactivity remained similar in the PO and PW rats compared to the POR and PWR rats. The POR rats did not receive any water in the maze but were submitted to both odors of the pair. In these rats, Fos labeling might reflect processing of odor cues, since the VLO/LO receives some olfactory inputs (Datiche and Cattarelli 1996). The present data did not show an involvement of the VLO/LO in mnemonic reactivation of the learned odors, since the difference between the TR rats and POR rats was not significant. Nevertheless, we observed that Fos expression was significantly higher in the TR rats compared to the PWR rats. In the PWR group, Fos expression might reflect water delivery. In accord with such an assumption, the reward consumption was shown to modify VLO neuron activity in a Go/No-Go procedure based on olfactory discrimination (Schoenbaum and Eichenbaum 1995). In the TR rats studied here, Fos expression should not reflect the sole reward consumption; otherwise a similar labeling would be observed in both the TR and the PWR rats. In the TR rats, reward consumption is linked to odor discrimination, since water-reward was obtained only when the choice was correct. The Fos expression in the TR rats might reflect the increased arousal level required to reactivate the memories required to choose the rewarded cue. Thus, mnemonic and reward processes linked to the odor cues seem to be intermingled in the orbitofrontal cortex. This area is reciprocally connected with the PCx-a (Datiche and Cattarelli 1996) and participates in central olfactory processing (Schoenbaum and Eichenbaum 1995). The latter authors showed that the neuronal activity was modified in the PCx-a and the orbitofrontal cortex following presentation of a relevant odor cue. It was hypothesized that these areas might cooperate to encode the significance of odor cues and subsequent recognition of relevant signals. The PCx-a might send information regarding odor identity to the VLO/LO, which in turn might provide information based on past experience in order to allow odor recognition. The connections between the VLO/LO and the PCx-a might permit the guidance of rat behavior on the basis of olfactory input detection, and the VLO/LO might play a critical role in memory representation for significant olfactory stimuli (Ramus and Eichenbaum 2000). Several lines of evidence further indicate that the prefrontal cortex could play an important role in long-term recognition memory processes. Bontempi et al. (1999) provided evidence of a time-dependent reorganization of the neuronal circuitry underlying long-term memory storage, since neocortical areas seem involved in retrieval. In agreement with previous data (Roulet et al. 2005), the present study supports a role of the VLO/LO when the rats master the olfactory discrimination task. It further underlines the complex involvement of the VLO/LO in memory reactivation, since integration of both odor significance and reward seems to be sustained by the VLO/LO.

In the IL, Fos expression in the T rats was not significantly different from that of the home-cage controls. No significant change in Fos immunoreactivity between trained and pseudo-trained rats was observed after memory reactivation. Integration

of rewarded cues in motivated rats during learning might be sustained in the infralimbic cortex (Pratt and Mizumori 2001). However, the present results do not support an involvement of the IL in either mastery of the olfactory discrimination task or memory reactivation.

Using a complex and progressively acquired olfactory discrimination task, the present study extends our knowledge of the neuroanatomical regions sustaining mnemonic processes in rats. It is notable that the cerebral patterns of Fos expression induced by learning of the olfactory task and by memory reactivation were different. Our findings are in accord with the current hypothesis that recalled memories might not reengage neuronal circuits that were previously required for learning (Squire and Alvarez 1995).

We observed that when memory was reactivated, the pattern of activated brain areas was reduced compared with the pattern involved when the olfactory discrimination learning task is well mastered. Significantly different Fos expression was found between trained and pseudotrained rats in the CA3, PCx-a, and VLO/LO only. It can be assumed that these areas, which process olfactory inputs, might participate in a reconsolidation phenomenon after olfactory memory reactivation. However, it should be kept in mind that the present experiment cannot distinguish the effects of retrieval from those linked to the performance of the olfactory task itself. Fos mapping cannot provide the answer to such a question. On the other hand, the temporal dimension of memory retention would also be important to examine. We reactivated memory after 10 d, but it would be interesting to investigate the activation within olfactory-related brain areas after shorter and longer retention delays.

Materials and Methods

Sixty-one male SPF Wistar rats weighing 200–220 g at the beginning of the experiment were used. The experimental procedures followed the guidelines of the European Communities council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC), and efforts were made to reduce the number of rats employed. Rats were individually housed under a 12 h/12 h inverted light:dark cycle and had food ad libitum. Rats were daily handled by the experimenter for ~2 wks prior to training initiation.

Training apparatus

The odor training discrimination apparatus was a four-arm radial maze described by Saar et al. (1998). For each trial, the rat was placed in the starting area of the maze, and the odors (geraniol and limonene) were randomly assigned to two of the four arms. After 7 sec, the guillotine doors were lifted and the rat had to choose an arm. When the rat reached the end of the arm, the breaking of an infrared beam interrupted the trial. Olfactory training consisted of 20 trials per day. Conditioning was performed in a ventilated room, and a fan was activated between each trial.

Groups of rats

Trained rats

The trained rat group ($n = 22$) was water-deprived (allowed to drink for 10 min per day only). The training was olfactory conditioning: The rats had to discriminate between rewarded (limonene) and nonrewarded (geraniol) odors of the pair delivered in the maze. The discrimination task was considered as acquired when the trained rats chose the positive odor in at least 80% of the trials. In order to ascertain that the task was well mastered, the rats had to maintain such a level of performance for two additional days. Ten trained rats (T group) were sacrificed 1 h after the last session in the maze, because this delay is adequate to reach a high concentration of Fos protein (Chaudhuri et al. 2000).

In order to examine brain activation after memory reactivation, 12 trained rats (TR group) were conditioned to learn the

olfactory discrimination task and then returned to their home cages for a resting period of 10 d. On the 11th day, they were submitted to a reactivation session, which consisted of 20 reinforced trials in the maze. One hour after this reactivation session, they were sacrificed for Fos immunocytochemical detection.

Pseudotrained rats

Two groups of pseudotrained rats were used for the examine Fos expression elicited by either getting water-reward (PW) or olfactory stimulation (PO). The PW rats ($n = 6$) were water-deprived (allowed to drink for 10 min per day only). They were daily submitted to the maze for a 20-trial session. On each trial, the PW rats had to reach the end of one or the other arm to get water, and they were systematically water-rewarded whatever the chosen arm. These rats were never stimulated by odors within the maze. The PO rats ($n = 7$) received water ad libitum. They were daily placed in the maze for a 20-trial session where they were stimulated by odors (geraniol and limonene). They could explore the maze freely, but never received the water reward.

For the investigation of memory reactivation, we also used PWR ($n = 9$) and POR ($n = 7$) rats that were sacrificed after a resting period of 10 d. On the 11th day, these groups were submitted to a session in the maze as previously described: The PWR rats received water systematically whatever the chosen arm, and the POR rats were olfactory-stimulated without getting water. Whatever the stage, i.e., learning or reactivation, the pseudotrained rats were always sacrificed in parallel to trained rats.

Control rats

Home-cage rats ($n = 10$), i.e. without any type of experimental manipulation were used. They allowed us to determine the basal level of Fos expression. The C rats ($n = 3$) were sacrificed in parallel to the T, PO, and PW rats, whereas the CR rats ($n = 7$) were sacrificed in parallel to the TR, POR, and PWR rats.

Fos immunocytochemistry

Following deep anesthesia with Equitesine (4 mL/kg i.p.), the rats were perfused transcardially with 200 mL of Ringer lactate containing 0.1% heparin followed by 500 mL of ice-cold fixative [4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (PB) at pH 7.4]. The brains were removed and post-fixed (2% paraformaldehyde, 0.2% picric acid in 0.1 M PB, pH 7.4) for 12 h at 4°C, then cryoprotected in a 30% sucrose PB solution for 48 h. The brains were then cut coronally (25 μ m) with a cryostat, and free-floating sections were collected in 0.1 M phosphate buffer saline containing 0.3% Triton X-100 (PBST; pH 7.4) to perform Fos immunohistochemistry. Brain sections were placed in a 3% hydrogen peroxide solution for 30 min and incubated in PBST containing 3% normal goat serum for 2 h. Subsequently, sections were incubated for 2 d at 4°C with a rabbit anti-c-fos antibody (AB-5; Oncogene Science) diluted at 1:5000 in 0.1 M PBST containing 0.1% sodium azide (PBST-Az). The sections were then transferred into biotinylated anti-rabbit IgG (1:1000 in PBST; 24 h at 4°C; Vector Laboratories). Then the sections were incubated for 1 h in avidin-biotin-horseradish peroxidase complex reagent from an ABC Elite kit (Vector Laboratories). Between all steps, sections were rinsed several times with PBST. Peroxydase activity was revealed by using 3-3'-diaminobenzidine (0.02%) and H₂O₂ (0.003%) in a 0.05 M Tris-HCl solution (pH 7.6). The reaction was enhanced by adding nickel ammonium sulfate (0.6%), which provides a black staining. The nickel-intensified diaminobenzidine reaction was controlled by inspecting sections under a microscope and stopped by rinses in PBST-Az. Finally, the brain sections were mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated, and coverslipped with DePeX for light microscopy.

Fos-positive cells were identified on the basis of a black reaction product that was confined to the cell nucleus.

Data analysis

The nomenclature used in the Paxinos and Watson atlas (1986) for the rat brain was used for delimitation of cerebral regions. The

PCx extends from +12.7 mm to +5.7 mm anterior to the interaural line. In each animal, we analyzed eight sections taken every 1000 μ m along the whole rostrocaudal PCx extent. This paleocortex can be divided into PCx-a and PCx-p parts; the boundary between them is located at the level of the anterior commissure (+8.7 mm from the interaural line). The dorsal hippocampus [CA1, CA3 subfields and dentate gyrus (DG)] and lateral habenula (LHAb) were analyzed on a representative section corresponding to the coronal plane located at +5.7 mm and +6.7 mm from the interaural line, respectively. We further counted Fos-labeled nuclei at the frontal cortex level in the infralimbic area (IL) on the coronal representative section located at +11.7 mm. Fos immunoreactivity was analyzed in the ventrolateral/lateral orbitofrontal area (VLO/LO) on a representative section at +12.7 mm from the interaural line (Fig. 5A). Then, Fos staining was analyzed automatically using Optilab software. All cells darker than the surrounding background were counted. Because of good delineation of the PCx, hippocampus, and LHAb, labeled cells could be counted on the entire extent of these target regions within the selected coronal sections. Because we verified that the respective surface of these areas was similar in the different rats, the data are expressed as mean number of labeled cells per rat in the PCx, hippocampus, and LHAb. As the borders of neocortical areas are less easily determined, labeled cells were counted in a sample region (0.66 mm² for the VLO/LO; 1 mm² for the IL), and the data are expressed as the number of Fos-positive cells per mm².

Statistical analysis

Behavioral data in trained and pseudotrained rats were compared using a X² test.

In all brain areas, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed. One factor was the experimental condition (T, PO, PW, or C), and the other was the mnemonic stage (learning or reactivation). For PCx data, a two-way ANOVA was further used with one factor being the experimental condition (T, PO, PW, or C) and the other being the location of the immunoreactive cells in the PCx subdivisions (PCx-a and PCx-p). Post hoc pairwise group comparisons were made by an LSD (Least Significant Difference) procedure. We considered differences as significant when $P < 0.05$. All statistical analyses were done with the software SAS 8.2 (SAS Institute).

Acknowledgments

We thank Dominique Valentin for her helpful comments on the statistical analysis, and Edi Barkai and his collaborators (Ben Gurion Univ., Israel) for their assistance with the maze elaboration. F.R. is a recipient of a Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MNERT) grant.

References

- Abel, T. and Lattal, K.M. 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**: 180–187.
- Anagnostaras, S.G., Maren, S., and Fanselow, M.S. 1999. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: Within-subjects examination. *J. Neurosci.* **19**: 1106–1114.
- Anokhin, K.V. and Rose, S.P. 1991. Learning-induced increase of immediate early-gene messenger mRNA in the chick forebrain. *Eur. J. Neurosci.* **3**: 162–167.
- Berman, D.E. and Dudai, Y. 2001. Memory extinction, learning anew, and learning the new: Dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science* **291**: 2417–2419.
- Bertaina, V. and Destrade, C. 1995. Differential time courses of *c-fos* mRNA expression in hippocampal subfields following acquisition and recall testing in mice. *Cog. Brain Res.* **2**: 269–275.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., and Jaffard, R. 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* **400**: 671–675.
- Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehghan, R., and Ye, F. 2000. Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol. Exp.* **60**: 403–410.
- Datiche, F. and Cattarelli, M. 1996. Reciprocal and topographic

- connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: A tracing study using the B subunit of the cholera toxin. *Brain Res. Bull.* **6**: 391–398.
- Datiche, F., Roulet, F., and Cattarelli, M. 2001. Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: An immunohistochemical study in the rat. *Brain Res. Bull.* **55**: 95–99.
- Debiec, J., LeDoux, J.E., and Nader, K. 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* **36**: 527–538.
- Dudai, Y. 2002. Molecular bases of long-term memories: A question of persistence. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**: 211–216.
- . 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Ann. Rev. Psychol.* **55**: 51–86.
- Eichenbaum, H. 2001. The long and winding road to memory consolidation. *Nat. Neurosci.* **4**: 1057–1058.
- Eichenbaum, H., Mathews, P., and Cohen, N.J. 1989. Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. *Behav. Neurosci.* **103**: 1207–1216.
- Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B., and Bunsey, M. 1996. Functional organization of the hippocampal memory system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 13500–13507.
- Gallagher, M., McMahan, R.W., and Schoenbaum, G. 1999. Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning. *J. Neurosci.* **19**: 6610–6614.
- Haberly, L.B. 1985. Neuronal circuitry in olfactory cortex: Anatomy and functional implications. *Chem. Senses* **10**: 219–238.
- . 2001. Parallel-distributed processing in olfactory cortex: New insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem. Senses* **26**: 551–576.
- Haberly, L.B. and Bower, J.M. 1989. Olfactory cortex: Model circuit for study of associative memory? *Trends Neurosci.* **12**: 258–264.
- Haberly, L.B. and Price, J.L. 1978. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I-Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J. Comp. Neurol.* **178**: 711–740.
- Hasselmo, M.E. 1995. Neuromodulation and cortical function: Modeling the physiological basis of behavior. *Behav. Brain Res.* **67**: 1–27.
- Herrera, D.G. and Robertson, H.A. 1996. Activation of *c-fos* in the brain. *Prog. Neurobiol.* **83**: 83–107.
- Hess, U.S., Lynch, G., and Gall, C.M. 1995a. Changes in *c-fos* mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning: Differential involvement of hippocampal subfields CA1 and CA3. *J. Neurosci.* **15**: 4786–4795.
- . 1995b. Regional patterns of *c-fos* mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *J. Neurosci.* **15**: 7796–7809.
- Jung, M.W., Larson, J., and Lynch, G. 1990. Long-term potentiation of monosynaptic EPSPs in rat piriform cortex in vitro. *Synapse* **6**: 279–283.
- Kaczmarek, L. 2000. Gene expression in learning processes. *Acta Neurobiol. Exp.* **60**: 419–424.
- Kaut, K.P. and Bunsey, M.D. 2001. The effects of lesions of the rat hippocampus or rhinal cortex on olfactory and spatial memory: Retrograde and anterograde findings. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* **1**: 270–286.
- Lipton, P.A., Alvarez, P., and Eichenbaum, H. 1999. Crossmodal associative memory representations in rodent orbitofrontal cortex. *Neuron* **22**: 349–359.
- Litaudon, P. and Cattarelli, M. 1996. Olfactory bulb repetitive stimulations reveal non-homogeneous distribution of the inhibitory processes in the rat piriform cortex. *Eur. J. Neurosci.* **8**: 21–29.
- Litaudon, P., Mouly, A.-M., Sullivan, R., Gervais, R., and Cattarelli, M. 1997. Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. *Eur. J. Neurosci.* **9**: 1593–1602.
- Maviel, T., Durkin, T.P., Menzaghi, F., and Bontempi, B. 2004. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* **305**: 96–99.
- Montag-Sallaz, M. and Buonviso, N. 2002. Altered odor-induced expression of *c-fos* and arg 3.1 immediate early genes in the olfactory system after familiarization with an odor. *J. Neurobiol.* **52**: 61–72.
- Mouly, A.M. and Gervais, R. 2002. Polysynaptic potentiation at different levels of rat olfactory pathways following learning. *Learn. Mem.* **9**: 66–75.
- Mouly, A.M., Fort, A., Ben-Boutayab, N., and Gervais, R. 2001. Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. *Neuroscience* **102**: 11–21.
- Nader, K. 2003. Memory traces unbound. *Trends Neurosci.* **26**: 65–72.
- Paxinos, G. and Watson, C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney, Australia.
- Pratt, W.E. and Mizumori, J.Y. 2001. Neurons in rat medial prefrontal cortex show anticipatory rate changes to predictable differential rewards in a spatial memory task. *Behav. Brain Res.* **123**: 165–183.
- Przybylski, J. and Sara, S.J. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav. Brain Res.* **84**: 241–246.
- Ramus, S.J. and Eichenbaum, H. 2000. Neural correlates of olfactory recognition memory in the rat orbitofrontal cortex. *J. Neurosci.* **20**: 8199–8208.
- Roesch, M.R. and Olson, C.R. 2004. Neuronal activity related to reward value and motivation in primate frontal cortex. *Science* **304**: 307–310.
- Roman, F.S., Chaillan, F.A., and Soumireu-Mourat, B. 1993. Long-term potentiation in rat piriform cortex following discrimination learning. *Brain Res.* **601**: 265–272.
- Roulet, F., Datiche, F., Liénard, F., and Cattarelli, M. 2004. Cue valence representation studied by Fos immunocytochemistry after acquisition of a discrimination learning task. *Brain Res. Bull.* **64**: 31–38.
- Roulet, F., Datiche, F., Liénard, F., and Cattarelli, M. 2005. Learning-stage dependent Fos expression in the rat brain during acquisition of an olfactory discrimination task. *Behav. Brain Res.* **157**: 127–137.
- Saar, D., Grossman, Y., and Barkai, E. 1998. Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *Eur. J. Neurosci.* **10**: 1518–1523.
- Sara, S.J. 2000. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learn. Mem.* **7**: 73–84.
- Schoenbaum, G. and Eichenbaum, H. 1995. Information coding in the rodent prefrontal cortex. I-Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex. *J. Neurophysiol.* **74**: 733–750.
- Schoenbaum, G., Setlow, B., Saddoris, M.P., and Gallagher, M. 2003. Encoding predicted outcome and acquired value in orbitofrontal cortex during cue sampling depends upon input from basolateral amygdala. *Neuron* **39**: 855–867.
- Slotnick, B. 2001. Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn. Sci.* **5**: 216–222.
- Squire, L.R. and Alvarez, P. 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: A neurobiological perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**: 169–177.
- Staubli, U., Schottler, F., and Nejat-Bina, D. 1987. Role of dorso-medial thalamic nucleus and piriform cortex in processing olfactory information. *Behav. Brain Res.* **25**: 117–129.
- Sutherland, R.J. 1982. The dorsal diencephalic conduction system: A review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **6**: 1–13.
- Treves, A. and Rolls, E.T. 1992. Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* **2**: 189–199.
- Tronel, S. and Sara, S. 2002. Mapping of olfactory memory circuits: Region-specific *c-fos* activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn. Mem.* **9**: 105–111.
- Truchet, B., Chaillan, F.A., Soumireu-Mourat, B., and Roman, F.S. 2002. Learning and memory of cue-reward association meaning by modifications of synaptic efficacy in dentate gyrus and piriform cortex. *Hippocampus* **12**: 600–608.
- Vale-Martinez, A., Marti-Nicolovius, M., Guillazo-Blanch, G., Coll-Andreu, M., and Morgado-Bernal, I. 1997. Effects of habenular lesions upon two-way active avoidance conditioning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* **68**: 68–74.

Received November 30, 2004; accepted in revised form February 28, 2005.

Chapitre VI – Discussion générale

Discussion générale

A – Résumés des résultats

Les principaux résultats obtenus à la suite des différentes expérimentations sont synthétisés dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 – Résumés des résultats obtenus au cours de la thèse

	Dans le CP	Dans les régions hippocampale et néocorticale
1 - Effet de l'apprentissage discriminatif olfactif sur l'expression de la protéine Fos dans le CP	Effet de la vitesse d'apprentissage du rat sur l'expression de Fos.	
2 - Influence de la valeur du stimulus sur l'expression de Fos		<p>Néocortex:</p> <ul style="list-style-type: none"> - L'expression de Fos dans l'IL semble sensible à l'obtention de la récompense hydrique attendue. - Le VLO serait impliqué dans l'élaboration de stratégie comportementale.
3 - Etude de l'expression cérébrale de Fos à différents stades de l'acquisition de la tâche de discrimination olfactive	<ul style="list-style-type: none"> - Dans le CPP, l'aspect de nouveauté de la situation induit une forte expression de Fos. 	<p>Hippocampe:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Implication précoce des subdivisions hippocampales CA1 et CA3 au cours de l'apprentissage. <p>Néocortex:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Implication plus tardive du néocortex (VLO) au cours de l'apprentissage.
4 - Expression de Fos après un apprentissage discriminatif olfactif et après sa réactivation	<ul style="list-style-type: none"> - La maîtrise et la consolidation de la tâche discriminative engendre une diminution de l'expression de Fos. - Le CPa serait impliqué dans le processus de réactivation de la tâche. 	<p>Hippocampe:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Implications de la CA1 plutôt dans la phase d'acquisition et de la CA3 dans celle de réactivation. <p>Néocortex :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dans le VLO, la maîtrise et la consolidation de la tâche discriminative engendre une diminution de l'expression de Fos. Le VLO serait impliqué d'autre part dans le processus de réactivation.

Avant de discuter nos données, nous allons examiner si les méthodes utilisées pourraient avoir interféré avec les résultats obtenus.

B - Considérations méthodologiques

Nos expérimentations soulignent l'importance du protocole et du choix des rats témoins lorsque des modifications de l'activité cérébrale liées à la mémoire sont abordées par l'immunocytochimie de la protéine Fos. Plus précisément, dans ce paragraphe méthodologique nous discuterons du choix de la session de réactivation, des différents groupes de témoins puis nous considérerons l'utilisation de la détection de la protéine Fos comme outil de cartographie des processus mnésiques.

B1 - Expression de Fos après réactivation mnésique : choix du test comportemental

Notre but était d'étudier l'expression de Fos après l'acquisition et lors de la réactivation d'une tâche de discrimination olfactive. Après un délai de 10 jours, les rats TR ayant préalablement acquis la tâche de discrimination olfactive sont soumis à la réactivation mnésique de la tâche apprise. Placés dans le labyrinthe, ils doivent y effectuer une session de 20 essais et les choix corrects sont récompensés par l'obtention d'eau.

Pourquoi avoir choisi de réactiver la mémoire de la tâche olfactive par une session de 20 essais ?

Une telle session nous permet d'analyser et de comparer la performance comportementale des rats lors de la réactivation par rapport à celle de la phase d'acquisition puisque notre critère de réussite (80%) est calculé sur l'ensemble d'une session de 20 essais. Nous confirmons d'ailleurs que les animaux TR sont capables de se souvenir de la tâche puisque leur score atteint 85% de choix corrects. Il faut noter que certaines études menées pour comprendre les processus mnésiques olfactifs utilisent une tâche de discrimination acquise rapidement en quelques essais seulement (Otto et al., 2000; Tronel et Sara, 2002). Tronel et Sara (2002) observent peu de différence d'expression de Fos entre les groupes d'animaux conditionnés et témoins lors du rappel d'une tâche de discrimination olfactive rapidement acquise. Les auteurs, qui utilisent pour la réactivation de la tâche un seul essai renforcé, suggèrent que le stimulus serait insuffisant pour induire une expression significativement différente chez les rats conditionnés. Soulignons enfin que notre tâche de discrimination est basée sur un renforcement positif et l'on peut supposer qu'à la différence des études utilisant un renforcement négatif, plusieurs essais sont nécessaires à la réactivation de l'apprentissage.

Les essais de la session de réactivation sont renforcés :

Dans les études examinant les processus de rappel, le stimulus conditionnel est souvent présenté seul, sans renforcement, ce qui n'exclut pas un début d'extinction (Nader, 2003; Duvarci et Nader,

Discussion générale

2004). D'autre part, on peut souligner que le rappel de l'information semble plus efficace lorsque l'animal se retrouve placé dans des conditions similaires aux conditions de l'acquisition (Dudaï, 2002). Pour ces différentes raisons, nous choisissons, lors de la session de réactivation, de soumettre les rats à une session « complète » dans le labyrinthe, les essais réussis étant renforcés. Dans ces conditions, nous ne pouvons écarter l'éventualité d'un phénomène de réapprentissage (Alescio-Lautier et al., 1995; Tronel et Sara, 2003). Néanmoins puisque les rats ont, à l'issue de l'unique session de réactivation, un score similaire au score obtenu lorsque la tâche est bien maîtrisée, le phénomène de réapprentissage a probablement un impact mineur. Dans tous les cas, au cours de la séance de réactivation, les animaux doivent sans doute mettre en oeuvre des souvenirs établis pendant la phase d'acquisition initiale. Si le souvenir de la valeur récompensante d'une des 2 odeurs de la paire s'était totalement estompé après l'intervalle de 10 jours, 20 essais n'auraient probablement pas été suffisants pour atteindre le score d'environ 85% que nous observons sur l'ensemble de la session de réactivation.

B2 - Choix des groupes de rats témoins

Nous avons utilisé au cours de nos expérimentations une large gamme de rats témoins (**tableau 2**).

Tableau 2 - Récapitulatif des différents groupes de rats témoins utilisés au cours de la thèse

Etude	Dénomination	Restriction hydrique	Passage labyrinthe	Stimulation olfactive dans le labyrinthe	Récompense hydrique dans le labyrinthe	Mode de stimulation le jour du sacrifice
1 - Datiche et al. 2001	Pseudo-conditionnés	+	+	A et B	aléatoire	Session de 20 essais dans le labyrinthe
	Naïfs	non	+	aucune	non	Libre exploration de 10 min dans le labyrinthe
2 – Rouillet et al. 2004	Pseudo-conditionnés	+	+	A et B	aléatoire	Stimulation par l'odeur A pendant 3 min 30 sec dans la cage
	Contrôles olfactifs	non	non	aucune	non	Stimulation par l'odeur A pendant 3min 30 sec dans la cage
3 – Rouillet et al. 2005a	Pseudo-conditionnés	non	+	A et B	non	Session de 20 essais dans le labyrinthe
4 – Rouillet et al. 2005b	Pseudo-conditionnés (Po)	non	+	A et B	non	Session de 20 essais dans le labyrinthe
	Pseudo-conditionnés (Pw)	+	+	aucune	+	Session de 20 essais dans le labyrinthe

Discussion générale

Certains de ces animaux sont soumis aux stimulus conditionnel et inconditionnel présentés dans un ordre aléatoire. De la sorte, aucune association entre les deux n'est possible. Nous employons également des animaux N pour examiner l'impact de la seule exploration du labyrinthe sur l'immunoréactivité. Le marquage Fos des animaux P et N se révèle être très dense (Datiche et al., 2001). Ainsi, le flairage, à lui seul, déclenche une forte expression de Fos. Afin d'éviter les stimulations liées à l'exploration du labyrinthe, nous avons choisi de sacrifier alors l'ensemble de nos animaux après une exposition à l'odeur récompensante dans une cage semblable à celle d'habitation.

Nous utilisons également des rats dits « contrôles olfactifs » (O), non assoiffés, n'explorant pas le labyrinthe, stimulés chaque jour pendant 3 min 30 sec avec l'odeur. Nous obtenons de faibles différences de marquage entre les rats T, P et O (Roullet et al., 2004). De ces premières études, nous pouvons tirer plusieurs hypothèses :

1) la stimulation olfactive, par elle même engendre une forte expression de Fos et masquerait les effets éventuels liés aux processus mnésiques.

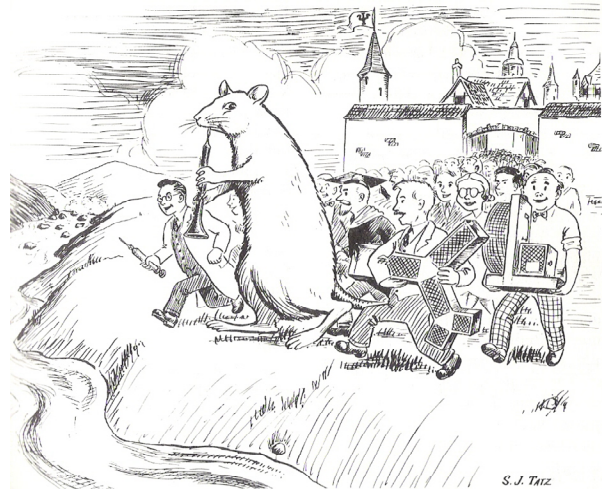
2) les sujets effectueraient des apprentissages non contrôlés par l'expérimentateur. En effet, Kaczmarek (2002) suggère que les sujets pseudo-conditionnés pourraient apprendre l'absence d'association entre les stimulus.

