



HAL
open science

Implication des corticoïdes et de leurs récepteurs hippocampiques dans les effets rapides et différés du stress sur le rappel mnésique

Rodolphe Dorey

► **To cite this version:**

Rodolphe Dorey. Implication des corticoïdes et de leurs récepteurs hippocampiques dans les effets rapides et différés du stress sur le rappel mnésique. Médecine humaine et pathologie. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR14790 . tel-00873391

HAL Id: tel-00873391

<https://theses.hal.science/tel-00873391>

Submitted on 15 Oct 2013

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.

N° D'ORDRE : 4790

THESE

PRESENTÉE DEVANT

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE : Sciences de la vie et de la santé

PAR

Rodolphe DOREY

Pour l'obtention du grade de

Docteur

SPECIALITE : NEUROSCIENCES

**IMPLICATION DES CORTICOÏDES ET DE LEURS RÉCEPTEURS
HIPPOCAMPIQUES DANS LES EFFETS RAPIDES ET DIFFÉRÉS DU
STRESS SUR LE RAPPEL MNESIQUE**

Soutenue le 6 juin 2013 devant la commission d'examen composée de :

Pr A-M. Mouly (Université Claude Bernard Lyon 1) :	Rapporteur
Dr G. Chapouthier (Université Paris VI, Pitié-Salpêtrière) :	Rapporteur
Pr C. Belzung (Université François Rabelais de Tours) :	Examinateur
Pr J-L. Guillou (Université Bordeaux 1) :	Examinateur
Dr Daniel Béracochéa (Université Bordeaux 1) :	Directeur de thèse
Dr Christophe Piérard (Spécialiste de recherches, IRBA) :	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

C'est avec mon enthousiasme le plus sincère que je voudrais rendre hommage à tous ceux qui, à leur manière, ont contribué à la concrétisation de ce travail. A Monsieur le Médecin Général Inspecteur Didier **Lagarde**, Directeur de l'IRBA qui a su me recevoir, m'écouter et me conseiller quand il a fallu. La mission qui nous est confiée est de réaliser une recherche applicative de qualité qui réponde aux besoins des forces. Cela passe par des collaborations sur des projets plus fondamentaux avec le milieu universitaire dont ce travail de thèse est l'exemple. J'ai travaillé trois ans au sein de L'IRBA sous contrat civil d'assistant chercheur qui m'a permis d'effectuer mon doctorat dans des conditions logistiques et techniques idéales. Je vous prie, Monsieur le Médecin Général Inspecteur, de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance pour la confiance que vous m'avez accordé.

A Madame la Vétérinaire en Chef Geneviève **Florence**, Chef du Département Environnements Opérationnels de l'IRBA, que je prie de bien vouloir trouver ici l'expression de mes sentiments distingués.

A Monsieur le Pharmacien en Chef Christophe **Piérard**, responsable de l'unité Neuropsychopharmacologie de l'IRBA, co-directeur de cette thèse. Christophe m'a énormément appris aux cours de ces trois dernières années. Il m'a fait partager une partie de ses connaissances en biochimie et pharmacopée. Toujours avec grande humilité, Christophe m'a présenté ses travaux de recherches et fait partager sa passion pour la recherche. Les discussions enrichissantes et stimulantes ainsi que la grande autonomie qu'il m'a accordé m'ont permis d'apprendre sur moi-même. Christophe m'a ouvert les yeux sur le monde du travail aussi sur les difficultés et les joies du travail de chercheur. Je tiens également à le remercier pour m'avoir offert l'opportunité de me former et de travailler au sein de l'IRBA alors que je n'avais aucune connaissance en comportement animal. Je tiens également à le remercier pour sa patience à mon égard. Je le prie de bien vouloir recevoir ici ma plus profonde reconnaissance et mes sentiments les plus respectueux.

A Monsieur le Docteur Daniel **Béracochéa**, responsable de l'équipe Interactions entre Emotions et systèmes de mémoires au sein de l'INCIA, co-directeur de cette thèse. Toujours enthousiaste et passionné, Daniel m'a fait découvrir les joies, les incertitudes et les surprises du métier de chercheur. Daniel m'a fait confiance en me recrutant comme technicien avant de me présenter à Christophe Piérard. Malgré l'éloignement géographique, les discussions avec Daniel ont toujours été stimulantes et ses conseils toujours pertinents notamment sa fameuse phrase « wait and see » qui redonnait le sourire après quelques expériences infructueuses. Qu'il soit assuré de ma très grande reconnaissance et de mes sentiments les plus sincères.

A Madame le Docteur Anne-Marie **Mouly** de l'Université Lyon 1 qui me fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse et que j'avais eu la chance de rencontrer lors du GDR neuromem de 2012.

A Madame Catherine **Belzung**, Professeur de l'Université François Rabelais de Tours qui me fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

A Monsieur Georges **Chapouthier**, Directeur de recherches au CNRS à l'Université Paris VI, biologiste et philosophe. Georges Chapouthier, reconnu sur le plan international pour ses travaux sur l'anxiété et la mémoire, est un expert international incontournable du domaine émotion-mémoire. Je mesure le grand honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de cette thèse.

A monsieur Jean-Louis **Guillou**, Professeur de l'Université de Bordeaux. Je le remercie d'être Président de jury. Je le remercie de ses conseils concernant l'implantation de guides canules. Je le prie de recevoir ma plus profonde reconnaissance et mes sentiments les plus respectueux.

Les travaux de recherche nécessitent un travail d'équipe. Je tiens donc à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Je souhaite vivement remercier les personnels de l'unité Neuropsychopharmacologie nouvellement baptisée unité neurophysiologie sous la responsabilité de Monsieur le Médecin Chef Frédéric **Canini**. A Madame Pierrette **Liscia**, pour m'avoir fait découvrir le personnel ainsi que le fonctionnement de l'IRBA et pour ces précieux conseils. Je tiens ici à la remercier chaleureusement. A Monsieur le Docteur Frédéric **Chauveau** pour ses conseils, son soutien scientifique et amical et je me souviendrai toujours du GDR en Corse. A Monsieur Mathieu **Coutan** et Mademoiselle Betty **Poly** pour leur contribution active et efficace aux expérimentations animales, ainsi que leur gentillesse, leurs conseils formateurs, leur soutien et les très bons moments passés en leur compagnie. Je tiens également à remercier Monsieur Julien Thomasson pour sa disponibilité lors de mes expériences. Je tiens à remercier Madame Dominique **Fromage** pour ses photos en microdialyse et sa disponibilité.

Merci également à Monsieur le Pharmacien en Chef Bruno **Huart**, responsable de l'unité STECA, de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Merci également à tous ses personnels et plus particulièrement Madame Isabelle **Franquin** et Madame Christine **Frédéric** pour leur contribution aux analyses biochimiques par HPLC. Je tiens également à les remercier pour les pauses goûter, qu'elles veuillent bien trouver ici mes plus sincères remerciements et ma plus grande reconnaissance.

Merci également à Monsieur Xavier **Holy** de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Merci également à tous ses personnels, Madame Sylvie **Renault**, Madame Catherine **André**, Messieurs Xavier **Butigieg** et Laurent **Bégot**, qui m'ont toujours réservé un très bon accueil et un peu de leur temps. Je les remercie également de leur conseils avisés tant sur le plan humain que professionnel.

Je tiens également à remercier Monsieur le Commandant Mounir **Chennaoui** pour sa bonne humeur constante, ses conseils lors de nos échanges et pour m'avoir fait confiance dès le début dans l'utilisation de son matériel de biologie moléculaire. Je tiens également à remercier Madame Catherine **Drogou** de m'avoir enseigné son savoir technique des dosages ELISA et de m'avoir permis d'utiliser en toute confiance et autonomie son plateau technique de biologie moléculaire.

Je tiens également à remercier Messieurs les Médecins-chercheurs Cyprien **Bourhillon** et Fabien **Sauvet** pour leurs échanges scientifiques et leurs conseils. Qu'ils veuillent bien trouver mes plus sincères remerciements.

Je tiens également à remercier les médecins-chercheurs Nathalie **Koulhman** et Sébastien **Banzet** pour leur échanges et leurs soutiens durant les derniers mois, merci à vous.

Au sein de l'IRBA nous avons un atout important au travers d'un soutien technique fort. Je tiens à remercier l'ensemble des personnels de ce soutien qui m'a aidé à réaliser ce travail.

Je désire remercier Messieurs Didier **Lici**, Christophe **Boismon** et Sylvain **Ciret** pour les soins apportés aux animaux utilisés durant cette étude. Je voudrais également remercier Monsieur Marc **Gauthier** pour l'édition des différents posters et autres productions écrites, ainsi que de sa gentillesse et de sa disponibilité.

Je les remercie également de leur bonne humeur durant ces trois années passées à l'IRBA.

Mes remerciements vont également au secrétariat du Département ENOP et plus particulièrement à Madame Martine **Chassagne** pour son dévouement et sa patience à mon égard.

Mes remerciements s'adresse également au Dr Vincent David et au Pr Marc Corio pour leurs conseils et leurs encouragements, à l'ingénieur Svitlana **Shinkaruk-Poix** et au Pr Catherine **Benneteau**, U862 Inserm, de l'Université de Bordeaux ainsi qu'au Dr Marie-Pierre **Moisan** et au Dr Amandine **Minni** pour la collaboration d'un travail mené à terme.

Je tiens à remercier Laurence **Decorte**, Angélique **Faugère**, Nadia **Henkous** de l'université de Bordeaux 1 pour leur contribution efficace aux contrôles histologiques, Gaëlle **Dominguez** (également prénommée « vent d'hiver »), étudiante en thèse à l'Université de Bordeaux 1 et le Docteur Mathieu **Baudonnat** (merci papa) pour leur disponibilité lors des chirurgies et des tests comportementaux.

Je tiens également à remercier le Docteur Christophe **Tronche** pour m'avoir initié aux joies de la microdialyse et pour ses conseils avisés.

Je tiens également à remercier ma collègue de bureau et de « galère » Mademoiselle Carine **Malle** qui a su faire preuve de patience à mon égard, qui a relu mon travail, m'a conseillé, encouragé, remotivé. Merci à toi Carine et bon courage.

Enfin, je voudrais terminer en remerciant mes parents qui ont su faire preuve d'une extrême patience à mon égard et qui ont toujours cru en moi.

RESUME

IMPLICATION DES CORTICOÏDES ET DE LEURS RÉCEPTEURS HIPPOCAMPIQUES DANS LES EFFETS RAPIDES ET DIFFÉRÉS DU STRESS SUR LE RAPPEL MNESIQUE

Tout d'abord, nous avons démontré l'origine périphérique de la corticostérone après l'administration d'un stress aigu. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de souris déficient en transporteur de corticostérone : Corticosterone binding-globulin (Cbg-/-). Ensuite, nous avons déterminé si les effets rapides du stress sur le rappel mnésique dépendaient de mécanismes non-génomiques. Nous avons précisé si ces effets étaient médiés par les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) ou aux glucocorticoïdes (GR) de l'hippocampe. Enfin, nous avons déterminé les récepteurs hippocampiques aux glucocorticoïdes impliqués dans les effets différés du stress sur la mémoire. Pour cela, nous avons administré dans l'hippocampe dorsal (HD) ou ventral (HV), 15 minutes avant le stress, l'antagoniste MR (RU 28318) et l'antagoniste GR (RU 38486) et nous avons évalué les performances mnésiques à 15, 60, 105 et 120 minutes après le stress. En effet ces délais ont été choisis selon l'apparition de pics de corticostérone induit par le stress, mesurés par microdialyse, dans l'HD et l'HV.

Pour conclure, notre étude a mis en évidence que le stress aigu diminue le rappel mnésique hippocampo-dépendant par l'intermédiaire d'un mécanisme de "switch" impliquant les récepteurs MR puis GR de l'HD à des délais plus courts et ensuite seulement les récepteurs GR de l'HV à des délais plus long.

Mots clés : rappel mnésique, stress aigu, hippocampe dorsal et ventral, corticostérone, récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR), effets non-génomique et génomique, RU 38486, RU 28318.

ABSTRACT

Involvement of corticosteroids and their hippocampal receptors in fast and delayed effects of stress on memory retrieval.

We first showed the peripheral origin of corticosterone after an acute stress administration (electric foot-shocks) using corticosterone binding globulin-deficient mice (Cbg ^{-/-}). Then, we intended to determine if the rapid effects of stress on memory retrieval depended on non-genomic mechanisms and in a further step to precise whether such effects are mediated by mineralocorticoid (MR) or glucocorticoid receptors (GR) in the hippocampus. To that aim, we first injected a macromolecular complex of corticosterone (Cort-3CMO-BSA) that cannot cross the cell membrane to assess the involvement of membrane mechanisms. In a second step, we injected 15 minutes before stress delivery either in the dorsal (DH) or ventral (VH) hippocampus the MR antagonist (RU 28318) and GR antagonist (RU 38486) and evaluated memory at 15, 60, 105 and 120 minutes after stress delivery. Indeed, these delays were chosen according to the occurrence of stress-induced corticosterone peaks measured by microdialysis in DH and VH.

The main results obtained in this study are:

i) Cbg ^{-/-} mice are not affected by stress delivery occurring 15 minutes before memory testing, in contrast wild-type control mice which exhibited an important memory retrieval deficit;

ii) Similarly, the rapid effects of stress on memory could be prevented by the systemic injection of metyrapone (a corticosterone synthesis inhibitor);

iii) We showed that the rapid (15min) deleterious effects of stress on memory are mediated by membrane receptors, since the injection of Cort-3CMO-BSA in the DH produced similar effects as stress delivery. Moreover, the effect of the Cort-3CMO-BSA complex is not blocked by systemic injection of anisomycin (a protein synthesis inhibitor);

iv) In DH, the injection of RU 28318 blocked the deleterious effects of stress when testing occurred 15 min after stress but not for longer delays. In contrast, RU 38486 prevented memory retrieval impairments when performance was evaluated at 60 but not at 105 min after stress. In addition, the opposite pattern was observed in VH since RU 38486 was denied of any effects when injected at 60 min but blocked the stress-induced memory impairments at

the 105 min post-stress delay. The involvement of MR and GR receptors and consequently the efficiency of their antagonists seem to depend on the time-course evolutions of stress-induced corticosterone rises within the DH and VH.

In conclusion, our study evidenced that acute stress impairs hippocampus-dependent memory retrieval via a switch mechanism involving the MR then GR in DH at shorter delays and then only GR in VH at longer delay.

Key words : acute stress, memory retrieval, hippocampus, corticosterone, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors, dorsal and ventral hippocampus, , non-genomic and genomic effects, RU 38486, RU 28318.

LABORATOIRES D'ACCUEIL

Direction commune de thèse

Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA)

Département des Environnements Opérationnels
Co-directeur de thèse : Dr Christophe Piérard



Université de Bordeaux 1

Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA)
Co-directeur de thèse : Dr Daniel Béracochéa



SOMMAIRE

remerciements.....	2
liste des abreviations.....	12
INTRODUCTION.....	13
Partie théorique.....	15
I) MEMOIRE	15
A) Historique	15
B) Les différents systèmes de mémoire.....	18
1) La mémoire à Court Terme vs la mémoire à Long Terme.....	18
2) La mémoire épisodique et sémantique.....	19
C) Le modèle de Squire.....	22
D) Le modèle de Tulving.....	23
E) Interactions entre les systèmes de mémoire	24
F) Une structure clé : l'hippocampe.....	26
1) Situation et cytoarchitecture de l'hippocampe :	26
2) Les connexions extrinsèques et le circuit trisynaptique de l'hippocampe	28
3) L'hippocampe : aspect cognitif et émotionnel.....	28
4) Dissociation fonctionnelle hippocampique.....	31
(a) Hippocampe dorsal.....	32
(b) Hippocampe ventral.....	33
II) Neuropsychobiologie du stress.....	35
A) Théories sur le stress.....	35
B) Complexité de la réponse au stress.....	36
A) Les principaux neuromédiateurs du stress	37
B) De la maladaptation au stress aux pathologies.....	40
C) Principales structures cérébrales impliquées dans la réponse au stress.....	41
1) Structures.....	41
2) Les connectivités entre ces structures :	43
III) L'axe corticotrope et les Glucocorticoïdes.....	43
A) L'axe corticotrope.....	43
1) Organisation fonctionnelle.....	43
2) Activité de l'axe corticotrope.....	48
B) Glucocorticoïdes	49
1) Biosynthèse, circulation et métabolisme des glucocorticoïdes.....	49
2) Les récepteurs aux glucocorticoïdes :	51
(a) Les récepteurs intracellulaires.....	51
(b) Les récepteurs membranaires :	53
3) Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.....	55
(a) Mécanisme génomique	55
(b) Mécanisme non-génomique.....	56

4) Régulation des glucocorticoïdes : rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope.....	58
C) Glucocorticoïdes, hippocampe et mémoire.....	60
1) Impact des glucocorticoïdes sur la mémoire.....	60
2) Impact des GCs sur la plasticité synaptique hippocampique :	61
OBJECTIFS.....	63
Partie expérimentale.....	64
I) Matériels et méthodes.....	64
A) Animaux :	64
B) Protocole de stress	65
C) Epreuve comportementale :	65
(a) Description du labyrinthe en T:	65
Image 1 : Labyrinthe en T.....	66
(b) Principe général de l'alternance forcée différée :	66
(c) Type de réponse évaluée :	67
D) Pharmacologie :.....	68
1) Voie d'administration pharmacologique :	68
2) Molécules utilisées.....	68
E) Microdialyse intracérébrale :	71
1) Principe.....	71
2) Mise en œuvre.....	72
F) Contrôle histologique.....	73
G) Dosage de la corticostérone intrahippocampique et plasmatique.....	73
H) Analyse statistique.....	73
II) Résultats.....	74
A) Etude 1 : Démonstration de l'origine périphérique de la corticostérone (annexe 1 : Minni, Dorey et al, 2012).....	74
B) ETUDE 2 : Impact d'un stress aigu et de la métyrapone sur les performances mnésiques et les concentrations de corticostérone intrahippocampique.....	77
C) Etude 3 : Détermination de la nature (membranaire versus génomique) et du type (MR versus GR) des récepteurs de l'HD dans les effets rapides du stress sur l'alternance différée (annexe 2 : Dorey et al, 2011).....	81
1) Expérience 1 : Effets d'une injection intrahippocampique bilatérale (15 min avant le test) de corticostérone et de Cort-3CMO-BSA sur les performances mnésiques.....	81
2) Expérience 2 : Implication des récepteurs membranaires de type MR dans les effets rapides du stress sur les performances d'alternance.....	83
3) Expérience 3 : Effet des injections intrahippocampiques des antagonistes MR ou GR sur les performances mnésiques évaluées 60 min après le stress.....	84
4) Conclusion	85
D) Etude 4 : régions hippocampiques et type de récepteurs impliqués dans les effets rapides et différés du stress aigu (annexe 3 : Dorey et al, 2012).....	86
1) Expérience 1 : étude de la cinétique des taux de corticostérone au sein de l'HD et l'HV.....	86

2) Expérience 2 : implication des récepteurs MR et GR de l'HD et l'HV dans le déficit mnésique.....	88
3) Conclusion :	90
Discussion et perspectives.....	91
I) DISCUSSION.....	91
A) Démonstration de l'origine périphérique de la corticostérone agissant au niveau central	91
1) Corticostérone et hippocampe.....	92
B) Détermination de la nature (membranaire ou génomique) des récepteurs GCs impliqués dans les effets rapides et différés du stress sur le rappel	93
C) Implication relative de l'HD et HV dans les effets du stress sur le rappel, en fonction du délai post-stress et du taux de corticostérone.....	94
II) PERSPECTIVES.....	97
A) Rôle de l'hippocampe intermédiaire en tant qu'interface entre les processus cognitifs et émotionnels.....	97
B) Rôle de l'hippocampe dorsal dans la manifestation du pic tardif de corticostérone dans l'hippocampe ventral.....	98
C) Interaction de l'hippocampe avec d'autres structures impliquées dans les processus cognitifs et émotionnels.....	99
D) Intervention de l'HV dans la mémoire émotionnelle ou traumatique.....	99
E) Existence d'autres récepteurs membranaires impliqués dans les effets rapides du stress.....	101
ANNEXES.....	103
ANNEXES I : Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin during stress to promote glucocorticoid delivery to the brain : impact on the memory.....	104
ANNEXES 2 : Membrane Mineralocorticoid but not Glucocorticoid Receptors of the Dorsal Hippocampus Mediate the Rapid Effects of Corticosterone on Memory Retrieval	114
ANNEXE 3 : Stress-Induced Memory Retrieval Impairments: Different Time-Course Involvement of Corticosterone and Glucocorticoid Receptors in Dorsal and Ventral Hippocampus.....	126
ANNEXE 4 : Effet du stress aigu avant l'acquisition sur les performances d'alternance	137
ANNEXE 5 : Régions cérébrales impliquées dans les effets rapides du stress sur la mémoire contextuelle.....	138
ANNEXE 6 : Détermination de l'implication des récepteurs AMPA de surface de l'hippocampe dorsal dans les effets du stress sur la mémoire contextuelle.....	147
BIBLIOGRAPHIE.....	155

LISTE DES ABREVIATIONS

- 11 β HSD-1** : *11-beta hydroxysteroid déshydrogénase de type 1*
ACTH : *hormone hypophysaire corticotrope*
AP : *coordonnée anatomique antéro-postérieure*
BLA : *noyau basolatéral de l'amygdale*
BSA : *albumine sérique de bovin*
CA1 : *champ Ammonique 1*
CA3 : *champ Amonique 3*
Cort-3CMO-BSA : *corticostérone 3 carboxyméthioxime couplée à la sérum albumine bovine*
Cbg -/- : *souris transgéniques déficientes en Corticosterone binding-globulin*
CeA : *noyau central de l'amygdale*
CRH : *corticotropin releasing hormone*
D1 : *première discrimination*
D2 : *seconde discrimination*
DSCS : *Discriminations Spatiales Contextuelles et Sérielles*
DLT : *dépression à long terme*
GCs : *glucocorticoïdes*
GD : *gyrus denté*
GR : *récepteur aux glucocorticoïdes (récepteur de type 2 à la corticostérone)*
HD : *hippocampe dorsal*
HPA : *axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou axe corticotrope*
HPC : *hippocampe*
HV : *hippocampe ventral*
IL/PL : *cortex infralimbique/prélimbique*
LA : *noyau latéral de l'amygdale*
LAT : *coordonnée anatomique latérale*
MCT : *mémoire à court terme*
MLT : *mémoire à long terme*
MR : *récepteur aux minéralocorticoïdes (récepteur de type 1 à la corticostérone)*
NPV : *noyau paraventriculaire de l'hypothalamus*
NTS : *noyau du tractus solitaire*
PFC : *cortex préfrontal*
PLT : *potentialisation à long terme*
V : *coordonnée anatomique verticale*

INTRODUCTION

Chez l'homme, la mémoire est un des phénomènes biologiques et psychologiques les plus intrigant. C'est certainement à cause de son importance que, dans l'antiquité, la mémoire a suscité un fort intérêt, attirant de nombreux penseurs, philosophes. La mémoire désigne à la fois le stockage des connaissances et les mécanismes d'utilisation, d'organisation et d'expression de ces connaissances. C'est une fonction cognitive qui se subdivise en différents systèmes fondés à la fois sur la résolution temporelle, la nature de l'information et les structures cérébrales mises en jeu selon le type de mémoire.

Actuellement, on distingue la mémoire à court terme et la mémoire à long terme. La mémoire à court terme stocke les informations utiles pour une durée limitée (de quelques secondes à quelques minutes). La mémoire à long terme est une sorte de « disque dur », où l'on peut emmagasiner une quantité illimitée d'informations sans limitation temporelle. Celle-ci implique trois processus : l'encodage, la consolidation et le rappel. Le rappel ou la restitution mnésique est la capacité d'utiliser et/ou d'évoquer un souvenir ou une information encodée et consolidée. Il est modulé par le contexte et l'état émotionnel dans lequel se trouve l'individu à un instant « T » (Schacter et al, 1998).

De nombreuses études ont mis en évidence l'influence de processus émotionnels bénéfiques ou délétères, sur les processus mnésiques (Joëls et al, 2006), tels que le stress et l'anxiété (Sandi et Pinelo-Nava, 2007). Des structures comme l'amygdale et l'hippocampe jouent un rôle prépondérant (Roosendaal, 2003). En effet, la situation anatomique et les connectivités de ces structures avec le reste du cerveau sont d'un intérêt majeur dans la compréhension des interactions entre les processus émotionnels et mnésiques notamment lors de la survenue d'un stress.

Le stress est une notion créée par Hans Selye (1936) pour définir la réponse physiologique d'un organisme en situation de détresse. Cette réponse permet à l'individu de s'adapter aux changements de l'environnement et implique de nombreuses structures cérébrales (notamment de la zone cortico-limbique). La réponse au stress emprunte deux axes principaux : l'axe catécholaminergique et l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA pour l'anglais Hypophysio-Pituitary-Adrenal axis). L'axe catécholaminergique est déclenché par le système nerveux sympathique, ainsi que par l'hypothalamus, qui permet la libération de l'acétylcholine qui va activer l'aire médullaire des glandes surrénales. Les hormones produites

par celles-ci sont des catécholamines, telles que la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline. L'axe catécholaminergique, empruntant des chemins nerveux, est le premier recruté par le stress. L'axe corticotrope, est déclenché plus tardivement par l'hypothalamus, qui sécrète de la CRH qui active l'hypophyse qui déclenche la libération de l'ACTH pour enfin activer l'aire corticale des glandes surrénales. Les hormones produites par celle-ci sont des glucocorticoïdes, telles que le cortisol ainsi que des minéralocorticoïdes tels que l'aldostérone. Les hormones produites se lient à deux types de récepteurs : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (Reul et de Kloet, 1985). Les glucocorticoïdes sont présents dans de nombreux organes au niveau périphérique mais également dans de nombreuses structures cérébrales, dont l'hippocampe, structure clé de la mémoire. En effet, il a été montré que l'hippocampe joue un rôle majeur dans le processus de rappel mnésique à long terme (Tulving et Markowitsch, 1998). De plus, cette structure exprime une forte densité de récepteurs aux glucocorticoïdes (Roosendaal et al, 2003 ; Brinks et al, 2007; Conway-Campbell et al, 2007 ; Lightman et al, 2008). Ainsi, les glucocorticoïdes par l'intermédiaire des récepteurs hippocampiques modulent les processus mémoire et de rappel (Sapolsky et al, 1996 ; Joëls et al, 2006 ; Oei et al, 2007).

Mes travaux de thèse font suite à des travaux antérieurs du laboratoire qui ont montré que, suite à un stress aigu, l'action des glucocorticoïdes sur l'hippocampe dorsal exerce des effets rapides (5-15 min après le stress) et différés sur le rappel mnésique (Chauveau et al, 2009 ; Tronche et al, 2010).

Toutefois, ces travaux n'avaient pas précisé d'une part la nature (membranaire versus génomique) et le type (mineralocorticoïde ou glucocorticoïde) des récepteurs mis en jeu ainsi que l'implication relative de l'hippocampe dorsal et ventral dans les effets délétères du stress sur le rappel mnésique.

De ce fait, l'objectif général de ce travail de thèse était d'évaluer à différents délais, par une approche comportementale et neuroendocrinienne, les effets du stress aigu et l'implication des récepteurs stéroïdiens de l'hippocampe dorsal et ventral sur le rappel mnésique.

Après avoir réalisé une présentation de l'état des connaissances théoriques actuelles sur les systèmes de mémoire, la notion de stress et l'importance des glucocorticoïdes dans les processus mnésiques ainsi que les interactions entre mémoire et stress, nous développerons les approches expérimentales utilisées durant cette étude. Enfin, après une discussion générale sur l'ensemble des résultats, les perspectives de ce travail seront envisagées.

PARTIE THÉORIQUE

I) MEMOIRE

A) Historique

Un des pionniers de l'étude de la mémoire a été le philosophe Théodule Ribot, en 1881. Selon lui, la « mémoire est, par essence un fait biologique ; par accident un fait psychologique » (Les maladies de la mémoire, 1881). La mémoire se caractérise par la conservation de certains états, leur reproduction et leur localisation dans le passé (« reconnaissance »). Le dernier élément est pour Ribot exclusivement psychologique, et fait appel à la conscience de l'individu. L'objectif de Ribot était de montrer que l'étude de la mémoire pathologique permettait d'apprendre sur la nature et le fonctionnement normal de celle-ci. Dans ses travaux, il remarque que la perte de mémoire porte sur les souvenirs (mémoire psychique) et non sur les habitudes (mémoire organique). Ainsi la perte de mémoire suit un ordre du plus nouveau au plus ancien, du moins organisé au plus organisé : c'est la loi de régression de « Ribot ». Ribot soutient que le souvenir est logé dans une partie du cerveau et ne serait que matériel. Selon Bergson (1896), qui s'oppose à cette réduction de l'esprit à la matière, le souvenir est spirituel et le cerveau oriente la mémoire vers le présent. Par ailleurs, Bergson distingue deux formes de mémoires. D'une part, la mémoire habitude qui rejoue le passé et utilise l'acquis de l'action passée pour l'action présente, l'individu étant conscient de ce processus. D'autre part, la mémoire pure ou souvenir qui enregistre sous forme « d'images-souvenirs » tous les événements de notre vie quotidienne à mesure qu'ils se déroulent. Cette dernière est dite spirituelle et le cerveau ne serait qu'un « outil pratique » pour manipuler les souvenirs (Bergson, Matière et mémoire, 1896).

En 1885, Hermann Ebbinghaus fut le premier à publier un travail expérimental sur la mémoire humaine dans lequel il défendait la conception de la mémoire comme ne se réduisant pas qu'au souvenir conscient des événements. En effet, il souligne le fait que nos expériences personnelles ne s'évanouissent pas dès qu'elles ne sont plus présentes dans notre conscience. C'est par le développement de sa méthode d'économie au réapprentissage (méthode de mesure de la mémoire) qu'Ebbinghaus mettra en avant deux caractéristiques de la mémoire :

les souvenirs ont différentes durées de vie (courbe de l'oubli) et la répétition rend les souvenirs plus durables.

L'expérimentation animale commence au début du XX^e siècle avec la naissance du courant béhavioriste par John Broadus Watson qui pose les bases scientifiques de la mémoire en accordant une importance particulière à l'analyse des comportements observables. C'est Ivan Pavlov (1890) qui le premier a étudié expérimentalement une situation d'apprentissage simple : le conditionnement ré pondant ou classique. Au cours d'un tel conditionnement, on apprend à un animal, en l'occurrence un chien, à associer deux événements comme le son d'une cloche suivie de la présentation de nourriture. A chaque essai, on enregistre la quantité de salive sécrétée par l'animal au moment où la cloche se fait entendre. Les résultats montrent que le chien se met à saliver au son de la cloche avant même que la nourriture soit présentée.

On oppose souvent au conditionnement classique le conditionnement opérant. L'étude de ce type de conditionnement a commencé avec les travaux d'Edward Thorndike (1898). L'animal apprend à faire une association entre une réponse correcte et une récompense (ou une réponse fautive et une punition) qui suit cette réponse en modifiant le comportement de l'animal. Ce courant de pensée n'a étudié que le mécanisme de recouvrement de l'information avec l'association par contiguïté ou similarité. Cette école ne s'est intéressée qu'à une seule forme de mémoire (mémoire des habitudes) et ne s'est absolument pas préoccupée des processus mentaux survenant entre le stimulus et la réponse.

C'est pendant les années 1950-1960 que les recherches sur la mémoire ont privilégié l'étude des processus mentaux. Le travail était surtout centré sur la mémoire conçue comme un processus polymorphe ; cette conception était inspirée d'une distinction avancée par William James (1950), incluant une mémoire primaire responsable du stockage de l'information à court terme, et une mémoire secondaire responsable du stockage de l'information à long terme. Les travaux expérimentaux d'Edward C. Tolman menés sur le rongeur permirent d'introduire la notion de carte cognitive et de distinguer une mémoire qui repose sur des connaissances et une mémoire plus automatique (Tolman, 1948). Tolman est le premier à parler du comportement animal comme étant le résultat du traitement et de l'utilisation flexible des informations de l'environnement. Il a démontré que les rats sont capables de générer des cartes cognitives spatiales qu'ils réutilisent lors de leur réexposition au contexte. En cela, il s'oppose aux théories proposant que les animaux soient uniquement capables d'apprendre des associations simples entre des stimuli et une réponse automatique. Les hypothèses de Tolman ont été plus particulièrement remises à l'ordre du jour par la découverte des « cellules de lieu » des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe, qui jouent un

rôle dans la navigation et la formation d'une carte spatiale (O'Keefe et Dostrovsky, 1971 ; O'Keefe et Nadel, 1978, Muller, 1996). Le GD et le CA3 sont impliqués dans l'encodage d'informations spatiales (Lee et al, 2005 ; Jerman et al, 2006), tandis que le CA1 est impliqué dans l'encodage d'informations temporelles (Gilbert et al, 2001). Collectivement, ces cellules constitueraient la base neurale d'une représentation de l'espace (carte cognitive spatiale) qui permettrait à l'animal de « savoir où il se trouve » et d'atteindre un objectif par des conduites de détour ou l'utilisation de raccourcis.