Si, dans nos expériences, la stimulation olfactive ne peut être éliminée, il était par contre plus simple d'envisager alors de nouveaux groupes d'animaux témoins pour qui la stimulation odorante et l'obtention de l'eau seraient dissociées. Il semble en effet important d'évaluer l'impact de la seule stimulation olfactive ou de la seule récompense hydrique sur l'expression de Fos. Ainsi nous avons utilisé les rats PO et PW, non assoiffés et stimulés par l'odeur dans le labyrinthe pour les premiers, assoiffés et récompensés de façon systématique mais sans être soumis à une stimulation olfactive dans le labyrinthe pour les seconds (Roullet et al., 2005b). Il faut souligner que les rats Pw présentent une forte expression de Fos dans le CP, en accord avec nos précédents résultats qui montrent que des rats, non stimulés par les odeurs mais explorant librement le labyrinthe, présentent une forte immunoréactivité de Fos dans cette région (Datiche et al., 2001). D'autre part, nous vérifions que la restriction hydrique n'influence pas à elle seule l'expression de Fos puisqu'elle n'induit pas de différence d'immunoréactivité chez rats C assoiffés ou pas (Datiche et al., 2001). Il faut enfin noter que les rats P, assoiffés et récompensés de façon aléatoire dans le labyrinthe, sont dans un état d'éveil certainement accru puisqu'il attendent l'arrivée de l'eau. Soit ces rats ne font aucune association entre

Discussion générale

la présence des odeurs dans le labyrinthe et la récompense aléatoire, soit ils sont capables d'apprentissage en associant ces événements ou en apprenant l'absence d'association. Puisque nos travaux visent à mettre en évidence une cartographie cérébrale de Fos qui reflète un apprentissage associatif chez les rats conditionnés, il apparaissait crucial de limiter les potentiels phénomènes mnésiques chez les rats témoins, en dissociant par exemple les stimulus conditionnels des inconditionnels. Dans notre cas, les rats témoins adéquats semblent ceux qui répondent à cette condition (rats PO et PW).

Néanmoins, l'analyse du marquage Fos dans le CP chez les différents rats témoins utilisés au cours de la thèse montre l'importance de la seule stimulation sensorielle sur l'expression de cette protéine. Nous fûmes donc amenés également à considérer les limites de la technique d'immunodétection de la protéine Fos.



Extrait de McGill (1965)

B3 - La protéine Fos : outil de cartographie des processus mnésiques ?

La détection des produits du proto-oncogène *c-fos* (ARNm, protéine) a tout d'abord été adoptée pour rendre compte de l'activité cellulaire (Hunt et al., 1987; Morgan et al., 1987; Herrera et Robertson, 1996). Récemment, l'expression de la protéine Fos dans le CP est employée pour témoigner du codage olfactif au niveau cortical (Zou et al., 2005). Par ailleurs, la technique d'immunodétection de la protéine Fos est aussi utilisée pour l'étude des processus mnésiques, (Anokhin et Rose, 1991; Bertaina-Anglade et al., 2000; Kaczmarek, 2002), en particulier olfactifs (Hess et al., 1997; Funk et Amir, 2000; Tronel et Sara, 2002). Cependant, Herdegen et Leah (1998), soulignent la complexité de l'analyse dans les expérimentations utilisant les FTI. Les expérimentations sont généralement menées pour étudier l'influence d'un stimulus particulier, mais les neurones cérébraux sont en fait constamment sollicités par une multitude d'afférences et il semble difficile de déterminer comment les FTI s'activent lors d'interactions entre plusieurs stimulus. Or, il n'est actuellement pas possible de savoir comment les FTI répondent face à ces interactions interstimuli. Par exemple, dans notre cas précis, le bruit de fond olfactif, mais aussi les bruits ambiants (ordinateur, ouverture des portes du

Discussion générale

labyrinthe) ainsi que la manipulation par l'expérimentateur stimulent en permanence les animaux. Ceci contribue certainement à induire une expression non spécifique de Fos et expliquerait peut être en partie les différences de marquage faibles voire non significatives entre les animaux T et P dans le CP constatées. Soulignons néanmoins que les animaux C, maintenus dans leur cage d'hébergement, présentent un très faible marquage dans l'ensemble des régions analysées (Datiche et al., 2001; Rouillet et al., 2004; 2005a, b). L'expression de la protéine Fos pouvant être induite par de nombreux stimuli (Herdegen et Leah, 1998), l'analyse de l'expression basale de Fos apparaît importante car elle indique que l'immunomarquage observé chez les rats conditionnés et témoins est bien liée aux conditions expérimentales.

Enfin, la protéine Fos peut être, d'une part impliquée dans les processus d'apprentissage et n'être parfois activée uniquement lorsque des informations convergent en même temps vers certaines cellules (Guzowski, 2002), et d'autre part avoir un niveau d'expression élevé chez un rat pseudo-conditionné (Kaczmarek, 2002). Ainsi, l'expression de la protéine Fos chez les rats conditionnés, malgré la mise en place d'une mémoire associative, peut être moins importante ou comparable à celle des rats témoins.

En conclusion, l'analyse de l'expression de Fos nous a permis d'observer des modifications liées à la vitesse d'apprentissage des rats conditionnés (Datiche et al., 2001), et de mettre en évidence des différences entre les animaux T et P dans certaines structures (hippocampales et néocorticales) (Rouillet et al., 2005 a, b). Certaines de ces modifications de l'immunoréactivité entre rats sont liées à la tâche discriminative et l'expression de Fos apparaît sensible à la réactivation de l'apprentissage. L'analyse de l'expression hippocampale et néocorticale de Fos nous a donc permis de mettre en évidence des modifications liées aux processus mnésiques olfactifs. Toutefois, dans le CP, la forte implication de cette région corticale dans le traitement d'informations sensorielles semble représenter une limite à la détection immunocytochimique de Fos comme outil d'investigation des processus d'apprentissage et de mémoire.

C - Le CP et les processus mnésiques

Dans ce travail, nous avons entrepris, par plusieurs expérimentations, de préciser l'implication du CP et de ses subdivisions dans les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation olfactifs. Des études montrent en effet que ce cortex est le siège de modifications électrophysiologiques à la suite d'un apprentissage olfactif (Litaudon et al., 1997; Saar et al., 1999) et représente un modèle de

Discussion générale

mémoire associative (Hasselmo et al., 1990). Nous avons étudié les motifs d'activation cellulaire induits dans le CP après (Datiche et al., 2001; Rouillet et al., 2004), ou pendant (Rouillet et al., 2005a) un apprentissage discriminatif olfactif nécessitant plusieurs jours d'entraînement quotidien et lors de sa réactivation (Rouillet et al., 2005b).

La tâche de discrimination étant acquise, nous constatons que, parmi les rats conditionnés (T), ceux qui apprennent rapidement en 7 à 8 jours (rats « rapides ») montrent une expression de Fos significativement plus faible que celle observée chez les sujets « lents » (>10 jours) (Datiche et al., 2001). Ce résultat corrobore des données obtenues par Anokhin et al. (2000) chez la Souris : les animaux qui acquièrent rapidement une tâche d'évitement actif présentent une expression de l'ARNm *c-fos* moins importante que celles qui apprennent lentement. Cahill et al., (2000) montrent par ailleurs que, lors d'un apprentissage de repérage spatial, l'injection systémique de propranolol, antagoniste noradrénergique, induit une amnésie rétrograde plus sévère chez les rats qui présentent un meilleur score que chez ceux qui sont moins performants, ce qui suggère un niveau d'activation adrénérergique différent chez ces deux groupes de rats. Dans notre expérience, une autre hypothèse peut être avancée. Les animaux T « lents » pourraient être perturbés dans leur apprentissage par les signaux du contexte expérimental. Ainsi, le traitement du signal pertinent (odeurs expérimentales) par rapport au bruit de fond olfactif pourrait être moins efficace chez ces animaux, entraînant une sollicitation plus vaste des cellules du CP.

Toutefois, si l'analyse de l'expression de Fos dans le CP montre une différence selon la rapidité d'apprentissage des rats T, elle n'indique pas, en revanche, de différence significative entre les animaux T et les animaux témoins P (récompensés aléatoirement pour l'une ou l'autre des deux odeurs) et N (placés quotidiennement dans le labyrinthe sans stimulation particulière) (Datiche et al., 2001). Ces données suggèrent que l'exploration quotidienne d'un environnement autre que la cage d'habitation suscite une forte expression de Fos. En particulier, le seul flairage des stimulus odorants (dans le cas des rats T et P) ou du bruit de fond olfactif (dans le cas des rats N) pourraient être responsables du marquage Fos constaté. Les modifications de l'immunoréactivité de Fos plus spécifiquement liées aux processus mnésiques pourraient alors être masquées en partie.

Ces résultats nous ont conduit à modifier le mode de sacrifice, lorsque nous testons l'effet de la valeur du stimulus sur l'expression de Fos dans le CP (Rouillet et al., 2004), afin d'éviter l'expression de Fos liée au dispositif expérimental : nous sacrifions alors les rats après une stimulation olfactive délivrée dans une cage semblable à la cage d'hébergement au lieu de les sacrifier à l'issue d'une

Discussion générale

session dans le labyrinthe. Toutefois, même dans ces conditions, nous n'observons pas de différence significative de l'immunoréactivité entre les rats T et P. Dans cette étude, nous utilisons, en parallèle aux rats T et P, un groupe d'animaux « témoins olfactifs » (groupe O) soumis à une stimulation olfactive quotidienne. Nous constatons alors, chez ces sujets, que l'expression de Fos dans le CP ne diminue pas par rapport à celle observée chez les rats T et P. Notons que Montag-Sallaz et Buonviso (2002) décrivent une expression de *c-fos* plus faible dans le BO des rats familiarisés avec une odeur. Cependant, leur analyse porte sur le niveau bulbaire, et utilise l'hybridation *in situ* de l'ARNm, méthode qui, comparée à la détection immunohistochimique de la protéine Fos, pourrait aboutir à des motifs d'expression différents dans la même structure cérébrale (Chaudhuri et al., 2000). De plus, dans notre étude, tous les rats se familiarisent avec les stimulus olfactifs au cours des tests. Dans ce cas, si la familiarisation olfactive induit une diminution de l'expression de Fos celle-ci devrait être similaire pour l'ensemble des sujets. Nous ne pouvons pas vérifier cette hypothèse ici puisque nous n'avons pas comparé les résultats obtenus au marquage Fos qui aurait pu être observé au début de l'expérience.

Comment expliquer la similarité des résultats de l'immunodétection de Fos entre les rats conditionnés et témoins dans le CP? Nous proposons l'hypothèse suivante : dans le labyrinthe, les rats T, P et N sont soumis à divers événements (exploration du labyrinthe, flairage...). Or, les cellules pyramidales du CP peuvent être activées par de multiples situations (échantillonnage de l'odeur, consommation d'eau...) pendant un apprentissage (Schoenbaum et Eichenbaum, 1995; Zinyuk et al., 2001). Cette plurimodalité fonctionnelle pourrait être alors en partie responsable de l'absence de différence d'expression de Fos entre les rats T, P et N.

Dans nos travaux examinant l'expression de Fos à différents stades au cours de l'apprentissage (J1, J4, Acquisition) nous n'observons aucune différence de l'expression de Fos dans le CP entre les animaux T et P (non soumis en restriction hydrique) (Roullet et al., 2005a). Toutefois, ces deux types de rats reçoivent une stimulation olfactive dans le labyrinthe et celle-ci pourrait occulter les modifications cellulaires liées aux processus mnésiques. D'autre part, rappelons que les rats T et P subissent diverses stimulations dans le labyrinthe (ouverture des portes, exploration des branches du labyrinthe..) qui pourraient activer de façon similaire l'expression de Fos dans les cellules plurimodales du CP chez les deux groupes de rats. Il faut souligner que notre analyse (quantitative) de l'expression de Fos ne nous permet pas de déterminer si les cellules activées sont les mêmes dans les deux groupes.

Lorsque l'apprentissage est achevé et consolidé, les rats T présentent significativement moins de cellules immunoréactives que les deux groupes d'animaux témoins PO et PW (non assoiffés et soumis

Discussion générale

aux deux odeurs ou préalablement assoiffés et récompensés de façon systématique sans aucune stimulation olfactive respectivement) (Roullet et al., 2005b). Or, la répétition d'une tâche déjà apprise chez le Poulet (Anokhin et Rose, 1991) ou un apprentissage bien maîtrisé chez la Souris (Bertaina et Destrade, 1995) induit une diminution de l'expression de Fos au niveau cérébral. Les rats PW et PO sont placés quotidiennement dans le labyrinthe où ils reçoivent respectivement de l'eau ou la stimulation odorante. La diminution significative du nombre de cellules immunoréactives chez les rats T par rapport aux rats P pourrait donc refléter les processus mnésiques et être corrélée à des processus d'attention et/ou à la consolidation spécifique de l'apprentissage. Nous pouvons donc supposer que lorsque l'apprentissage est bien maîtrisé, seules les cellules qui intègrent l'information olfactive pertinente (odeur récompensante) à l'obtention de la récompense hydrique sont activées. Ces arguments expliqueraient pourquoi les rats T ayant acquis et consolidé l'apprentissage présentent un marquage significativement moins important par rapport aux rats P. La diminution de l'expression de Fos chez les rats T qui doivent maintenir un score de 80% de choix corrects durant 2 jours consécutifs pourrait refléter la fin du processus de consolidation.

Dans le CP, pris dans son ensemble, nos données montrent d'une part une modification de l'expression de Fos selon la rapidité du rat à acquérir la tâche de discrimination, et d'autre part que l'activation cellulaire paraît diminuée avec la consolidation de l'apprentissage olfactif discriminatif.

Cependant, on sait que, sur les plans structurel et fonctionnel le CP peut être divisé en deux subdivisions, le CPa et le CPp. L'analyse de leurs immunoréactivités respectives au cours de ces différentes études nous a apporté des données complémentaires dont nous allons examiner l'implication éventuelle dans les processus mnésiques.

Les CP antérieur et postérieur jouent-ils un rôle similaire dans les processus d'apprentissage et de mémoire olfactifs ?

De façon générale, nos expérimentations mettent en évidence une immunoréactivité de Fos significativement plus forte dans le CPa que dans le CPp (Datiche et al., 2001; Roullet et al., 2004; 2005a, b). Cette hétérogénéité antéro-postérieure de l'expression de Fos est observée aussi bien chez les rats conditionnés que chez les témoins. Ce caractère commun pourrait refléter la prédominance des afférences bulbaires dans le CPa (Haberly, 2001).

Discussion générale

Nous avons mis en évidence des modifications significatives de l'expression de Fos entre les rats T et P, particulières à chaque subdivision. **Dans le CPa**, lors de la réactivation de la tâche de discrimination olfactive 10 jours après l'acquisition, les rats T présentent un marquage Fos significativement plus faible par rapport aux rats PO (rats uniquement soumis aux odeurs, sans récompense hydrique dans le labyrinthe) (Rouillet et al., 2005b). Cette différence n'est pas observée dans le Cpp. Rappelons que l'organisation des fibres d'association diffère entre les deux subdivisions. Les fibres intrinsèques d'association dans le CPa sont dirigées caudalement et rostralement (Haberly et Price, 1978; Datiche et al., 1996) et cette organisation anatomique serait favorable à l'activité récurrente et aux phénomènes auto-associatifs (Haberly, 2001). Le CPa pourrait être impliqué dans le codage olfactif (Illig et Haberly, 2003; Zou et al., 2005), le traitement sensoriel (Litaudon et Cattarelli, 1996 ; Litaudon et al., 1997 ; Wilson, 2000, 2001), dans la généralisation rapide de la signification de l'odeur (Haberly, 2001) et dans la transmission de l'information vers d'autres aires cérébrales (Datiche et Cattarelli, 1996b; Litaudon et Cattarelli, 1996). Nos résultats indiquent en outre une implication de cette subdivision dans la réactivation de la tâche de discrimination olfactive. Notons cependant que Tronel et Sara (2002) ne mettent en évidence aucune modification de l'expression de Fos chez des rats conditionnés ou pseudo-conditionnés après un apprentissage discriminatif olfactif ou lors de son rappel. Toutefois, dans ce cas, des différences dans les protocoles expérimentaux pourraient rendre compte des résultats observés :

- la tâche de conditionnement utilisée par ces auteurs était rapidement acquise en quelques essais seulement
- la tâche de rappel dans leur étude consistait en un seul essai renforcé.

Dans le Cpp, les rats T et P sacrifiés à l'issue de la première session de conditionnement (T1 et P1) présentent un marquage significativement plus important par rapport aux animaux T et P sacrifiés le jour même de l'acquisition. Toutefois, l'expression de Fos chez les rats T n'étant pas différente de celle observée chez les rats P, l'expression élevée de Fos lors de la première session dans le labyrinthe ne semble pas liée à des processus mnésiques. Cependant, il se pourrait que l'aspect de nouveauté des stimulus olfactifs le premier jour de conditionnement soit responsable de la forte expression de Fos dans le Cpp. En effet, Hess et al. (1995b) montrent, par hybridation *in situ* de l'ARNm *c-fos*, une activation plus importante du CP chez les rats qui explorent le dispositif de conditionnement olfactif

Discussion générale

par rapport à des rats surentraînés à la tâche d'apprentissage. La familiarisation progressive à l'environnement olfactif au cours du passage quotidien dans le labyrinthe pourrait induire, chez les rats T et P, une diminution de l'immunoréactivité de Fos. Ceci conforte des résultats précédents qui indiquent que la familiarisation aux stimulus induit une diminution de l'expression de Fos dans les régions cérébrales visuelles (Zhu et al., 1995) et olfactives (Montag-Sallaz et al., 1999).

L'ensemble de nos résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une hétérogénéité fonctionnelle entre les deux subdivisions du CP (Lynch et Granger, 1989; Litaudon et al., 1997a). Il faut souligner que ces auteurs décrivent une implication privilégiée du Cpp dans les processus mnésiques. Nos travaux amènent donc des données fonctionnelles nouvelles, puisque nous montrons que le Cpa serait engagé dans les phénomènes de mémoire olfactive, en particulier lors de la réactivation de la tâche de discrimination.

D - Implication de l'hippocampe et du néocortex dans les processus mnésiques olfactifs

On suppose généralement que la mémoire repose sur des modifications d'activation neuronale au sein de réseaux cérébraux. Or, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre d'introduction, tant sur le plan anatomique (Haberly et Price, 1978; Price, 1985; Datiche et Cattarelli, 1996; Vanderwolf, 2001) que fonctionnel (Tanabe et al., 1975; Eichenbaum et al., 1983; Otto et Eichenbaum, 1992; Rolls et al., 1996; Kaut et Bunsey, 2001; Rolls, 2001; Hudon et al., 2002; Hudon et al., 2003), le CP est en relation avec diverses aires cérébrales impliquées dans l'apprentissage et la mémoire comme la formation hippocampique ou le néocortex.

Nous avons donc également analysé l'expression de Fos dans ces régions néocorticale et limbique.

D1 - Expression de Fos dans l'hippocampe dans l'étude des processus mnésiques olfactifs

L'aire CA3

Nous ne rapportons pas de différence significative entre les animaux T et P après la phase d'acquisition de la tâche dans CA3 (Roulet et al., 2004; 2005b) en accord avec les résultats de Tronel et Sara (2002). Cependant, nous observons une immunoréactivité de Fos plus importante chez les rats P par rapport aux T à l'issue du quatrième jour de conditionnement lors de la mise en place de l'apprentissage (Roulet et al., 2005a) et chez les POR par rapport aux TR à la fin de la session de

Discussion générale

réactivation (Roulet et al., 2005b). Dans les deux cas, les rats P et POR, non assoiffés, sont stimulés par les odeurs dans le labyrinthe. D'un point de vue comportemental, pour ces deux groupes, le pourcentage de « non choix » sur l'ensemble de la session est important. Nous constatons que les animaux P, non motivés puisque non assoiffés, réduisent peu à peu leurs déplacements dans le labyrinthe au cours des sessions. De même, l'analyse du comportement des rats POR sur les 20 essais de la session de réactivation indique l'apparition progressive de « non choix » au cours de la session. L'élévation de l'expression de Fos dans la CA3 pourrait donc refléter une modification dans le comportement exploratoire du rat, puisque l'HC serait engagé dans le contrôle de certaines tâches locomotrices Vanderwolf (2001).

Par ailleurs, la différence de marquage entre les rats TR et POR suggère que cette subdivision serait impliquée dans le processus de réactivation du traitement de l'information olfactive. Cette donnée soutient certains travaux de modélisation suggérant que cette aire hippocampique représenterait un réseau auto-associatif pour le stockage et le rappel de l'information (Treves et Rolls, 1992).

L'aire CA1

A l'issue de la première session de conditionnement (stade J1), nous notons une immunoréactivité Fos plus importante chez les animaux T par rapport aux P dans la subdivision CA1. Ce résultat est en accord avec les travaux de Bertaina-Anglade et al. (2000) qui mettent en évidence une implication précoce de CA1 lors d'une tâche de conditionnement opérant chez la Souris. Au stade J1, la différence d'expression de Fos ne peut être attribuée à l'acquisition de la discrimination olfactive associée à la récompense hydrique par les animaux T puisqu'il s'agit de la toute première session d'entraînement. Nous pourrions alors envisager un effet de la nouveauté de la situation puisque ce phénomène joue un rôle particulièrement important dans l'activation de Fos (Anokhin et Rose, 1991; Montag-Sallaz et al., 1999). Par ailleurs, Hess et al. (1995b) montrent que la découverte et l'exploration initiale du dispositif expérimental peuvent induire une forte expression de Fos dans CA1. Cependant, dans notre cas, ces phénomènes ne peuvent expliquer la différence observée entre les deux groupes de rats puisque, pour l'ensemble des animaux, l'introduction dans le labyrinthe et la stimulation par les odeurs représentent une situation nouvelle et les rats T et P explorent le dispositif pour la première fois : nous pourrions alors nous attendre à une induction semblable de Fos dans ces deux groupes. Nous pouvons plus vraisemblablement avancer l'hypothèse d'une différence d'état motivationnel entre les rats T et P car seuls les rats T sont soumis à une restriction hydrique et obtiennent de l'eau dans le labyrinthe ; ils présentent donc des niveaux attentionnel et motivationnel accrus. L'état interne de soif et la présence

Discussion générale

d'une récompense hydrique dans le labyrinthe pour ces animaux participent certainement à la modification du motif d'activation cellulaire dans CA1. D'ailleurs certaines cellules de cette aire sont sensibles au facteur « récompense » lors d'un l'apprentissage spatial récompensé par de la nourriture (Hölscher et al., 2003).

Il faut souligner que, selon nos expériences, nous observons (Roullet et al., 2005a) ou pas (Roullet et al., 2005b) une différence de l'expression de Fos entre les animaux T et P lorsque la discrimination olfactive est acquise. Rappelons que, dans un cas, les animaux sont sacrifiés immédiatement après avoir atteint le critère de réussite, dans l'autre cas, ils doivent atteindre et maintenir ce critère pendant deux jours consécutifs (80% de choix corrects ou 10 essais consécutifs réussis sur l'ensemble de la session versus 80% de choix corrects sur l'ensemble d'une session de 20 essais) . Nous pouvons donc supposer que les degrés de maîtrise de la tâche et de consolidation diffèrent dans les deux cas et pourraient être à l'origine des variations observées.

L'ensemble de ces résultats indique que la CA1 serait plutôt impliquée dans l'apprentissage que dans celle de réactivation. Notons que certains auteurs ont démontré que le processus de reconsolidation dans la CA1 n'était que l'image partielle du processus de consolidation à l'échelle moléculaire (von Herten et Giese, 2005). En particulier ces auteurs montrent que le gène du facteur de croissance inductible B (NGFI-B) est régulé uniquement pendant la phase de consolidation dans cette aire hippocampique. Or, nous avons déjà évoqué (chapitre C4) que le gène *c-fos* était inductible par les facteurs de croissance (Curran et Morgan, 1985) en particulier dans les cellules de l'HC (Ferhat et al., 1993). D'autre part, l'immunoréactivité de *c-fos* et l'expression de l'ARNm NGFI-B sont parfois colocalisées au niveau cérébral (Backman et Morales, 2002). Ainsi l'activation de *c-fos* pourrait refléter les variations de la régulation transcriptionnelle, sensible aux processus de consolidation. Nos données confortent donc l'hypothèse que les phénomènes transcriptionnels et la participation de la CA1 diffèrent au cours des processus de mise en mémoire.

Alors que de nombreuses études utilisant les lésions de la région hippocampale indiquent que cette aire cérébrale n'est pas cruciale pour l'acquisition d'une tâche discriminative olfactive (Otto et Eichenbaum, 1992b ; Li et al. 1999 ; Hudon et al. 2002 ; 2003), nous mettons en évidence une implication de l'HC dans les processus mnésiques olfactifs. Récemment, Wood et al. (2004) concluent que l'HC n'est pas impliqué dans une tâche associative olfactive acquise rapidement. Cependant, une lésion de l'HC affecte la capacité des rats à se souvenir de la séquence de présentation des odeurs lors d'un apprentissage de discrimination olfactive (Fortin et al., 2002). Le rôle de l'HC dans la mémoire

Discussion générale

olfactive, qui semble donc dépendre fortement du type de tâche comportementale à effectuer, reste à préciser.

D2 - Expression de Fos dans les régions corticales

Le cortex infralimbique

Nos principaux résultats concernant l'IL montrent que les rats T, stimulés par l'odeur récompensante et recevant une récompense hydrique le jour du sacrifice (rats T+/w+) ont une immunoréactivité de Fos significativement supérieure aux animaux P. Il semblerait que cette région soit sensible à l'obtention de la récompense attendue. De plus, l'IL est impliqué dans des processus complexes d'intégration de l'association « stimulus/récompense » lors d'une tâche de conditionnement spatial (Pratt et Mizumori, 2001). Toutefois, nous n'observons pas de différence entre rats conditionnés et témoins dans nos travaux.

Le cortex orbitofrontal ventrolatéral et latéral

Nous mettons en évidence une immunoréactivité Fos significativement plus élevée chez les animaux P par rapport aux rats T+/w- stimulés par l'odeur récompensante sans obtenir de récompense hydrique (Roullet et al., 2004). Dans cette étude, de façon plus générale, les rats P présentent une expression de Fos plus importante par rapport à l'ensemble des autres groupes. Selon la théorie de Pearce et Hall (1980), le niveau d'attention est proportionnel à l'incertitude concernant le renforcement. Or, chez les rats P, récompensés de façon aléatoire durant les sessions dans le labyrinthe, l'incertitude sur l'issue du test est grande (**tableau 3**) car, pour ces animaux,

Groupe de rat	Entraînement		Sacrifice	
	Stimulation olfactive par	Obtention d'eau	Stimulation olfactive par	Prédiction sur l'obtention de la récompense (avant l'obtention de l'eau)
T+/w+	A B	+ -	A	Probabilité = 1
T+/w-	A B	+ -	A	Probabilité = 1
T-	A B	- +	A	Probabilité = 0
P	A B	aléatoire aléatoire	A	Probabilité = 0.5
O	A	-	A	Probabilité = 0

Tableau 3 - Incertitude sur l'issue du test chez les rats T et témoins dans « Roullet et al. 2004 »

Discussion générale

l'odeur A est parfois associée à l'obtention d'un renforcement. Chez les rats P le niveau d'attention est donc certainement élevé et pourrait induire une forte expression de Fos. Chez le Singe, le niveau d'activation cellulaire est corrélé à la probabilité d'obtenir une récompense hydrique lors de l'essai à venir (Fiorillo et al., 2003). Dans cette étude, plus l'incertitude est grande, plus les neurones dopaminergiques de la région mésencéphalique ventrale sont actifs. Or, le cortex préfrontal est la cible d'afférences dopaminergiques issues de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale (Berger et al., 1991) et les phénomènes attentionnels dans le cortex préfrontal dépendent de l'activité dopaminergique (Cetin et al., 2004). De plus, l'activation des neurones dopaminergiques peut induire l'expression du gène *c-fos* (Weaver et al., 1992). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la forte expression de Fos dans le VLO/LO chez les rats P pourrait être liée à une activité dopaminergique accrue, due à l'incertitude sur l'issue du test olfactif. Une étude pharmacologique pourrait, à l'avenir, permettre de vérifier cette hypothèse.