C'est en partie grâce à la découverte du syndrome amnésique qu'on envisagea l'existence de plusieurs formes de mémoire. En 1957, la psychologue Brenda Milner a souligné le rôle majeur du lobe temporal médian interne (incluant l'hippocampe, le gyrus denté, le cortex temporal inférieur et l'amygdale) dans la mémoire via l'étude du patient HM. En effet ce patient présentait des crises d'épilepsie sévères qui s'aggravaient au fil du temps. Afin de soulager ce patient, le neurochirurgien Scoville décida en dernier recours de procéder à la résection bilatérale de la face interne du lobe temporal. En dépit d'une mémoire à court terme (MCT) normale, de capacités intellectuelles et perceptives préservées, HM ne pouvait plus convertir de trace mnésique temporaire en souvenir durable, à long terme (MLT). Ainsi, il présentait une amnésie antérograde sévère qui l'empêchait donc de former de nouveaux souvenirs. De plus cette amnésie était accompagnée d'une amnésie rétrograde des événements de un à quatre ans avant l'opération. Malgré tout, ce patient était capable d'apprendre et de retenir des informations relevant d'un apprentissage automatique. Les études réalisées à partir du cas HM ont montré que les lésions des structures temporales internes (incluant l'hippocampe) dissocient la MCT de la MLT et démontrent expérimentalement l'existence de plusieurs formes de mémoire. Ces résultats et d'autres études sur le syndrome amnésique, ont permis de raisonner en terme de systèmes de mémoire et de se poser la question de l'existence de plusieurs mémoires indépendantes, ayant chacune sa structure et son fonctionnement propre.

En parallèle de ces découvertes, le développement des technologies (l'imagerie cérébrale et l'apport de la génétique) va permettre une avancée considérable dans la compréhension des substrats biologiques sous-tendant la formation de la mémoire. L'une des premières expériences mettant en évidence les modifications de communication au sein d'un réseau provient des travaux sur la potentialisation à long terme (PLT). Schématiquement, la PLT est décrite comme l'amplification du potentiel d'action excitateur du neurone post-synaptique suite à une stimulation répétée à haute fréquence du neurone pré-synaptique. La PLT illustre la théorie hebbienne (1942) de la formation de la mémoire, qui démontre que

lorsque deux neurones sont activés au même moment, ils créent ou renforcent leur connexion de sorte que l'activation de l'un par l'autre sera plus facile à l'avenir. Bliss et Lomo (1973) ont démontré cette théorie au sein de l'hippocampe. Ils ont remarqué que l'application de stimulations électriques répétées au niveau de la voie perforante provoquait une potentialisation des neurones du gyrus denté, rendant l'induction des potentiels d'actions excitateurs au niveau de cette zone plus aisée qu'avant la stimulation. Par la suite, l'existence de la PLT fut vérifiée dans de nombreuses structures cérébrales impliquées dans la mémoire telles que le cortex préfrontal et l'amygdale (Racine et al, 1983 ; Voronin et al, 1984 ; Sakamoto et al, 1987 ; Alonso et al, 1990 ; Chapman et al, 1990 ; Jung et al, 1990 ; Laroche et al, 1990 ; Uno and Ozawa, 1991). La conséquence de ce phénomène est une diminution du seuil d'excitabilité du neurone. Certains auteurs ont ensuite été tentés de réduire les apprentissages à une simple induction de PLT au sein d'un réseau (Lynch et al, 2007). La PLT est initiée par une entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique suite à l'activation de récepteurs au glutamate de type NMDA. La liaison conjointe de neuromodulateurs, tels que la dopamine (DA), sur les récepteurs de ce même neurone permet l'activation de mécanismes intracellulaires de transduction du signal. Cela aboutit à la synthèse de protéines qui modifieront physiquement les connexions entre neurones. Parmi ces mécanismes, les protéines kinases/phosphatases jouent un rôle majeur dans la régulation de la transcription.

B) Les différents systèmes de mémoire

La mémoire n'est pas une fonction unitaire mais polymorphe c'est-à-dire composée de différentes formes ou systèmes. Un système de mémoire est une « entité neuropsychologique qui se définit par les règles opératoires, caractéristiques du traitement d'un type d'information particulière » (Jaffard 1994).

Les études en neuropsychologie menées sur les déficits mnésiques post-lésionnels, tels que le cas HM vu précédemment, ont permis de mettre en évidence différents types de mémoire.

1) La mémoire à Court Terme vs la mémoire à Long Terme

La distinction de ces deux types de mémoire est fondée sur un gradient temporel par rapport à l'acquisition. La MCT est un système mnésique à capacité limitée qui permet la

réalisation de tâches nécessitant le maintien en mémoire d'informations disponibles pour un traitement immédiat (stockage temporaire de l'information).

Suite aux observations d'études de cas et de la description de patients ayant une atteinte de la mémoire à court terme sans atteinte de la mémoire à long terme (Warrington et Shallice, 1969), émergea le modèle de mémoire de travail (Baddeley et Hitch, 1974) décrit comme un système mnésique de capacité limitée, permettant le maintien temporaire et la manipulation des informations en vue d'une action ou de la réalisation d'activités cognitives complexes, telles que la compréhension, l'apprentissage, le raisonnement.

Ce système représente une interface entre la perception, la mémoire à long terme et l'action (Baddeley, 2003). La mémoire de travail est non seulement une voie de passage des informations vers la mémoire à long terme, mais aussi une interface entre ces informations et les connaissances stockées dans la mémoire à long terme. Ce modèle est constitué de deux sous-systèmes asservis de stockage : la boucle phonologique (stockant et rafraîchissant l'information phonologique) et un calepin visuo-spatial (maintenant les informations visuelles et spatiales impliquées dans la formation des images mentales). Ces sous-systèmes sont coordonnés et supervisés par un «administrateur central » qui s'apparente à un système attentionnel à capacité limitée.

Contrairement à la MCT, la MLT permet de maintenir des informations, avec une capacité de stockage très importante et une durée de rétention apparemment illimitée. Au sein de la MLT, une distinction est faite entre mémoire déclarative et mémoire non déclarative. Dans la partie suivante, nous ne décrirons que le versant déclaratif, qui distingue la mémoire « épisodique » de la mémoire « sémantique ».

2) *La mémoire épisodique et sémantique*

Chez l'homme, ces deux concepts sont proposés par Tulving (1972) qui ne cessera par la suite d'en affiner les définitions. La mémoire épisodique est définie par Tulving comme étant une reconstitution ou une reconstruction mentale d'événements passés, personnellement vécus. Ces représentations s'inscrivent dans un contexte spatial et temporel, c'est-à-dire associées à un lieu et une date. La mémoire épisodique est donc dépendante du contexte d'acquisition, et celui-ci fait partie intégrante du souvenir. Les attributs contextuels de l'information répondent aux questions « quoi, où, et quand ? » (what ?, where ?, when ?). Wheeler et ses collaborateurs (Wheeler et al, 1997) insistent sur la caractéristique de la mémoire épisodique, qui est de pouvoir initier un voyage mental à travers le temps, dans le

passé et vers le futur. Ce « voyage dans le temps » s'entend dans le sens où l'individu peut non seulement se représenter consciemment les événements antérieurs, mais également les intégrer au futur en se projetant et en planifiant ses activités. La caractéristique « épisodique » de la mémoire implique d'initier une prise de conscience propre de l'individu et une impression de revivre intégralement « la scène », avec tous les détails et l'émotion du moment. C'est cet état de conscience particulier que Tulving a dénommé « conscience autooétique » (Tulving et Markowitsch, 1997 ; 1998). Cette notion fait référence à la prise de conscience par le sujet de sa propre identité au sein d'un va et vient incessant du passé, au présent et au futur. La conscience est nécessaire pour la démonstration de l'existence de la mémoire épisodique. La compréhension de cette conscience s'exprime le plus souvent au travers d'un langage, ce qui ne peut être démontré chez l'animal.

Cependant, les animaux possèdent une mémoire épisodique élémentaire. De nombreux travaux, dont l'objectif est de modéliser la mémoire épisodique en la réduisant à ses caractéristiques les plus simples, ont été développés. On parle alors de mémoire « episodic-like » (Clayton et Dickinson, 1998 ; Morris, 2001 ; Babb et Crystal, 2006) dans laquelle le contenu de la mémoire épisodique (quoi, où, quand ?) peut être évalué chez l'animal d'un point de vue comportemental (Crystal, 2009). S'il est difficile de démontrer expérimentalement l'existence d'un voyage mental dans le temps chez l'animal, on peut cependant étudier la mémoire de type épisodique à partir des attributs contextuels de l'information intégrant les natures d'objet, de lieu et de temps : what, where et when. What = qu'est ce qui s'est produit durant l'épisode ?, where = où l'événement unique a-t'il pris place ? et when = quand l'épisode est-il arrivé ?). L'intérêt de cette définition est que le rappel et l'intégration d'un événement unique reposant sur ces trois caractéristiques peuvent être démontrés expérimentalement chez l'animal (Griffiths et al, 1999). La composante temporelle est considérée comme un facteur crucial qui permet l'ancrage d'un événement particulier dans un contexte temporel particulier, se distinguant d'autres événements similaires produits à des moments différents (Clayton et al, 2001). Dans leur étude, Clayton et Dickinson (1998) ont travaillé chez le geai. Dans cette expérience, la nourriture était dissimulée dans des boîtes de rangement localisées distinctement. L'animal avait le choix entre deux types de nourriture : des arachides, ou des vers. Les geais étaient répartis selon deux groupes : un groupe « dégradé » dans lequel les geais devaient apprendre que le vers était périssable et ainsi choisir les arachides (délai de 124 h après acquisition) et le groupe « non dégradé » dans lequel les geais préféraient les vers aux arachides (délai de rappel 4 h après l'acquisition). En fonction du délai, les résultats de cette étude ont montré que le geai préférait le vers (au délai

court) aux arachides (au délai long) et inversement lorsque le vers n'était plus comestible. Ainsi, ces données suggèrent que le geai est sensible au « what » (choix du type de nourriture), au « where » (choix spatial de la localisation de la nourriture), ainsi qu'au « when » (choix temporel). De même, des études menées chez le rongeur ont adopté l'approche de Clayton et Dickinson. Ainsi, Dere et ses collaborateurs (2006) ont évalué la mémoire « episodic-like » chez la souris. Afin d'évaluer une mémoire intégrant le « what, le where et le when », ces auteurs utilisent un test d'exploration d'objets. Ce test est combiné à différents paradigmes de préférence à la nouveauté afin d'évaluer la reconnaissance d'objet, la localisation de l'objet et l'ordre temporel d'apparition des objets. Dans cette étude, les animaux sont soumis à deux essais chacun et à une phase test. Dans le premier essai, la souris est placée au centre de la boîte, contenant quatre objets identiques placés dans une configuration spatiale triangulaire. Un objet est placé au centre de la paroi nord de la boîte (CN), un autre au centre de la paroi sud (CS), un dans le coin sud-est (SE) et le dernier dans le coin sud-ouest (SO). Après un délai de 50 minutes, les animaux sont soumis au deuxième essai identique au premier à l'exception que quatre nouveaux objets sont placés dans la boîte selon une configuration quadratique (les quatre objets sont répartis dans chaque coin de la boîte : au nord-est (NE), nord-ouest (NO), au sud-est (SE) et au sud-ouest (SO)). Enfin, après un délai de rétention de 50 minutes, la phase test est réalisée. Dans cette phase, les objets sont placés selon une configuration quadratique avec deux objets identiques de l'essai 1 placés au NE et au SW (nommés « objets familiers ») et deux objets identiques de l'essai 2 placés au NO et au SE (nommés « objets récents»). Les résultats de cette étude ont montré que les souris sont capables de reconnaître des objets explorés préalablement, de se souvenir de la localisation de l'objet et de discriminer la récence de présentation des objets. Cette étude suggère que la souris est sensible au « what, where et when ». Ainsi, ces différentes études mettent en avant des critères comportementaux objectifs de la mémoire épisodique chez l'animal.

La mémoire sémantique, quant à elle, fait référence aux connaissances qu'un individu possède sur le monde qui l'entoure, connaissances incluant le langage et les caractéristiques associatives fonctionnelles des mots et des concepts. C'est ce système qui nous permet, par exemple, de savoir que la capitale de la France est Paris. Son contenu est par définition décontextualisé. Cette mémoire est évoquée de façon consciente et ne met pas en jeu d'indexation spatio-temporelle. De par son caractère conscient, ce processus mnésique appartient au registre de la mémoire déclarative.

C) Le modèle de Squire

En 1992, Squire propose un modèle dichotomique de la mémoire basé sur des observations menées chez l'homme et l'animal (Squire, 1992). Le premier système de mémoire déclarative, centré hippocampe, reprend l'idée selon laquelle une opération mentale X peut être associée à une structure cérébrale clé (ou à un réseau de structures) Y dépositaire de la fonction X, l'ensemble XY forme un « système cognitif ». La MLT est divisée en deux sous-systèmes majeurs. Le premier système est la mémoire déclarative (explicite et relationnelle). C'est une mémoire accessible à la conscience. Elle dépend essentiellement de l'intégrité du lobe temporal médian (hippocampe) et regroupe la mémoire sémantique (des connaissances générales) et la mémoire épisodique. Le second système est la mémoire non déclarative (ou implicite). Elle représente quant à elle un système très hétérogène qui regroupe un grand nombre d'apprentissages inconscients (habitudes, conditionnement classique et l'amorçage), sous-tendus par diverses opérations cognitives très différentes dont le seul point commun est qu'elles ne dépendent pas de l'hippocampe (figure 1).

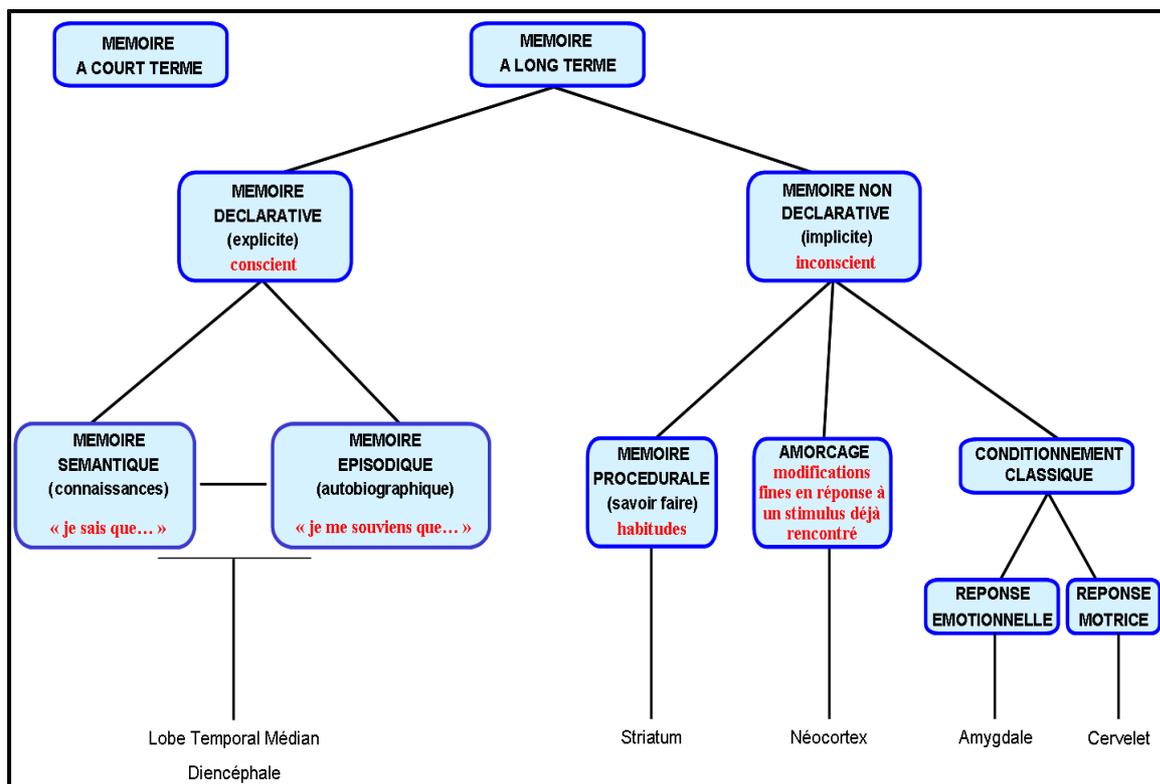


Figure 1 : Classification dichotomique des systèmes de mémoire.

Cette classification associe à chaque type d'opération une structure cérébrale impliquée dans l'encodage de l'information (adaptée de Squire et al, 2004).

Ce modèle repose sur les caractéristiques des informations à stocker et sur l'intégrité des structures nécessaires à l'encodage des informations. Cette classification présente l'avantage de rapprocher des données biologiques et neuropsychologiques, c'est d'ailleurs pour cela qu'elle reste l'une des références les plus citées. Malgré tout, Squire centre son modèle sur une dépendance étroite entre la mémoire déclarative et le lobe temporal médian. De plus, les interactions entre les différents systèmes de mémoire sont peu considérées.

D) Le modèle de Tulving

La théorie de Squire suppose un fonctionnement unitaire des mémoires épisodique et sémantique dans la mesure où l'élaboration de nouvelles connaissances sémantiques est impossible si la mémoire épisodique est altérée. Contrairement à Squire, Tulving estime que les mémoires sémantique et épisodique ne peuvent être regroupées au sein d'un même système unitaire. En 1995, Tulving aboutit à un modèle d'organisation de la mémoire humaine fondé sur cinq systèmes de mémoire : le modèle Sériel Parallèle et Indépendant (SPI : figure 2), dans ce modèle, l'encodage des informations est effectué de façon sérielle (l'encodage dans un système dépend de la qualité de l'encodage dans le système inférieur), aboutissant à un stockage en parallèle où les mêmes informations peuvent être contenues dans plusieurs systèmes en même temps. Ainsi, la récupération des items se ferait dans le système le plus adapté de manière indépendante des autres systèmes. Ce modèle postule qu'au moment de l'encodage le système sémantique, dépendant des régions parahippocampiques, serait sollicité avant le système épisodique dépendant de l'hippocampe. Cette théorie permet ainsi d'expliquer les cas d'amnésie asymétrique.

Pour perfectionner son modèle, Tulving s'est appuyé sur le travail de Vargha-Khadem et ses collaborateurs (Vargha Khadem, 1997) qui ont mené une étude sur trois jeunes amnésiques souffrant d'une amnésie antérograde causée par une atteinte précoce bilatérale de l'hippocampe. Cette étude a permis de dégager trois principaux résultats. Tout d'abord, tous les patients ont de grandes difficultés à se souvenir des expériences et événements personnels vécus. Ensuite, ces patients ont fait preuve d'une intelligence normale et ont réussi normalement à l'école, ce qui suggère qu'ils ont pu acquérir de nouvelles connaissances (concrètes ou abstraites). Enfin, les examens radiologiques ont révélé une pathologie hippocampique bilatérale plus ou moins sévère, alors que les régions parahippocampiques semblaient préservées. Cette étude démontre que l'hippocampe est nécessaire pour le

stockage et le rappel d'expériences vécues (mémoire épisodique) mais non pour la mémoire sémantique, qui implique les régions du lobe temporal médian.

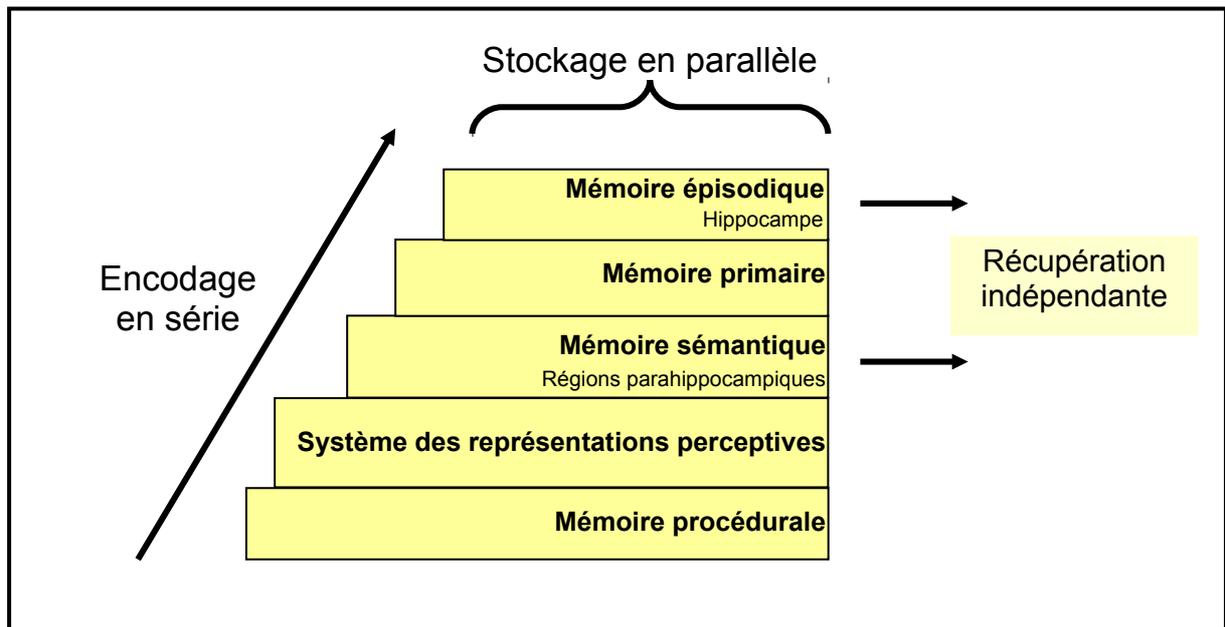


Figure 2 : Le modèle de Tulving (SPI : Sériel parallèle et Indépendant) (adapté de Tulving 2002)

E) Interactions entre les systèmes de mémoire

Comme déjà évoqué, un grand nombre d'études ont mis en évidence l'existence de plusieurs systèmes de mémoire distincts, montrant une perte sélective d'aptitudes suite à des lésions cérébrales. Le patient H.M., malgré son amnésie antérograde, était capable d'acquérir des capacités motrices ne faisant pas appel à un rappel conscient. Au contraire, les lésions au niveau des ganglions de la base ou du cervelet (Maladie de Parkinson, Chorée de Huntington) perturbent les apprentissages procéduraux tout en préservant les capacités de mémoire déclarative (Packard et Knowlton, 2002).

Des données expérimentales suggèrent des interactions fonctionnelles entre systèmes de mémoire (Jaffard et Meunier 1993, White et McDonald 2002). Chez l'animal, des recherches pour identifier les structures cérébrales qui sous-tendent la mémoire déclarative et non déclarative ont été menées. Par des techniques lésionnelles localisées, des études ont permis d'identifier le rôle du lobe temporal et de l'hippocampe (Jarrard, 1993 ; Squire et Zola, 1996 ; Célérier et al, 2004). Les résultats obtenus chez le singe ont montré que l'atteinte des cortex rhinal et para-hippocampique, situés à l'interface entre l'hippocampe et les aires sensorielles corticales, induisait de profonds

déficits dans une tâche de reconnaissance différée d'objets, alors que l'atteinte strictement limitée à l'hippocampe produisait des déficits plus modérés (Gerlai, 1998). Suite à ces travaux, il est apparu que l'ensemble du système du lobe temporal interne, et notamment les cortex rhinal et para-hippocampique, formait un ensemble critique lors du maintien à long terme des informations (Squire, 1992). Dusek et Eichenbaum (Dusek et Eichenbaum, 1997) ont mis en évidence dans une tâche de discrimination d'odeurs que l'hippocampe avait pour rôle de coder les représentations relationnelles entre stimuli. Cependant, cette structure n'était pas requise lors de l'apprentissage d'associations simples. Par ailleurs, l'hippocampe et l'amygdale sont décrits comme soutenant respectivement l'intégration de la nature de l'information (objet-place) et l'état émotionnel évoqué par ces informations (objet-récompense) (Rolls et al, 1989). Enfin, des études menées sur des rongeurs soumis à des stratégies conflictuelles ont été élaborées. Le conflit pouvait être résolu par la mise en place d'une stratégie spatiale/relationnelle (hippocampe-dépendante) ou de guidage (striatum dorsal-dépendante). Les animaux lésés au niveau de la formation hippocampique présentent une stratégie de guidage, alors que les animaux porteurs d'une lésion du striatum dorsolatéral répondent en suivant une stratégie spatiale/relationnelle (Devan et White, 1999). Lorsque deux structures sont en compétition pendant un apprentissage, l'inhibition de l'une favorise le fonctionnement de l'autre (White et McDonald, 2002 ; Martel et al, 2007).

Dans leur modèle, White et McDonald (White et McDonald, 2002) décrivent la théorie des systèmes de mémoire « multiples et parallèles » (Multiple Parallel Memory System) selon laquelle les systèmes de mémoire sont comme des structures neuronales interconnectées. Cette théorie postule que dans toutes les situations où un apprentissage peut être effectué, chaque système centré soit sur l'hippocampe, soit sur le striatum dorsal, soit sur l'amygdale, reçoit des informations similaires mais traite les situations selon des principes opératoires différents. En fonction de la situation, la réponse de l'animal se basera sur les relations spécifiques entre les événements présents (hippocampe : stimulus-stimulus, striatum dorsal : stimulus-réponse, amygdale : stimulus-renforcement). Ces auteurs suggèrent, par l'analyse des connexions anatomiques des structures, une interaction entre ces différents systèmes. En effet, des connexions directes ou indirectes existent au sein même de ce réseau de trois structures (par ex : le noyau basolatéral de l'amygdale projette sur l'hippocampe et sur le striatum dorsal, le striatum dorsal est à la fois en contact avec l'hippocampe et l'amygdale via un relais dans le striatum dorso-médian) ainsi qu'avec le cortex préfrontal. Ces interactions neuroanatomiques confortent l'idée selon laquelle il existerait des interactions coopératives et/ou compétitives entre ces réseaux lors de l'acquisition (Baudonnat et al, 2012).

F) Une structure clé : l'hippocampe

1) Situation et cytoarchitecture de l'hippocampe :

D'un point de vue anatomique, l'hippocampe du rongeur n'est pas similaire à celui de l'Homme. En effet, chez le rongeur on distingue l'hippocampe dorsal (HD) de l'hippocampe ventral (HV) alors que chez l'Homme on distingue l'hippocampe postérieur de l'hippocampe antérieur qui correspondraient respectivement à l'HD et l'HV du rongeur (Colombo et al, 1998). Le lobe temporal médian est composé de la formation hippocampique et des cortex parahippocampique et périrhinal, principales structures des entrées des informations provenant des aires associatives néocorticales. La formation hippocampique se compose de trois régions : le cortex entorhinal, l'hippocampe et le subiculum. Dans le cadre de notre travail nous ne détaillerons que l'hippocampe. Cette structure sous-corticale du système limbique est située à la croisée des structures néocorticales et diencephaliques. Sa position lui confère un rôle stratégique dans l'intégration des signaux extérieurs.

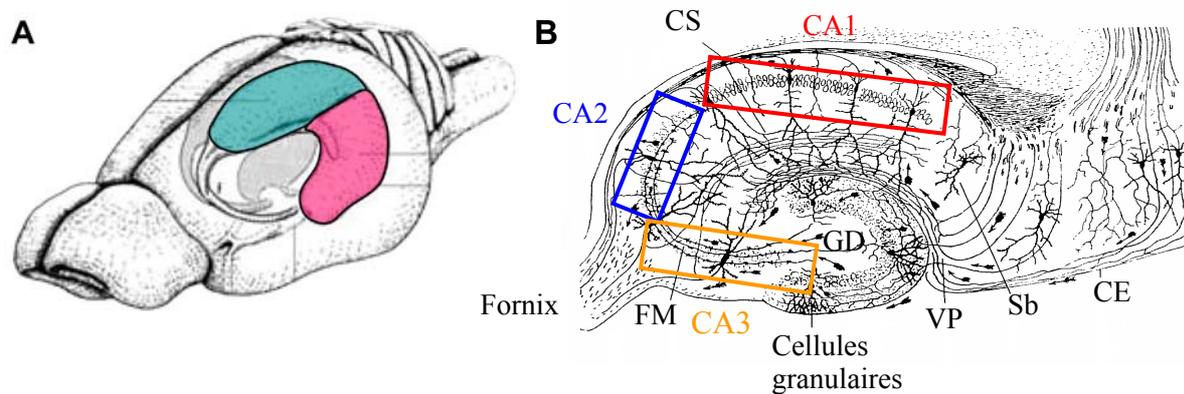


Figure 3 : Représentations schématiques de l'hippocampe chez la souris.

(A) Localisation de l'hippocampe dans le cerveau entier de rongeur (adapté de Amaral & Witter, 1995). Hippocampe dorsal (en vert) et hippocampe ventral (en rose)

(B) Connexions intra-hippocampiques du circuit trisynaptique en coupe frontale d'hippocampe (adapté de Ramon y Cajal, 1911)

CE : cortex entorhinal ; CS : collatérales de Schaeffer ; FM : fibres moussues ; GD : gyrus denté ; Sb : subiculum ; VP : voie perforante.

Chez le rongeur, sur une coupe sagittale, l'hippocampe s'étend à la manière d'un « C » le long de l'axe septo-temporal aussi appelé dorso-ventral (fig 3 A). En coupe frontale, l'hippocampe se compose de deux structures en forme de U inversé, définies comme le gyrus denté (GD) et la corne d'Ammon subdivisée en quatre champs : CA1, CA2, et CA3 (Figure 3 B) (Ramon y Cajal, 1911). Le GD se compose de trois couches : la couche moléculaire (constituée de prolongements dendritiques et axonaux, et d'interneurones GABAergiques), la couche granulaire (constituée de cellules granulaires et de neurones GABAergiques) et la couche polymorphique. La corne d'Ammon quant à elle, s'organise en couches semblables pour tous les champs et comprend une couche de cellules pyramidales sous laquelle se situe le stratum oriens et au dessus le stratum radiatum où se font les connexions collatérales CA3-CA1 via les fibres de Schaeffer.

2) *Les connexions extrinsèques et le circuit trisynaptique de l'hippocampe*

Les connexions extrinsèques de l'hippocampe sont de deux types : les afférences et les efférences. Les principales afférences hippocampiques proviennent du cortex entorhinal qui reçoit lui-même des projections des cortex périrhinal, piriforme, insulaire, préfrontal et rétrosplénial. A son tour, le cortex entorhinal émet des projections vers le GD, via la voie perforante (en partie constituée de projection axonales), mais aussi vers le CA3 (via les fibres moussues) et le CA1. C'est par ces voies que l'hippocampe va recevoir la majeure partie des informations en provenance des aires sensorielles. Par ailleurs, ces champs reçoivent directement des afférences GABAergiques et cholinergiques provenant du septum, noradrénergiques du locus coeruleus, et sérotoninergiques des noyaux du raphé. Plus spécifiquement, le CA1 reçoit des afférences thalamiques et amygdaliennes (noyau basolatéral) (Pikkarainen et al, 1999 ; Pitkanen et al, 2000).

Les principales voies efférentes de l'hippocampe sont au nombre de deux. Le subiculum, qui reçoit des projections en provenance du CA1, projette à son tour sur différentes aires corticales tels que les cortex orbito-frontal médian et entorhinal. L'autre voie efférente est le fornix qui est constitué par les axones des cellules pyramidales hippocampiques. Le fornix permet ainsi le transit des informations de l'hippocampe vers des structures telles que le septum et l'hypothalamus (Chronister & White, 1975). Le champ CA1 projette directement sur des structures sous-corticales (noyau septal latéral, CA3, le noyau accumbens, l'hypothalamus et amygdale).

Les connexions intrahippocampiques, aussi appelées circuit trisynaptique, présentent la particularité de n'être composées que de connexions unilatérales (fig 3 B). Les cellules granulaires du GD reçoivent des entrées du cortex entorhinal et projettent sur les cellules pyramidales du CA3. Le CA3 projette à son tour sur les cellules principales du CA1 via les collatérales de Schaeffer. Enfin, le cortex entorhinal projette aussi directement sur le CA3 et le CA1 qui est le seul à projeter directement sur le cortex entorhinal.

3) *L'hippocampe : aspect cognitif et émotionnel*

En 1978, O'Keefe et Nadel ont suggéré que l'hippocampe jouait un rôle dans l'encodage et le maintien de l'information de nature exclusivement spatiale. Selon cette théorie, le système hippocampique de mémoire est spécialisé dans l'acquisition et le maintien en mémoire d'une carte cognitive, cette dernière étant une représentation qui intègre les

stimuli, de même que les angles et les distances entre ces stimuli (Nadel, 1991 ; O'Keefe, 1991). La carte cognitive est basée sur l'espace allocentrique ne dépendant pas de l'orientation corporelle de l'animal ou de sa position dans l'espace, et fournit un moyen flexible de traiter l'information spatiale et de guider les déplacements dans l'environnement. Olton et ses collaborateurs (Olton et al, 1979) proposaient plutôt la théorie de la mémoire de travail. Elle postule que l'hippocampe sous-tend un maintien à court terme, de capacité limitée, de tous les types d'informations.

Ces théories sont issues principalement des tâches du labyrinthe aquatique de Morris (Morris et al, 1982) et du labyrinthe radial (Olton et al, 1979). L'existence dans l'hippocampe de cellules de lieu (« place cells »), qui déchargent en fonction de la position de l'animal dans l'espace, appuie l'hypothèse de la carte cognitive (O'Keefe et Dostrovsky, 1971 ; O'Keefe, 1999).

Certains auteurs soutiennent encore fortement la théorie de la carte cognitive (O'Keefe, 1999). Toutefois, l'hippocampe joue, chez l'animal et l'Homme, un rôle qui n'est pas limité à la mémoire spatiale et qui est beaucoup plus général (Buzsaki, 2005).

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, de par ses connexions et ses caractéristiques anatomiques, l'hippocampe est une structure clé pouvant jouer un rôle important en tant qu'administrateur ou de lien entre les différents systèmes de mémoire décrits précédemment. Il est important de déterminer le degré de dépendance entre les mémoires épisodiques et sémantiques. Dans leur théorie, Squire et Knowlton (1995) mettent en évidence une forte inter-dépendance entre la mémoire sémantique et épisodique. En effet, la mémoire épisodique permettrait la construction de la mémoire sémantique. Ainsi, cette dernière est le résultat d'une accumulation d'épisodes qui, par répétition, deviennent indépendants d'une contextualisation, que ce soit en terme spatial ou temporel.

Pour Eichenbaum et Squire, l'hippocampe est nécessaire pour la mise en œuvre de la mémoire épisodique et de la mémoire sémantique car ces deux systèmes de mémoire supposent un traitement de l'information de type relationnel (Eichenbaum, 2003), qui consiste en la création de représentations d'événements vécus en un tout cohérent qui sont comparées, aux épisodes antérieurs pour chacune des caractéristiques qui les composent. Le réseau serait réactivé afin d'intégrer un nouvel épisode. Selon Eichenbaum (2001) l'hippocampe posséderait la capacité d'identifier les caractéristiques communes entre les épisodes, liant ensemble les caractéristiques épisodiques. Dans une tâche d'inférence transitoire pour rat basée sur la modalité olfactive, les animaux devaient choisir l'odeur associée à la récompense alimentaire (des céréales). Les stimuli étaient des épices (A : paprika, B : café, C : basilic, D :

cumin, E : cacao) mélangées à une dose de sable contenu dans une tasse. Les stimuli olfactifs étaient présentés par paires : AB, BC, CD, DE (le premier stimulus de chaque paire était récompensé). En creusant dans le sable, l'animal obtenait la récompense alimentaire lorsqu'il sélectionnait l'item approprié. Pendant la phase d'acquisition, l'animal apprenait à reconnaître par paire les stimuli associés à la récompense. Lors de la phase test l'animal était confronté à une paire d'odeurs qu'il n'avait pas rencontré (AE) ensemble dans la phase d'apprentissage. Les résultats ont montré que l'animal choisissait l'item A. En effet, lors de la phase d'acquisition, l'animal avait été confronté aux stimuli AB et DE où A était appâté et non E. Ainsi Dusek et Eichenbaum (1997) ont montré que les rats sont capables d'une organisation relationnelle flexible des informations déclaratives, caractéristique essentielle de la fonction hippocampique chez l'homme.

Outre son implication dans la mémoire déclarative certains auteurs ont montré l'implication de l'hippocampe dans les processus émotionnels. Une émotion peut être définie comme une réaction affective intense à un événement, associée à des perturbations transitoires de l'équilibre interne d'un organisme. Elle se manifeste par un ensemble de réactions complexes comprenant des réactions comportementales, des réponses physiologiques (neurovégétatives) et une sensation subjective (le ressenti de l'individu) (Dantzer, 1988; Belzung, 2007). Historiquement, le lien entre l'hippocampe et l'émotion remonte à la découverte du circuit limbique de Papez (1937), qui tenait une place importante dans le contrôle des émotions.

En 1949, MacLean propose d'élargir le circuit de Papez dans un système composé de trois parties, mettant en évidence le rôle central de l'hippocampe (structure appartenant au système limbique). D'une part, MacLean propose le « cerveau reptilien » incluant le complexe striatal et les ganglions de la base ayant pour fonction de contrôler les émotions dites primaires (peur, agression...). D'autre part, le cerveau « ancien » (« cerveau viscéral » ; composé du thalamus, de l'hippocampe, du cortex cingulaire, de l'amygdale et du cortex préfrontal) sous-tend les émotions sociales plus évoluées (peur, anxiété...). Finalement, le « nouveau » cerveau, (apparu le plus tardivement au cours de l'évolution chez les mammifères) incluant exclusivement les zones néocorticales, aurait comme fonction le contrôle cognitif des émotions. MacLean a été le premier à proposer que les émotions impliquent l'intégration des informations d'origine somatique au niveau central.

Gray et McNaughton (2000) ont confirmé les observations de Mac Lean. Ils ont suggéré que l'hippocampe était impliqué dans les états émotionnels. L'état émotionnel est un

facteur qui a été proposé pour tenir compte des variabilités dans les capacités d'apprentissage et de mémoire chez les animaux (de Quervain et al, 2003).

4) *Dissociation fonctionnelle hippocampique*

Une partie de la littérature considère l'hippocampe comme une structure purement cognitive et une autre partie comme une structure régulatrice des émotions. D'un point de vue anatomique et fonctionnel l'hippocampe peut être subdivisé en deux principales régions : la région dorsale et ventrale (cf fig 3 A).

Moser et Moser (1998) ont mis en évidence que l'hippocampe ne serait pas une structure unitaire mais posséderait des fonctions distinctes le long de son axe longitudinal (dorso-ventral chez le rongeur et antéro-postérieur chez le primate et l'Homme). L'HD et l'HV possèdent des afférences et des efférences bien distinctes avec le reste du cerveau. L'HD est principalement connecté avec le néocortex tandis que l'HV est principalement connecté avec les structures sous-corticales (amygdale et hypothalamus) (figure 4)

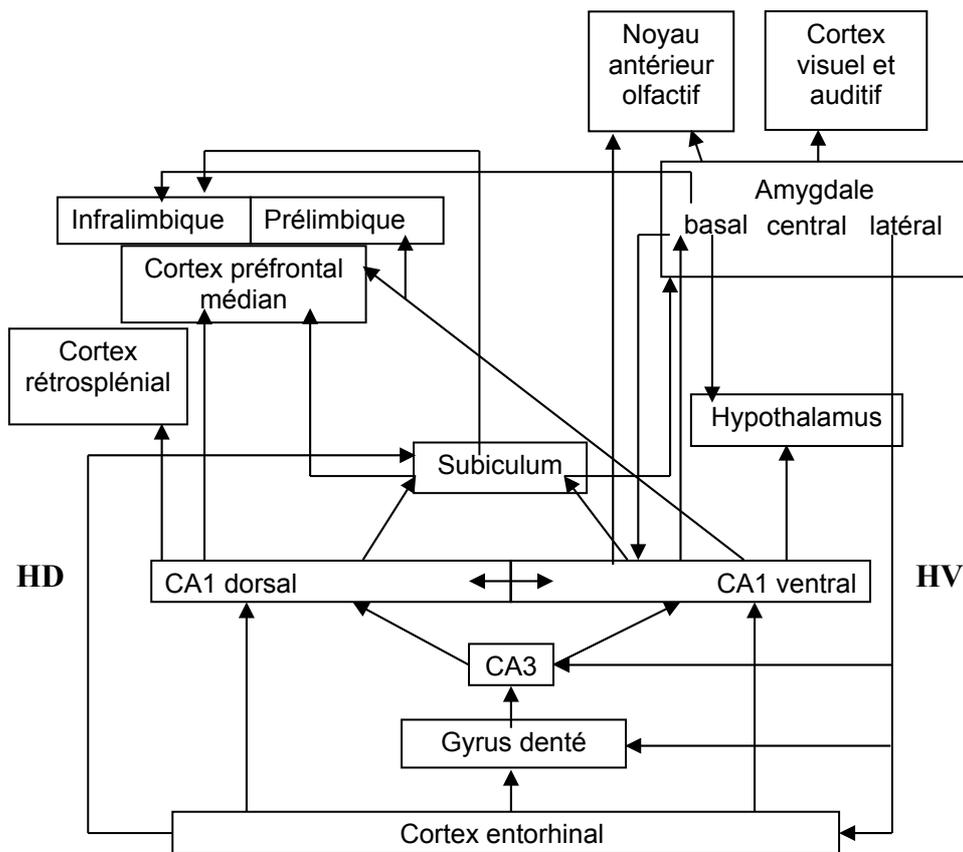


Figure 4 : Schéma récapitulatif des principales connexions de l'HD et de l'HV.

(D'après Pikkariainen et al, 1999 ; Pitkänen et al, 2000 ; Chiba, 2000; Ishikawa et Nakamura, 2003, 2006 ; Vertes, 2004, 2006 ; Cenquizca et Swanson, 2007 ; Müller et al, 2012)

(a) Hippocampe dorsal

Des études comportementales ont mis en évidence la différenciation fonctionnelle entre HD et HV. Ainsi en 1984, Morris a montré qu'une lésion totale de l'hippocampe diminue les performances en mémoire spatiale dans une enceinte aquatique, sans affecter les aspects motivationnels et moteurs. Dans la même tâche comportementale, en lésant l'HD de rat, Moser et ses collègues ont montré que l'apprentissage spatial était perturbé. De plus, ces mêmes auteurs ont montré que les lésions hippocampiques ventrales sont sans effet sur l'apprentissage spatial (Moser et al, 1993 ; 1995). Par la suite, de nombreuses études ont examiné l'effet des lésions cytotoxiques de l'HD ou de l'HV sur l'apprentissage spatial dans

différents paradigmes. Ces résultats amènent les mêmes conclusions chez le rongeur et le primate : les lésions dorsales (hippocampe postérieur chez le primate), mais non les lésions ventrales (hippocampe antérieur chez le primate), perturbent l'encodage en mémoire spatiale (Moser et Moser, 1998 ; Hock et Bunsey, 1998 ; Bannerman et al, 1999 ; Pothuizen et al, 2004, Chauveau et al, 2008). Enfin, des études électrophysiologiques de la PLT ont validé la dissociation fonctionnelle entre l'HD et l'HV. En effet, en condition normale, les neurones CA1 de l'HV sont moins excitables que les neurones de l'HD (Maggio et Segal, 2009a). Cependant, cette tendance peut être inversée par une exposition à un agoniste des récepteurs glutamatergiques métabotropiques, une administration de corticostérone ou un stress (Maggio et Segal, 2007a,b ; Segal et al, 2010 ; Maggio et Segal, 2012). L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en lumière une différenciation fonctionnelle entre HD et HV, et notamment le rôle majeur de l'HD dans l'apprentissage et la mémoire spatiale.

(b) Hippocampe ventral

Emotion

De nombreuses études concordantes mettent en évidence le rôle de l'HV dans les processus émotionnels (Donley et al, 2005 ; McEown et Treit, 2009, 2010). En effet, Kjelstrup et al (2002) ont démontré que la lésion de plus du quart de l'hippocampe ventral, chez le rongeur, augmente les entrées dans les bras ouverts d'un labyrinthe en croix surélevé et diminue l'émission de fèces (index d'anxiété) dans une pièce fortement éclairée, ce qui est cohérent avec une réduction de l'anxiété (Calfa et al, 2007 ; Hunsaker et al, 2008 ; McHugh et al, 2011). Bannerman et ses collaborateurs (2003) suggèrent que l'HV modifie le comportement exploratoire dans une boîte claire/obscur. Ces auteurs ont montré qu'une lésion de l'HV chez le rat lui permet de se diriger plus rapidement du compartiment éclairé vers le compartiment sombre. De plus, les animaux porteurs d'une lésion de l'HV défèquent moins que les animaux contrôles dans l'«open field». Cependant, cette lésion n'affecte pas l'apprentissage spatial, que ce soit dans la piscine de Morris ou bien dans le labyrinthe en T (Bannerman et al, 2003). Fanselow et Ding (2010) ont montré que l'expression de gènes était accrue d'une part dans l'HD lors d'épreuve cognitive et d'autre part dans l'HV dans des épreuves à fortes composante émotionnelle. Selon Segal et ses collaborateurs (2010), le stress favoriserait un circuit impliquant l'HV. En effet, durant et après un événement stressant, les

efférences dorsales sont moins excitables et la voie ventrale connectant l'hippocampe à l'amygdale et l'hypothalamus serait dominante (figure 5) (voir également Vouimba et al, 2011)

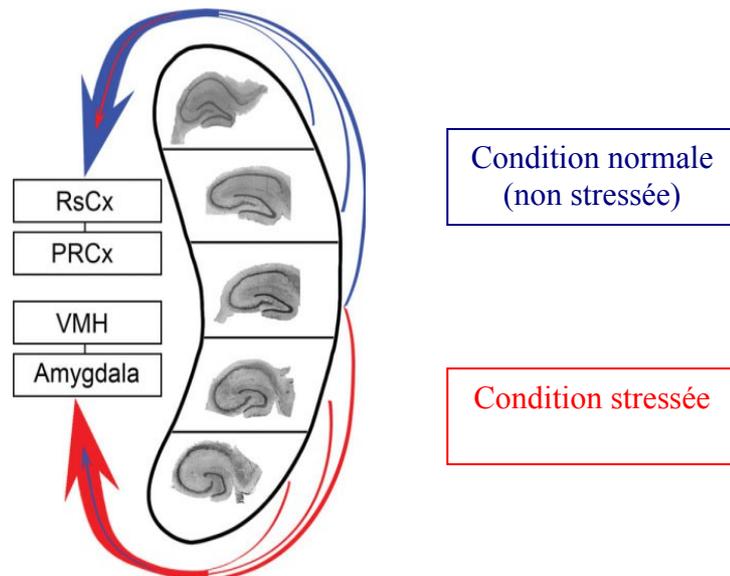


Figure 5 : Schéma illustrant les principales efférences de l'hippocampe en conditions de référence ou de stress.

Légende : RsCx : cortex retrospinal ; PRCx : cortex préfrontal ; VMH : noyau ventromédian hypothalamique ; amygdale (Adapté de Segal et al, 2010)

Mémoire spatiale

L'HV ne serait pas seulement dédié aux processus émotionnels. En effet, dans une étude électrophysiologique, Poucet et ses collaborateurs (1994) ont montré l'implication de l'HV dans le comportement spatial. Les principaux résultats établissent l'existence de cellules de lieu au sein de l'HV. Ces cellules possèdent des propriétés électrophysiologiques similaires à celles des cellules de lieu présentes dans l'HD. De fait, une étude a démontré, par l'enregistrement de l'activité neuronale, que les cellules de lieu sont présentes dans tout le CA3. Dans cette expérience, des rats devaient se déplacer le long d'une poutre de 18 mètres

et les cellules s'activaient de façon linéaire de l'HD (entre 1 mètre et 10 mètres) vers l'HV (à plus de 10 mètres) (Kjelstrup et al, 2008).

Ces résultats démontrent que l'intervention de l'HV n'est pas réduite aux seuls états émotionnels. En effet, l'HV est nécessaire à l'encodage, la consolidation et au rappel d'informations en mémoire spatiale (Wiltgen et al, 2010 ; Loureiro et al, 2012).

II) NEUROPSYCHOBIOLOGIE DU STRESS

A) Théories sur le stress

Le mot stress vient du latin « stringere » qui signifie mettre sous tension. Le stress est défini comme étant une réponse de l'organisme aux facteurs d'agressions physiologiques et psychologiques ainsi qu'aux émotions (positives et négatives) qui nécessitent une adaptation.

A ses débuts, le concept de stress était limité à l'idée de réaction biologique. En 1872 Darwin considérait que la peur avec toutes ses manifestations permettait de préparer l'organisme à faire face au danger. A la fin du 19^e siècle, Claude Bernard a fait la distinction entre le milieu intérieur (intra-organique) et extérieur (extra-organique) entre lesquels il existe des rapports nécessaires d'échange et d'équilibre. Selon lui, « la fixité du milieu intérieur est la condition de vie libre, indépendante » où toutes les réactions du sujet n'ont pour but que de maintenir les constantes du milieu intérieur.

Au début du 20^e siècle Walter Cannon (1928) désigna la « stabilité du milieu intérieur » par le concept « d'homéostasie ». Par ailleurs, il emploie le mot « stress » pour désigner les agressions susceptibles de perturber l'homéostasie en mettant en avant l'importance du rôle du système nerveux central (région hypothalamique et néocorticale) dans la régulation de l'homéostasie. Selon Cannon, le système nerveux central réagit de manière spécifique au stimulus du stress pour mettre en œuvre la réponse appropriée. C'est la réaction d'alarme qui mène à la mobilisation de l'organisme pour lutter ou fuir (fight or flight), face à la contrainte extérieure.

En 1936, Hans Selye définit le stress comme « la réponse non spécifique de l'organisme à toute demande qui lui est faite ». La réponse au stress n'est pas une réponse qui dépend de la nature de la stimulation mais une réponse identique visant à rétablir l'équilibre homéostatique. Selye désigne le stress comme un « syndrome général d'adaptation » (SGA) dans lequel la réponse comporte trois phases. Dans un premier temps, l'organisme est soumis

à une réaction d'alarme durant laquelle il mobilise ses ressources (la sécrétion d'hormones et neuromédiateurs par exemple) pour lutter contre les agents stressants. Si le stimulus persiste, on assiste à une phase de résistance où l'organisme met en place une réaction adaptative jusqu'au stade d'épuisement ou de retour à l'état normal. Selye élabore, à partir de nombreuses expériences menées chez le rat, la première théorie complète du stress médical dans lequel le « stress est indispensable à la vie et l'absence de stress induit la mort ». Cette phrase traduit la connotation positive du stress (réponse adaptée de l'organisme), que Selye nommera « eustress ») mais également négative (les conséquences du stress inadapté ou « distress » ou stress dépassé). Ces travaux ont mis en évidence l'implication d'un système composé de l'hypothalamus et des glandes surrénales : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). Néanmoins, Selye démontre la non-spécificité de la réponse au stress.

Les réponses émotionnelles sont nécessaires pour initier les stratégies comportementales face aux événements aversifs (Sapolsky, 1999). La réponse de l'organisme à un agent stressant est complexe car elle résulte d'un ensemble de modifications physiologiques et psychologiques. Des études menées chez la souris ont montré que chaque individu sera plus ou moins vulnérable au stress, selon son vécu, la valeur émotionnelle qu'il attribue à une expérience, son âge et son sexe (Hall et Symonds, 2006 ; Brinks et al, 2007 ; Gross et al, 2012 ; Riggins et al, 2012).

En d'autres termes, un organisme va privilégier certains types de réponses face à un agent stressant. En effet, selon Joëls et Baram (2009), différents agents stressants induisent différentes réponses ce qui est en contradiction avec le syndrome général d'adaptation de Selye dans lequel la réponse ne dépend pas du stresser. Ces comportements induits par le stress vont permettre à l'organisme de réduire ou d'éliminer les effets négatifs d'un agent stressant.

Pour conclure, le concept de stress est une notion multidimensionnelle où les émotions ont une part active dans la mise en œuvre de la réponse à un agent stressant. Nous terminerons sur une des définitions les plus actualisées du stress donnée par McEwen (2000) : « le stress peut être une menace réelle ou interprétée de l'intégrité physiologique et psychologique d'un individu qui résulte d'une réponse physiologique et/ou comportementale ».

B) Complexité de la réponse au stress

La réponse au stress est complexe et met en jeu des composantes d'ordre physiologique, psychologique, comportemental, et cognitif (Steckler, 2005 ; Roozendaal et al, 2009).

Au plan physiologique, les processus mis en jeu lors d'un stress sont non conscients (cerveau reptilien) par exemple : une piloérection, la transpiration, l'augmentation du rythme cardiaque, l'activation de l'axe corticotrope et l'intervention de nombreux neurotransmetteurs (Sandi et Pinelo-Nava, 2007 ; Joëls et Baram, 2009).

Au plan psychologique, des études menées chez le singe ont démontré l'importance de l'impact psychologique dans une expérience menée sur deux groupes de singes qui n'avaient pas été nourris pendant une courte période. Dans le premier groupe, les singes étaient seuls alors que dans le second, les singes pouvaient voir d'autres singes être nourris. Bien que les deux groupes aient subi le même stress physique dû à la faim, les singes du second groupe présentaient une élévation de glucocorticoïdes supérieure ainsi qu'une agitation comportementale plus importante que le groupe de singes isolés, chez lesquels l'aspect psychologique était masqué (Mason et al, 1961). Dans une étude réalisée chez le rat, Levine (2000) a montré qu'un rat ayant appris à associer un goût induisant un malaise gastrique (le lithium) montre une forte élévation de glucocorticoïdes lorsqu'il est forcé de boire cette solution. Cette activation disparaît s'il peut choisir entre cette solution et une autre qui lui paraît sans danger.

Une réactivité émotionnelle et une évaluation cognitive s'avèrent cruciales dans l'ajustement de la réponse adaptative face aux stimulations de l'environnement (Karazek, 1979 ; Lazarus, 1999). Le stress psychologique est déterminé par la perception individuelle de la relation spécifique avec l'environnement. Cette perception résulte de facteurs émotionnels, personnellement vécus (facteurs contextuels ou environnementaux). La seule prise en compte des prédictors (variables personnelles et environnementales) ne suffit pas à expliquer les conséquences sur la santé, sur le bien être et sur le comportement des individus.

A) Les principaux neuromédiateurs du stress

La réponse adaptative au stress est possible grâce à l'action combinée de nombreux circuits neuronaux centraux et périphériques avec la libération de « médiateurs du stress » (Joëls et Baram, 2009). Ces molécules médiatrices peuvent être réparties selon trois principales catégories : les neurotransmetteurs (monoamines), les neuropeptides

(corticolibérine) et les hormones stéroïdiennes (cortisol ou corticostérone). L'intervention de chaque classe se caractérise par la fenêtre temporelle de son action et la structure cérébrale ciblée.

La libération des monoamines (adrénaline, dopamine et sérotonine) implique l'activation rapide du système nerveux sympathique en réponse à un événement stressant. Une augmentation de la libération de monoamines après un stress a été démontrée dans l'hippocampe (Robertson et al, 2005), l'amygdale (Roozendaal et al, 2009), et le cortex préfrontal (Jackson et Moghaddam, 2004). La libération des monoamines se produit quelques minutes après l'événement stressant. Elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs couplés à la protéine G (Joëls et Baram, 2009). De plus, chaque monoamine contribue à des aspects comportementaux de la réponse immédiate au stress. Lorsque les niveaux d'adrénaline augmentent, un changement d'orientation de l'attention s'opère. En effet, le focus attentionnel ne porte plus sur l'information sensorielle mais sur l'environnement général. Cette stratégie traduit une meilleure adaptabilité face à une situation stressante (Aston-Jones et Cohen, 2005). La dopamine libérée dans le cortex préfrontal lors d'un stress modéré permet l'évaluation du danger de la situation, conduisant ainsi au choix de la stratégie optimale pour faire face à la situation stressante (Goto et al, 2007). La sérotonine est déterminante dans la réduction des états anxieux et dépressifs (Adamec et al, 2008). Collectivement, les monoamines permettent donc la mise en place de stratégies comportementales favorisant l'adaptation immédiate au stress.

Des neuropeptides sont également libérés suite à un stress dans des populations de neurones spécifiques contribuant, par l'activation de nombreux récepteurs, à la réponse au stress. Le tableau 1 résume des exemples de neuropeptides libérés en réponse à un stress au sein du système nerveux central.

Neuropeptides	Localisation	Fonctions liées au stress
Corticolibérine (CRH)	Amygdale (noyau central)	Stress/ mémoire émotionnelle, anxiété
	Locus cœruleus	Interaction avec le système noradrénergique
	Interneurones hippocampiques	Stress lié à l'apprentissage et à la mémoire
Vasopressine	Dendrites hypothalamiques	Stress et comportements sociaux
Orexine	Zone hypothalamique latérale	Stress lié à l'homéostasie énergétique et au sommeil

Tableau 1 : Neuropeptides libérés lors du stress. (D'après Gallagher et al, 2008 ; Muller et al, 2003 ; Valentino et Van Bochstaele, 2008 ; Blank et al, 2002 ; Raggendass, 2008)

La CRH est libérée quelques secondes à quelques minutes après un stress par les terminaisons axonales de l'éminence hypothalamique médiane. Ce neuropeptide agit sur les récepteurs de l'hypophyse, de l'hippocampe (Chen et al, 2001), de l'amygdale (Koob, 2008) et du locus cœruleus (Valentino et Van Bockstaele, 2008). La CRH exerce des effets modulateurs sur les neurones cibles quelques secondes après sa libération par l'intermédiaire de deux récepteurs couplés à la protéine G : le CRHR1 et le CRHR2. Lors d'un stress aigu, la libération de la CRH dans le noyau central de l'amygdale améliore le processus de consolidation mnésique (Roosendaal et al, 2002). Au sein de l'hippocampe, la libération de la CRH lors d'un stress modéré initie le phénomène de potentialisation à long terme ou PLT (Blank et al, 2002). Elle est impliquée dans les processus mnésiques (Wang et al, 1998).

Les glucocorticoïdes agissent sur les récepteurs cérébraux aux minéralocorticoïdes (MR) et glucocorticoïdes (GR) (cf partie III. B). Néanmoins, leurs principales actions sont restreintes aux structures cérébrales exprimant ces récepteurs : hippocampe, amygdale, cortex préfrontal, septum latéral, locus cœruleus et noyau parvocellulaire). Ces régions définissent un circuit impliqué dans les processus cognitifs, émotionnels et endocriniens, en réponse à des événements stressants.

Chacun des neuromédiateurs du stress est libéré selon une vague temporelle qui s'étend des secondes aux jours. Cependant, il ne faut pas considérer le découpage temporel comme figé. Les neuromédiateurs agissent de façon synergique au sein des différentes structures cérébrales.

B) De la maladaptation au stress aux pathologies

Toutes les dérégulations des systèmes de stress, par le biais de la désensibilisation de récepteurs hormonaux ou aux neurotransmetteurs, contribuent au développement d'une réponse inappropriée. Dans ce cas, l'organisme n'est plus en équilibre. Il en résulte une hyper ou une hypoactivité des systèmes nerveux central et périphérique. En raison de la large étendue d'action du système de stress, il est aisé de comprendre que ces dérégulations homéostatiques peuvent perturber la composition corporelle, entraîner des troubles comportementaux, endocriniens, métaboliques et cardiovasculaires et donc perturber la croissance et le développement.

Ces dérégulations conduisent au développement de maladies liées au stress. Des études menées chez l'Homme ont révélé une atrophie significative de l'hippocampe dans différentes maladies psychiatriques associées à des altérations mnésiques et une grande réactivité au stress : dépression (Vythiligam et al, 2004, Sawyer et al, 2012), anxiété (Bennett et al, 2008), schizophrénie (Heckers, 2001), syndrome de stress post-traumatique (Bremner, 2003 ; Bossini et al, 2007 ; Maller et al, 2007). En situation de stress chronique, une sécrétion prolongée de corticostéroïdes induit une hypercortisolémie qui endommage voire détruit les structures cérébrales. Ainsi, ce phénomène va engendrer une atrophie de la structure cible chez des patients souffrant de stress. En effet, un volume hippocampique plus petit est observé chez des patients atteints d'un syndrome de stress post-traumatique par rapport à des sujets sains (Tischler et al, 2006 ; Woon et al, 2010 ; Apfel et al, 2011 ; Golub et al, 2011 ; Admon et al, 2012). Il a également été observé que le stress occupe une place importante dans

l'apparition de troubles du comportement alimentaires. En effet, des animaux soumis à des situations stressantes ont montré une stimulation de leur prise alimentaire suite à un stress de faible intensité (Antelman, et al, 1975), ou bien une inhibition après administration d'un stress de forte intensité (Souquet et Fantino, 1993).

De manière générale, la réaction au stress n'est plus considérée comme une simple réponse limitée dans le temps, mais devient une réponse adaptative, dynamique, à la fois biologique et comportementale.

C) Principales structures cérébrales impliquées dans la réponse au stress

Le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'amygdale (figure 6) sont des structures sensibles au stress, impliquées dans les fonctions cognitives (apprentissage, la mémoire).

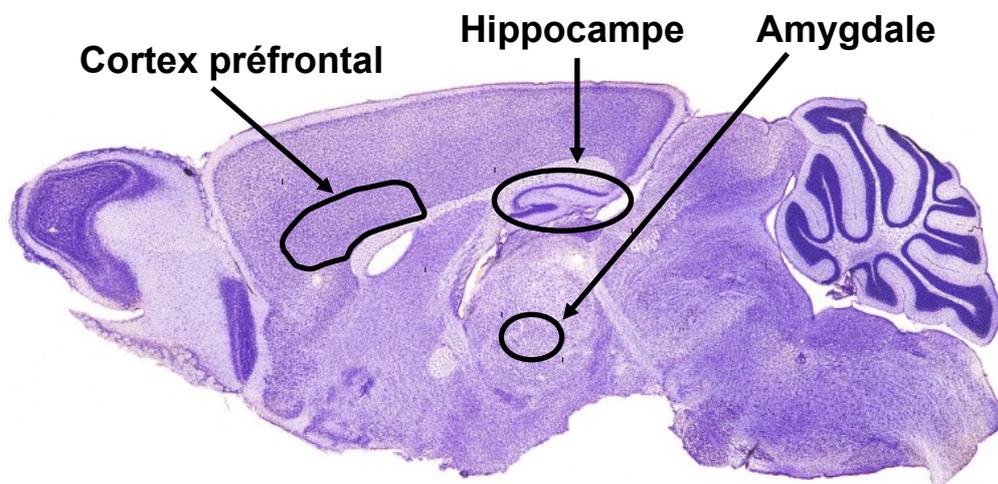


Figure 6 : Localisation de l'hippocampe, du cortex préfrontal et de l'amygdale dans le cerveau de souris.

1) Structures

L'hippocampe. Il est impliqué dans les processus cognitifs en lien avec des informations contextuelles, incluant l'apprentissage spatial et la mémoire, mais aussi dans le

comportement de peur au travers de ses connexions avec l'amygdale. L'hippocampe joue un rôle dans la régulation des taux de base de corticostérone ainsi que dans la fin de la réponse au stress (inhibition des taux circulants de corticostérone après la décharge induite par le stress).

L'amygdale. Elle est impliquée dans le conditionnement de peur, qui emploie des stimuli aversifs dans le but d'évaluer la mémoire et l'apprentissage « émotionnel » (Ponnusamy et al, 2007). L'amygdale comme l'hippocampe, est situé dans le lobe temporal (chez l'Homme) et est constitué de plusieurs noyaux (basal, central et médian). Plusieurs hormones influencent le fonctionnement amygdalien. L'une d'entre elles, la CRH, facilite l'attention pour les événements externes et sous-tend les mécanismes de peur et d'anxiété (Schulkin et al, 2005). L'amygdale est également sous l'influence des cathécholamines dont la noradrénaline qui l'affecte indirectement (Roozental et al, 2009).