Une autre explication peut être avancée. Pour les rats T+/w-, lorsque l'apprentissage est acquis, l'attention de l'animal serait focalisée sur sa tâche et l'activation cellulaire reflèterait le traitement de l'information pertinente. Les rats P au contraire ne seraient pas en mesure de construire une stratégie comportementale adaptée au problème (insoluble) du choix de l'odeur. Ceci pourrait se traduire par une expression importante de Fos, comparée à celle des rats T+/w-, en réponse à une stimulation massive du VLO. Ce résultat est en accord avec ceux que nous obtenons par ailleurs (lors de l'étude portant sur la réactivation de la tâche), puisque les rats T sont moins immunoréactifs par rapport aux rats P (Po et Pw) à la fin de la phase d'apprentissage. Cependant, lorsque nous analysons l'activation cérébrale à différents stades de l'apprentissage, nous observons que les animaux T présentent dans cette région corticale un marquage Fos plus élevé par rapport aux rats P au stade de l'acquisition de la tâche. Il est, là encore, important de souligner que dans ces expériences les rats sont sacrifiés soit après que le critère de réussite ait été atteint et maintenu sur un ou deux jours, soit le jour même où le critère de réussite est atteint (sur l'ensemble de la session ou sur les 10 derniers essais). On peut supposer que le degré de consolidation de l'apprentissage ne serait pas similaire et pourrait contribuer aux différences de marquage observées. Lorsque l'apprentissage est bien maîtrisé, l'activation cellulaire ne concerne certainement que le réseau neuronal focalisé, impliqué dans le traitement de l'information pertinente. Au contraire, lorsque la consolidation de l'information n'est pas achevée, la protéine Fos s'exprimerait au niveau d'un réseau cellulaire plus étendu.

Discussion générale

Lors de la réactivation de la tâche, nous ne mettons pas en évidence de différence d'expression de Fos entre les animaux TR et POR. Notons que Tronel et Sara (2002) lors du rappel d'une tâche de discrimination olfactive rapidement acquise n'observent pas non plus de différence de l'expression de Fos entre les rats conditionnés et témoins. Dans notre étude, il semble que le marquage du VLO/LO n'est pas modifié par la seule stimulation olfactive, ou que la stimulation odorante seule aboutit à une induction similaire de la protéine dans ces deux groupes. Les rats TR présentent en revanche un marquage significativement plus important en comparaison avec les rats PWR. Cette différence d'expression de Fos ne peut être attribuée à la différence de stimulation odorante entre ces deux groupes puisque les rats POR, stimulés olfactivement, ne sont pas différents des rats PWR. Le VLO/LO pourrait donc participer à la réactivation de l'information, initialement acquise, associant la reconnaissance de l'odeur à la récompense hydrique. Nos résultats confortent l'hypothèse selon laquelle le cortex orbitofrontal jouerait un rôle à la fois dans la mémorisation de stimulus spécifiques et dans l'élaboration de stratégie comportementale (Schoenbaum et al., 1998; Ramus et Eichenbaum, 2000; Schoenbaum et al., 2003b).

Relation entre l'hippocampe et le néocortex

En conclusion, l'ensemble de nos travaux indique que les structures hippocampales et néocorticales pourraient être impliquées, de façon différenciée, dans les processus mnésiques olfactifs.

Les régions CA1 et VLO en particulier semble jouer un rôle dans la phase d'acquisition de l'apprentissage et nous constatons par ailleurs que l'expression de Fos entre la fin de l'acquisition de la tâche et sa réactivation (Roullet et al., 2005b) évolue de façon similaire dans les structures CA1 et VLO (**tableau 4**). En effet, dans ces deux aires seulement on observe une augmentation significative du marquage chez les rats T alors que pour l'ensemble des rats P (Po et Pw) l'immunoréactivité de Fos n'est pas modifiée. Les variations des motifs d'expression de la protéine Fos au cours du temps semblent donc indiquer un rôle particulier de ces deux régions cérébrales dans les processus mnésiques olfactifs.

Tableau 4 - Evolution de l'expression de Fos entre le stade de l'acquisition et la réactivation dans la CA1 et le VLO (Roullet et al., 2005b)

Aire \ Groupe	CA1	VLO
T	↗	↗
Po	→	→
Pw	→	→

- ↗ : Augmentation significative
- : Pas de modification significative
- ↘ : Diminution significative

Chapitre VII

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

A - Rôle du CP dans la mémoire olfactive: approche utilisant la détection de la protéine Fos

Les résultats obtenus sur l'ensemble des expérimentations nous permettent de mettre en évidence que :

- d'une part l'expression de la protéine Fos dans le CP varie selon la vitesse d'apprentissage de l'animal,
- d'autre part nos données corroborent l'hypothèse d'une hétérogénéité fonctionnelle entre les subdivisions antérieure et postérieure de ce cortex.

Le CPa apparaît plus immunomarqué que le CPe, reflétant sans doute la distribution des afférences bulbaires, plus nombreuses au niveau antérieur. Nous montrons par ailleurs que le CPa serait plus précisément impliqué dans la réactivation de la tâche discriminative. Dans le CPe, l'aspect de nouveauté à l'odeur modifie le motif d'activation cellulaire, et induit une augmentation de l'expression de Fos. Enfin, dans ces deux subdivisions, l'immunoréactivité de Fos diminue lorsque la tâche de discrimination est bien consolidée. Il semblerait que le large réseau cellulaire activé en début d'apprentissage se focalise lorsque la tâche est bien maîtrisée.

B- Implication d'un réseau pirifo-hippocampo-néocortical dans les processus mnésiques olfactifs

Les résultats obtenus dans les régions hippocampique et néocorticale permettent de confirmer que ces structures sont également mises en jeu lors de l'apprentissage et de la mémorisation des odeurs. Précisément, nous montrons que ces régions cérébrales sont activées de façon différentielle au cours de la mise en place de l'apprentissage. Ainsi, nous montrons que la CA1 serait impliquée plutôt pendant la phase initiale de conditionnement tandis que le VLO/LO interviendrait plus tardivement lorsque l'apprentissage est mis en place. L'ensemble de nos travaux sont en accord avec l'hypothèse d'un dialogue hippocampo-néocortical, étape clef dans le traitement de l'information et de sa mémorisation (Sutherland et McNaughton, 2000). D'autre part, ils étayent les résultats sur la réorganisation du réseau neuronal au fil du temps (Bontempi et al., 1999; DeStrade et al., 1992) et indiquent que l'activation des structures hippocampo-néocorticales diffère au cours même de la mise en place de l'apprentissage.

Enfin, confortant l'hypothèse de Squire et Alvarez (1995), les circuits neuronaux engagés dans l'acquisition de l'apprentissage et ceux impliqués dans la réactivation apparaissent distincts. L'activation de la CA3 ainsi que du VLO/LO et du CPa participeraient à la réactivation de la tâche. Le CP, l'HC et le néocortex constituent donc un réseau engagé dans les processus d'apprentissage et de mémorisation des signaux olfactifs; le motif d'activation de ce réseau différerait au cours de

Conclusion générale et perspectives

l'acquisition de la tâche et lors de sa réactivation confirmant un modèle dynamique, dans l'espace et dans le temps, de la mémorisation des signaux olfactifs. Nos résultats tendent à confirmer que la représentation platonicienne de l'engramme sous la forme d'une empreinte unitaire peut-être révisée, étant constituée en fait d'une multitude de points formant probablement un réseau dans le cerveau. Néanmoins, le choix par Platon de la cire, matière malléable et « plastique », pour symboliser le cerveau était judicieux puisqu'il autorise des modifications successives de ce réseau telles que nous les observons.

En perspective

Quatre axes principaux émergent de nos résultats. D'une part, des expériences de lésion de certaines connexions, en particulier des afférences néocorticales et hippocampiques au CP, devraient permettre de préciser le fonctionnement du réseau pirifo-hippocampo-néocortical décrit précédemment dans les phénomènes mnésiques olfactifs. La relation CPa/VLO pourrait notamment être examinée plus en détail dans les phénomènes de réactivation et de rappel mnésique.

D'autre part, le rôle de neurotransmetteurs, tels l'acétylcholine ou la dopamine, dans les processus de mémorisation et d'attention est bien établi. On sait par ailleurs que les innervations cholinergique et monoaminergique diffèrent entre CPa et CPp et sous-tendraient, au moins en partie, les différences fonctionnelles observées entre les deux subdivisions. Il serait donc intéressant de mener une étude combinant les approches pharmacologique et comportementale pour mieux comprendre l'influence de certains neurotransmetteurs dans la mémoire olfactive. Les techniques d'imagerie, telle la tomographie par émission de positon, offrent aujourd'hui la possibilité d'introduire et de suivre l'évolution d'une molécule radio-marquée (comme le transporteur de la Dopa) au niveau cérébral chez le Rongeur anesthésié. Cette technique permettrait de comparer les variations de l'activité neuromodulatrice chez un même animal, avant, pendant et après un apprentissage discriminatif olfactif.

Il est aussi probable que les motifs d'activation de l'ARNm *c-fos* et de la protéine associée soient différents. Nous pourrions envisager de réaliser des doubles marquages « protéine / ARNm » du proto-oncogène *c-fos* sur des coupes histologiques issues d'un même animal pour définir des cartographies de l'activité cérébrale plus complètes, tenant compte des événements pré- et post-transcriptionnels. De plus, il apparaît indispensable d'examiner l'expression d'autres types de messagers nucléaires, telle la

Conclusion générale et perspectives

protéine Arc, impliquée plus tardivement dans la cascade cellulaire et agissant au niveau de la synapse dans le remaniement architectural du neurone.

Enfin, il semblerait judicieux de tester d'autres types d'apprentissage discriminatif olfactif (acquisition plus rapide, autre type de renforcement...) pour tenter de dégager, si possible, un schéma neuroanatomofonctionnel commun à tout processus de mémorisation olfactive.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Abraham WC, Dragunow M et Tate WP. (1991). The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol Neurobiol* **5**, 297-314.
- Alescio-Lautier B, Rao H, Paban V, Devigne C et Soumireu-Mourat B. (1995). Inhibition of the vasopressin-enhancing effect on memory retrieval and relearning by a vasopressin V1 receptor antagonist in mice. *European Journal of Pharmacology* **294**, 763-770.
- Anokhin KV et Rose SP. (1991). Learning-induced Increase of Immediate Early Gene Messenger RNA in the Chick Forebrain. *Eur J Neurosci* **3**, 162-167.
- Anokhin, KV, Riabinin AE et Sudakov KV. (2000). [The expression of the c-fos gene in the brain of mice in the dynamic acquisition of defensive behavioral habits]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova* **50**, 88-94.
- Backman, C. et Morales, M. (2002). Acute methamphetamine administration upregulates NGFI-B mRNA expression in the striatum: co-localization with c-Fos immunoreactivity. *Synapse* **44**, 158-165.
- Bartel DP, Sheng M, Lau LF et Greenberg ME. (1989). Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev* **3**, 304-313.
- Barkai E et Hasselmo MH. (1997). Acetylcholine and associative memory in the piriform cortex. *Mol Neurobiol* **15**, 17-29.
- Barkai E et Saar D. (2001). Cellular correlates of olfactory learning in the rat piriform cortex. *Rev Neurosci* **12**, 111-120.
- Berger B, Gaspar P et Verney C. (1991). Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *Trends in Neurosci* **14** (1), 21-27.
- Bertaina V et Destrade C. (1995). Differential time courses of c-fos mRNA expression in hippocampal subfields following acquisition and recall testing in mice. *Brain Res Cogn Brain Res* **2**, 269-275.
- Bertaina-Anglade V, Tramu G et Destrade C. (2000). Differential learning-stage dependent patterns of c-Fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *Eur J Neurosci* **12**, 3803-3812.
- Bliss TV et Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**, 331-356.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C et Jaffard R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* **400**, 671-675.
- Bouret S et Sara SJ. (2002). Locus coeruleus activation modulates firing rate and temporal organization of odour-induced single-cell responses in rat piriform cortex. *Eur J Neurosci* **16**, 2371-2382.
- Brennan PA, Hancock D et Keverne EB. (1992). The expression of the immediate-early genes c-fos, egr-1 and c-jun in the accessory olfactory bulb during the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience* **49**, 277-284.
- Brennan PA et Keverne EB. (1997). Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol* **51**, 457-481.

Bibliographie

- Broad KD, Hinton MR, Keverne EB et Kendrick KM. (2002). Involvement of the medial prefrontal cortex in mediating behavioural responses to odour cues rather than olfactory recognition memory. *Neuroscience* **114**, 715-729.
- Buck L et Axel R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-187.
- Buonviso N, Chaput MA et Scott JW. (1991a). Mitral cell-to-glomerulus connectivity: an HRP study of the orientation of mitral cell apical dendrites. *J Comp Neurol* **307**, 57-64.
- Buonviso N, Revial MF et Jourdan F. (1991b). The Projections of Mitral Cells from Small Local Regions of the Olfactory Bulb: An Anterograde Tracing Study Using PHA-L (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin). *Eur J Neurosci* **3**, 493-500.
- Cahill L, Pham CA et Setlow B. (2000). Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade. *Neurobiol Learn Mem* **74**, 259-266.
- Cain DP et Bindra D. (1972). Responses of amygdala single units to odors in the rat. *Exp Neurol* **35**, 98-110.
- Cammarota M, Bevilaqua LR M., Medina JH et Izquierdo I. (2004). Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* **11**, 572-578.
- Campeau S, Hayward MD, Hope BT, Rosen JB, Nestler EJ et Davis M. (1991). Induction of the c-fos proto-oncogene in rat amygdala during unconditioned and conditioned fear. *Brain Res* **565**, 349-352.
- Carelli RM. (2002). Nucleus accumbens cell firing during goal-directed behaviors for cocaine vs. "natural" reinforcement. *Physiol Behav* **76**, 379-387.
- Carrive P, Kehoe EJ, Macrae M et Paxinos G. (1997). Fos-like immunoreactivity in locus coeruleus after classical conditioning of the rabbit's nictitating membrane response. *Neurosci Lett* **223**, 33-36.
- Cattarelli M. (1982). The role of the medial olfactory pathways in olfaction: behavioral and electrophysiological data. *Behav Brain Res* **6**, 339-364.
- Cattarelli M, Astic L et Kauer JS. (1988). Metabolic mapping of 2-deoxyglucose uptake in the rat piriform cortex using computerized image processing. *Brain Res* **442**, 180-184.
- Cattarelli M, Pager J et Chanel J. (1977). Modulation des réponses multiunitaires du bulbe olfactif et de l'activité respiratoire en fonction des odeurs chez le rat non-contraint. *J Physiol (Paris)* **73**, 963-984.
- Cetin T, Freudenberg F, Fuchtemeier M et Koch M. (2004). Dopamine in the orbitofrontal cortex regulates operant responding under a progressive ratio of reinforcement in rats. *Neurosci Lett* **370** (2-3):114-7.
- Chabaud P, Ravel N, Wilson DA et Gervais R. (1999). Functional coupling in rat central olfactory pathways: a coherence analysis. *Neurosci Lett* **276**, 17-20.
- Chaillan FA, Roman FS et Soumireu-Mourat B. (1996). Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus and piriform cortex by physiologically meaningful olfactory cues in an olfactory association task. *J Physiol Paris* **90**, 343-347.