Le cortex préfrontal. Il influence également les fonctions cognitives et émotionnelles. Il est impliqué dans la prise de décision, l'inhibition, la flexibilité comportementale et dans le comportement dirigé vers un but ou une nouveauté (Wallis, 2009 ; Schawbe et al, 2011). Le cortex préfrontal est localisé dans la partie antérieure du cerveau juste au dessus de l'orbite des yeux. Il ne fait pas partie du système limbique mais dispose de connectivités avec les structures limbiques. Le cortex préfrontal se subdivise en plusieurs zones (médiane, orbitale et latérale) qui ont des fonctions différentes. Au niveau du cortex préfrontal médian, il existe une subdivision en deux zones : la zone infra-limbique et pré-limbique. Ces deux zones semblent être associées aux processus émotionnels mis en jeu dans de nouvelles situations (Heibreder et Groenewegen, 2003). Au travers des connexions avec l'amygdale, ces sous-structures peuvent affecter le comportement lié à l'anxiété (Jinks et al, 1997). Le cas de Phinéas Gage vers 1850 aux Etats-Unis, décrit des changements de personnalité et de comportement suite à une lésion du lobe frontal. En effet, lors d'un accident sur un chantier de chemin de fer, cet homme se retrouva avec une barre à mine qui avait traversée la partie frontale de sa tête. Après une période de convalescence suite à l'accident, Phinéas présentait des perturbations dans ses prises de décision (elles étaient devenues irrationnelles) associées à un changement de personnalité (processus émotionnels perturbés, Damasio, 2001).

2) Les connectivités entre ces structures :

L'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal sont abondamment inter-connectés. Nous présenterons brièvement dans cette partie une représentation schématique des principales interconnexions de ces structures (figure 7).

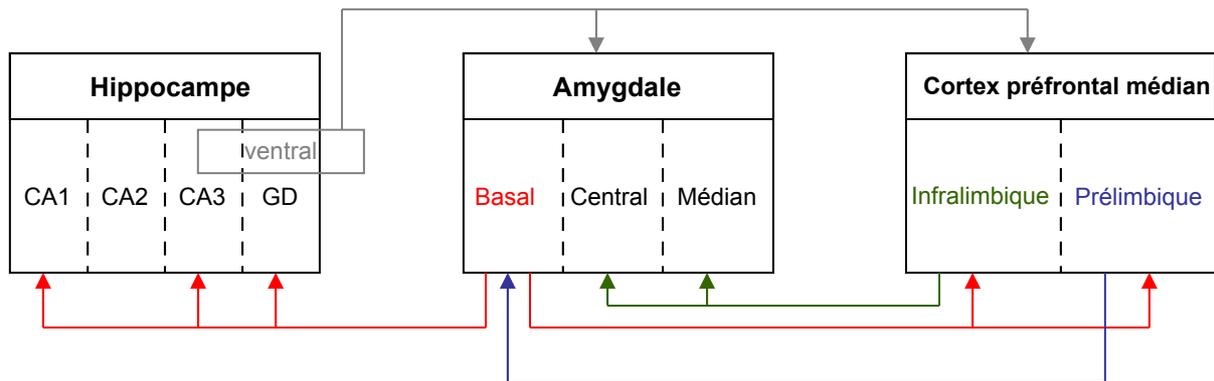


Figure 7 : Représentation schématique des principales projections neuronales entre l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal.

(D'après Pikkarainen et al, 1999 ; Pitkainen et al, 2000 ; Vertes, 2004 ; Ishito et Yakanike, 2003, 2006 ; Hampton et al, 2007).

III) L'AXE CORTICOTROPE ET LES GLUCOCORTICOÏDES

A) L'axe corticotrope

1) Organisation fonctionnelle

L'axe corticotrope ou axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA pour le terme anglais Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis) constitue un axe endocrinien majeur. Il se compose de trois structures principales en interaction : l'hypothalamus, l'hypophyse et les glandes surrénales (figure 8). Une grande diversité de stimuli (rythme circadien, prise alimentaire, stimuli homéostatiques ou externes) peut être à l'origine de l'activation de l'axe

corticotrope. Cette activation aboutit à la libération dans la circulation sanguine des hormones glucocorticoïdes, responsables de la plupart des effets physiologiques.

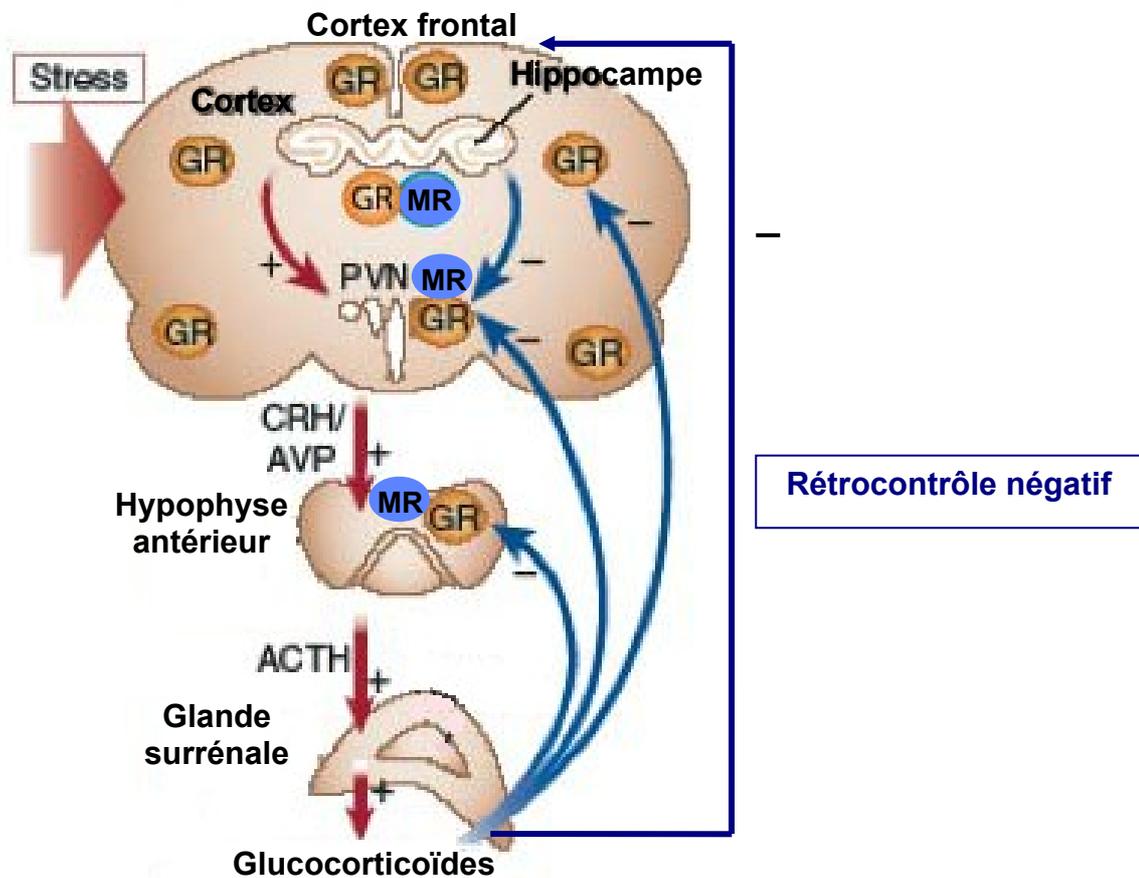


Figure 8 : Organisation de l'axe corticotrope (selon Akil, 2005, Lupien et al, 2009). L'activation de l'axe corticotrope est initiée par l'hypothalamus qui reçoit des informations du système limbique. Le noyau paraventriculaire sécrète en réponse le CRH et l'AVP, stimulant la libération d'ACTH par l'antéhypophyse. Cette hormone stimule à son tour la sécrétion des glucocorticoïdes par les surrénales. L'augmentation des GCs cible des sites impliqués dans le rétrocontrôle négatif (l'hypophyse antérieure, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cortex frontal) en activant des récepteurs MR et GR, limitant ainsi l'activité de l'axe corticotrope et la sécrétion des GCs.

NPV : noyau parventriculaire ; AVP : arginine vasopressine ; CRH : corticolibérine ; ACTH : hormone adrénocorticotrope ; GR : récepteur aux glucocorticoïdes ; MR : récepteur aux minéralocorticoïdes

Le système limbique est constitué de la région septale, du fornix, de l'hippocampe, du complexe amygdalien et des cortex insulaire et fronto-orbitaire postérieur. Le système limbique contrôle le comportement, les émotions, la motivation. Il intervient également dans la régulation de conditions internes de l'organisme telles que la température corporelle, la sensation de faim et de soif, l'équilibre osmotique. C'est une zone de perception des stimuli externes qui joue un rôle dans le déclenchement des réactions adaptatives en stimulant l'hypothalamus auquel il est relié.

L'hypothalamus est une région du cerveau qui assure le lien entre le système nerveux et le système hormonal au travers de leurs afférences. L'hypothalamus est régulé par le système limbique. L'hypothalamus joue un rôle primordial dans les fonctions végétatives et endocriniennes de l'organisme ainsi que dans les comportements émotionnel et alimentaire. Il intervient également dans le maintien de l'homéostasie hormonale et dans les réponses adaptatives du système endocrinien face aux situations de stress (Conte-Devolx et al, 1993). En réponse aux stimulations du système nerveux et hormonal, l'hypothalamus sécrète des peptides hypothalamiques hypophysiotropes : la corticolibérine (CRH ou Corticotropin-Releasing Hormone) et l'arginine vasopressine (AVP). La CRH est un neuropeptide synthétisé dans les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus. Ces neurones se projettent dans la couche externe de l'éminence médiane de l'hypothalamus jusqu'au système porte hypothalamo-hypophysaire où les hormones hypothalamiques sont sécrétées. La CRH, ainsi libérée dans les capillaires irriguant l'antéhypophyse, peut alors agir sur les cellules corticotropes en se fixant sur ses récepteurs hypophysaires spécifiques. Cette fixation permet alors l'activation de la transcription du gène codant pour la proopiomélanocortine (POMC), précurseur de l'hormone adrénocorticotrope ou ACTH (Adreno Cortico Trophic Hormone).

L'AVP est sécrétée par les neurones du PVN de l'hypothalamus responsables de la sécrétion de la CRH. Ce peptide co-libéré avec la CRH potentialise l'action de cette dernière sur la libération de l'ACTH.

L'hypophyse est une glande endocrinienne située à la base du crâne dans une loge appelée "selle turcique", en rapport anatomique direct avec le chiasma optique (chez l'Homme comme chez le rongeur). Elle est liée au cerveau (diencéphale) par la tige pituitaire. On distingue trois zones, ou lobes, dans l'hypophyse : l'antéhypophyse (hypophyse antérieur) située en avant; la post-hypophyse (hypophyse postérieure) située en arrière et le lobe intermédiaire (figure 9). La sécrétion de l'ACTH fait suite à l'activation des cellules corticotropes de l'antéhypophyse par la CRH. Une fois libérée dans la circulation sanguine,

l'ACTH agit sur les cellules du cortex surrénalien par l'intermédiaire de récepteurs membranaires couplés à l'adénylate cyclase, en stimulant la production et la sécrétion des corticostéroïdes. Au niveau hypothalamique, l'ACTH exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de CRH et donc sur la sécrétion de l'ACTH elle-même.

Les glandes surrénales, situées chacune aux pôles supérieurs des deux reins (fig 10 A), sont formées de deux zones associées anatomiquement mais fonctionnellement différentes (fig 10 B). La corticosurrénale qui secrète les glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez le rongeur) et les minéralocorticoïdes (aldostérone). La médullosurrénale est constituée de cellules nerveuses, dites « chromafines », qui ont migré à partir des cellules de la crête neurale et qui secrètent les catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Les glucocorticoïdes (GCs) sont des stéroïdes dérivés du cholestérol prélevé dans les lipoprotéines de basse densité, et synthétisés dans la zone du cortex des surrénales. Les GCs n'étant pas stockés, ils passent immédiatement dans la circulation générale après leur synthèse.

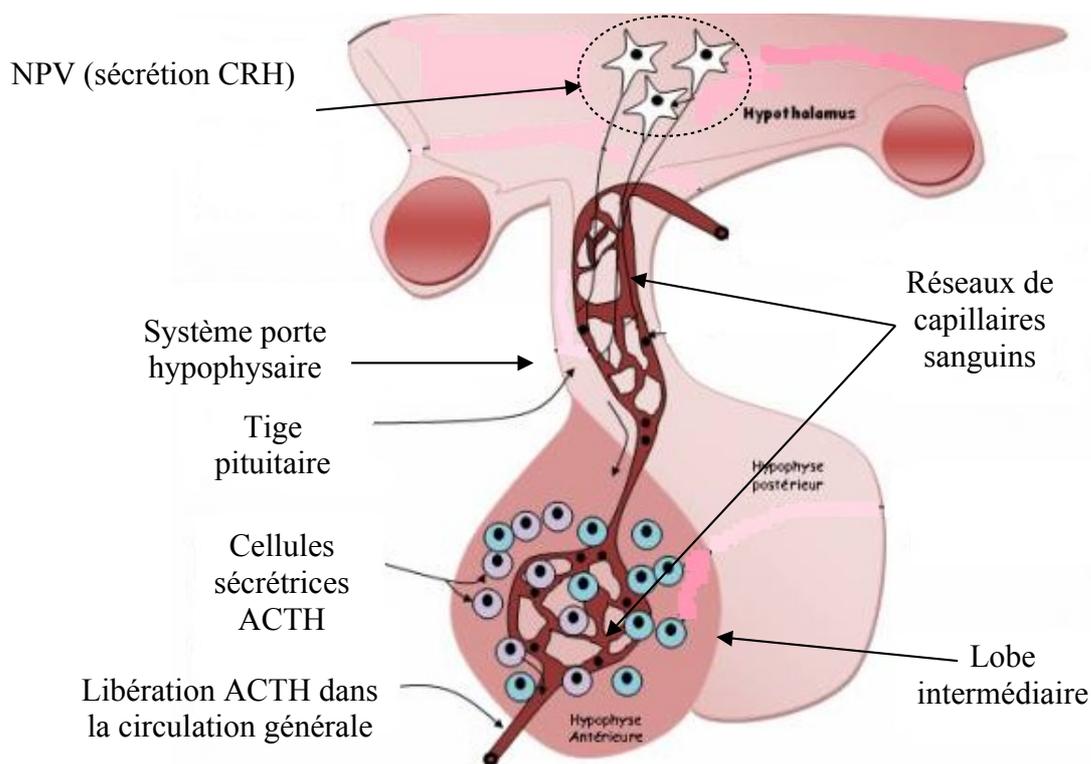
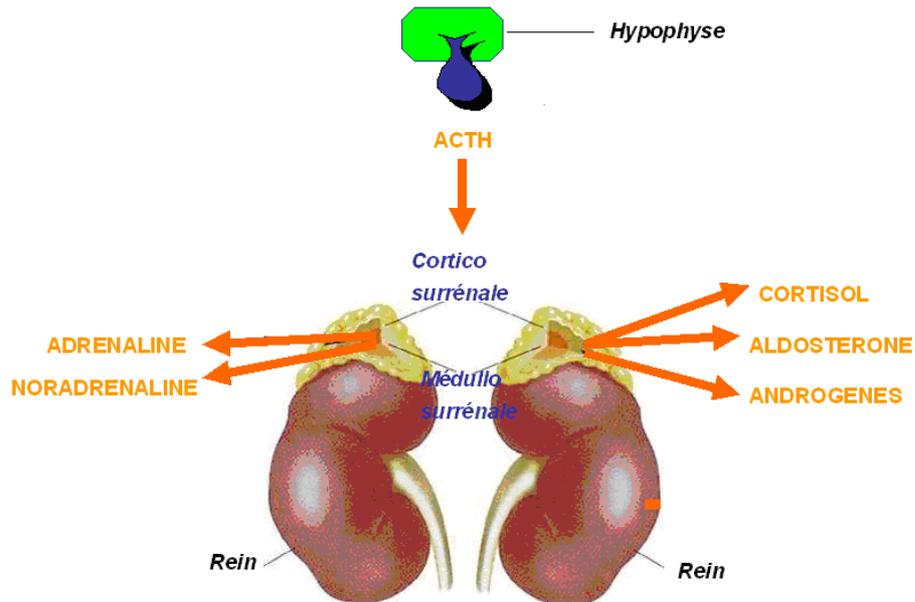


Figure 9 : axe hypothalamo-hypophysaire (Adapté d'Alain Gallien sur www.intellego.fr)

NPV : noyau paraventriculaire ; CRH : corticolibérine ; ACTH : hormone adrénocorticotrope

A)



B)

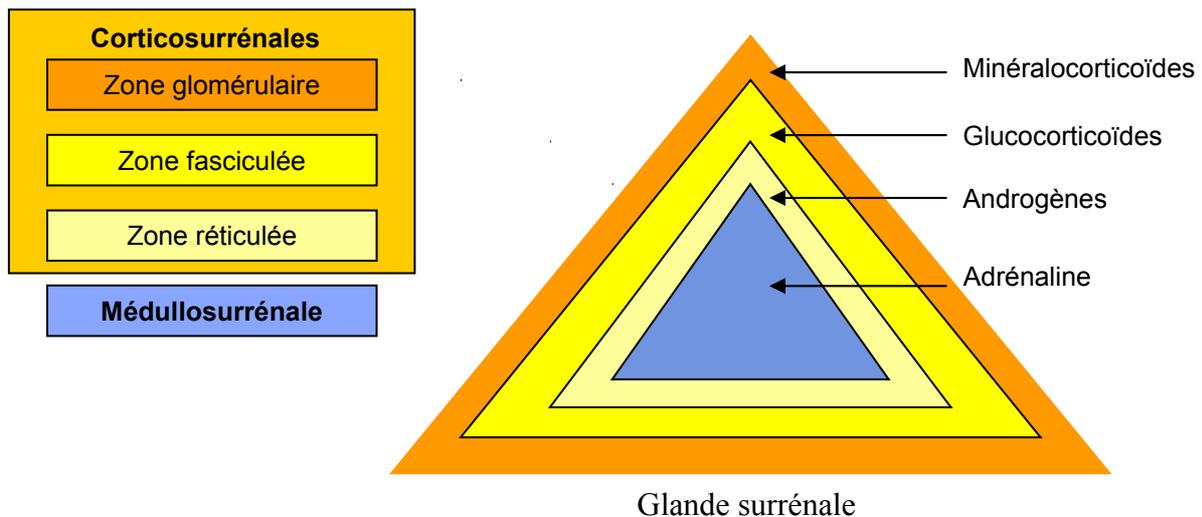


Figure 10 : Axe hypophyso-surrénalien et-sécrétion des hormones au sein des différentes couches d'une glande surrénale (d'après www.memobio.fr)

(A) : Axe hypophyso-surrénalien. L'hypophyse sécrète l'ACTH qui à son tour va stimuler les glandes surrénales, permettant la synthèse des glucocorticoïdes.

(B) : Sécrétion des hormones dans les glandes surrénales. Les glandes surrénales se composent de quatre zones, chacune sécrétant une hormone spécifique. Les trois premières couches externes des glandes surrénales composent la corticosurrénale et la couche la plus interne, la médullosurrénale.

2) *Activité de l'axe corticotrope*

L'intégrité de l'axe HPA est essentielle à la survie des espèces vertébrées. L'axe HPA assure un état d'équilibre optimal de l'organisme, en lien avec la concentration des GCs dans le sang. L'activité de cet axe endocrinien dépend de la rythmicité biologique (circadien/ultradien) et de l'état de stress de l'individu.

L'activité basale de l'axe HPA présente, chez l'Homme comme chez l'animal, une rythmicité liée à l'alternance jour-nuit appelée cycle nyctéméral ou encore rythme circadien, dont la période est d'à peu près 24 heures (de Kloet and Sarabdjitsingh, 2008). Ce rythme est majoritairement coordonné aux signaux externes jour/nuit détectés par les noyaux supra-chiasmatisques de l'hypothalamus, mais également par d'autres stimulations de l'environnement comme la prise alimentaire (Follenius et al, 1982). Le début de la phase active (le matin chez l'Homme, le soir chez le rongeur) se produit lors des pics circadiens d'AVP, de CRH puis d'ACTH et enfin des glucocorticoïdes. Ces pics circadiens permettent une réaction anticipatrice au moment du réveil car les glucocorticoïdes mobilisent les substrats énergétiques nécessaires à cette période. Les taux d'hormones vont ensuite diminuer progressivement tout au long de la phase d'activité jusqu'à atteindre un creux circadien en période de sommeil, où les besoins énergétiques de l'organisme sont plus faibles (Windle et al, 1998a).

Des rythmes ultradiens (période d'une heure environ) sont observés chez l'Homme et l'animal. La CRH, l'AVP, l'ACTH et les glucocorticoïdes présentent une sécrétion de type pulsatile avec des épisodes sécrétoires courts d'une fréquence de un à trois pulses par heure, suivis d'une phase d'inhibition d'environ 20 minutes induisant la clairance rapide de ces hormones circulantes (Windle et al, 1998a; Windle et al, 1998b) (figure 11). Ce rythme ultradien constituerait un processus dynamique qui permettrait de mettre en place rapidement les processus d'adaptation au stress c'est-à-dire une régulation fine des processus d'homéostasie et d'allostasie (Lightman and Conway-Campbell, 2010).

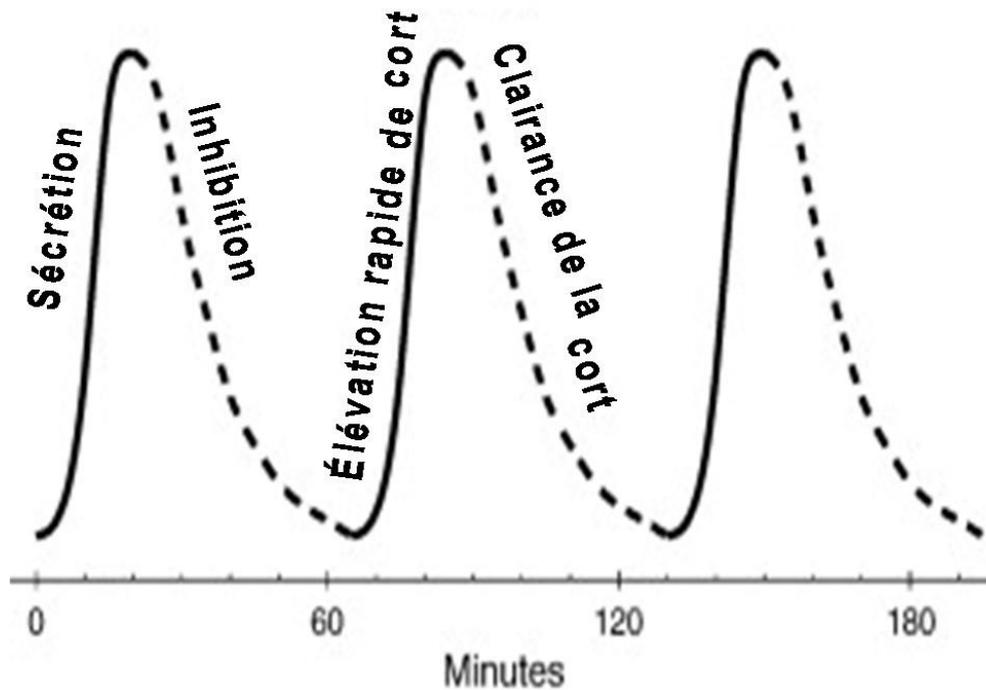


Figure 11 : Modèle de pulsativité de la corticostérone.

Un « pulse » de sécrétion dure environ une heure. Ce pulse se compose de deux phases : une phase de sécrétion rapide, où les niveaux de corticostérone s'élèvent rapidement, et une phase d'inhibition (D'après Lightman et al, 2008).

B) Glucocorticoïdes

1) Biosynthèse, circulation et métabolisme des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez le rongeur) sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol et synthétisées par les corticosurrénales (figure 10 B). Il est à noter qu'il existe une autre classe d'hormone stéroïdienne synthétisée par les glandes surrénales : les minéralocorticoïdes. La biosynthèse des glucocorticoïdes a lieu dans les cellules de la zone fasciculée des corticosurrénales. Une succession de réactions enzymatiques permet de transformer le cholestérol en cortisol/corticostérone (Figure 12). Cette voie de biosynthèse des glucocorticoïdes est activée par l'ACTH en se fixant sur des récepteurs spécifiques surrénaux. L'hormone active (cortisol ou corticostérone) est en équilibre avec son métabolite inactif (cortisone ou 11-déhydrocorticostérone, respectivement). Le cortisol ou la corticostérone sont inactives au sein

des tissus. Le mécanisme local, au niveau tissulaire, est sous le contrôle de deux isoenzymes 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β HSD) de types 1 et 2. Ces enzymes catalysent les réactions d'interconversion entre ces formes actives et inactives. La 11 β HSD de type 1 est présente dans le réticulum endoplasmique et possède à la fois une activité déshydrogénase (actif-inactif) et une action réductase prédominante, catalysant la conversion de la forme inactive en forme active. Elle est présente dans de nombreux tissus cibles des glucocorticoïdes, tels que le foie, le tissu adipeux, les muscles lisses vasculaires, les poumons et le système nerveux central. La 11 β HSD de type 2 possède une activité déshydrogénase, inactivant le cortisol (ou la corticostérone) en cortisone (11-dehydrocorticostérone). Cette enzyme est présente dans les tissus périphériques cibles de l'aldostérone (rein, côlon, glandes salivaires et sudoripares). Les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) ayant la même affinité pour les glucocorticoïdes que pour l'aldostérone, le rôle de la 11 β HSD2 est de protéger les MR d'une occupation prédominante des glucocorticoïdes (due à une plus forte concentration circulante) en les inactivant, créant ainsi une spécificité de ces récepteurs à l'aldostérone dans les tissus cibles (Edwards et al, 1988).

En condition normale, chez l'Homme, le cortisol circule dans le sang majoritairement sous la forme liée à une protéine spécifique : la transcortine ou Corticosteroid binding Globulin (80 à 90%, Cbg). Une partie (10%) est liée à l'albumine de manière non spécifique mais avec une capacité plus importante que celle de la Cbg. 5 à 10% du cortisol circule dans le plasma sous forme libre (Siiteri et al, 1982). Chez le rat, la corticostérone circulante est liée de manière identique, dans les proportions similaires (Hammond et al, 1991)

La demi-vie du cortisol est de 60 à 90 minutes et celle de la corticostérone de 50 min. la majorité du cortisol est réduite et conjuguée dans les cellules cibles et le foie, puis éliminée dans les urines.

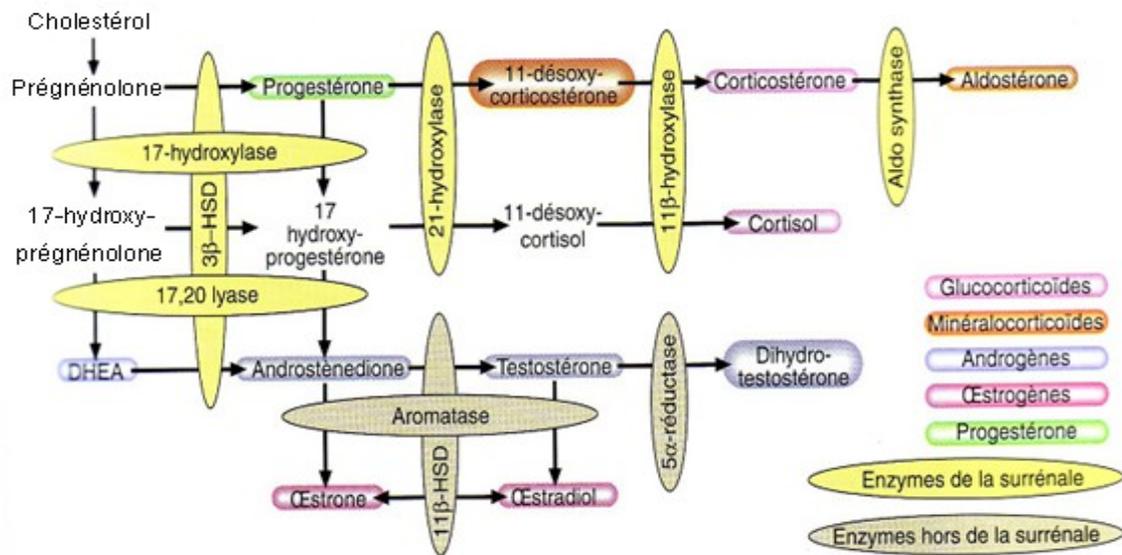


Figure 12 : Voie de synthèse des stéroïdes surréniaux.

(Adapté de David Richfield et Mikael Haggström, www.hormone.wikibis.com)

2) Les récepteurs aux glucocorticoïdes :

(a) Les récepteurs intracellulaires

Les actions des glucocorticoïdes sur les cellules cibles sont médiées par des récepteurs de deux types : les récepteurs aux minéralocorticoïdes (de type 1) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (de type 2) (Reul et de Kloet, 1985). Ils partagent une structure composée de trois domaines : un domaine N-terminal (NTD) activant les gènes cibles, un domaine central composé de « deux doigts de zinc » constituant le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et participant à la dimérisation des récepteurs, à la liaison aux sites cibles, à l'activation ou l'inhibition de la transcription. Enfin, un domaine C-terminal responsable de la liaison avec le ligand (LBD) contenant aussi des séquences de liaison aux protéines de choc thermique (Heat shock protein ou Hsp), et aux co-activateurs. Ces récepteurs sont présents sous forme inactive dans le cytosol. Les MR et les GR appartiennent à la même famille de récepteurs, ils sont étroitement liés et montrent une similitude dans leur structure génique. Les MR et GR partagent 57 % d'acides aminés du LBD et 94 % des gènes du DBD (Roumestan, 2004) expliquant leur capacité de liaison aux glucocorticoïdes (Figure 13).

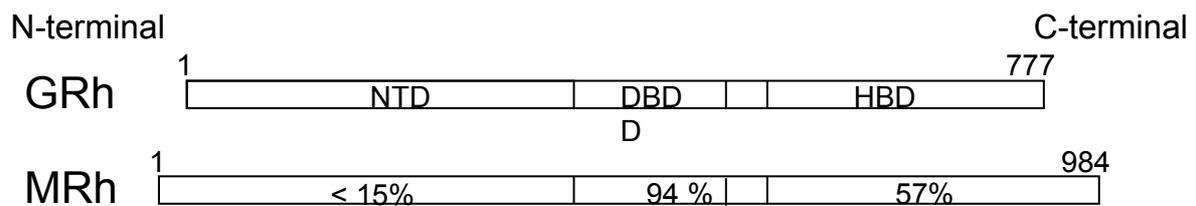


Figure 13 : Structure et homologie des récepteurs stéroïdiens.

Le récepteur aux glucocorticoïdes humain (GRh) appartient à la super famille des récepteurs nucléaires. Il forme, avec le récepteur aux minéralocorticoïdes humain (MRh) une sous-famille de récepteurs aux stéroïdes. Cette classification est fondée sur l'homologie des séquences des deux domaines les plus conservés : le domaine central de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine C-terminal de liaison de l'hormone (HBD). Adapté de Roumestan et al, 2004.

Cependant, l'affinité de ces deux récepteurs à leur ligand est différente. Le MR lie le cortisol (ou la corticostérone) et l'aldostérone avec une forte affinité (constante de dissociation $K_d = 0,5 \text{ nM}$) alors que le GR présente une forte affinité pour les glucocorticoïdes de synthèse (dexaméthasone). Il lie les corticostéroïdes avec une affinité dix fois moins forte que celle des MR ($K_d = 5 \text{ nM}$) (de Kloet et al, 1998). En condition normale, du fait des affinités différentes du MR et du GR, les glucocorticoïdes sont liés aux MR. La saturation des GR ne peut avoir lieu qu'en cas d'hypersécrétion de glucocorticoïdes.

Des études d'hybridation *in situ*, de double marquage immunohistochimique, d'immunocytochimie et d'analyse par microscopie confocale menées sur le système nerveux central du rongeur ont permis de localiser les GR et les MR.

Les MR sont exprimés au sein du cortex préfrontal, de l'amygdale central et médian, du septum latéral et au sein des noyaux thalamiques et hypothalamiques (Patel et al, 1989 ; Han et al, 2005). Les GR sont largement exprimés à travers tout le cerveau. Cependant, c'est dans l'hippocampe que les récepteurs MR et GR sont le plus co-localisés (Robertson et al, 2005 ; figure 14) mais inégalement répartis. En effet, les MR seraient plus abondants que les GR (Robertson et al, 2005) dans l'hippocampe dorsal (régions du CA1, CA2, CA3 et le gyrus denté) (Van Eekelen et al, 1988 ; Van Eekelen et de Kloet, 1992) et ventral (région du CA3) (Van Eekelen et al, 1988). Les GR quant à eux se limiteraient aux régions du CA1, CA2 (de l'HD et de l'HV) et du gyrus denté (Van Eekelen et al, 1988). Par ailleurs, ces études ont permis de mettre en évidence la co-localisations des MR et les GR dans les noyaux des neurones pyramidaux et des cellules granulaires (Van Eekelen et al, 1988 ; Van Eekelen et de Kloet, 1992 ; Van Steensel et al, 1996). Cependant, Han et ses collaborateurs (2005) ont

démontré que les MR sont également localisés dans le cytoplasme des cellules pyramidales et granulaires (figure 14).

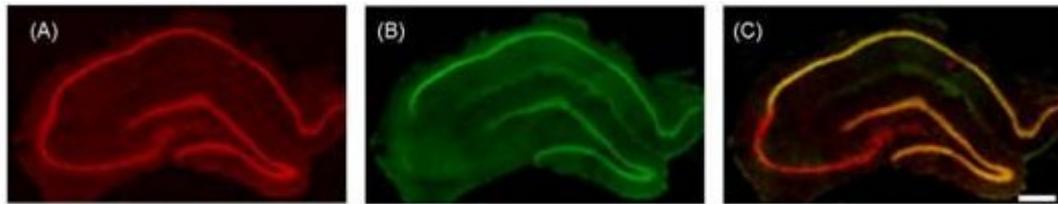


Figure 14 : Mise en évidence par immunomarquage de la co-localisation des MR et GR dans l'hippocampe

Localisation des MR (rouge, A) et des GR (vert, B) dans les cellules pyramidales du CA1, CA2 de l'hippocampe et des cellules granulaires de gyrus denté. Co-localisation des MR et des GR dans l'hippocampe dorsal (C). Barre 500µm. D'après Han et al, 2005.

(b) Les récepteurs membranaires :

Des études ont montré que des récepteurs aux glucocorticoïdes sont localisés sur la membrane plasmique (Tasker et al, 2006 ; Joëls et al, 2008). Selon Karst et ses collaborateurs (2005), les récepteurs membranaires de type MR présentent une affinité aux glucocorticoïdes comparables à celle des GR intra-cellulaires. Ainsi, ces récepteurs membranaires de type MR sont activés lorsque la concentration des GCs augmente. De plus, ces auteurs ont montré que les effets rapides non génomiques médiés par les récepteurs de types MR augmentent la neurotransmission glutamatergique, qui n'est plus observée chez des souris « knock out » MR. Il a également été démontré que ces récepteurs membranaires de type MR régulent le trafic de surface des récepteurs glutamatergiques (Groc et al, 2008 ; Chaouloff et Groc, 2011). Il a été montré que des récepteurs localisés sur la membrane plasmique, autres que les récepteurs MR et les GR, interviendraient dans les effets physiologiques du stress sur le cerveau (tableau 2).

Récepteurs impliqués	Structures étudiées	Type de stresser	Techniques utilisées	Délai d'intervention des récepteurs membranaires après le stresser	Références
mMR	HPC et AMG de souris	Injection icv de Cort (100 nM)	électrophysiologie	5 min	Olijslagers et al, 2008
	Culture hippocampique de rat	Cort (10^{-9} M) + Cort-BSA (10^{-8} M)	WB sur synaptosomes	5 min	Qi et al, 1995
	AMG + HPC souris	Cort (100 nM)	électrophysiologie	5 min	Karst et al, 2005, 2010
mGR	HYP de rat	Cort-BSA (10^{-7} à 10^{-4} mol/l)	WB sur synaptosomes	20 min	Liu et Chen, 1995
Nouveaux récepteurs	Culture primaire de neurones hippocampiques de rat	Cort-BSA et Cort (10^{-5} M)	Immunocytochimie, WB, double marquage fluorescent	15 min	Xiao et al, 2005
	Rat <i>in vivo</i>	Injection de Cort (2,5 ou 5 mg/kg)	Test comportemental	7 min	Sandi et al, 1996

Tableau 2 : Implication de récepteurs membranaires dans les effets non-génomiques du stress sur la mémoire, selon différentes études et différents stressers.

(Adapté de Groeneweg et al, 2011).

HPC : hippocampe ; HYP : hypothalamus ; AMG : amygdale ; WB : western blot ; WM : water maze ; mMR : récepteurs membranaires aux minéralocorticoïdes ; mGR : récepteurs membranaires aux glucocorticoïdes ; Cort : corticostérone ; Cort-BSA : corticostérone couplée à la serum albumine bovine.

3) *Mécanismes d'action des glucocorticoïdes*

(a) Mécanisme génomique

En l'absence de ligand, les récepteurs présents dans le cytoplasme de la cellule sont complexés à des protéines de choc thermique (Heat shock protein) (Binart et al, 1995) à savoir deux protéines Hsp 90, une protéine Hsp 70 et une protéine Hsp 50. Ces protéines, dites chaperonnes, se fixent au niveau du domaine de liaison de l'hormone ; le récepteur est ainsi maintenu dans une conformation de haute affinité pour les GCs. La liaison des GCs à leur récepteur induit un changement conformationnel et une hyperphosphorylation du récepteur provoquant la dissociation du complexe récepteur-protéines chaperonnes. Ceci entraîne la translocation nucléaire des récepteurs. Le ligand module alors la transcription de gènes cibles, soit positivement par un processus de transactivation, soit négativement selon deux mécanismes de transrepression distincts (transrepression directe et indirecte avec l'ADN).

Dans le cas de la transactivation et du premier mode de transrepression, les récepteurs se lient sous forme d'homodimère directement à l'ADN au niveau d'un élément de réponse, respectivement positif (GRE : Glucocorticoid Responsive Elements) ou négatif (nGRE : negative Glucocorticoid Responsive Elements). Le GRE, situé près des gènes cibles dans la région régulatrice, est constitué d'un site double où vient se fixer deux récepteurs. La liaison de l'hormone avec son récepteur provoque un changement conformationnel qui permet à ce dernier de se fixer à l'ADN par l'intermédiaire des GRE (figure 15). Il a également été montré que certaines actions des GCs ne passeraient pas nécessairement par une interaction directe avec l'ADN mais par des interactions protéine-protéine. Ainsi, les récepteurs activés régulent, par ce type d'interaction, l'effet des complexes NF-KB (Nuclear Factor KB) et AP-1 (Activating Protein-1) (Hellal-Levy et al, 2000 ; Roumestan et al, 2004 ; Viengchareun et al, 2007).

D'autre part, dans les structures où les récepteurs MR et GR sont co-exprimés, comme l'hippocampe et l'hypothalamus, ils forment des homodimères MR/MR et GR/GR et des hétérodimères MR/GR (Nishi et al, 2004) qui peuvent activer les GRE. Cependant, il n'existe que très peu de données sur ces mécanismes (De Kloet et al, 1998).

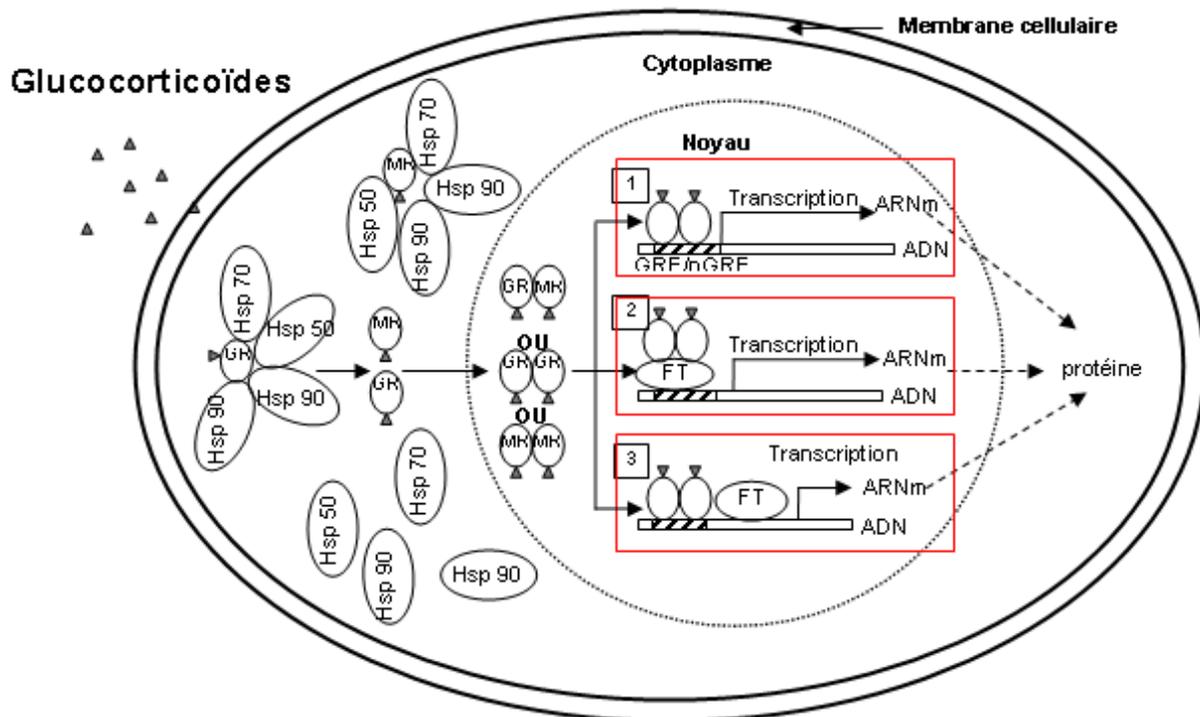


Figure 15 : Mode d'action génomique des récepteurs aux glucocorticoïdes

(Adapté de Zou et Cidlowski, 2005)

Après la liaison aux GCs dans le cytoplasme, les récepteurs corticostéroïdiens se dissocient de leurs protéines chaperonnes et traversent la membrane nucléaire. Ils se dimérisent et module la transcription des gènes via :

- 1) Une interaction directe avec l'ADN via les GRE ou nGRE
- 2) Une interaction indirecte avec l'ADN via des facteurs de transcriptions (FT : AP-1, NF-kB, NF-IL-6 : Nuclear Factor interleukine 6)
- 3) Une interaction avec à la fois l'ADN et des FT.

(b) Mécanisme non-génomique

Les études relatives aux mécanismes moléculaires des effets non-génomiques des corticostéroïdes sont nombreuses. C'est pourquoi, afin de rester dans le cadre de notre travail, l'accent sera mis d'une part sur une brève définition des effets non-génomiques des glucocorticoïdes et d'autre part, sur les mécanismes de signalisation associés aux récepteurs membranaires de l'hippocampe impliqués dans les effets rapides du stress sur la mémoire.

Les effets non génomiques se produisent par définition sans modifier l'expression génique et surviennent plus rapidement que les effets génomiques. Les effecteurs du mécanisme génomique sont des protéines. Pour mettre en évidence l'implication d'un

mécanisme non-génomique, il faut donc bloquer la synthèse protéique par un inhibiteur spécifique : par exemple l'anisomycine (Venero et Borell, 1999 ; Khakari et al, 2007). Une autre approche consiste à conjuguer les glucocorticoïdes avec une protéine qui ne franchit pas la membrane cellulaire. Le complexe « corticostérone/sérum albumine-bovine », ou Cort-BSA, est le plus utilisé (Lou et Chen, 1998 ; Chauveau et al, 2009b).

Un critère à prendre en considération est le critère temporel. En effet, les mécanismes d'action génomique des glucocorticoïdes impliquent plusieurs étapes qui requièrent un long délai, 10 à 30 minutes de translocation nucléaire (Nishi et al, 1999), 5 à 120 min de traduction et de transcription. Tous ces facteurs considérés, les effets génomiques apparaîtraient après un délai de 30 min (Makara et al, 2001) alors que les effets non génomiques sont très rapides (de l'ordre de la minute).

Il semble que les actions rapides des glucocorticoïdes soient médiées par des récepteurs membranaires de type MR et GR. De nombreux travaux, menés *in vitro et in vivo*, ont montré l'implication des MR membranaires (Karst et al, 2005 ; Joëls et al, 2006), en interaction avec des protéines G. En effet, les récepteurs membranaires de type MR, dans les neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe, semblent être impliqués dans la facilitation des courants post-synaptiques excitateurs (« Excitator Post Synaptic Current », EPSC) et l'inhibition des courants potassiques, en association avec l'activation de la protéine G. Ainsi, l'inhibition de l'activation de la protéine G abolit les effets rapides des glucocorticoïdes sur ces différents courants (Olijslagers et al, 2008). Il a également été établi une implication de la ERK 1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase 1/2) au niveau présynaptique. Les résultats d'Olijslagers et al indiquent que les effets rapides non génomiques s'effectuent au travers des voies pré et post synaptiques des neurones hippocampiques. Dans son travail, French-Mullen a montré l'implication de la PKC (protéine kinase C) (French-Mullen, 1995). En effet, l'inhibition de la synthèse de la PKC, induit une atténuation de l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur le courant calcique voltage-dépendant.

De plus, Groc et ses collaborateurs (2008) ont montré l'effet des corticostéroïdes sur le trafic des récepteurs glutamatergiques AMPA et sur la plasticité synaptique. En effet, selon ces auteurs, la corticostérone modifie l'intensité de la transmission des synapses excitatrices, en mobilisant les récepteurs glutamatergiques AMPA de surface. Par ailleurs, ils ont montré qu'après un événement stressant, la libération de corticostéroïdes, via leur action sur des récepteurs membranaires de type MR, induit une augmentation rapide (de l'ordre de la minute) du trafic de surface des récepteurs AMPA. Plus précisément la libération des GCs, induite par un stress aigu, augmente rapidement la diffusion latérale de la sous-unité GluA2

des récepteurs AMPA et modifie la transmission et la plasticité synaptique de l'hippocampe, pouvant refléter une augmentation de la capacité d'encodage de l'information (Conboy et Sandi, 2010). Conboy et Sandi ont montré le rôle du trafic de la sous-unité GluA2 dans les effets comportementaux du stress en injectant dans l'hippocampe du pep2m, neuropeptide qui interfère avec le « N-éthylmaleimide-Sensitive-Factor » (NSF) impliqué dans le trafic du GluA2. En effet, les performances mnésiques des animaux, ayant subi l'injection de pep2m, étaient plus faibles que celles des animaux ayant seulement subi le stress.

Cependant, les MR ne sont pas les seuls récepteurs membranaires impliqués dans les effets non-génomiques. En effet, les récepteurs GR ont également été identifiés comme récepteurs membranaires pré-synaptiques. Ils seraient impliqués dans les effets rapides non-génomiques, facilitant la libération de glutamate neuronal (Wang et Wang, 2009). De plus, il a été observé que l'injection d'un agoniste GR (dexaméthasone) engendre une augmentation rapide des courants inhibiteurs post-synaptiques dans les neurones pyramidaux du CA1. Cet effet est engendré par l'activation non-génomique des GR (Hu et al, 2010).

Bien que de nombreux travaux mettent en avant l'implication de récepteurs membranaires de type MR et GR dans les effets rapides non génomiques des GCs, des études suggèrent l'intervention de « nouveaux » récepteurs membranaires. Xiao et ses collaborateurs ont développé un modèle d'étude des effets rapides non génomique des GCs à partir de cultures cellulaires hippocampiques embryonnaires de rats, dépourvues de GR. Ils ont démontré que les effets rapides étaient résistants aux antagonistes MR et donc qu'ils ne suffisent pas à expliquer l'activation rapide des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), JNK (c-Jun- NH2-terminal kinase), la ERK 1 et 2 (Xiao et al, 2005).

4) *Régulation des glucocorticoïdes : rétrocontrôle négatif de l'axe corticotrope*

Les GCs sont capables de réguler leur propre sécrétion en exerçant un rétrocontrôle négatif sur les structures composant l'axe HPA (figure 7). Ce rétrocontrôle négatif a pour but de limiter la production de l'hormone dans le sang et ainsi de limiter la durée d'exposition des tissus cibles aux glucocorticoïdes, délétères à long terme pour l'organisme (Adam et Epel, 2007). Les glucocorticoïdes répriment au sein de l'hypophyse antérieure l'expression de la pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur de l'ACTH. Dans le NPV de l'hypothalamus, les GCs sont connus pour réguler l'expression de la CRH et de l'AVP. Le mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé par les GCs sur l'axe HPA, agit sur différentes structures telles que le cortex préfrontal, l'hippocampe, l'hypophyse et l'amygdale. Ces structures expriment

des récepteurs MR et GR (Han et al, 2005 ; Patel et al, 2008 ; Myers et Greenwood-Van Meerveld, 2010) dont l'activation module la sécrétion de la CRH et inhibe la libération d'ACTH. En effet, les GCs activent par l'intermédiaire de synapses glutamatergiques un réseau de neurones GABAergiques qui inhibe les neurones du NPV (Herman et al, 2012). Ce mécanisme d'inhibition est également observé au sein du cortex préfrontal médian.

Au repos, lorsque les niveaux de GCs sont les plus faibles dans le plasma, ils oscillent selon le mode circadien c'est-à-dire qu'au creux du rythme circadien les GCs occuperaient préférentiellement les récepteurs MR. Alors que pendant le pic, l'hormone étant très élevée, les GCs occuperaient les MR et les GR (Reul et de Kloet, 1985 ; Bradbury et al, 1991). L'occupation différentielle des MR et GR est cohérente avec les caractéristiques de liaison de ces récepteurs avec les glucocorticoïdes. En effet, l'activation des MR est essentielle pour maintenir le rythme circadien basal puisqu'une administration d'un antagoniste MR, le spironolactone, augmente l'activité de l'axe HPA chez l'Homme (Born et al, 1991). Alors que l'activation des GR, qui coïncide avec l'augmentation des niveaux de GCs, permet de retrouver une activité basale par l'intermédiaire du rétrocontrôle négatif (De Kloet et al, 1998). Des études chez l'animal (Kolber et al, 2008) et chez l'Homme (Dodt et al, 1993) ont montré que l'activation des MR affecte l'activité basale de l'axe HPA lors du creux et du pic circadien. De plus, des études menées chez des rats âgés ont montré qu'ils présentaient une réduction de la concentration des récepteurs MR au sein de l'hippocampe, augmentant ainsi l'activité basale de l'axe corticotrope (Van Eekelen et al, 1991). Les récepteurs MR de l'hippocampe sont importants en termes de contrôle inhibiteur sur l'activité de l'axe HPA. Les récepteurs GR, dont le taux d'occupation augmente progressivement après un stress et durant l'augmentation circadienne des Gcs, permettraient ainsi d'exercer un rétrocontrôle négatif sur le NPV (Kolber et al, 2008). L'activation prédominante des MR maintient l'excitabilité hippocampique au travers des projections inhibitrices du PVN lors de l'activité basale de l'axe HPA. Inversement, lors de l'augmentation de la concentration en GCs l'activation des GR supprime les réponses hippocampiques, résultant d'une désinhibition du PVN. En réponse au stress, les niveaux de Gcs déclenchent et participent à la boucle de rétrocontrôle négative.

Cependant, l'implication des MR et GR lors du rétrocontrôle ne forme pas un consensus. En effet, bloquer l'activation des MR chez le rat induit une prolongation de la réponse au stress (Pace et Spencer, 2005). De même, Smythe et ses collaborateurs ont montré que le blocage des MR par injection intrahippocampique de spironolactone 10 minutes avant le test comportemental (test de préférence spatiale) provoque des effets anxiolytiques (Smythe

et al, 1996). En effet, le temps passé dans le compartiment blanc (plus lumineux) est plus important chez les rats traités que chez les animaux contrôles. De plus, le nombre de transferts entre les deux compartiments augmente chez les rats expérimentaux. Cependant, des travaux ont montré que les GR sont nécessaires lors du rétrocontrôle négatif après un stress aigu (Spencer et al, 1998 ; Furay et al, 2008). Les différents résultats suggèrent que les MR et les GR interviennent différemment selon le type de stresser, le test comportemental utilisé et la structure impliquée.

C) Glucocorticoïdes, hippocampe et mémoire

1) Impact des glucocorticoïdes sur la mémoire

Oitzl et de Kloet (1992) ont montré que lors de l'apprentissage d'une tâche stressante, la consolidation de cette tâche est améliorée par la sécrétion de GCs (cf également Cordero et Sandi, 1998 ; Sandi and Pinelo-Nava, 2007). Ce résultat est retrouvé pour des apprentissages mettant en jeu la formation hippocampique tels que le conditionnement classique, les évitements passifs et actifs ou des tâches spatiales (Conrad et al, 2005). Une étude récente menée dans la piscine de Morris par Conboy et Sandi (2010) montre que les souris entraînées dans une eau à 22°C développent une meilleure capacité d'apprentissage ainsi que de plus hauts niveaux de corticostérone, par rapport à des souris entraînées dans une eau à 30°C. Des résultats similaires ont montré que l'amélioration des performances cognitives peut être obtenue par l'injection de glucocorticoïdes après l'apprentissage (Mc Gaugh et Roozendaal, 2002).

Contrairement au processus d'apprentissage, l'action des GCs sur le processus de consolidation est dépendante de la tâche (faiblement aversive vs fortement aversive). Dans une tâche faiblement aversive (changement d'environnement de quelques minutes) des injections d'un agoniste aux GCs, immédiatement après la séance d'apprentissage, chez des rats ayant subi une ablation des glandes surrénales, diminuent les performances dans un labyrinthe en Y. De même, l'injection d'un antagoniste GR chez des rats surrénalectomisés, avant et après un apprentissage, diminue les performances dans la piscine de Morris (Oitzl et de Kloet, 1992). Des données similaires ont été retrouvées chez l'Homme où l'injection de cortisol après un apprentissage affecte la mémoire déclarative (Wolf et al, 2001, 2009). Inversement, dans une tâche d'évitement passif fortement aversive, la plupart des études ont montré que la mémoire déclarative était modulée par le niveau des GCs (Roozendaal et al,

1997). De plus, il a été démontré dans une expérience réalisée chez le poulet que l'injection de GCs une heure après l'apprentissage améliore les performances dans une tâche d'évitement passif (Sandi et Rose, 1994). Ainsi, les GCs diminuent les performances de consolidation lors d'une tâche faiblement aversive et facilitent la consolidation mnésique dans les tâches fortement aversives.

Une série d'études a également mis en évidence une perturbation du rappel mnésique, provoquée par le stress. Diamond et al (1992) ont montré que l'exposition à un prédateur avant le rappel d'une information, interfère avec la restitution de cette information dans le labyrinthe aquatique. Un effet délétère comparable sur le rappel d'informations spatiales a été observé après injection de corticostérone 30 minutes avant le test de rétention (de Quervain et al, 1998). Cet effet délétère des GCs sur le rappel d'informations spatiales à long terme a permis de mettre en évidence une implication hippocampique (Roozendaal et al, 2003, Chauveau et al, 2009, Chauveau et al 2010). Des travaux, menés chez l'Homme, ont montré un effet des GCs sur le rappel mnésique (Lupien et al, 1997, de Quervain et al, 2000, 2003). Ces travaux ont montré que l'injection périphérique d'un agoniste des GCs, 30 min avant le rappel d'une liste de mots préalablement apprise, interfère avec le processus de rappel mnésique. Ces différents travaux indiquent que l'expérience d'une situation stressante peut interférer avec le processus de rappel d'une information stockée préalablement. Les processus de rappel mnésique sont perturbés par de hauts niveaux de glucocorticoïdes circulants ou par l'injection dans l'hippocampe d'agonistes des récepteurs aux glucocorticoïdes (Roozendaal, 2002).

Les niveaux de GCs endogènes, l'activation des MR et GR dépendante du contexte sont des éléments essentiels dans les effets bénéfiques ou délétères des glucocorticoïdes sur les formes de mémoires hippocampo-dépendantes. Chez l'Homme comme chez l'animal, une courbe en « U » inversée a été observée entre les doses des corticostéroïdes et les performances cognitives (Lupien et McEwen, 1997).

2) *Impact des GCs sur la plasticité synaptique hippocampique :*

L'induction de la PLT dans l'hippocampe dorsal, et particulièrement dans le champ amonique CA1, est diminuée chez les rats exposés à un stress comportemental (Foy et al, 1987 ; Maggio et Seagal, 2009). De même, l'administration d'une forte dose de corticostérone *in vivo* (Diamond et al, 1992) ou *in vitro* (Alfarez et al, 2002) produit un effet identique. L'activation des récepteurs stéroïdiens peut affecter la conductance calcique des

neurones hippocampiques, modifiant l'efficacité synaptique (Joels, 2008). La corticostérone induit une diminution de la PLT, qui serait liée à l'activation des GR intracellulaires (Krugers et al, 2005). A l'inverse, il a également été montré que la PLT peut être facilitée en présence de concentrations modérées de corticostérone, ou bien diminuée en son absence (Diamond et al, 1992). Des études ont montré que l'activation rapide des MR augmente la PLT (Avital et al, 2006) facilitant ainsi le flux d'informations liées au stress, de l'HV vers l'hypothalamus (Maggio et Segal, 2009a). Plus tardivement, l'activation des GR devient dominante. Ainsi, ces récepteurs augmentent la conductance ionique des canaux calciques facilitant la PLT au sein de l'amygdale, qui joue un rôle dans la formation du souvenir aversif (Blair et al, 2001 ; Krugers et al, 2005). Cet effet se produit une heure après le stress impliquant ainsi l'intervention d'un mécanisme génomique (Maggio et Segal, 2007b). En accord avec ces résultats, les GR pourraient avoir la même fonction au sein de l'HV, dans la formation de souvenirs d'événements stressants (Donley et al, 2005, Maggio et Segal, 2012).

La DLT dans la région CA1 serait facilitée par le stress (Maggio et Segal, 2009b) par un mécanisme qui requière l'intervention des GR (Maggio et Segal, 2007) et leur effet sur les récepteurs NMDA (Yang et al, 2005). La corticostérone module la DLT de manière opposée dans l'hippocampe ventral et dorsal : alors que la DLT augmente dans l'HD, la PLT augmente dans l'HV. Le stress et la corticostérone facilitent la DLT au sein de l'hippocampe dorsal au travers d'un mécanisme GR-dépendant (Maggio et Segal, 2009b). Les stimuli stressants pourraient temporairement supprimer la voie cognitive de l'hippocampe pour permettre la transmission de l'information émotionnelle vers l'amygdale, par l'intermédiaire de l'HV. La manifestation de la DLT est facilitée par le stress, par l'intermédiaire des récepteurs GR (Maggio et Segal, 2009b).

Les effets du stress sur la PLT et la DLT indiquent que les glucocorticoïdes affectent l'excitabilité neuronale de l'HD et de l'HV de manière opposée. Par ailleurs, on observe que les récepteurs aux corticostéroïdes régulent différemment la PLT et la DLT dans l'hippocampe (Maggio et Segal, 2009 ; Segal et al, 2010). Cette régulation est fonction de la concentration en corticostérone, dépendante du temps et de la structure cérébrale (HD/HV). Les mécanismes de PLT et de DLT modifient la connectivité de l'hippocampe avec le reste du cerveau. En condition normale, l'information emprunte la voie dorso-hippocampique, alors que durant une expérience stressante l'information emprunterait la voie ventro-hippocampique (Maggio et Segal, 2010).

OBJECTIFS

Notre revue bibliographique et les travaux antérieurs de l'équipe ont fait émerger plusieurs questions auxquelles nous avons cherché à répondre dans ces travaux de thèse.

Tout d'abord, il s'agissait de déterminer l'origine de la corticostérone : périphérique ou centrale ?

Ensuite, quelle est la nature (membranaire ou génomique) et le type des récepteurs (MR ou GR) impliqués dans les effets rapides et différés du stress sur le rappel mnésique ?

Enfin, quelle est l'implication relative des régions hippocampiques (dorsale ou ventrale) dans les effets délétères du stress sur le rappel mnésique, en fonction du délai post stress et des taux de corticostérone mesurés dans ces mêmes régions ?

Partie expérimentale

I) MATÉRIELS ET MÉTHODES

A) Animaux :

Les expérimentations menées sur les animaux sont conformes à la directive du conseil de la communauté européenne se rapportant à l'utilisation d'animaux de laboratoire à des fins expérimentales (directive n° 86/609/ECC). Les protocoles utilisés dans ce travail de recherche ont été évalués au préalable par le comité d'éthique animal de l'IRBA.

Des souris mâles appartenant à la lignée C57 bl/6J ont été utilisées pour l'ensemble des expériences. Ces souris sont issues d'une lignée consanguine, ce qui favorise l'homogénéité des facteurs génétiques et par conséquent des structures cérébrales. De plus, l'utilisation de souris « knock out » dépourvue de transporteur de corticostérone ont été obtenue par recombinaison homologe dans des cellules souches, l'exon 2 du gène *Cbg* a été flanqué de 2 sites loxP. Ces souris ainsi « floxées » sont très intéressantes car elles permettent d'obtenir un k.o. total ou tissu spécifique du gène *Cbg*. Par croisements avec une souris CMV-Cre un k.o. total du gène *Cbg* a été obtenu et rétrocroisé sur plusieurs générations afin d'obtenir un fond génétique C57BL/6J homogène à 95%. Par croisements de mâles et de femelles *Cbg*^{+/-} entre elles, des souris *Cbg*^{-/-} (déficiência totale), *Cbg*^{+/-} (déficiência partielle) et *Cbg*^{+/+} (animaux contrôles) de mêmes portées ont ainsi été obtenues et étudiées

Hébergement :

Les animaux proviennent de l'élevage Charles River (France). Ils sont livrés à l'âge de 5 mois dans l'animalerie où ils sont hébergés tout au long de l'expérimentation, dans un environnement contrôlé (température ambiante : $21 \pm 1^\circ\text{C}$, humidité relative : $45 \pm 10\%$, éclairage artificiel de 7h00 à 19h00). Pendant les 2 premières semaines, les souris sont hébergées dans des cages collectives. La surface au sol des cages est de 720 cm^2 . Conformément aux normes européennes (décret n°2001-486 du 6 juin 2001, Journal Officiel), les souris sont regroupées par 10 animaux par cage, chacune des souris ayant un poids

compris entre 20 et 25 g. Une semaine avant la chirurgie, elles sont transférées dans des cages individuelles dont la surface est de 424 cm² et dont la hauteur est de 14 cm. La litière est changée une fois par semaine. L'aliment standard AO3 pour rats et souris de laboratoire, provenant de SAFE, est délivré *ad libitum* de même que la boisson. Les souris sont manipulées quotidiennement, 6 jours avant l'épreuve comportementale, afin de réduire les réactions de peur et d'anxiété liées à la présence de l'expérimentateur qui pourraient interférer avec les mesures comportementales.

B) Protocole de stress

L'agent stressant est constitué par l'administration de chocs électriques inévitables au niveau des pattes de l'animal. Trois chocs électriques successifs séparés par un intervalle de 15 secondes pendant une minute sont administrés 15 minutes avant la phase de rappel. L'intensité des chocs est de 0,9 mA et la durée de chaque choc est de 10 ms. Les animaux « contrôles » sont placés dans la cage de délivrance des chocs pendant la même durée mais ne reçoivent aucun choc électrique. Les animaux sont replacés dans leur cage à la fin de la procédure de stress avant d'être soumis à la phase de rappel.

L'avantage de ce modèle de stress par chocs électriques réside dans le fait qu'il est très utilisé (études de conditionnement de peur principalement) et qu'il induit une réponse à la fois physiologique (nociception, activation des axes du stress) et psychologique (liée à l'impossibilité de prédire, d'éviter et de contrôler la survenue des chocs électriques). Le stress par l'administration de chocs électriques induit un changement sur le plan comportemental (Chauveau et al, 2009) et endocrinien (décharge de corticostérone plasmatique, Célérier et al, 2004b).

C) Epreuve comportementale :

L'alternance forcée différée

(a) Description du labyrinthe en T:

Cette épreuve est réalisée dans un labyrinthe en forme de « T » fabriqué en PVC opaque et de compartiments isolés par des portes coulissantes. Ce labyrinthe est composé d'une allée centrale (avec un compartiment de départ) et de deux bras latéraux pourvus d'un

compartiment d'arrivée. Chaque bras mesure 75 cm de long, 12 cm de large et 20 cm de hauteur. Les portes s'ouvrent et se ferment automatiquement. L'appareil est piloté à un ordinateur situé dans une pièce adjacente au labyrinthe. De plus, le comportement de l'animal est suivi par une caméra. Le bruit de fond (bruit blanc de 10 décibels) et l'éclairage (40 lux) sont maintenus constants. Des indices visuels (hachurés) sont positionnés sur les murs (Est, Ouest), à un mètre au dessus du dispositif, durant la phase d'acquisition et de rappel.