Bibliographie

- Chaillan FA, Truchet B, Roman FS et Soumireu-Mourat B. (1999). Early polysynaptic potentiation recorded in the dentate gyrus during an associative learning task. *Neuroscience* **94**, 443-451.
- Chaudhuri A, Zangenehpour S, Rahbar-Dehgan F et Ye F. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* **60**, 403-410.
- Curran T et Morgan JJ. (1985). Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science* **229**, 1265-1268.
- Curran T et Teich NM. (1982). Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. *Virology* **116**, 221-235.
- Curran T et Verma IM. (1984). FBR murine osteosarcoma virus. I. Molecular analysis and characterization of a 75,000-Da gag-fos fusion product. *Virology* **135**, 218-228.
- Datiche F. (1995). Projections afférentes et efférentes du cortex piriforme chez le Rat: organisation topographique et implication dans le traitement des informations olfactives. *Thèse de troisième cycle - Université Claude Bernard Lyon I*.
- Datiche F, Luppi PH et Cattarelli M. (1995). Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: a cholera toxin B subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study. *Brain Res* **671**, 27-37.
- Datiche F et Cattarelli M. (1996a). Catecholamine innervation of the piriform cortex: a tracing and immunohistochemical study in the rat. *Brain Res* **710**, 69-78.
- Datiche F et Cattarelli M. (1996b). Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin. *Brain Res Bull* **41**, 391-398.
- Datiche F, Litaudon P et Cattarelli M. (1996). Intrinsic association fiber system of the piriform cortex: a quantitative study based on a cholera toxin B subunit tracing in the rat. *J Comp Neurol* **376**, 265-277.
- Datiche F, Rouillet F et Cattarelli M. (2001). Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: an immunohistochemical study in the rat. *Brain Res Bull* **55**, 95-99.
- Destrade C, Messier C, Bontempi B, Sif J et Jaffard, R. (1992). Investigations into time-dependent metabolic changes during memory processing in the mouse brain using (¹⁴C)-deoxyglucose and (¹⁴C)-glucose. In *Gonzales Lima, F(ed), Advances in Metabolic Mappings Techniques for Brain Imaging of Behavior and Learning Functions Kluwer Academic Publishers, the Netherlands*, 389-407.
- Dudaï D. (2002). "Memory from A to Z" - Keywords, concepts and beyond. *Edition Oxford*.
- Duvarci S et Nader K. (2004). Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* **24**, 9269-9275.
- Da Costa AP, Broad KD et Kendrick KM. (1997). Olfactory memory and maternal behaviour-induced changes in c-fos and zif/268 mRNA expression in the sheep brain. *Brain Res Mol Brain Res* **46**, 63-76.
- De Rosa E et Hasselmo ME. (2000). Muscarinic cholinergic neuromodulation reduces proactive interference between stored odor memories during associative learning in rats. *Behav Neurosci* **114**, 32-41.

Bibliographie

- Deshmukh SS et Bhalla US. (2003). Representation of odor habituation and timing in the hippocampus. *J Neurosci* **23**, 1903-1915.
- Doty RL, Bagla R et Kim N. (1999). Physostigmine enhances performance on an odor mixture discrimination test. *Physiol Behav* **65**, 801-804.
- Douglas RM, Dragunow M et Robertson HA. (1988). High-frequency discharge of dentate granule cells, but not long-term potentiation, induces c-fos protein. *Brain Res* **464**, 259-262.
- Dragunow M et Faull R. (1989). The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* **29**, 261-265.
- Dragunow M et Robertson HA. (1987). Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* **329**, 441-442.
- Dragunow M et Robertson HA. (1988). Brain injury induces c-fos protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain. *Brain Res* **455**, 295-299.
- Eichenbaum H. (1998). Using olfaction to study memory. *Ann N Y Acad Sci* **855**, 657-669.
- Eichenbaum H, Clegg RA et Feeley A. (1983). Reexamination of functional subdivisions of the rodent prefrontal cortex. *Exp Neurol* **79**, 434-451.
- Ekstrand JJ, Domroese ME, Feig SL, Illig KR et Haberly LB. (2001). Immunocytochemical analysis of basket cells in rat piriform cortex. *J Comp Neurol* **434**, 308-328.
- Engelman M, Wotjak CT et Landgraf R. (1995). Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* **58**, 315-321.
- Ferhat L, Khrestchatsky M, Roisin MP et Barbin G. (1993). Basic fibroblast growth factor-induced increase in zif/268 and c-fos mRNA levels is Ca²⁺ dependent in primary cultures of hippocampal neurons. *J Neurochem* **61**, 1105-1112.
- Ferry B et Di Scala G. (2000). Basolateral amygdala NMDA receptors are selectively involved in the acquisition of taste-potentiated odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* **114**, 1005-1010.
- Ferry B, Oberling P, Jarrard LE et Di Scala G. (1996). Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behav Neurosci* **110**, 443-450.
- Ferry B, Sandner G et Di Scala G. (1995). Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiol Learn Mem* **64**, 169-180.
- Ferry B, Wirth S et Di Scala G. (1999). Functional interaction between entorhinal cortex and basolateral amygdala during trace conditioning of odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* **113**, 118-125.
- Fiorillo CD, Tobler PN et Schultz W. (2003). Discrete coding of reward probability and uncertainty by dopamine neurons. *Science* **299**, 1898-1902.
- Fortin NJ, Agster KL et Eichenbaum H. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nature Neurosci* **5**, 458-462.
- Fortin NJ, Agster KL et Eichenbaum H. (2004). One-trial odor-reward association: a form of event memory not dependent on hippocampal function. *Behav Neurosci* **18**, 526-539.
- Frankland PW et Bontempi B. (2005). The organisation of recent and remote memories. *Nature Rev. Neurosci.* **6**, 119-130.

Bibliographie

- Frassoni C, Radici C, Spreafico R et de Curtis M. (1998). Calcium-binding protein immunoreactivity in the piriform cortex of the guinea-pig: selective staining of subsets of non-GABAergic neurons by calretinin. *Neuroscience* **83**, 229-237.
- Freeman FM et Rose SP. (1995). MK-801 blockade of Fos and Jun expression following passive avoidance training in the chick. *Eur J Neurosci* **7**, 563-569.
- Funk D et Amir S. (2000). Enhanced fos expression within the primary olfactory and limbic pathways induced by an aversive conditioned odor stimulus. *Neuroscience* **98**, 403-406.
- Gellman RL et Aghajanian GK. (1993). Pyramidal cells in piriform cortex receive a convergence of inputs from monoamine activated GABAergic interneurons. *Brain Res* **600**, 63-73.
- Gervais R, Holley A et Keverne B. (1988). The importance of central noradrenergic influences on the olfactory bulb in the processing of learned olfactory cues. *Chem senses* **13**, 3-12.
- Giachetti I et MacLeod P. (1975). Cortical neuron responses to odour in the rat. *Dans: Olfaction and taste V*, 303-307.
- Giachetti I et MacLeod P. (1977). Olfactory input to the thalamus: evidence for a ventroposteromedial projection. *Brain Res* **125**, 166-169.
- Grassi-Zucconi G, Menegazzi M, De Prati AC, Bassetti A, Montagnese P, Mandile P, Cosi C et Bentivoglio M. (1993). c-fos mRNA is spontaneously induced in the rat brain during the activity period of the circadian cycle. *Eur J Neurosci* **5**, 1071-1078.
- Greenberg ME, Greene LA et Ziff EB. (1985). Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem* **260**, 14101-14110.
- Greenberg ME, Hermanowski AL et Ziff EB. (1986a). Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. *Mol Cell Biol* **6**, 1050-1057.
- Greenberg ME et Ziff EB. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* **311**, 433-438.
- Greenberg ME, Ziff EB et Greene LA. (1986b). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* **234**, 80-83.
- Grimm R, Schicknick H, Riede I, Gundelfinger ED, Herdegen T, Zuschratter W et Tischmeyer W. (1997). Suppression of c-fos induction in rat brain impairs retention of a brightness discrimination reaction. *Learn Mem* **3**, 402-413.
- Groenewegen HJ. (1988). Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience* **24**, 379-431.
- Guzowski JF. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* **12**, 86-104.
- Haberly LB. (1969). Single unit responses to odor in the prepiriform cortex of the rat. *Brain Res* **12**, 481-484.
- Haberly LB. (1985). Neuronal circuitry in olfactory cortex: anatomy and functional implications. *Chem Senses* **10**, 219-238.

Bibliographie

- Haberly LB. (1998). Olfactory cortex. In: *The Synaptic Organization of the Brain* edited by and G. M. Shepherd New York: Oxford Univ. Press.
- Haberly LB. (2001). Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem Senses* **26**, 551-576.
- Haberly LB et Bower JM. (1984). Analysis of association fiber system in piriform cortex with intracellular recording and staining techniques. *J Neurophysiol* **51**, 90-112.
- Haberly LB et Bower JM. (1989). Olfactory cortex: model circuit for study of associative memory? *Trends Neurosci* **12**, 258-264.
- Haberly LB et Price JL. (1978a). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I- Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J Comp Neurol* **178**, 711-740.
- Haberly LB et Price JL. (1978b). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. II- Systems originating in the olfactory peduncle. *J Comp Neurol* **181**, 781-807.
- Hasselmo, ME. (1995). Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behav Brain Res* **67**(1), 1-27
- Hasselmo ME et Bower JM. (1990). Afferent and association fiber differences in short-term potentiation in piriform (olfactory) cortex of the rat. *J Neurophysiol* **64**, 179-190.
- Hasselmo ME et Bower JM. (1992). Cholinergic suppression specific to intrinsic not afferent fiber synapses in rat piriform (olfactory) cortex. *J Neurophysiol* **67**, 1222-1229.
- Hasselmo ME et Bower JM. (1993). Acetylcholine and memory. *Trends Neurosci* **16**, 218-222.
- Hasselmo ME, Linster C, Patil M, Ma D et Cekic M. (1997). Noradrenergic suppression of synaptic transmission may influence cortical signal-to-noise ratio. *J Neurophysiol* **77**, 3326-3339.
- Hasselmo ME, Wilson MA, Anderson BP et Bower JM. (1990). Associative memory function in piriform (olfactory) cortex: computational modeling and neuropharmacology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **55**, 599-610.
- Hebb DO. (1947). *The organization of behaviour*. Edited by Wiley. New York.
- Heimer L. (1968). Synaptic distribution of centripetal and centrifugal nerve fibres in the olfactory system of the rat. An experimental anatomical study. *J Anat* **103**, 413-432.
- Herdegen T et Leah JD. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* **28**, 370-490.
- Herrera DG et Robertson HA. (1989). Unilateral induction of c-fos protein in cortex following cortical devascularization. *Brain Res* **503**, 205-213.
- Herrera DG et Robertson HA. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* **50**, 83-107.
- Hess US, Gall CM, Granger R et Lynch G. (1997). Differential patterns of c-fos mRNA expression in amygdala during successive stages of odor discrimination learning. *Learn Mem* **4**, 262-283.
- Hess US, Lynch G et Gall CM. (1995a). Changes in c-fos mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning: differential involvement of hippocampal subfields CA1 and CA3. *J Neurosci* **15**, 4786-4795.

Bibliographie

- Hess US, Lynch G et Gall CM. (1995b). Regional patterns of c-fos mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *J Neurosci* **15**, 7796-7809.
- Holley A et MacLeod P. (1977). Transduction et codage de l'information olfactive. *J Physiol (Paris)* **73**, 725-848.
- Holley A et Sicard G. (1994). Les récepteurs olfactifs et le codage neuronal de l'odeur. *Med/Sci* **10**, 1091-1098.
- Hölscher C, Jacob W et Mallot HA. (2003). Reward modulates neuronal activity in the hippocampus of the rat. *Behav Brain Res* **142**, 181-191.
- Haupt TA, Philopina JM, Wessel TC, Joh TH et Smith GP. (1994). Increased c-fos expression in nucleus of the solitary tract correlated with conditioned taste aversion to sucrose in rats. *Neurosci Lett* **172**, 1-5.
- Hudon C, Allen K, Potvin O, Dore FY et Goulet S. (2002). Selective impairments in rats on an odor-guided continuous delayed nonmatching-to-sample (cDNMS) task after fornix transection. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **26**, 1291-1301.
- Hudon C, Dore FY et Goulet S. (2003). Selective impairment of fornix-transected rats on a new nonspatial, odor-guided task. *Hippocampus* **13**, 48-52.
- Hudson R et Distel H. (1987). Regional autonomy in the peripheral processing of odor signals in newborn rabbits. *Brain Res* **421**, 85-94.
- Hunt SP, Pini A et Evan G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* **328**, 632-634.
- Hunter AJ et Murray TK. (1989). Cholinergic mechanisms in a simple test of olfactory learning in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **99**, 270-275.
- Illig KR et Haberly LB. (2003). Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. *J Comp Neurol* **457**, 361-373.
- Irwin KB, Craig AD, Bracha V et Bloedel JR. (1992). Distribution of c-fos expression in brainstem neurons associated with conditioning and pseudo-conditioning of the rabbit nictitating membrane reflex. *Neurosci Lett* **148**, 71-75.
- Johnson BA, Woo CC, Duong H, Nguyen V et Leon M. (1995). A learned odor evokes an enhanced Fos-like glomerular response in the olfactory bulb of young rats. *Brain Res* **699**, 192-200.
- Johnson DM, Illig KR, Behan M et Haberly LB. (2000). New features of connectivity in piriform cortex visualized by intracellular injection of pyramidal cells suggest that "primary" olfactory cortex functions like "association" cortex in other sensory systems. *J Neurosci* **20**, 6974-6982.
- Jorgensen MB, Deckert J, Wright DC et Gehlert DR. (1989). Delayed c-fos proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: an in situ hybridization study. *Brain Res* **484**, 393-398.
- Jung MW, Larson J et Lynch G. (1990). Long-term potentiation of monosynaptic EPSPs in rat piriform cortex in vitro. *Synapse* **6**, 279-283.
- Kaczmarek L. (1993). Molecular biology of vertebrate learning: is c-fos a new beginning? *J Neurosci Res* **34**, 377-381.