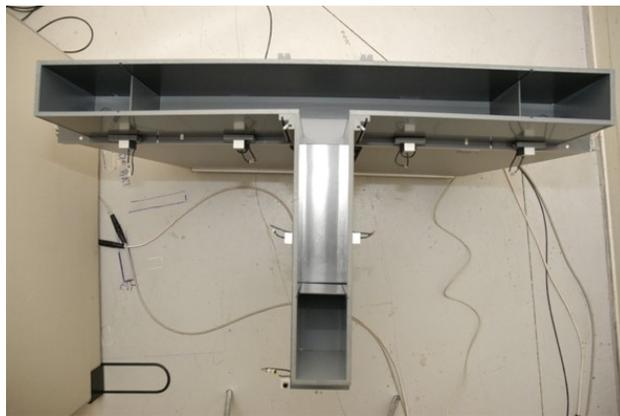


Image 1 : Labyrinthe en T

(b) Principe général de l'alternance forcée différée :

Ce test permet d'évaluer la mémoire spatiale à long terme (Béracochéa et Jaffard, 1985 ; Lalonde, 2002).

L'épreuve comprend 4 phases : une phase d'habituation, une phase d'alternance spontanée, une phase d'acquisition et une phase test de rappel.

Lors de l'habituation (Jour 1 et Jour 2), chaque animal explore librement le labyrinthe pendant 10 minutes. Lors de l'alternance spontanée (Jour 3), l'animal est placé pendant 30 secondes dans le compartiment de départ. Au terme de ce délai, la porte est ouverte et l'animal est libre de choisir l'un des deux bras d'arrivée. Après être entré dans le compartiment d'arrivée, la porte est refermée et l'animal demeure dans ce compartiment

pendant 30 secondes. L'animal est de nouveau replacé dans le compartiment de départ pour un nouvel essai. L'animal est ainsi soumis à une série de 8 essais successifs.

Lors de l'acquisition (Jour 4), la souris réalise deux essais forcés au cours desquels elle est contrainte d'entrer deux fois consécutivement dans le même bras d'arrivée, l'accès à l'autre bras étant bloqué par une porte. Chaque essai est séparé par un intervalle de 30 s.

La phase test de rappel (Jour 5) est réalisée 24 heures après l'acquisition. L'animal est dans ce cas libre d'entrer dans chacun des deux bras d'arrivée de l'appareil, la réponse « correcte » (alternance) étant la visite du bras opposé à celui visité dans la phase d'acquisition.

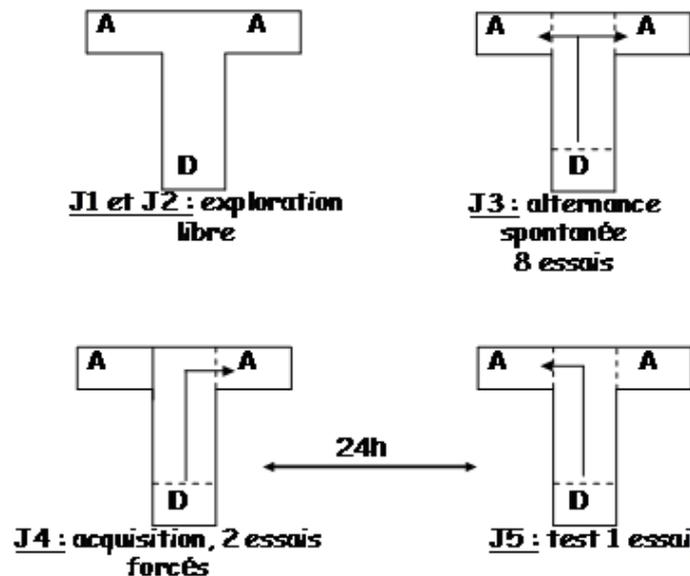


Figure 17 : Protocole d'alternance forcée différée

Chaque animal est soumis à quatre sessions d'essais forcés dans lesquelles il est obligé d'entrer alternativement dans les bras « gauche » ou « droit » de l'appareil, afin de compenser une éventuelle préférence spatiale pour l'un des deux côtés lors de la phase Test. Chaque session est séparée par un délai de 72 heures.

(c) Type de réponse évaluée :

Le critère mesuré est le pourcentage d'alternance, le hasard étant de 50 % (une chance sur deux d'alterner). L'alternance est un indice mnésique.

D) Pharmacologie :

1) Voie d'administration pharmacologique :

A l'exception de la métyrapone injectée 30 min avant la phase test par voie ip, tous les produits sont injectés in situ bilatéralement dans l'hippocampe.

Deux guide-canules (inox ; Ø ext = 0,45 mm ; longueur = 8 mm ; Le Guellec tubular components, France) ont été implantés bilatéralement dans l'hippocampe dorsal ou ventral selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes (en mm par rapport au bregma) :

Pour l'HV : AP = -2,9 mm ; L = +/- 2,9 mm ; V = -3,1 mm.

Pour l'HD : AP = -2,0 mm ; L = +/- 1,3 mm ; V = - 1,0 mm.

Une vis de fixation (inox ; pied de vis : Ø= 0,5 mm ; longueur= 1,0 mm ; FOM 2000, France) est insérée dans le crâne. L'ensemble est fixé sur le crâne de l'animal par un ciment dentaire. Un mandrin est déposé dans chaque guide-canule pour éviter l'obturation. Les animaux récupèrent de l'opération pendant une semaine dans leur cage à l'animalerie avant les épreuves comportementales.

Lors de la phase test, les produits sont injectés par des canules (diamètre extérieur = 0,23 mm ; longueur = 9 mm) reliées à une seringue Hamilton (1µl) par des cathéters de polyéthylène. Chaque canule est insérée dans son guide-canule. Les substances sont administrées par injection bilatérale intrahippocampique dorsale ou ventrale, 15 min avant le stress par l'intermédiaire d'un pousse-seringue, au débit de 0,05 µl/min pendant 9 min (soit un volume injecté de 0,45 µl de chaque côté).

2) Molécules utilisées

Implication de la corticostérone dans les effets rapides du stress.

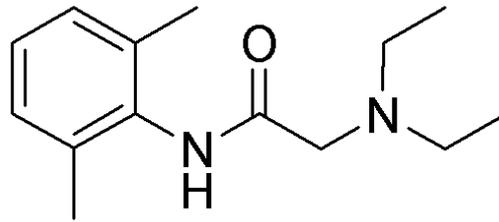


Figure 18 : métyrapone

Afin de s'assurer de l'implication de la corticostérone dans les effets du stress aigu sur l'alternance différée, nous avons injecté de la **métyrapone** (35 mg/kg par voie intrapéritonéale; LGC Promochem, France). La **métyrapone** inhibe la 11- β -hydroxylase (qui intervient dans la synthèse de la corticostérone) et donc la synthèse de corticostérone induite par l'administration du stress aigu (Célérier, 2002). La métyrapone a été dissoute dans un mélange de 2% d'éthanol et de 98% d'une solution physiologique (NaCl 0,9%) et injectée chez la souris à la dose de 0,1 ml de solution pour 10 g de poids corporel. La métyrapone est injectée 30 minutes avant le stress.

Afin de simuler l'effet du stress sur les performances mnésiques, nous avons injecté bilatéralement de la **corticostérone** (Sigma, France) dans l'hippocampe dorsal (0,4 μ l/côté) à une concentration de 1 mg/ml. La corticostérone a été diluée dans du Liquide Céphalo-rachidien artificiel (LCRa ; solution tampon phosphate Dulbecco ; composition en g/L : CaCl₂ : 0,133 ; MgCl₂ : 0,1 ; KCl : 0,2 ; KH₂PO₄ : 0,2 ; NaCl : 8,0 ; Na₂HPO₄ : 1,15 ; pH de 7,4 ; Sigma, France). La corticostérone est injectée 15 minutes avant le stress.

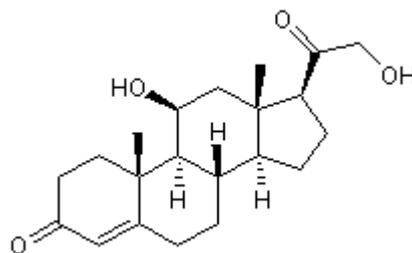


Figure 19 : corticostérone

Détermination du type (MR ou GR) et de la nature (membranaire ou génomique) des récepteurs et des régions hippocampiques impliqués.

Afin de vérifier l'implication de récepteurs membranaires à la corticostérone dans les effets rapides du stress et de la corticostérone, nous avons injecté in situ dans l'hippocampe dorsal de la corticostérone sous une forme complexée à la BSA (« sérum albumine bovine ») par des liaisons covalentes (dilution dans du LCRA ; 1mg/ml ; 0,5 µl/côté). Cette molécule (**Cort-3CMO-BSA**, stœchiométrie 30-1) a été synthétisée par l'Ecole Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux ; U862 Inserm physiopathologie de la mémoire, Bordeaux, France ; pour plus d'informations, voir notre article en annexe 2). La Cort-3CMO-BSA est injectée 15 minutes avant le stress.

Afin de s'assurer que la corticostérone ne provoquait aucun effet génomique dans nos conditions expérimentales, nous avons injecté de l'**anisomycine**, antibiotique inhibiteur de la synthèse protéique (160 µg/µl, Sigma, France). Ce produit est dilué dans HCl (1 M) et dans du LCRA. L'anisomycine est injectée 15 minutes avant le stress (annexe II)

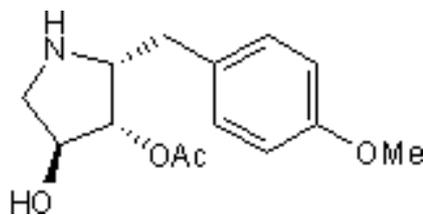


Figure 20 : anisomycine

Afin de déterminer l'implication des récepteurs MR et/ou GR, nous avons injecté in situ dans l'hippocampe dorsal ou ventral un antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes (**RU 28318**, à une concentration de 20 mg/ml Tocris, St Louis, MO) ou glucocorticoïdes (**RU 38486**, à une concentration de 20 mg/ml Tocris, St Louis, MO). Ces antagonistes spécifiques ont été dilués dans une solution de 2% d'éthanol et de 98% de LCRA. Le RU 28318 et le RU 38486 sont des antagonistes compétitifs qui, en se fixant sur les sites de l'agoniste naturel (corticostérone) des récepteurs, empêchent la fixation de la corticostérone. Ces antagonistes sont injectés 15 min, 45 min ou 90 min avant le stress selon le protocole.

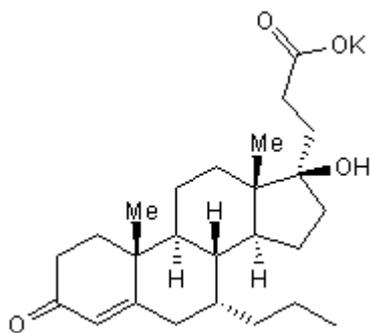


Figure 21 : RU 28318 (antagoniste des récepteurs aux minéralocorticoïdes)

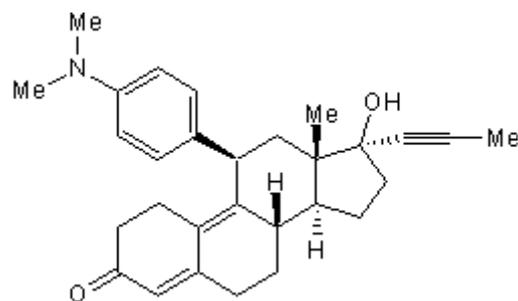


Figure 22 : RU 38486 (antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes)

E) Microdialyse intracérébrale :

1) Principe

Le principe de la microdialyse est la diffusion passive de molécules au travers d'une membrane semi-perméable (figure 23). La microdialyse ne nécessite pas d'extraction tissulaire. Les dialysats sont prélevés au cours du temps afin de doser la corticostérone. Pour cela, un guide-sonde est implanté dans l'hippocampe dorsal et/ou ventral selon les coordonnées stéréotaxiques ci-dessous. Une semaine après l'opération, lors de la phase test, la sonde est insérée dans le guide-sonde. La membrane de la sonde devient l'interface entre deux milieux liquidiens : le milieu extracellulaire cérébral et le milieu de perfusion. Les molécules présentes dans le milieu extracellulaire cérébral sont alors échangées par simple diffusion selon le gradient de concentration (passage par diffusion d'un composé chimique ou d'un ion, du milieu où il est le plus concentré vers le moins concentré) en fonction du débit de la dialyse (plus le débit de dialyse est élevé, moins l'équilibre des concentrations a le temps de s'établir). Le rendement de la sonde a été estimé in vitro, la sonde a été immergée dans une solution tampon phosphate Dulbecco avec une concentration de 1mg/μl de corticostérone maintenue à 37°C. La solution tampon est perfusée à un débit de 1μl/min. Le rendement se calcule entre le rapport des concentrations dans le dialysat et des concentrations dans le milieu extracellulaire. Ce rendement est d'environ 60% dans nos conditions expérimentales.

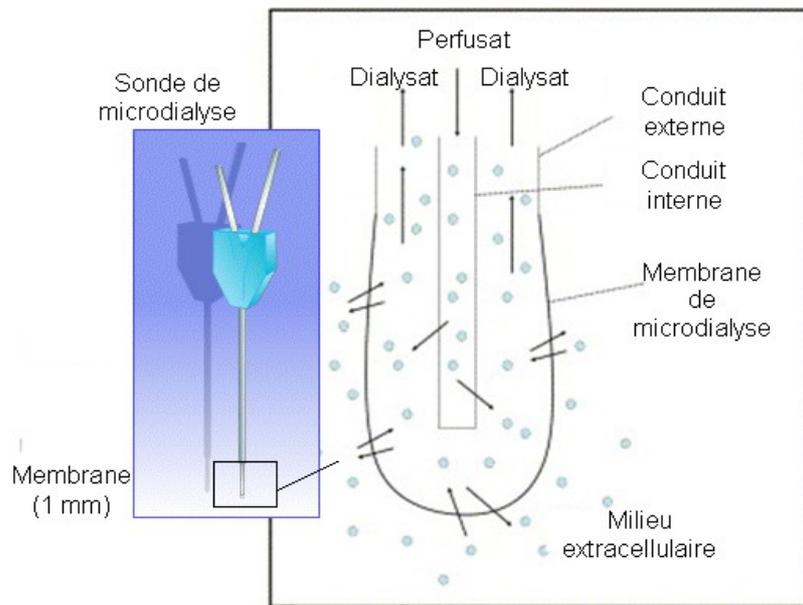


Figure 23 : Principe de fonctionnement de la sonde de microdialyse CMA 7

2) Mise en œuvre

Le crâne de l'animal est trépané de 3 trous d'un diamètre de 600 μm dont 2 pour les guides-sondes (CMA/7 ; CMA microdialysis, Suède) et 1 pour une vis de fixation (inox ; pied de vis : $\text{\O} = 0,5 \text{ mm}$; longueur = 1,0 mm ; FOM 2000, France) insérée dans le crâne. Les guides-sondes sont implantés bilatéralement dans l'HD ou l'HV selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes (en mm par rapport au bregma) :

Pour l'HV : AP = -2,9 mm ; L = +/- 2,9 mm ; V = -2,8 mm.

Pour l'HD : AP = -2,0 mm ; L = +/- 1,3 mm ; V = - 0,8 mm.

L'ensemble est recouvert de ciment dentaire.

Après une semaine de récupération, les sondes (CMA/7 ; CMA Microdialysis, Suède ; longueur membrane = 1 mm, cuprophane, cut-off 6000 Da) perfusées par du LCRA à un débit de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ sont introduites dans leur guide-sonde. Lors de la perfusion des sondes, les animaux sont libres de tout mouvement dans une enceinte en PVC et ont libre accès à la nourriture et à l'eau. Les cathéters sont reliés à un bras asservis aux mouvements de l'animal (MCS/5 five channel swivel, INSTECH, USA). Afin de permettre l'équilibre des concentrations extracellulaires, les sondes sont perfusées pendant 12 heures la veille de l'expérience à un débit de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Benveniste et Huttemeier, 1990). Par la suite, les dialysats

sont recueillis toutes les 15 minutes dans un collecteur tournant réfrigéré. Les animaux sont stressés par les chocs électriques (3 chocs électriques de 0,9 mA au niveau des pattes) dans l'enceinte même et les prélèvements sont réalisés pendant 5 heures (2 heures en niveau de base et 3 heures en post-stress) et stockés à -80°C en attente d'analyse.

F) Contrôle histologique

Toutes les expériences avec intervention au niveau cérébral (lésion, canulation) se terminent par le prélèvement du cerveau pour contrôle histologique afin de vérifier la bonne localisation des implantations. Après anesthésie d'une solution de kétamine (50 mg/ml) et de xylazine (1 mg/ml) : 0,1 ml pour 10 g de poids corporel, les souris sont perfusées par voie intracardiaque avec 100 ml de sérum physiologique (NaCl 0,9%) puis 100 ml de formaldéhyde (10%). Les cerveaux sont prélevés et placés à 4°C dans une solution de formol-saccharose (10/30 v/v) pendant 15 jours. Les cerveaux sont coupés frontalement en tranches de $50\ \mu\text{m}$ d'épaisseur au cryostat (-21°C). Les coupes sont ensuite montées sur des lames gélatinées, puis colorées au crésyl violet. Après montage sur lamelle, les coupes sont observées sous microscope optique (x 20) afin de vérifier la localisation des implantations.

G) Dosage de la corticostérone intrahippocampique et plasmatique

Les taux de corticostérone intrahippocampique et plasmatique ont été déterminés grâce à l'utilisation d'un kit commercial (kit ELISA ayant une limite de détection de $16,8\ \text{pg/ml}$; DetectX®, Arbor Assays, Etats-Unis).

Le dosage de corticostérone plasmatique est effectué à la suite des épreuves comportementales. Les animaux sont sacrifiés par décapitation, le sang est recueilli par le tronc vasculaire et déposé dans des tubes secs. Les prélèvements sont immédiatement centrifugés 10 minutes (3000 tours/min à 4°C). Chaque dosage nécessite $50\ \mu\text{l}$ de plasma.

H) Analyse statistique

Pour l'analyse comportementale, les comparaisons entre groupes sont effectuées par analyse de variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs. Cette analyse est suivie d'un test statistique post-hoc, le test de Bonferroni-Dunnnett, permettant la comparaison deux à deux de

tous les groupes expérimentaux. Nous avons réalisé un test t de Student pour comparer les performances mnésiques par rapport au hasard (50%).

Pour les dosages de corticostérone plasmatique, les comparaisons entre groupes ont été réalisées par une ANOVA, suivie d'un test post-hoc de Bonferroni-Dunnnett pour les comparaisons deux à deux.

Enfin, pour les concentrations de corticostérone intrahippocampique, chaque résultat est exprimé en pourcentage par rapport à la valeur de base moyennée à partir des points obtenus avant l'application du stress. Les performances mnésiques sont comparées par une ANOVA (à deux facteurs) en mesures répétées, suivi d'un test post-hoc lorsque justifié.

II) RÉSULTATS

A) Etude 1 : Démonstration de l'origine périphérique de la corticostérone (annexe 1 : Minni, Dorey et al, 2012)

Cette étude avait pour but de démontrer que le transporteur plasmatique de corticostérone (la transcortine ou Cbg) joue un rôle important dans la régulation de l'accès des glucocorticoïdes libres vers le cerveau. A ce titre, des souris dépourvues de transcortines (Cbg^{-/-}) et des souris contrôles (Cbg^{+/+}) ont été utilisées. Leurs performances mnésiques ont été évaluées dans le test d'alternance forcée différée, 15 min après l'administration d'un stress aigu (chocs électriques aux pattes). Par ailleurs, les taux de corticostérone intrahippocampiques dorsaux ont été mesurés avant et après le stress.

Résultats comportementaux

Les résultats ont montré une interaction significative entre le génotype et le stress ($F(1,22) = 4,45$; $p < 0,05$) (Fig 24). Les souris Cbg^{-/-} et Cbg^{+/+} présentent des performances d'alternance similaires en condition non stressante ($75,0\% \pm 7,5\%$ et $83,3\% \pm 7,1\%$, respectivement) contrairement aux performances observées en condition de stress ($33,3\% \pm 9,4\%$ chez le groupe Cbg^{+/+} et $70,8\% \pm 9,7\%$ chez le groupe Cbg^{-/-} ; $p < 0,01$).

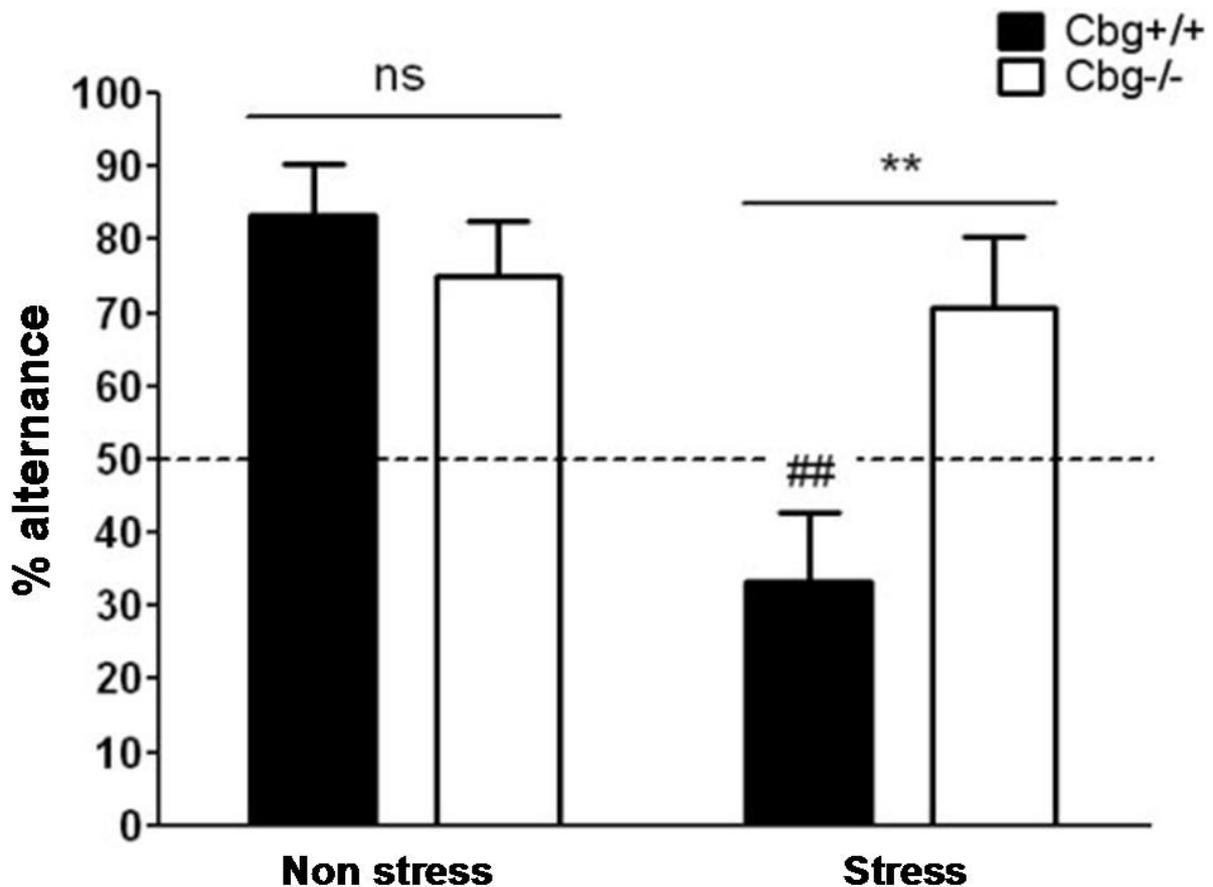


Figure 24 : Effet du stress sur les performances d'alternance différée chez les souris Cbg-/- et Cbg +/+.

Le niveau de hasard est de 50%

Effet génotypique : ** : $p < 0,01$, ns : non significatif

Comparaison par rapport au groupe Cbg +/+ non stressé : ## : $p < 0,001$

Afin de démontrer chez les Cbg -/-, que la sensibilité au stress est liée aux niveaux de corticostérone intrahippocampique, des injections intrahippocampiques de corticostérone chez des souris Cbg +/+ et Cbg -/- ont été pratiquées. Les résultats ont montré un effet significatif de l'injection ($F(1,39) = 14,8$; $p < 0,001$; fig 25). En effet, l'injection de corticostérone a diminué de façon significative les performances mnésiques des deux groupes ($45,5 \pm 12,5\%$ pour les souris Cbg +/+ et $40,9 \pm 11,3\%$ pour les souris Cbg -/-, $p < 0,001$ entre les deux groupes) contrairement à l'injection de liquide céphalo-rachidien ($85,7 \pm 6,3\%$ pour les souris Cbg +/+ et $90,0 \pm 6,7\%$ pour les souris Cbg -/-, n.s).

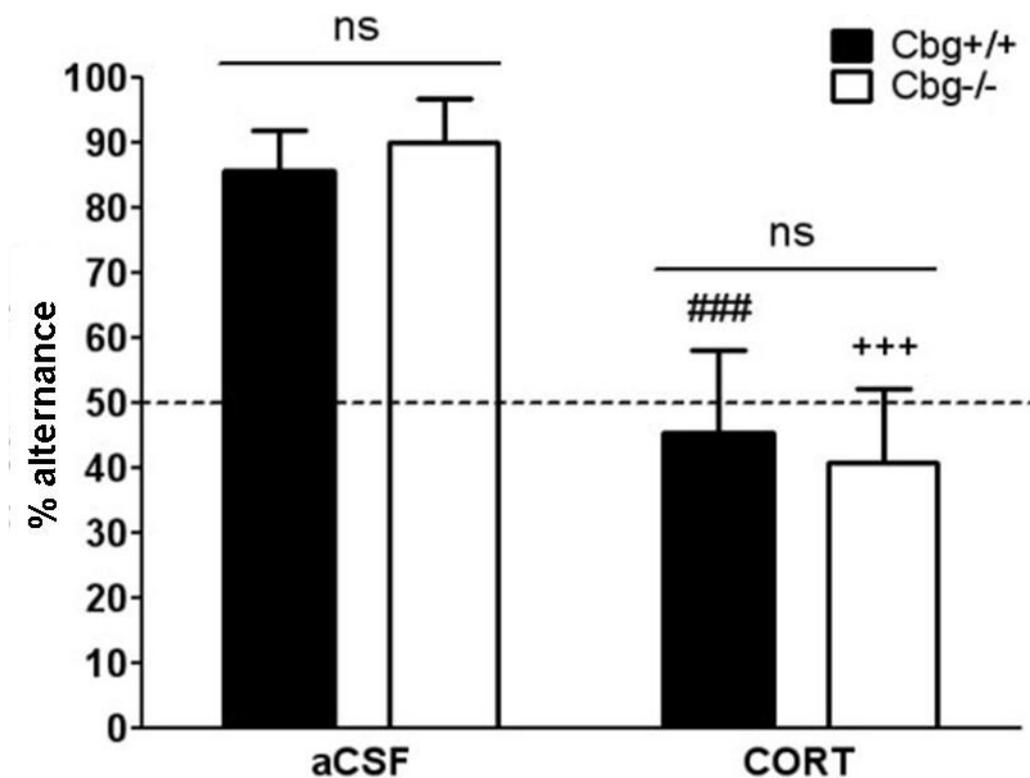


Figure 25 : Effet de l'injection de corticostérone dans l'hippocampe dorsal.

Le hasard est fixé à 50 %

Comparaison avec les souris Cbg +/+ aCSF : ### : $p < 0,001$

Comparaison avec les souris Cbg -/- aCSF : +++ : $p < 0,001$

Données endocriniennes

La figure 26 représente les concentrations de corticostérone dans l'HD. Les résultats révèlent une différence significative entre les groupes au cours du temps ($F(14,210) = 3,44$; $p < 0,001$). Chez les animaux Cbg $^{+/+}$, le stress aigu induit une augmentation progressive des taux de corticostérone entre 15 et 90 min, comparé au dernier dialysat prélevé en condition non stress (point « 0 »). De plus, nous observons que la différence la plus élevée par rapport à ce point (« point 0 » ; $96,7 \pm 6,6\%$) est observée 75 min après l'administration du stress ($207,3 \pm 9,1\%$; $p < 0,001$). Cependant, l'augmentation de corticostérone n'a pas été observée chez les animaux Cbg $^{-/-}$ qui présentent des différences significatives avec les animaux Cbg $^{+/+}$ à 30, 60 et 90 minutes post-stress ($p < 0,05$).

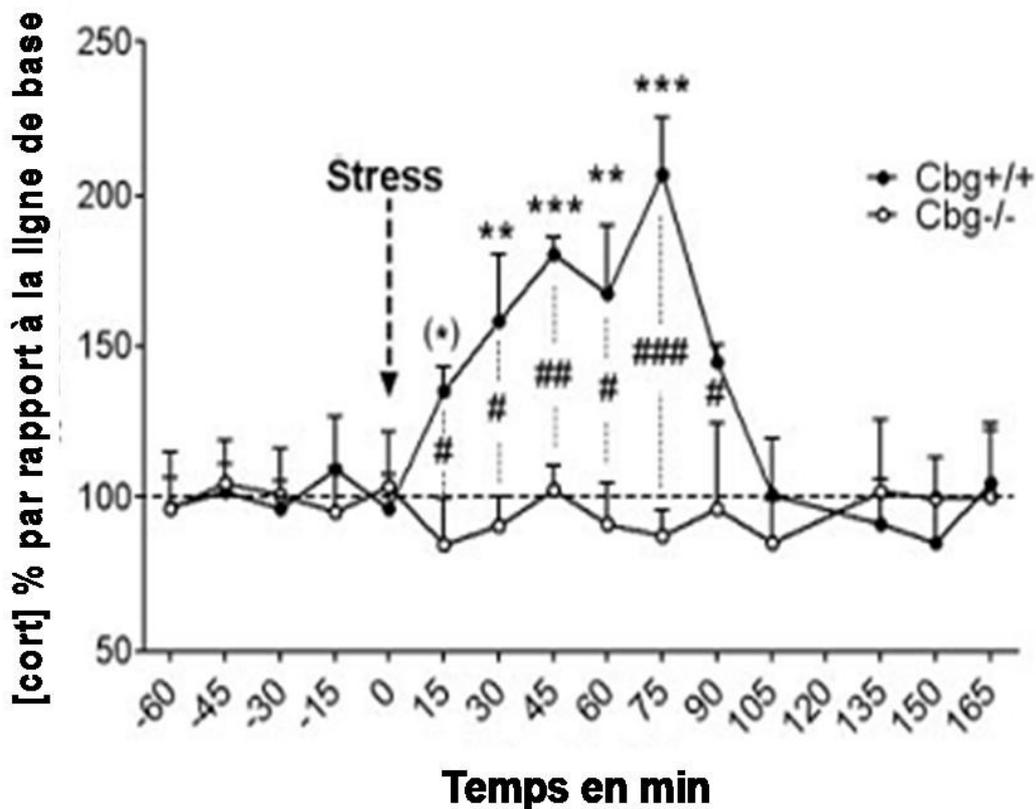


Figure 26 : Etude cinétique des taux de corticostérone dans l'hippocampe dorsal avant et après le stress aigu, chez des animaux déficitaires ou non de transporteur de corticostérone

Ligne de base à 100%, résultats exprimés en concentrations relatives

Comparaison au groupe Cbg +/+ à T=0 : * : p< 0,01 ; *** p< 0,001

Comparaison entre les groupes : # : p<0,005 ; ## p< 0,01 ; ### : p<0,001

B) ETUDE 2 : Impact d'un stress aigu et de la métyrapone sur les performances mnésiques et les concentrations de corticostérone intrahippocampique

Toujours dans le but de démontrer l'origine périphérique de la corticostérone agissant au niveau central, nous avons évalué les effets du stress aigu et d'une injection intrapéritonéale de métyrapone (inhibiteur de synthèse de corticostérone) sur les concentrations intrahippocampiques dorsales de corticostérone et leur impact sur le rappel mnésique. Dans nos expériences, la métyrapone est administrée 30 min avant l'administration du stress.

Les résultats montrent que l'administration d'un stress aigu a des effets délétères sur les performances mnésiques dans l'épreuve d'alternance forcée différée (figure 27A). En effet, le groupe stressé présente des taux d'alternance plus faibles que le groupe non-stressé ($46,6 \pm 9,2\%$ et $85,0 \pm 5,5\%$, respectivement, $p < 0,001$).

Les données de la figure 27B, révèlent que l'administration de la métyrapone bloque l'effet du stress aigu sur les performances mnésiques. En effet, alors que les groupes « solvant » ($77,7 \pm 10,0\%$), « métyrapone » ($76,4 \pm 10,6\%$) et « métyrapone + stress » ($88,8 \pm 7,6\%$) présentent des performances mnésiques similaires, le groupe « stressé + solvant » ($44,4 \pm 12,0\%$) présente des performances significativement plus faibles par rapport aux souris non stressées « solvant » ($p < 0,05$).

La figure 28 représente les concentrations de corticostérone dans l'HD. Les résultats révèlent, chez le groupe « solvant » (cercles noirs), que le stress induit une augmentation progressive des taux de corticostérone entre 15 min ($131,3 \pm 8,2\%$; $t = 2,9$; $p \leq 0,05$) et 90 min ($179,7 \pm 21,3\%$; $t = 2,9$; $p \leq 0,05$). De plus, nous observons que la différence la plus élevée par rapport au dernier point avant l'administration du stress (« temps 0 » ; $108,0 \pm 10,9\%$) est observée 60 min après l'administration du stress ($200,2 \pm 31,6\%$; $t = 4,1$; $p \leq 0,001$). Contrairement au groupe « solvant », le groupe « métyrapone » (cercles blancs) ne présente pas d'augmentation progressive des taux de corticostérone après l'administration du stress.

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que la corticostérone induite en réponse au stress aigu, affectant le rappel dans l'épreuve d'alternance forcée différée, est d'origine périphérique.

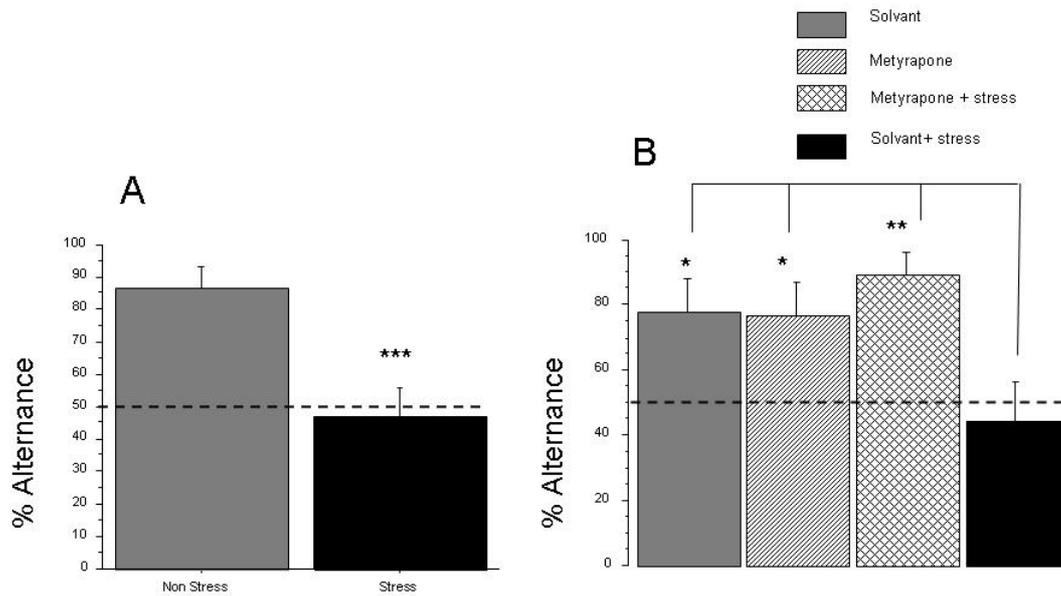


Figure 27 : (A) : Effet du stress sur les performances en alternance forcée différée.

(B) : Effet de l'injection de la métyrapone sur les performances d'alternance.

Le hasard est à 50% (ligne pointillée)

Fig A : Comparaison au groupe non stress : *** : $p < 0,001$

Fig B : Comparaison au groupe « solvant + stress » : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$

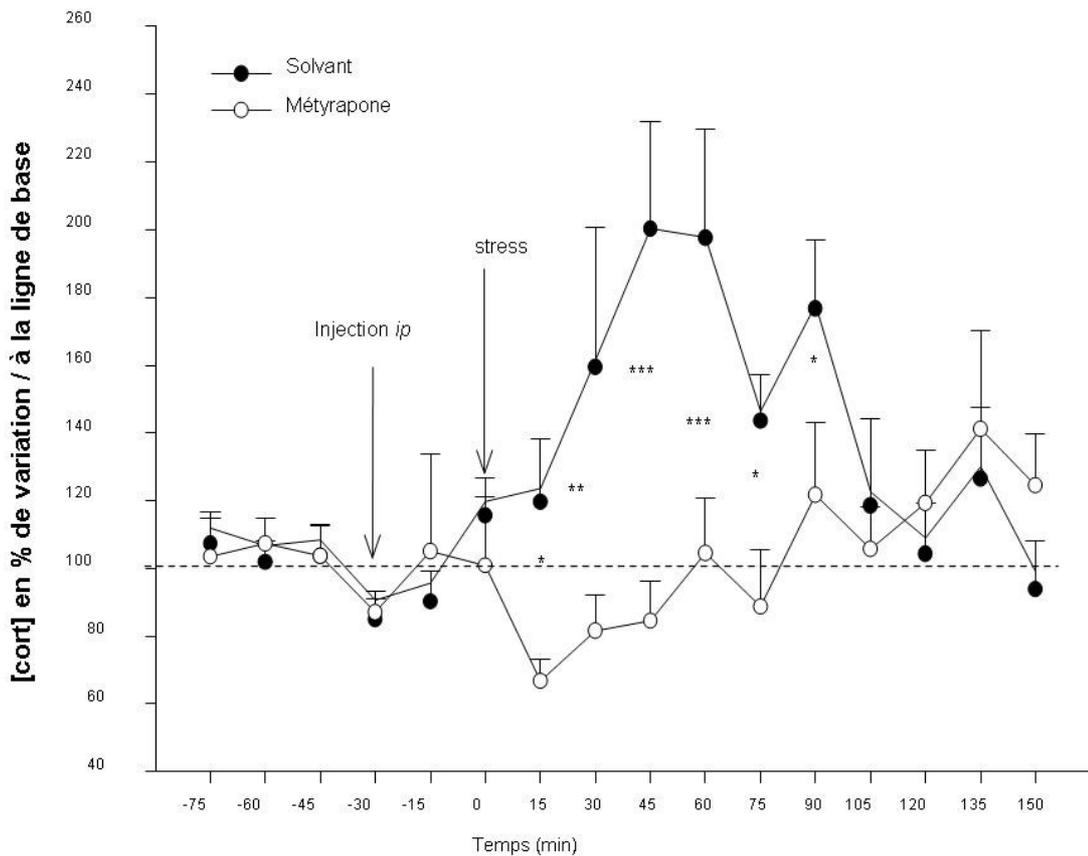


Figure 28 : Effet de la métyrapone sur la cinétique des taux de corticostérone dans l'hippocampe dorsal.

La ligne de base (100%) est représentée en pointillé. Résultats exprimés en concentrations relatives.

Effet de l'injection de métyrapone : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Conclusion :

Les résultats ont mis en évidence que les souris transgéniques Cbg \neg/\neg étaient insensibles au stress appliqué avant le rappel mnésique. Nous avons montré que les souris transgéniques ne présentent pas le même profil endocrinien que les souris « contrôles » après l'administration du stress. Pour conclure, nous avons démontré que la Cbg (transcortine) est nécessaire au transport des glucocorticoïdes vers le cerveau et que l'origine de la corticostérone agissant au niveau central est donc périphérique. Par ailleurs nos résultats, en accord avec ceux de Qian et al (2011), ont montré que la protéine Cbg est responsable de l'augmentation différée de corticostérone libre vers l'HD. Nous suggérons que la libération rapide de la protéine Cbg après un stress aigu détermine la concentration en glucocorticoïde

libre vers l'HD. La Cbg intervient dans l'adaptation rapide au stress aigu (délai de 15 minutes après le stress).

Les données dégagées de l'étude pharmacologique montrent également l'implication de la corticostérone d'origine périphérique dans les effets délétères du stress sur le rappel mnésique.

Dans les deux expériences, l'effet délétère du stress sur le rappel mnésique paraît associé à un taux élevé de corticostérone dans l'HD.

C) Etude 3 : Détermination de la nature (membranaire versus génomique) et du type (MR versus GR) des récepteurs de l'HD dans les effets rapides du stress sur l'alternance différée (annexe 2 : Dorey et al, 2011)

1) Expérience 1 : Effets d'une injection intrahippocampique bilatérale (15 min avant le test) de corticostérone et de Cort-3CMO-BSA sur les performances mnésiques

L'effet des injections intrahippocampiques bilatérales de corticostérone ou de Cort-3CMO-BSA sur les performances mnésiques a été évalué. Ces molécules ont été administrées afin de s'assurer qu'elles produisent des déficits mnésiques rapides et similaires à ceux résultant d'un stress aigu. Par ailleurs, afin d'évaluer des effets rapides membranaires délétères du stress sur le rappel mnésique la Cort-3CMO-BSA (complexe macromoléculaire qui ne franchit pas la membrane cellulaire) à été utilisée. Ces composés ont été injectés 15 min avant le test.

Les données de la figure 29A montrent une différence significative entre les groupes ($F(2,57) = 4,3$; $p = 0,0018$). On observe que le groupe ayant reçu l'injection intrahippocampique de corticostérone dans l'HD a des performances ($44,4\% \pm 12,0\%$) plus faibles que le groupe « témoin » ($75,0 \pm 9,9\%$, $p < 0,005$) et le groupe « sham-opéré » (animaux opérés avec injection de solution véhicule) ($85,0 \pm 8,2\%$, $p < 0,01$).

Les résultats des effets de l'injection de la Cort-3CMO-BSA sont présentés dans la figure 29B. On observe une différence significative entre les groupes ($F(2,33) = 5,31$; $p = 0,008$). Le groupe ayant reçu l'injection de Cort-3CMO-BSA présentent des performances

plus faibles ($40,4 \pm 5,4\%$) par rapport aux groupes « non-opéré » ($72,9 \pm 4,7\%$) et « BSA » ($71,1 \pm 5,1\%$) ($p < 0,01$ dans les deux comparaisons).

Ces résultats nous permettent de conclure que les injections intrahippocampiques de Cort-3CMO-BSA et de corticostérone dans l'HD 15 minutes avant le test, diminuent les performances mnésiques de façon similaire au stress aigu.

Nous pouvons dès lors conclure que les effets rapides du stress sur le rappel mnésique sont médiés par les récepteurs membranaires aux GCs.

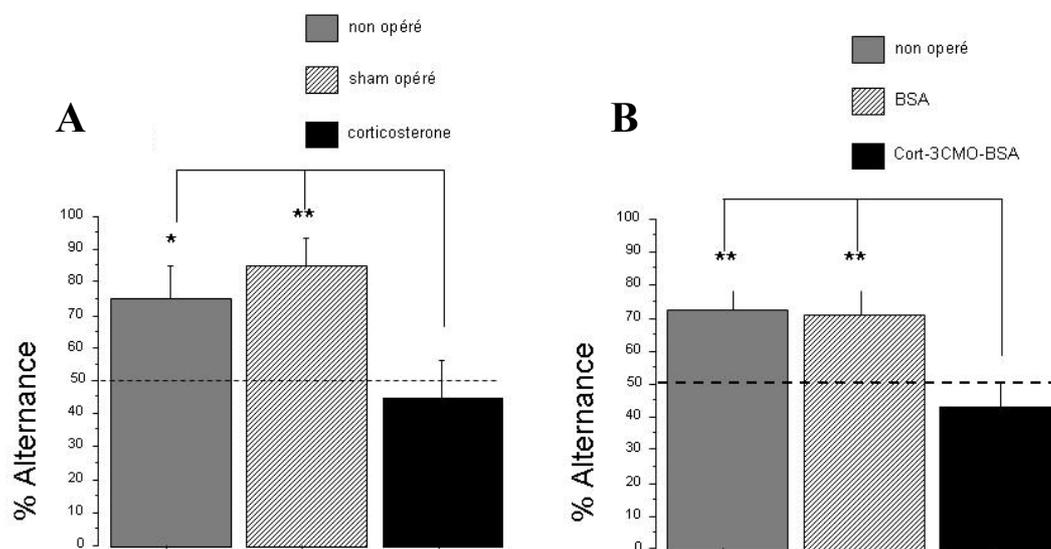


Figure 29 : (A) : Effet de l'injection intrahippocampique dorsale de corticostérone sur les performances d'alternance.

(B) : Effet de l'injection intrahippocampique dorsale de la Cort-3CMO-BSA sur les performances d'alternance.

Fig A : Effet de l'injection de corticostérone : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$

Fig B : Effet de l'injection de cort-3CMO-BSA : ** : $p < 0,01$

2) *Expérience 2 : Implication des récepteurs membranaires de type MR dans les effets rapides du stress sur les performances d'alternance*

Dans une deuxième expérience, l'antagoniste des récepteurs GR (RU 38486) ou MR (RU 28318) a été injecté bilatéralement dans l'HD 15 min avant l'injection de Cort-3CMO-BSA, afin de déterminer le type de récepteur membranaire impliqué dans les effets mnésiques de la Cort-3CMO-BSA.

Les résultats présentés en figure 30 révèlent une différence significative entre les groupes ($F(3,58) = 5,48$) ; $p = 0,002$). En effet, les performances mnésiques observées chez le groupe « solvant + Cort-3CMO-BSA » ($33,3 \pm 14,2\%$) sont significativement plus faibles par rapport au groupe « solvant + solvant » ($70,0 \pm 12,9\%$) et au groupe « antagoniste MR + Cort-3CMO-BSA » ($84,4 \pm 6,0\%$) ($p < 0,02$ et $p < 0,002$ respectivement). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre le groupe « antagoniste GR + Cort-3CMO-BSA » ($43,2 \pm 8,9\%$) et le groupe « solvant + Cort-3CMO-BSA » ($33,7 \pm 9,1\%$).

L'injection de l'antagoniste MR, mais non GR, bloque les effets rapides délétères de la Cort-3CMO-BSA sur les performances mnésiques. On en conclue que les récepteurs membranaires impliqués dans les effets rapides de la Cort-3CMO-BSA sur le rappel sont de type MR et non GR.

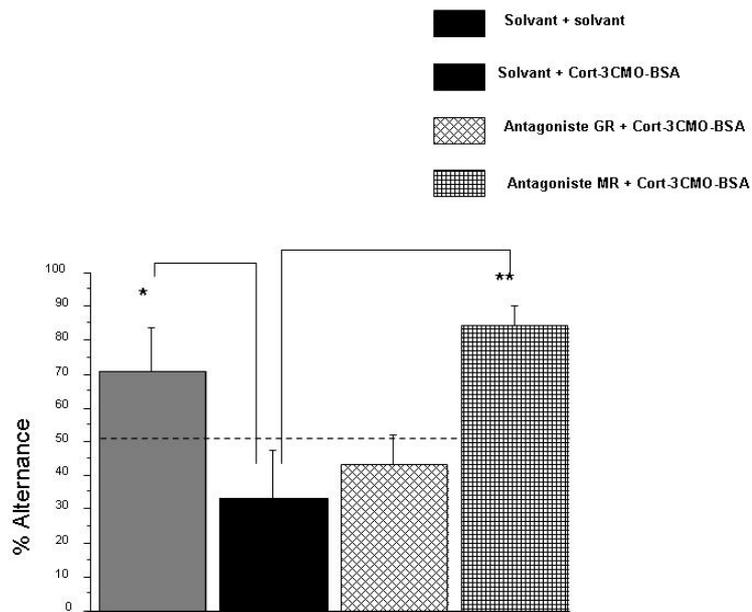


Figure 30 : Effet des injections intrahippocampiques dorsales des antagonistes GR ou MR sur les performances d'alternance évaluées 15 min après le stress.

Comparaison par rapport au groupe Cort-3CMO-BSA : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$

3) *Expérience 3 : Effet des injections intrahippocampiques des antagonistes MR ou GR sur les performances mnésiques évaluées 60 min après le stress*

Enfin, nous avons étudié l'effet de l'injection bilatérale du RU 28318 dans l'HD 15 min avant le stress aigu. Les performances mnésiques ont été évaluées 15 ou 60 min après le stress afin de déterminer si les récepteurs de type MR sont impliqués dans les effets rapides et différés du stress sur le rappel.

Les données représentées figure 31 révèlent une différence significative entre les groupes ($F(3,90) = 5,78$; $p = 0,001$). Les performances mnésiques du groupe « antagoniste MR + stress 15 min » ($68,0 \pm 9,5\%$) sont significativement différentes en comparaison au groupe « solvant + stressé » ($30,0 \pm 10,5\%$; $p < 0,01$). Par contre, nous n'observons pas de différence significative entre ce dernier groupe et le groupe « antagoniste MR + stressé 60 min » ($39,2 \pm 9,3\%$). Cependant, ce dernier groupe présente des performances

significativement plus faibles en comparaison des groupes « solvant + non stressé » ($80,9 \pm 8,7\%$) et « antagoniste MR + stressé 15 min » ($p= 0,002$ et $p= 0,02$, respectivement).

L'antagoniste MR injecté dans l'HD ne bloque pas les effets délétères du stress aigu sur les performances mnésiques évaluées 1 heure après le stress. On peut donc conclure que les récepteurs MR ne sont pas impliqués dans les effets différés du stress aigu sur la mémoire.

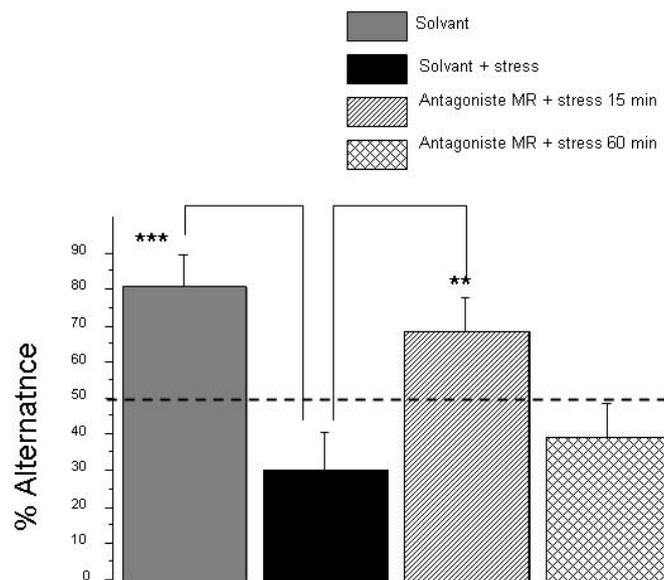


Figure 31 : Effet des injections des antagonistes MR dans l'hippocampe dorsal sur les performances d'alternance évaluées 15 et 60 min après le stress.

Comparaison par rapport au groupe stressé : ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

4) Conclusion

En conclusion, notre étude a permis de mettre en évidence l'implication des GCs et des récepteurs membranaires de type MR dans les effets rapides non-génomiques du stress sur le rappel mnésique.

Cette étude démontre que les récepteurs membranaires aux GCs de type MR sont responsables des effets cognitifs rapides du stress et de la Cort-3CMO-BSA sur le rappel

mnésique. En effet, dans notre tâche comportementale, l'antagoniste RU 28318 bloque les effets délétères du stress ou de l'administration de la Cort-3CMO-BSA sur le rappel, alors que l'antagoniste GR (RU 38486) est incapable de prévenir ces effets. Ainsi, les récepteurs membranaires de type MR de l'HD paraissent responsables des altérations cognitives rapides, induites par le stress et la corticostérone.

D) Etude 4 : régions hippocampiques et type de récepteurs impliqués dans les effets rapides et différés du stress aigu (annexe 3 : Dorey et al, 2012)

Les résultats précédents ont montré que l'augmentation rapide de corticostérone dans l'HD, 15 minutes après un stress aigu, altère les performances mnésiques sous-tendues par les récepteurs de type MR via un mécanisme membranaire non-génomique (Dorey et al, 2011). Pour compléter cette étude, nous avons entrepris de déterminer l'implication relative de l'HD et de l'HV ainsi que des différents types de récepteurs aux GCs dans les effets différés (>30 minutes) du stress sur le rappel mnésique.

1) Expérience 1 : étude de la cinétique des taux de corticostérone au sein de l'HD et l'HV

Dans une première expérience, nous avons mesuré l'impact du stress aigu sur les concentrations de corticostérone au sein de l'hippocampe dorsal et ventral, sur le même animal vigile. A cet effet, l'animal est porteur d'une double canulation (une canule dans l'HD et une autre dans l'HV). Parallèlement, ces données ont été comparées aux résultats comportementaux évaluant l'impact du stress sur les performances mnésiques à différents délais choisis en fonction des pics de corticostérone déterminés sur la courbe obtenue par l'étude de microdialyse.

Microdialyse intrahippocampique (fig 32)

Les comparaisons intergroupes présentées dans la figure A montrent que les concentrations en corticostérone de l'HD et l'HV diffèrent significativement à 60 minutes ($197,4 \pm 24,7\%$ contre $110,9 \pm 7,5\%$; $p < 0,05$, respectivement) et 105 minutes ($103,0 \pm 10,5\%$ contre $165,0 \pm 19,2\%$, respectivement, $p < 0,05$). Dans l'HD, le stress induit une augmentation progressive et significative des concentrations en corticostérone entre 15 ($137,6 \pm 20,2\%$; $t = 2,3$; $p \leq 0,05$) et 90 minutes ($139,1 \pm 24,1\%$; $t = 2,32$; $p \leq 0,05$) en comparaison

au point « T0 » ($97,1 \pm 4,9\%$). La concentration la plus élevée de corticostérone a été observée 60 minutes après le stress ($197 \pm 24,7\%$; $t = 3,6$; $p \leq 0,01$). Au sein de l'HV, en comparaison au point « T0 » ($97,3 \pm 4,9\%$), la concentration la plus élevée est observée 105 minutes après le stress ($165,0 \pm 19,2\%$; $t = 3,8$; $p \leq 0,01$).

Données comportementales

L'analyse des données de la figure 33 révèle une différence significative entre les groupes ($F(4,90) = 6,2$; $p = 0,017$). Plus précisément, les groupes stressés dont les performances mnésiques sont évaluées 15, 60 et 105 minutes après le stress présentent des performances significativement différentes par rapport au groupe « non stressé » ($44,4 \pm 8,9\%$; $p < 0,05$; $46,2 \pm 13,3\%$; $p < 0,05$ et $35,1 \pm 13,3\%$; $p < 0,05$; respectivement). Par contre, le groupe stressé évalué 120 minutes après le stress ($79,1 \pm 7,6\%$; NS) ne présente pas de différences significatives avec le groupe « non stressé ».

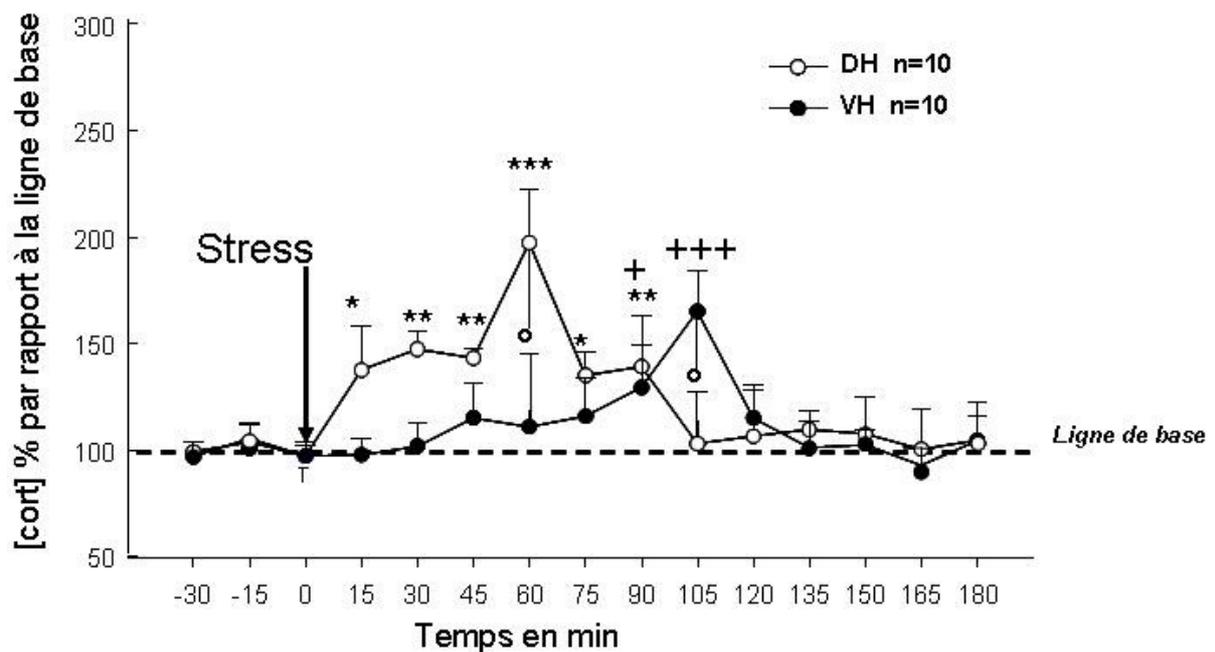


Figure 32 : Etude cinétique simultanée des concentrations en corticostérone dans l'HD et l'HV.

Comparaison par rapport à la ligne de base : HD : * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

HV : + : $p < 0,05$; +++ : $p < 0,001$

Comparaison HD vs HV : ° : $p < 0,05$

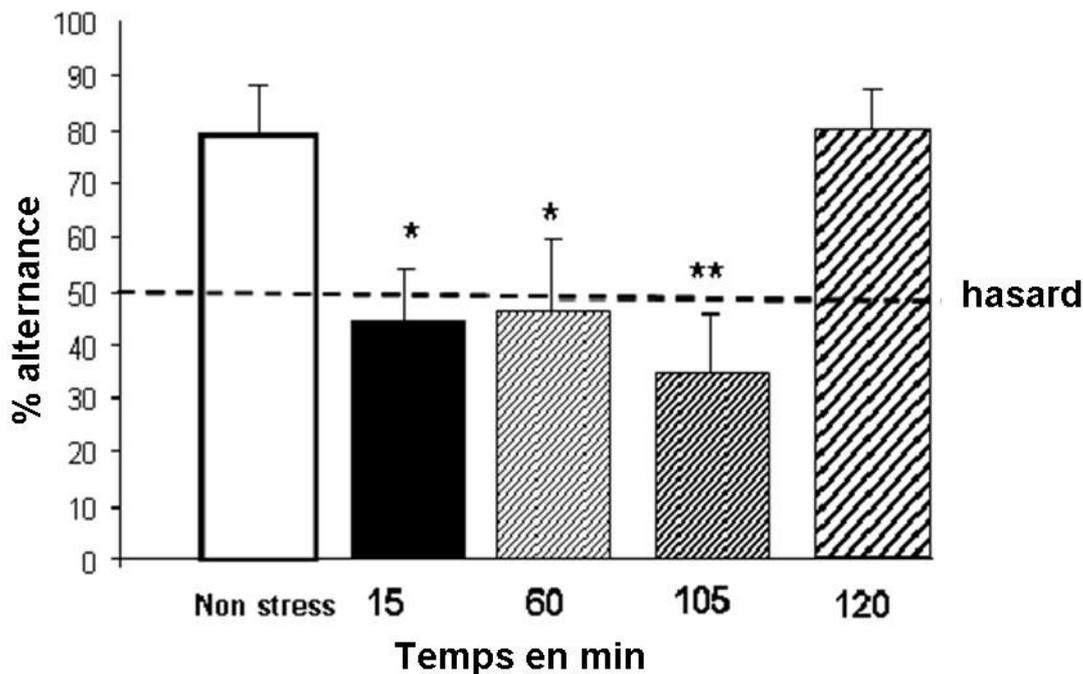


Figure 33 : Effet du stress aigu sur les performances d'alternance évaluées à 15, 60, 105 et 120 min après le stress aigu.

Comparaison par rapport au groupe non stress : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$

Les résultats de cette expérience mettent en évidence une concomitance entre les déficits mnésiques en alternance différée et l'augmentation des taux de corticostérone dans l'HD et l'HV.

2) *Expérience 2 : implication des récepteurs MR et GR de l'HD et l'HV dans le déficit mnésique*

Dans une seconde expérience, nous avons déterminé l'implication des récepteurs aux GCs dans le déficit mnésique, en fonction de l'évolution des concentrations en corticostérone dans l'HD et l'HV. Des résultats préliminaires (non publiés) ont montré que les effets rapides du stress dans la planche à 4 trous (DSCS) étaient liés à l'HD mais non à l'HV (annexe 5). Nous avons donc voulu savoir s'il existe une dissociation de la région dorsale et ventrale de l'hippocampe dans le test d'alternance forcée différée.

Lorsque les performances mnésiques sont évaluées 60 min après le test, les données mettent en évidence une différence globale significative entre les groupes ($F(3,72)=7,1$; $p < 0,01$). Les résultats révèlent qu'après injection de l'antagoniste GR dans l'HD, les performances ne diffèrent pas entre le groupe « non stressé + solvant » en comparaison avec

le groupe « stress + antagoniste GR » ($73,2 \pm 9,6\%$ et $77,9 \pm 9,6\%$; respectivement) (figure 34A). Par contre, dans l'HV l'administration des antagonistes MR ($55,8 \pm 8,4\%$) ou GR ($52,3 \pm 5,4\%$) ne bloquent l'effet délétère du stress sur le rappel (figure 34B).

En revanche, au délai de 105 minutes (qui correspond au pic de corticostérone observé dans l'HV ; cf figure 36), les données révèlent une différence significative entre les groupes $F(3,72)= 9,2$; $p<0,01$). Cependant, chez les souris stressées, l'injection des antagonistes MR ($46,5 \pm 12,7\%$) ou GR ($49,7 \pm 10,3\%$) dans l'HD ne bloque pas les effets délétères du stress (figure 34C). Par contre, après injection dans l'HV de l'antagoniste GR (figure 34D), le groupe « non-stressé + solvant » ($77,1 \pm 8,3\%$) ne présente pas de différence significative avec le groupe « antagoniste GR + Stress » ($72,3 \pm 10,9\%$; NS) contrairement aux groupes « stressé » ($40,8 \pm 6,8\%$; $p< 0,01$) et « antagoniste MR + stress » ($39,1 \pm 11,8\%$; $p< 0,05$).

Pour résumer l'ensemble des données pharmacologiques relatives aux antagonistes des récepteurs aux GCs, les résultats montrent que le déficit mnésique observé 15 min après le stress est bloqué par l'injection dans l'HD d'un antagoniste MR. Au contraire, 60 min après le stress, un antagoniste GR mais non MR administré dans l'HD mais non dans l'HV bloque l'effet délétère du stress sur le rappel mnésique.

Au délai de 105 min post-stress, l'injection d'un antagoniste GR dans l'HV mais non dans l'HD bloque les effets du stress sur le rappel.

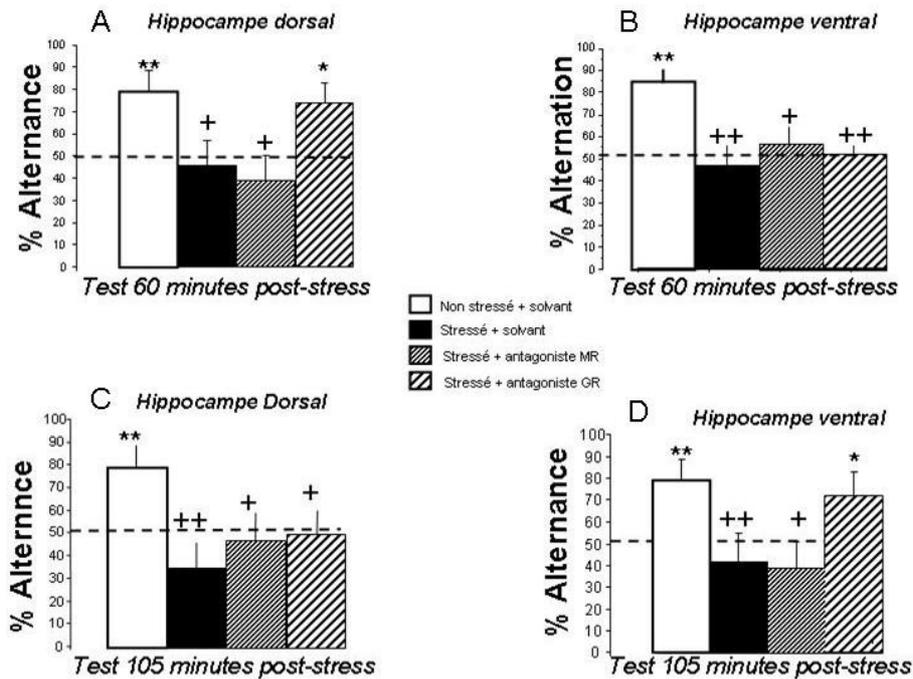


Figure 34 : A et B : Effets des injections intrahippocampiques dorsales et ventrales des antagonistes MR ou GR sur les performances d'alternance, évaluées 60 min après le stress.