Bibliographie

- Kaczmarek L. (2000). Gene expression in learning processes. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* **60**, 419-424.
- Kaczmarek, L. (2002). Chapter VIII - c-Fos in learning: beyond the mapping of neuronal activity. *Handbook of chemical neuroanatomy Vol 19: Immediate early genes and inducible transcription factors in mapping of the central nervous system function and dysfunction* L Kaczmarek and HJ Robertson editors.
- Kaczmarek L, Siedlecki JA et Danysz W. (1988). Proto-oncogene c-fos induction in rat hippocampus. *Brain Res* **427**, 183-186.
- Kanter ED et Haberly LB. (1990). NMDA-dependent induction of long-term potentiation in afferent and association fiber systems of piriform cortex in vitro. *Brain Res* **525**, 175-179.
- Kanter ED et Haberly LB. (1993). Associative long-term potentiation in piriform cortex slices requires GABAA blockade. *J Neurosci* **13**, 2477-2482.
- Kaut KP et Bunsey MD. (2001). The effects of lesions to the rat hippocampus or rhinal cortex on olfactory and spatial memory: retrograde and anterograde findings. *Cogn Affect Behav Neurosci* **1**, 270-286.
- Kaut KP, Bunsey MD et Riccio DC. (2003). Olfactory learning and memory impairments following lesions to the hippocampus and perirhinal-entorhinal cortex. *Behav Neurosci* **117**, 304-319.
- Kilpatrick L et Cahill L. (2003). Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* **117**, 184-188.
- Knafo S, Ariav G, Barkai E et Libersat F. (2004a). Olfactory learning-induced increase in spine density along the apical dendrites of CA1 hippocampal neurons. *Hippocampus* **14**, 819-825.
- Knafo S, Barkai E, Herrero A, Libersat F, Sandi C et Venero C. (2005). Olfactory learning-related NCAM expression is state, time and location specific and is correlated with individual learning capabilities. *Hippocampus* **15(3)**, 316-25
- Knafo S, Grossman Y, Barkai E et Benshalom G. (2001). Olfactory learning is associated with increased spine density along apical dendrites of pyramidal neurons in the rat piriform cortex. *Eur J Neurosci* **13**, 633-638.
- Lamprecht R et Dudai Y. (1996). Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learn Mem* **3**, 31-41.
- Lavenex P et Schenk F. (1996). Integration of olfactory information in a spatial representation enabling accurate arm choice in the radial arm maze. *Learn Mem* **2**, 299-319.
- Li H, Matsumoto K et Watanabe H. (1999). Different effects of unilateral and bilateral hippocampal lesions in rats on the performance of radial maze and odor-paired associate tasks. *Brain Res Bull* **48**, 113-119.
- Linster C, Garcia PA, Hasselmo ME et Baxter MG. (2001). Selective loss of cholinergic neurons projecting to the olfactory system increases perceptual generalization between similar, but not dissimilar, odorants. *Behav Neurosci* **115**, 826-833.
- Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M et Buonviso N. (2003). Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *Eur J Neurosci* **17**, 2457-2461.
- Litaudon P et Cattarelli M. (1995). Piriform cortex late activity revealed functional spatial heterogeneity. *Neuroreport* **6**, 1377-1380.

Bibliographie

- Litaudon P et Cattarelli M. (1996). Olfactory bulb repetitive stimulations reveal non-homogeneous distribution of the inhibitory processes in the rat piriform cortex. *Eur J Neurosci* **8**, 21-29.
- Litaudon P, Datiche F et Cattarelli M. (1997a). Optical recording of the rat piriform cortex activity. *Prog Neurobiol* **52**, 485-510.
- Litaudon P, Mouly AM, Sullivan R, Gervais R et Cattarelli M. (1997b). Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. *Eur J Neurosci* **9**, 1593-1602.
- Löscher W, Lehmann H et Ebert U. (1998). Differences in the distribution of GABA- and GAD-immunoreactive neurons in the anterior and posterior piriform cortex of rats. *Brain Research* **800**, 21-31.
- Loughlin SE et Fallon JH. (1984). Substantia nigra and ventral tegmental area projections to cortex: topography and collateralization. *Neuroscience* **11**, 425-435.
- Lu XC et Slotnick BM. (1998). Olfaction in rats with extensive lesions of the olfactory bulbs: implications for odor coding. *Neuroscience* **84**, 849-866.
- Luiten PG, Gaykema RP, Traber J et Spencer DG, Jr. (1987). Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Res* **413**, 229-250.
- Luskin MB et Price JL. (1983a). The laminar distribution of intracortical fibers originating in the olfactory cortex of the rat. *J Comp Neurol* **216**, 292-302.
- Luskin MB et Price JL. (1983b). The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. *J Comp Neurol* **216**, 264-291.
- Lynch G et Granger R. (1989). Stimulation and analysis of a simple cortical network. *Psychol Learn Motiv* **23**, 205-241.
- Malnic B, Malnic B, Hirono J, Sato T et Buck L. (1999). Combinatorial receptor codes for odors." *Cell* **96**(5): 713-723.
- Marchetti E, Dumuis A, Bockaert J, Soumireu-Mourat B et Roman FS. (2000). Differential modulation of the 5-HT(4) receptor agonists and antagonist on rat learning and memory. *Neuropharmacology* **39**, 2017-2027.
- Martinez MC, Blanco J, Bullon MM et Agudo FJ. (1987). Structure of the piriform cortex of the adult rat. A Golgi study. *J Hirnforsch* **28**, 341-348.
- McCollum J, Larson J, Otto T, Schottler F, Granger R et Lynch G. (1991). Short latency single unit processing in olfactory cortex. *J Cogn Neurosci* **3**, 293-299.
- McGill TE (1965). Readings in animal behavior. *Editions Holt, Rinehart et Winston*, Williams College.
- McDonald AJ. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* **55**, 257-332.
- McGaugh JL. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci* **25**, 456.
- Montag-Sallaz M et Buonviso N. (2002). Altered odor-induced expression of c-fos and arg 3.1 immediate early genes in the olfactory system after familiarization with an odor. *J Neurobiol* **52**, 61-72.

Bibliographie

- Montag-Sallaz M, Welzl H, Kuhl D, Montag D et Schachner M. (1999). Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. *J Neurobiol* **38**, 234-246.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL et Curran T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* **237**, 192-197.
- Morgan JI et Curran T. (1986). Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* **322**, 552-555.
- Morgan JI et Curran T. (1990). Inducible proto-oncogenes of the nervous system: their contribution to transcription factors and neuroplasticity. *Prog Brain Res* **86**, 287-294.
- Morgan JI et Curran T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* **14**, 421-451.
- Mori K et Yoshihara Y. (1995). Molecular recognition and olfactory processing in the mammalian olfactory system. *Prog Neurobiol* **45**, 585-619.
- Morrow BA, Elsworth JD, Inglis FM et Roth RH. (1999). An antisense oligonucleotide reverses the footshock-induced expression of fos in the rat medial prefrontal cortex and the subsequent expression of conditioned fear-induced immobility. *J Neurosci* **19**, 5666-5673.
- Mouly AM, Fort A, Ben-Boutayab N et Gervais R. (2001). Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. *Neuroscience* **102**, 11-21.
- Mouly AM et Gervais R. (2002). Polysynaptic potentiation at different levels of rat olfactory pathways following learning. *Learn Mem* **9**, 66-75.
- Mouly AM, Gervais R et Holley A. (1990). Evidence for the Involvement of Rat Olfactory Bulb in Processes Supporting Long-Term Olfactory Memory. *Eur J Neurosci* **2**, 978-984.
- Mouly AM, Kindermann U, Gervais R et Holley A. (1993). Involvement of the olfactory bulb in consolidation processes associated with long-term memory in rats. *Behav Neurosci* **107**, 451-457.
- Müller R, Bravo R, Burckhardt J et Curran T. (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* **312**, 716-720.
- Nacher J, Alonso-Llosa G, Rosell D et McEwen B. (2002). PSA-NCAM expression in the piriform cortex of the adult rat. Modulation by NMDA receptor antagonist administration. *Brain Res* **927**, 111-121.
- Nader K. (2003). Memory traces unbound. *Trends Neurosci* **26**, 65-72.
- Nemitz JW et Goldberg SJ. (1983). Neuronal responses of rat pyriform cortex to odor stimulation: an extracellular and intracellular study. *J Neurophysiol* **49**, 188-203.
- Nikolaev E, Werka T et Kaczmarek L. (1992). C-fos protooncogene expression in rat brain after long-term training of two-way active avoidance reaction. *Behav Brain Res* **48**, 91-94.
- Ono T, Nishijo H et Uwano T. (1995). Amygdala role in conditioned associative learning. *Prog Neurobiol* **46**, 401-422.
- Otto T, Cousins G et Herzog C. (2000). Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. *Behav Brain Res* **110**, 119-128.

Bibliographie

- Otto T et Eichenbaum H. (1992a). Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task. *Behav Neurosci* **106**, 762-775.
- Otto T et Eichenbaum H. (1992b). Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: evidence for hippocampal processing in recognition memory. *Hippocampus* **2**, 323-334.
- Patil MM, Linster C, Lubenov E et Hasselmo ME. (1998). Cholinergic agonist carbachol enables associative long-term potentiation in piriform cortex slices. *J Neurophysiol* **80**, 2467-2474.
- Pavlov, IP. (1927). Conditioned reflexes. Oxford University press, Oxford, UK. Cité dans Cammarota et al. (2004).
- Paxinos G et Watson C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney.
- Pearce, JM et Hall, G. (1980). A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychol Rev* **87**, 532-552.
- Platenik J, Kuramoto N et Yoneda Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci* **67**, 335-364.
- Pratt, WE et Mizumori, SJ. (2001). Neurons in rat medial prefrontal cortex show anticipatory rate changes to predictable differential rewards in a spatial memory task. *Behav Brain Res* **123**, 165-183.
- Price JL. (1973). An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *J Comp Neurol* **150**, 87-108.
- Price JL. (1985). Beyond the primary olfactory cortex: olfactory-related areas in the neocortex, thalamus and hypothalamus. *Chemical Senses* **10**, 239-258.
- Ramus, SJ et Eichenbaum, H. (2000). Neural correlates of olfactory recognition memory in the rat orbitofrontal cortex. *J Neurosci* **20**, 8199-8208.
- Ravel N, Elaagouby A et Gervais R. (1994). Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behav Neurosci* **108**, 317-324.
- Ravel N, Vigouroux M, Elaagouby A et Gervais R. (1992). Scopolamine impairs delayed matching in an olfactory task in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **109**, 439-443.
- Ray JP et Price JL. (1992). The organisation of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal topography. *J Comp Neurol* **323**, 167-197.
- Ressler KJ, Sullivan SL et Buck LB. (1994a). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* **79**, 1245-1255.
- Ressler KJ, Sullivan SL et Buck LB. (1994b). A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system. *Curr Opin Neurobiol* **4**, 588-596.
- Robertson HA. (1992). Immediate-early genes, neuronal plasticity, and memory. *Biochem Cell Biol* **70**, 729-737.
- Rolls ET. (2001). The rules of formation of the olfactory representations found in the orbitofrontal cortex olfactory areas in primates. *Chem Senses* **26**, 595-604.

Bibliographie

- Rolls ET, Critchley HD, Mason R et Wakeman EA. (1996). Orbitofrontal cortex neurons: role in olfactory and visual association learning. *J Neurophysiol* **75**, 1970-1981.
- Roman F, Staubli U et Lynch G. (1987). Evidence for synaptic potentiation in a cortical network during learning. *Brain Res* **418**, 221-226.
- Roman FS, Chaillan FA et Soumireu-Mourat B. (1993a). Long-term potentiation in rat piriform cortex following discrimination learning. *Brain Res* **601**, 265-272.
- Roman FS, Simonetto I et Soumireu-Mourat B. (1993b). Learning and memory of odor-reward association: selective impairment following horizontal diagonal band lesions. *Behav Neurosci* **107**, 72-81.
- Roman, FS, Alescio-Lautier, B et Soumireu-Mourat, B. (1996). Age-related learning and memory deficits in odor-reward association in rats. *Neurobiol Aging* **17**, 31-40.
- Roman FS, Truchet B, Chaillan FA, Marchetti E et Soumireu-Mourat B. (2004). Olfactory associative discrimination: a model for studying modifications of synaptic efficacy in neuronal networks supporting long-term memory. *Rev Neurosci* **15**, 1-17.
- Roulet, F., Datiche, F., Liénard, F. et Cattarelli, M. (2004). Cue valence representation studied by Fos immunocytochemistry after acquisition of a discrimination learning task. *Brain Res Bull* **64**, 31-38.
- Roulet, F., Datiche, F., Liénard, F. et Cattarelli, M. (2005a). Learning-stage dependent Fos expression in the rat brain during acquisition of an olfactory discrimination task. *Behav Brain Res* **157(1)**, 127-137.
- Roulet, F., Liénard, F., Datiche, F. et Cattarelli, M. (2005b). Fos protein expression in olfactory-related brain areas after learning and after reactivation of a slowly-acquired olfactory discrimination task in the Rat. *Learn Mem* **12**, 307-317.
- Rosin JF, Datiche F et Cattarelli M. (1999). Modulation of the piriform cortex activity by the basal forebrain: an optical recording study in the rat. *Brain Res* **820**, 105-111.
- Saar D et Barkai E. (2003). Long-term modifications in intrinsic neuronal properties and rule learning in rats. *Eur J Neurosci* **17**, 2727-2734.
- Saar D, Grossman Y et Barkai E. (1998). Reduced after-hyperpolarization in rat piriform cortex pyramidal neurons is associated with increased learning capability during operant conditioning. *Eur J Neurosci* **10**, 1518-1523.
- Saar D, Grossman Y et Barkai E. (1999). Reduced synaptic facilitation between pyramidal neurons in the piriform cortex after odor learning. *J Neurosci* **19**, 8616-8622.
- Saar D, Grossman Y et Barkai E. (2001). Long-lasting cholinergic modulation underlies rule learning in rats. *J Neurosci* **21**, 1385-1392.
- Sagar SM, Sharp FR et Curran T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* **240**, 1328-1331.
- Sakai N et Yamamoto T. (1997). Conditioned taste aversion and c-fos expression in the rat brainstem after administration of various USs. *Neuroreport* **8**, 2215-2220.
- Sara SJ. (1985). Noradrenergic modulation of selective attention: its role in memory retrieval. *Ann N Y Acad Sci* **444**, 178-193.

Bibliographie

- Sara SJ. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* **7**, 73-84.
- Schettino LF et Otto T. (2001). Patterns of Fos expression in the amygdala and ventral perirhinal cortex induced by training in an olfactory fear conditioning paradigm. *Behav Neurosci* **115**, 1257-1272.
- Schoenbaum, G, Chiba, AA et Gallagher, M. (1998). Orbitofrontal cortex and basolateral amygdala encode expected outcomes during learning. *Nat Neurosci* **1**, 155-159.
- Schoenbaum G, Chiba AA et Gallagher M. (1999). Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. *J Neurosci* **19**, 1876-1884.
- Schoenbaum G et Eichenbaum H. (1995). Information coding in the rodent prefrontal cortex. I. Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex. *J Neurophysiol* **74**, 733-750.
- Schoenbaum G, Setlow B, Nugent SL, Saddoris MP et Gallagher M. (2003a). Lesions of orbitofrontal cortex and basolateral amygdala complex disrupt acquisition of odor-guided discriminations and reversals. *Learn Mem* **10**, 129-140.
- Schoenbaum, G., Setlow, B. et Ramus, S. J. (2003b). A systems approach to orbitofrontal cortex function: recordings in rat orbitofrontal cortex reveal interactions with different learning systems. *Behav Brain Res* **146**, 19-29.
- Schultz W, Tremblay L et Hollermann JR. (2000). Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia. *Cereb Cortex* **10**, 272-283.
- Schwabe K, Ebert U et Loscher W. (2000). Bilateral lesions of the central but not anterior or posterior parts of the piriform cortex retard amygdala kindling in rats. *Neuroscience* **101**, 513-521.
- Schwartz WJ, Takeuchi J, Shannon W, Davis EM et Aronin N. (1994). Temporal regulation of light-induced Fos and Fos-like protein expression in the ventrolateral subdivision of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **58**, 573-583.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH et Bunney BS. (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* **290**, 213-242.
- Setlow B, Schoenbaum G et Gallagher M. (2003). Neural Encoding in Ventral Striatum during Olfactory Discrimination Learning. *Neuron* **38**, 625-636.
- Sevelinges Y, Gervais R, Messaoudi B, Granjon L et Mouly A. (2004). Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learn Mem* **Nov 10**.
- Sharp FR, Gonzalez MF, Sharp JW et Sagar SM. (1989). c-fos expression and (14C) 2-deoxyglucose uptake in the caudal cerebellum of the rat during motor/sensory cortex stimulation. *J Comp Neurol* **284**, 621-636.
- Sheng M et Greenberg ME. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**, 477-485.
- Squire LR et Alvarez P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 169-177.
- Slotnick B. (2001). Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn Sci* **5**, 216-222.

Bibliographie

- Slotnick BM. (1985). Olfactory discrimination in rats with anterior amygdala lesions. *Behav Neurosci* **99**, 956-963.
- Slotnick, BM, Kufera, A. et Silberberg, AM. (1991). Olfactory learning and odor memory in the rat. *Physiol Behav* **50**, 555-561.
- Slotnick BM et Berman EJ. (1980). Transection of the lateral olfactory tract does not produce anosmia. *Brain Res Bull* **5**, 141-145.
- Slotnick BM et Risser JM. (1990). Odor memory and odor learning in rats with lesions of the lateral olfactory tract and mediodorsal thalamic nucleus. *Brain Res* **529**, 23-29.
- Slotnick BM et Schoonover FW. (1992). Olfactory pathways and the sense of smell. *Neurosci Biobehav Rev* **16**, 453-472.
- Smith MA, Banerjee S, Gold PW et Glavia J. (1992). Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. *Brain res* **578**, 135-141.
- Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T et Morgan JI. (1989). Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* **3**, 359-365.
- Staubli U, Fraser D, Faraday R et Lynch G. (1987a). Olfaction and the "data" memory system in rats. *Behav Neurosci* **101**, 757-765.
- Staubli U, Schottler F et Nejat-Bina D. (1987b). Role of dorsomedial thalamic nucleus and piriform cortex in processing olfactory information. *Behav Brain Res* **25**, 117-129.
- Staubli U, Ivy G et Lynch G. (1984). Hippocampal denervation causes rapid forgetting of olfactory information in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5885-5887.
- Stripling JS, Patneau DK et Gramlich CA. (1988). Selective long-term potentiation in the pyriform cortex. *Brain Res* **441**, 281-291.
- Stripling JS, Patneau DK et Gramlich CA. (1991). Characterization and anatomical distribution of selective long-term potentiation in the olfactory forebrain. *Brain Res* **542**, 107-122.
- Strotmann J, Wanner I, Helfrich T, Beck A, Meinken C, Kubick S et Breer H. (1994). Olfactory neurones expressing distinct odorant receptor subtypes are spatially segregated in the nasal neuroepithelium. *Cell Tissue Res* **276**, 429-438.
- Sullivan RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C et Wilson DA. (2000). Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behav Neurosci* **114**, 957-962.
- Sullivan RM et Wilson DA. (1993). Role of the amygdala complex in early olfactory associative learning. *Behav Neurosci* **107**, 254-263.
- Sutherland GR et McNaughton B. (2000). Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 180-186.
- Sun B et Tank AW. (2003). c-Fos is essential for the response of the tyrosine hydroxylase gene to depolarization or phorbol ester. *J Neurochem* **85**, 1421-1430.
- Tanabe T, Iino M et Takagi SF. (1975). Discrimination of odors in olfactory bulb, pyriform-amygdaloid areas, and orbitofrontal cortex of the monkey. *J Neurophysiol* **38**, 1284-1296.

Bibliographie

- Thanos PK et Slotnick BM. (1997). Short-term odor memory: effects of posterior transection of the lateral olfactory tract in the rat. *Physiol Behav* **61**, 903-906.
- Tischmeyer W et Grimm R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* **55**, 564-574.
- Tischmeyer W, Kaczmarek L, Strauss M, Jork R et Matthies H. (1990). Accumulation of c-fos mRNA in rat hippocampus during acquisition of a brightness discrimination. *Behav Neural Biol* **54**, 165-171.
- Treves A et Rolls ET (1992). Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* **2**, 189-199.
- Tronel S et Sara SJ. (2002). Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn Mem* **9**, 105-111.
- Tronel S et Sara SJ. (2003). Blockade of NMDA Receptors in Prelimbic Cortex Induces an Enduring Amnesia for Odor-Reward Associative Learning. *J Neurosci* **23**, 5472-5476.
- Truchet B, Chaillan FA, Soumireu-Mourat B et Roman FS. (2002). Learning and memory of cue-reward association meaning by modifications of synaptic efficacy in dentate gyrus and piriform cortex. *Hippocampus* **12**, 600-608.
- Valverde F. (1965). Studies on the piriform lobe. *Harvard University Press, Cambridge, Mass.*
- Vanderwolf CH. (2001). The hippocampus as an olfacto-motor mechanism: were the classical anatomists right after all? *Behav Brain Res* **127**, 25-47.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB et Axel R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* **79**, 981-991.
- Vassar R, Ngai J et Axel R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* **74**, 309-318.
- von Herten LSJ et Giese KP. (2005). Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci* **25**, 1935-1942.
- Weaver DR, Rivkees SA et Reppert SM. (1992). D1-dopamine receptors activate c-fos expression in the fetal suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9201-9204.
- Wilson DA. (2000). Comparison of odor receptive field plasticity in the rat olfactory bulb and anterior piriform cortex. *J Neurophysiol* **84**, 3036-3042.
- Wilson DA. (2001). Scopolamine enhances generalization between odor representations in rat olfactory cortex. *Learn Mem* **8**, 279-285.
- Witter MP. (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* **3 Spec No**, 33-44.
- Witter MP, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH et Lohman AH. (1989a). Functional organisation of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog neurobiol* **33**, 161-253.
- Witter MP, Van Hoesen GW et Amaral DG. (1989b). Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci* **9**, 216-228.
- Wood ER, K. M. Agster, and H. Eichenbaum. 2004. One-trial odor-reward association: a form of event memory not dependent on hippocampal function. *Behav Neurosci* **118**(3):526-39.

Bibliographie

- Woolf NJ, Eckenstein F et Butcher LL. (1984). Cholinergic systems in the rat brain: I. projections to the limbic telencephalon. *Brain Res Bull* **13**, 751-784.
- Yonemori M, Nishijo H, Uwano T, Tamura R, Furuta I, Kawasaki M, Takashima Y et Ono T. (2000). Orbital cortex neuronal responses during an odor-based conditioned associative task in rats. *Neuroscience* **95**, 691-703.
- Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ et Aggleton JP. (1995). Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in rat brain. *Neuroscience* **69**, 821-829.
- Zimmer LA, Ennis M et Shipley MT. (1999). Diagonal band stimulation increases piriform cortex neuronal excitability in vivo. *Neuroreport* **10**, 2101-2105.
- Zinyuk LE, Datiche F et Cattarelli M. (2001). Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat. *Behav Brain Res* **124**, 29-32.
- Zou Z, Li F et Buck LB. (2005). Odor maps in the olfactory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7724-7729.
- Zou Z, Horowitz LF, Montmayeur JP, Snapper S et Buck LB. (2001). Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature* **414**, 173-179.

Annexes

Abréviations « générales »

2-DG : 2-désoxyglucose

ACA : branche antérieure de la CA

Ach : acétylcholine

AI : cortex agranulaire insulaire

AMPc : AMP cyclique

AMYG : amygdale

Arc : activity-regulated cytoskeletal associated gene

Bla : noyau amygdalien basolatéral

BO : bulbe olfactif

CA : commissure antérieure

CA1 : première sous-région de la Corne d'Amon

CA3 : troisième sous-région de la Corne d'Amon

cDNMS : tâche de non appariement avec reconnaissance différée

CE : cortex entorhinal

COF : cortex orbito-frontal

CP : cortex piriforme

CPa : subdivision antérieure du CP

CPF : cortex préfrontal

CPp : subdivision postérieure du CP

CREB : protéine « cAMP-response-element-binding »

DAB : diaminobenzidine

DI : aire disgranulaire insulaire

FTC : facteurs de transcription constitutifs

FTI : facteurs de transcription inductibles

GABA : acide gamma-aminobutyrique

GD : gyrus dentelé

GI : aire granulaire insulaire

HC : hippocampe

IEGs : gènes précoces immédiats

IL : cortex infralimbique

LC : locus coeruleus

LO : cortex orbito-frontal latéral

Nad : noradrénaline

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NOA : noyau olfactif antérieur

ODNs : oligonucléotides modifiés

PHA-L : leucoagglutinine du *Phaseolus vulgaris*

PKC : protéine kinase C

PLT : potentialisation à long terme

PPSI : potentiels post-synaptiques inhibiteurs

RO : récepteurs olfactifs

TH : tyrosine hydroxylase

TO : tubercule olfactif

TOL : tractus olfactif latéral

TTv : partie ventrale de la tenia tecta

VLO : cortex orbito-frontal ventrolatéral

Abréviations concernant les groupes de rats

C : rats contrôles de base

CR : rats contrôles de base sacrifiés en parallèle aux rats TR, POR et PWR

N : rats « naïfs » explorant quotidiennement le labyrinthe

O : rats « témoins olfactif » stimulé quotidiennement pendant 3,5 minutes par le géraniol

P : rats pseudo-conditionnés

PO : rats P sans restriction hydrique, uniquement stimulés par les odeurs dans le labyrinthe

POR : rats PO sacrifiés après une période de « repos » de 10 jour (réactivation)

PW : rats P en restriction hydrique, recevant de l'eau sans être soumis aux odeurs dans le labyrinthe

PWR : rats PW sacrifiés après une période de repos de 10 jour (réactivation)

T : rats conditionnés

T+ : rats T associant le géraniol à la récompense

T+/w+ : rats T+ stimulés par le géraniol et recevant en même temps de l'eau le jour du sacrifice

T+/w- : rats T+ stimulés par le géraniol et ne recevant pas d'eau le jour du sacrifice

T- : rats T associant le limonène à la récompense

TR : rats conditionnés sacrifiés après une période de « repos » de 10 jour (réactivation)

Liste des illustrations

Figure 1 - Représentation des voies olfactives chez le rongeur	p 5
Figure 2 - Schéma des structures olfactives sur une vue latéro-ventrale d'encéphale de Rat.....	p 9
Figure 3 - Illustrations des principaux types cellulaires dans le CP	p 10
Figure 4 - Schéma de l'organisation synaptique du CP	p 11
Figure 5 - Connexions du CP avec les structures nerveuses centrales	p 13
Figure 6 - Connexions du CP avec le système hippocampique.....	p 14
Figure 7 - Codage combinatoire des odeurs	p 17
Figure 8 - Motifs d'activation de la protéine Fos dans le Cpa après une stimulation par quatre odorants.....	p 18
Figure 9 - Comparaison de la structure anatomique du CP avec une matrice de la mémoire auto-associative	p 21
Figure 10 - Schéma représentant la cascade de signalisation conduisant à l'expression de la protéine Fos.....	p 34
Figure 11 - Photographie (A) et schéma (B) du dispositif expérimental	p 46
Figure 12 - Principe de la détection immunohistochimique de la protéine Fos	p 48
Figure 13 (a) - Evolution du comportement des rats PO et POR sur l'ensemble des sessions	p 104
Figure 13 (b) - Evolution du comportement des rats POR sur les 20 essais de la session de réactivation	p 104
Photographie 1 - Photographie du dispositif expérimental (voir figure 11)	p 46
Photographie 2 - Illustration de l'immunoréactivité à la protéine Fos dans le CP de Rat	p 49
Tableau 1 - Résumé des résultats obtenus au cours de la thèse	p 123
Tableau 2 - Récapitulatif des groupes de rats témoins utilisés au cours de la thèse	p 125
Tableau 3 - Incertitude sur l'issue du test chez les rats T et témoins	p 136
Tableau 4 - Evolution de Fos entre le stade de l'acquisition et la réactivation dans la CA1 et le VLO	p 138