C et D : Effets des injections intrahippocampiques dorsales et ventrales des antagonistes MR ou GR sur les performances d'alternance, évaluées 105 min après le stress.

Comparaison par rapport au hasard (50%) : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$
 Comparaison par rapport au groupe non stress : + : $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$

3) Conclusion :

Les récepteurs de type GR de l'HD puis de l'HV sont impliqués dans les effets différés du stress sur le rappel mnésique, cependant à des délais post-stress différents.

Notre étude utilise une approche dynamique de l'évolution temporelle des concentrations en corticostérone de l'HD et l'HV en relation avec les déficits mnésiques induits par le stress aigu et le type de récepteurs impliqués (MR et GR).

Cette triple dissociation (en terme de zones, de récepteurs et de délais) met l'accent sur la complexité de l'interaction stress-mémoire au sein de l'HD et l'HV.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I) DISCUSSION

L'objectif de ce travail de thèse a été de mettre en évidence la contribution des glucocorticoïdes et de leurs récepteurs dans les processus de rappel mnésique rapides et différés, au sein de l'HD et l'HV, dans la tâche d'alternance différée. Notre démarche expérimentale était sous-tendue par les questions suivantes :

- i) Quelle est l'origine de la corticostérone : périphérique ou centrale ?
- ii) Quelle est la nature (membranaire ou génomique) et le type des récepteurs (MR ou GR) impliqués dans les effets rapides et différés du stress sur le rappel mnésique ?
- iii) Quelle est l'implication relative des régions hippocampiques (dorsale ou ventrale) dans les effets délétères du stress sur le rappel mnésique, en fonction du délai post stress et des taux de corticostérone mesurés dans ces mêmes régions ?

A) **Démonstration de l'origine périphérique de la corticostérone agissant au niveau central**

Le test d'alternance forcée différée chez la souris nous a permis de montrer une atteinte de la mémoire spatiale portant sur la phase de rappel après administration d'un stress aigu. Ce résultat peut être mis en parallèle avec les résultats observés chez l'Homme (Nyberg, 1998 ; Burgess, 2008) et avec ceux obtenus dans une épreuve de mémoire contextuelle (Tronche et al, 2009). En effet, chez l'Homme, l'administration d'un stress aigu avant la phase d'acquisition ne perturbe pas ou très peu la phase de restitution (Lupien et al, 2007). Par contre, le stress administré avant la phase de restitution induit une perturbation importante du rappel. Des études confirment la perturbation du rappel en condition de stress. Ainsi, lorsqu'un stressleur expérimental (parler en public) est présenté avant le rappel d'une liste de

mots préalablement apprise, on constate que les sujets stressés rappellent moins d'items par rapport au groupe non stressé (Mc Ewen et Sapolsky, 1995 ; Roozendaal et al, 2003).

1) Corticostérone et hippocampe

Dans l'HD, nous avons observé un lien entre la concentration en corticostérone et les performances des animaux, quelque soit leur statut émotionnel (avant le stress et après le stress). En effet, lorsque la concentration en corticostérone est faible, les souris non stressées ont de meilleures performances. Par contre chez les souris stressées, lorsque les concentrations en corticostérone sont élevées, le rappel mnésique est altéré. Ces résultats sont également observés chez l'Homme (Lupien 2007, 2009 ; Wolf, 2009). Wolf et ses collaborateurs (2011) ont observé qu'une injection de cortisol avant le rappel d'une liste de mots (à valence émotionnelle positive ou négative), affecte le rappel de cette liste. Dans notre étude, nous avons montré que l'injection de métyrapone (inhibiteur de la synthèse de corticostérone), trente minutes avant l'administration du stress aigu, bloque d'une part l'élévation de la corticostérone intrahippocampique et d'autre part son effet délétère sur le rappel mnésique. Des travaux précédents de notre équipe ont permis de montrer grâce à l'utilisation de la métyrapone que le déficit cognitif induit par le stress est associé à un taux élevé de corticostérone dans l'HD (Chauveau et al, 2009).

L'origine périphérique de la corticostérone hippocampique a été établie. Pour cela, en collaboration avec le Dr Marie-Pierre Moisan (INSERM, Laboratoire NutriNeuro, Bordeaux), nous avons utilisé une lignée de souris dépourvue du transporteur de la corticostérone (souris « knock out » en Corticosterone binding globulin, *Cbg*^{-/-}). Les résultats comportementaux ont montré que les animaux ne manifestent pas de perturbation comportementale en condition non stress (Minni, Dorey et al, 2012 ; annexe 1). Par contre, contrairement aux souris témoins (« wild-type »), elles sont insensibles au stress administré juste avant la phase de rappel. De plus, nous avons mesuré par microdialyse la concentration de corticostérone intrahippocampique dorsale des souris *Cbg*^{-/-} suite à l'application du stress. Nos résultats ont montré que ces souris ne présentent pas d'augmentation des concentrations de corticostérone dans l'HD après un stress aigu, contrairement au groupe « wild-type ». Nos données montrent qu'en situation stressante, la déficience en *Cbg* conduit à une augmentation fortement atténuée de la corticostérone dans le plasma et inexistante dans l'hippocampe. L'absence de *Cbg* a pour effet d'altérer les réponses comportementales après un stress. La *Cbg* joue donc

un rôle majeur dans la régulation de la quantité de glucocorticoïdes accédant au cerveau en situation de stress (Minni, Dorey et al, 2012).

Dans une étape ultérieure, nous avons injecté de la corticostérone dans l'hippocampe dorsal des souris *Cb1r*^{-/-}. Les souris *Cb1r*^{-/-} ayant reçu l'injection de corticostérone montraient un déficit mnésique, comparable aux souris « wild-type » stressées (Minni, Dorey et al, 2012). Ce dernier résultat nous a donc permis de confirmer nos précédents résultats montrant la relation causale entre la concentration de corticostérone intrahippocampique et le déficit du rappel mnésique (Chauveau et al., 2009 ; Tronche et al., 2010).

B) Détermination de la nature (membranaire ou génomique) des récepteurs GCs impliqués dans les effets rapides et différés du stress sur le rappel

Dans une étape ultérieure, nous avons voulu préciser la nature (membranaire ou génomique) et le type des récepteurs aux glucocorticoïdes de l'HD impliqués dans les effets rapides ou différés du stress sur le rappel mnésique. Dans cette perspective, nous avons montré que des souris non stressées recevant une injection intrahippocampique bilatérale de Cort-3CMO-BSA (molécule ne traversant pas les membranes cellulaires) présentent des déficits de mémoire comparables à ceux de souris stressées. Ce dernier résultat montre que les effets rapides de la corticostérone sur le rappel mnésique sont dépendants de récepteurs membranaires au niveau de l'HD. De plus, l'administration d'anisomycine, ne bloque pas les effets délétères à court-terme du stress. On peut donc conclure que les effets du stress, médiés par des récepteurs hippocampiques membranaires aux glucocorticoïdes, ne mettent pas en jeu des mécanismes génomiques.

Dans une étape suivante, nous avons alors précisé le type des récepteurs membranaires impliqués dans les effets rapides du stress. A cet effet, nous avons administré préalablement au stress dans l'hippocampe dorsal un antagoniste des récepteurs MR (RU 28318) ou GR (RU 38486). Ainsi nos résultats ont montré une implication des récepteurs membranaires de type MR dans les effets rapides délétères du stress sur le rappel mnésique dans la mesure où seule l'administration de l'antagoniste MR bloquait les effets du stress. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature. En effet, il a été montré que les effets délétères de la corticostérone sur le rappel mnésique impliquent des mécanismes non-génomiques (Sajadi, 2006). De plus, Khaksari et ses collaborateurs (2007) ont montré d'une part que l'administration

intraventriculaire de corticostérone 30 minutes avant la phase test diminue le rappel d'informations et d'autre part, que cet effet est médié par les récepteurs MR et non GR. Nos résultats, en accord avec ceux de Khaksari et al, démontrent de plus l'implication de l'HD dans les effets rapides du stress sur la mémoire.

Cependant, contrairement à notre étude, une étude récente menée par Barsegyan et al (2010) a montré que la Cort-BSA, injectée dans le cortex préfrontal médian altère les performances en mémoire de travail. Dans leur étude, cet effet est bloqué par l'antagoniste GR et non MR. Cette divergence de résultats peut résulter du fait que les sites et les temps (60 min avant la phase de rappel) d'injection des antagonistes diffèrent de notre étude. En effet, pour un délai post-stress de 60 min, on ne peut exclure ni un effet génomique ni l'implication des récepteurs GR, puisque nous avons montré que l'injection de l'antagoniste MR est incapable de bloquer le déficit mnésique induit par la corticostérone.

Par ailleurs, nos travaux ont montré l'apparition d'un pic de corticostérone dans l'HD 60 min après l'administration du stress. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'absence d'effet du RU 28318 sur les performances mnésiques évaluées 60 min après le stress repose sur l'implication des récepteurs GR, qui nécessitent une forte concentration de corticostérone pour être activés. L'ensemble des données recueillies dans notre étude suggère que le stress mettrait d'abord en jeu des récepteurs MR compte tenu de leur faible affinité pour la corticostérone, puis ultérieurement les récepteurs GR qui prolongeraient la réponse au stress (Joëls et al, 2006, 2007, 2008).

C) Implication relative de l'HD et HV dans les effets du stress sur le rappel, en fonction du délai post-stress et du taux de corticostérone

Nous avons formulé l'hypothèse que les récepteurs GR pouvaient être impliqués dans les effets différés du stress dans la mesure où nous avons montré par microdialyse l'émergence de pics distincts dans l'HD et HV. En effet, le pic de corticostérone dans l'HD apparaît plus précocement (60 min post-stress), par rapport au pic de corticostérone de l'HV (105 min post-stress). Le délai tardif d'émergence des pics de corticostérone dans l'HD et dans l'HV suggère l'implication des récepteurs GR. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons injecté *in situ* dans l'HD ou l'HV un antagoniste GR afin d'essayer de prévenir les effets

délétères du stress sur la mémoire. Ainsi, l'antagoniste GR (RU 38486) a été injecté aux temps correspondant aux deux pics de corticostérone dans l'HD et l'HV (60 et 105 min post-stress). Nous avons montré que le RU 38486 était efficace lorsqu'il est administré dans l'HD 60 min mais non 105 min après l'administration du choc électrique ; le phénomène inverse est observé lorsque le RU 38486 est administré dans l'HV puisqu'il s'avère efficace lorsqu'il est administré 105 min mais non 60 min après le stress.

Nos résultats sont conformes avec l'hypothèse selon laquelle les récepteurs GR de l'hippocampe sont impliqués dans les effets différés du stress. Des données de la littérature montrent l'implication de ces récepteurs dans les effets à long terme du stress sur le rappel mnésique et dans la consolidation à long-terme d'événements personnellement vécus (de Kloet et Reul, 1987 ; Oitzl et de Kloet, 1992 ; de Kloet et al, 1999). Ces données sont en accord avec nos résultats dans la mesure où l'inactivation pharmacologique des récepteurs GR de l'HD (60 min après le stress) ou l'HV (105 min après un stress aigu) empêche la dégradation des performances mnésiques, alors que l'inactivation pharmacologique des récepteurs MR à ces mêmes délais, n'a aucun effet. On constate donc que les récepteurs GR interviennent dans les effets différés du stress sur le rappel mnésique.

Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence l'implication tardive de l'HV dans une tâche purement cognitive n'ayant pas une composante émotionnelle forte. Ces observations sont en accord avec des données de la littérature montrant que cette région hippocampique est impliquée dans le rappel en mémoire spatiale (Lorenzini et al, 1997 ; Ferbinteanu et al, 2003 ; Loureiro et al, 2011). De plus, nos résultats montrent la transition séquentielle (« switch ») entre l'HD et l'HV. En effet, les données de la littérature suggèrent une dissociation fonctionnelle entre l'HD et l'HV (Moser et Moser, 1998 ; Leonardo et al, 2006 ; Fanselow et Ding, 2010 ; Segal et al, 2010). Selon la plupart des auteurs, l'HD serait impliqué dans les processus cognitifs, tandis que l'HV jouerait un rôle dans les processus de consolidation émotionnelle et dans les processus de mémoire antérograde (Fanselow et Dong, 2010). Selon Segal et ses collaborateurs (2010), un stress aigu augmente l'activité fonctionnelle de l'HV et des principales structures impliquées dans les processus émotionnels (amygdale et hypothalamus). Toutefois, nos résultats montrent que l'HV peut être recruté dans une épreuve sans valence émotionnelle forte.

Nos résultats ont montré l'existence d'une implication séquentielle des récepteurs MR de l'HD et GR de l'HD puis de l'HV dans les déficits mnésiques rapides et différés respectivement, induits par le stress, en rapport avec l'évolution temporelle des concentrations

de corticostérone. Nous avons résumé l'ensemble de nos données dans le schéma synoptique suivant (figure 35).

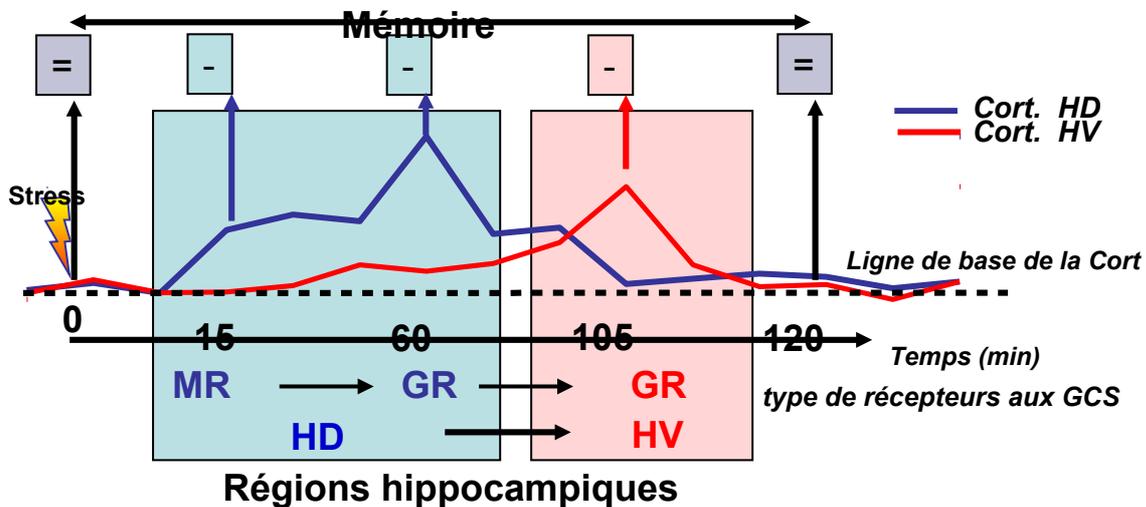


Figure 35 : Représentation des principaux résultats de la thèse

L'activation séquentielle des récepteurs MR et GR de l'HD pourrait être liée à la différence d'affinité de ces récepteurs avec la corticostérone (respectivement $K_d = 5\text{nM}$; $K_d = 0,5\text{ nM}$). En effet, du fait de leur forte affinité pour la corticostérone, les récepteurs MR sont activés 15 min après le stress suite aux faibles concentrations en corticostérone. Par la suite, au cours du temps, les concentrations en corticostérone augmentant progressivement (de l'ordre de 5 à 60 min) au sein de l'HD, les récepteurs MR seraient saturés. Ainsi, les récepteurs GR seraient sollicités à leur tour lorsque les concentrations en corticostérone sont élevées (60 min après le stress). Les données de la littérature vont dans ce sens. En effet, il a été montré que l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes est dépendante des concentrations en corticostérone au cours du temps (de Kloet et Reul, 1985 ; Joëls, 2006, 2008 ; Yau et Seckl, 2012).

Nos résultats ont montré que 15 min après le stress, lorsque les taux de corticostérone sont faibles, les récepteurs MR de l'HD sont d'abord impliqués. Ensuite, les récepteurs GR de l'HD puis de l'HV entrent en jeu à des délais plus tardifs (respectivement 60 min et 105 min post-stress) lorsque les taux de corticostérone sont les plus élevés. Ainsi l'activation séquentielle de l'HD et de l'HV semble en rapport avec l'évolution temporelle des concentrations de corticostérone dans chaque région. Nos données sont en accord avec le point de vue de Maggio et Segal (2012) qui suggèrent que les concentrations de

corticostérone, suite à un stress, agissent comme un élément de « switch » en modifiant la force de la connectivité synaptique de l'hippocampe.

II) PERSPECTIVES

A) Rôle de l'hippocampe intermédiaire en tant qu'interface entre les processus cognitifs et émotionnels

Entre l'HD et l'HV, il n'y a probablement pas une frontière bien marquée. Il existerait une région intermédiaire (Fanselow et Ding, 2010). Ainsi, alors que la région hippocampique, allant de la partie dorsale à la partie intermédiaire, serait en charge du codage de l'environnement, la région hippocampique allant de la partie intermédiaire à la partie ventrale serait en charge du contrôle comportemental (par l'intermédiaire de ses connexions avec le cortex préfrontal médian, le striatum dorsomédian, le noyau accumbens, l'amygdale, le septum latéral et l'hypothalamus) (Bast et Feldon, 2003, Bannerman et al, 2002 et 2004). L'hippocampe intermédiaire (HI) se situant au point de convergence des régions hippocampiques traitant d'un part des informations spatiales et d'autre part des informations nécessaires au contrôle comportemental, aurait un rôle d'intégrateur informationnel (Bast et al, 2009 ; Fanselow et Dong, 2010).

Les données de la littérature (Bast et al, 2009 ; Burton et al, 2009 ; Fanselow et Ding, 2010) mettent en avant l'action de l'HI dans l'intégration d'informations de l'HD vers l'HV. Il pourrait être envisagé d'étudier l'évolution du taux de corticostérone dans l'HI. Il pourrait également être envisagé de tester l'effet de lésions de la zone intermédiaire hippocampique dans la gestion des émotions et de la mémoire. Les conséquences de ces lésions pourraient être évaluées sur un plan comportemental et endocrinien . Cette lésion pourrait-elle perturber les performances mnésiques dans différents tests (DSCS, alternance forcée différée, « water maze ») évaluant différentes formes de mémoire (mémoire à long terme de type déclaratif, mémoire de travail) ? Aurait-elle des répercussions sur l'apparition du pic tardif de corticostérone observée dans l'HV105 minutes post-stress ?

Ces résultats pourraient apporter des arguments sur le rôle potentiel de cette zone intermédiaire et son rôle dans le processus de « switch » de l'HD et l'HV dans la réponse au stress.

B) Rôle de l'hippocampe dorsal dans la manifestation du pic tardif de corticostérone dans l'hippocampe ventral

Il reste à expliquer les mécanismes sous-tendant l'émergence des deux pics de corticostérone dans l'HD et l'HV après le stress. Nous avons montré que l'administration systémique de métyrapone (inhibiteur de synthèse de la corticostérone) bloque l'augmentation de corticostérone dans l'HD (Chauveau et al, 2010). De plus, les souris privées des transporteurs aux GCs (transcortine ou Cbg : « Corticosterone binding globulin ») ne présentent pas d'augmentation des concentrations en corticostérone dans l'HD après l'administration d'un stress (Minni et al, 2012). Nos résultats montrent que le pic de corticostérone plasmatique observé 60 min après le stress est en phase avec le pic de corticostérone intrahippocampique dorsal, ce qui n'est pas le cas dans l'HV 105 min après le stress (cf annexe 3, fig 2). Bien que l'HV montre des connectivités distinctes de l'HD avec le reste du cerveau, ces deux zones ne sont pas fonctionnellement indépendantes l'une de l'autre. La mise en jeu tardive de l'HV pourrait être dépendante des variations des concentrations de corticostérone dans l'HD. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'HD pourrait permettre le passage de la corticostérone vers l'HV et mettre en jeu ce dernier. Nous n'avons à ce jour aucun argument fonctionnel sous-tendant cette hypothèse. Cependant, nous tenterons de léser l'HD afin de vérifier son rôle dans l'apparition différée du pic de corticostérone de l'HV induit par le stress. En effet, selon cette hypothèse, nous nous attendons à ce que la lésion de l'HD inhibe l'apparition tardive du pic de corticostérone dans l'HV.

Un argument supplémentaire permettant d'expliquer le déphasage des pics de corticostérone dans l'HD et dans l'HV pourrait être l'inégale densité capillaire dans ces deux zones. En effet, l'HD est caractérisé par une plus grande densité capillaire que l'HV (Grivas et al, 2003). Les capillaires permettent la diffusion de corticostérone aux structures cérébrales. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la diffusion de corticostérone observée de manière plus importante et plus précoce dans l'HD que dans l'HV pourrait être liée à une plus grande densité capillaire. Une lésion irréversible de l'HD, en détruisant son réseau capillaire, pourrait donc inhiber l'apparition tardive de corticostérone dans l'HV. Si tel n'est pas le cas, l'apparition des deux pics de corticostérone serait indépendante.

C) Interaction de l'hippocampe avec d'autres structures impliquées dans les processus cognitifs et émotionnels

L'ensemble de nos travaux suggèrent également des expériences complémentaires afin de mieux comprendre l'interaction existante entre les effets du stress et le réseau des structures cérébrales impliquées à la fois dans les processus cognitifs et émotionnels. Pour cela, il pourrait être envisagé d'étudier la cinétique des taux de corticostérone de façon simultanée dans l'hippocampe et dans l'amygdale, dans l'hippocampe et le cortex préfrontal, dans le cortex préfrontal et l'amygdale. Il serait intéressant de comparer les taux de corticostérone dans ces structures en relation avec la mémoire.

D) Intervention de l'HV dans la mémoire émotionnelle ou traumatique.

Nos résultats ont montré que l'activation différée de l'HV, par l'intermédiaire des récepteurs GR, est impliquée dans le rappel mnésique. En effet, l'injection du RU 486 dans l'HV bloque les effets délétères du stress sur le rappel mnésique. Selon le point de vue de Segal et al (2010), un stress aigu pourrait induire une déconnexion de l'HD entraînant plus tardivement une augmentation de l'activité fonctionnelle de l'HV dont les principales cibles cérébrales sont impliquées dans les processus émotionnels (amygdale et hypothalamus). Le test d'alternance forcée différée permet une évaluation du rappel en mémoire spatiale. Cependant, ce test ne nous permet pas de comprendre la dissociation fonctionnelle de l'HD et de l'HV, respectivement dans les processus cognitifs et émotionnels. C'est pourquoi, afin d'évaluer le versant émotionnel en relation avec l'apparition tardive du pic de corticostérone dans l'HV, il serait plus pertinent d'utiliser un modèle d'évaluation de la mémoire émotionnelle chez l'animal : le conditionnement de peur ou « fear conditioning » (McEown et Treit, 2009) et son extinction. En effet, la mémoire émotionnelle se base sur la sélection de stimuli prédictifs d'un événement important pour l'individu. Lorsque ce processus de sélection est altéré et ne permet plus de sélectionner certains éléments particulièrement pertinents d'un événement, apparaissent des formes de mémoire émotionnelle pathologique. En particulier lors d'un événement traumatique, la sélection d'un élément discret et saillant associée à une occultation des éléments contextuels serait à la base de l'altération mnésique

de l'Etat de Stress Post Traumatique (ESPT). Dans le cadre d'études chez l'animal, le conditionnement classique aversif (« fear conditioning ») constitue un modèle d'apprentissage intéressant. En effet, il se caractérise par la nécessité de sélectionner un stimulus permettant de prédire de façon adéquate l'occurrence d'un événement aversif. Ce paradigme permet alors d'étudier les mécanismes de sélection correcte ou incorrecte d'un stimulus prédictif en fonction de la contingence avec un événement aversif. Bien qu'il soit difficile de reproduire tous les symptômes de l'ESPT dans un modèle animal (Belzung et al, 2001 ; El Hage et al, 2006), le conditionnement aversif permet d'étudier les aspects mnésiques fondamentaux de cette pathologie, tels que l'hypermnésie pour un élément saillant et l'amnésie pour les éléments du contexte.

Nos résultats nous permettent de supposer que l'activation différée de l'HV par l'intermédiaire des récepteurs GR pourrait être importante dans l'établissement de la mémoire à long-terme, ou bien dans la contribution au développement du syndrome de stress post-traumatique. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'administration intrahippocampique d'un antagoniste GR limiterait le rôle de l'HV et des récepteurs GR dans la consolidation ou la reconsolidation d'un souvenir traumatique chez l'animal. En effet, les récepteurs GR influencent les processus cognitifs tels que la consolidation mnésique (Barsegyan et al, 2010). La fonction des récepteurs GR a été étudiée dans le comportement de peur associé à l'apprentissage et à la mémoire. Le blocage pharmacologique des GR chez des animaux non stressés et stressés chroniquement atténue l'expression d'une réponse de peur conditionnée (Cordero et Sandi, 1998 ; Donley et al, 2005). Il a également été montré que l'HV est impliqué dans le conditionnement élémentaire d'un stimulus discret (un son par exemple) (Hunsaker et Kesner, 2008) et dans les processus émotionnels (Keljstrup et al, 2002, Bannerman et al, 2003). En effet, Keljstrup et ses collaborateurs ont montré une réduction de la réponse de peur conditionnée après des lésions de l'HV. De même d'autres travaux ont montré que les lésions de l'HV diminuaient l'expression de peur conditionnée (Trivedi et Coover, 2004). Les récepteurs GR étant actifs au sein de l'HV, ils pourraient plus spécifiquement permettre la consolidation d'un événement à forte valence émotionnelle (Revest et al, 2005). L'administration d'un antagoniste GR pourrait être envisagée dans le test de peur conditionnée. Ainsi, on s'attend à ne plus observer de comportement d'immobilisation (« freezing »), lors de la présentation du stimulus prédictif à l'événement aversif (un son par exemple) et une extinction plus rapide de la peur conditionnée. Sur le long terme, ce travail s'inscrit dans la perspective de prévenir et d'éviter la formation d'un souvenir traumatique (notamment dans l'ESPT) chez le sujet humain en limitant les effets

négatifs des glucocorticoïdes sur les récepteurs GR dans le cerveau et plus particulièrement dans l'HV. Ainsi, les antagonistes GR pourraient être utilisés comme thérapie pharmacologique pour éviter la consolidation ou la reconsolidation d'événements traumatiques (Bonne et al, 2004 ; 2008).

E) Existence d'autres récepteurs membranaires impliqués dans les effets rapides du stress

Dans notre étude, nous avons montré que les récepteurs membranaires de types MR sont impliqués dans les effets rapides délétères du stress sur le rappel mnésique (annexe 2). Cependant, des travaux ont montré que des récepteurs membranaires de type GR étaient également impliqués dans les effets d'un stress aigu sur la mémoire et l'apprentissage (Rozendaal et al, 2010 ; Groeneweg et al, 2011). De plus, l'implication des récepteurs membranaires de type MR et GR a été mise en évidence par l'utilisation d'antagonistes et de souris KO aux récepteurs MR et GR (Karst et al, 2005, 2010). Toutefois, ces récepteurs ne sont pas les seuls impliqués dans les effets membranaires de la corticostérone. En effet, des études ont montré l'implication d'autres récepteurs membranaires stéroïdiens tels que les récepteurs œstrogènes, androgènes et à la progestérone (Hammes et Levin, 2007 ; Gorosito et al, 2008 ; Micevych et Dominguez, 2009 ; Razandi et al, 2010). Par ailleurs, il est suggéré dans la littérature que de « nouveaux récepteurs » localisés sur la membrane cellulaire sont impliqués dans les actions des glucocorticoïdes sur la neurotransmission, la régulation de l'axe HPA et le comportement. Les candidats les plus probables seraient des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR) (Orchinik et al, 1997).

L'hippocampe, où s'expriment de nombreux récepteurs, est une structure cérébrale importante dans les processus cognitifs. Ainsi, des études ont suggéré l'implication des récepteurs AMPA en condition stressante (Groc et al, 2008, Martin et al, 2009 ; Krugers et al, 2010). Des résultats préliminaires (non publiés) ont mis en avant la relation existante entre la corticostérone hippocampique et l'activité des récepteurs AMPA glutamatergiques de surface dans le rappel d'informations contextuelles (annexe 6). Les récepteurs AMPA suscitent un grand intérêt dans les effets de la corticostérone sur les processus mnésiques. Des études suggèrent que la différence de densité des récepteurs AMPA observée entre l'hippocampe ventral et dorsal implique une dissociation fonctionnelle du système glutamatergique entre ces

deux structures (Pandis et al, 2006). De même, une étude a montré que l'exposition à un stress aigu cause des changements dans la transmission glutamatergique en diminuant l'efficacité synaptique dans l'HD mais en l'augmentant dans l'HV (Caudal et al, 2010). Cette étude suggère que la modification de la phosphorylation des récepteurs glutamatergiques peut médier les effets délétères du stress sur la cognition. Ces résultats mettent en évidence que l'exposition à un stress aigu induit des changements dans le fonctionnement des récepteurs AMPA qui sont spécifiques de la sous-unité (Glu A1 et Glu A2) et de la région cérébrale (HD et HV).

La dissociation fonctionnelle de l'HD et l'HV pourrait être expliquée par l'ensemble de ces résultats. En effet, il peut être envisagé de tester l'effet de l'injection du pep2m au sein de l'HD et de l'HV dans une tâche de peur conditionnée afin d'apprécier le rôle de ces deux régions dans la mémoire émotionnelle normale ou pathologique.

ANNEXES

**ANNEXES I : CRITICAL ROLE OF PLASMA
CORTICOSTEROID-BINDING-GLOBULIN DURING
STRESS TO PROMOTE GLUCOCORTICOID
DELIVERY TO THE BRAIN : IMPACT ON THE
MEMORY**

Critical Role of Plasma Corticosteroid-Binding-Globulin During Stress to Promote Glucocorticoid Delivery to the Brain: Impact on Memory Retrieval

Amandine M. Minni,* Rodolphe Dorey,* Christophe Piérard, Gaëlle Dominguez, Jean-Christophe Helbling, Aline Foury, Daniel Béracochéa, and Marie-Pierre Moisan

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (A.M.M., J.C.H., A.F., M.-P.M.), Nutrition et Neurobiologie Intégrée, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1286, 33076 Bordeaux, France; Université de Bordeaux (A.M.M., J.C.H., A.F., M.-P.M.), Nutrition et Neurobiologie Intégrée, UMR 1286, 33076 Bordeaux, France; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (R.D., G.D., D.B.), Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA), UMR 5287, 33405 Talence, France; Université de Bordeaux (R.D., G.D., D.B.), INCIA, UMR 5287, 33405 Talence, France; and Institut de Recherche Biomédicale des Armées (R.D., C.P.), Département Environnements Opérationnels, 91223 Brétigny sur Orge, France

We aimed at demonstrating that corticosteroid binding globulin (CBG), a plasma glycoprotein binding glucocorticoids with high affinity in blood, endorses a major role under stress conditions by regulating free glucocorticoid access to the brain and thereby influences glucocorticoid-dependent behaviors. Hence, we compared CBG-deficient mice (Cbg^{-/-}) and their controls (Cbg^{+/-}) in a specific memory task, *i.e.* the delayed alternation behavior, requiring memory retrieval both under stress and nonstress conditions and previously shown to be dependent on hippocampal glucocorticoid levels. Our results evidence that Cbg^{-/-} mice, unlike controls, remain insensitive to stress applied before memory retrieval. Furthermore, under stress conditions, we observed a blunted surge of corticosterone (CORT) in plasma and no free CORT rise in the hippocampus of Cbg^{-/-}. Moreover, intrahippocampal infusion of CORT through implanted cannulae was used to mimic stress CORT rise before memory retrieval. This infusion of CORT reproduced memory retrieval impairments in Cbg^{-/-} as in Cbg^{+/-} controls. Finally, we provide evidence that Cbg^{-/-} mice exhibit a normal adrenal response to stress and ACTH. Given that CBG deficiency is known to markedly impact on CORT clearance from plasma, our current article demonstrates that Cbg^{-/-} insensitivity in memory retrieval after stress results from the blunted CORT response due to increased CORT clearance. Overall, our data suggest that the impact of CBG genetic deficiency on various behavioral patterns reported previously stems from a smaller CORT reservoir in blood. Inasmuch as CBG discloses interindividual variations, such a parameter ought to be taken into account when studying stress-induced glucocorticoid action in brain. (*Endocrinology* 153: 0000–0000, 2012)

Corticosteroid binding globulin (CBG) or transcortin is a circulating glycoprotein synthesized in liver and secreted in blood, where it binds approximately 80% of circulating glucocorticoids with a high affinity. The role of CBG is mostly seen as acting as a buffer of glucocorticoids by limiting the amount of circulating free hormones that are active on their receptors. However, the role of CBG as

a glucocorticoid reservoir and carrier is also well described, in particular on inflammation sites, where circulating CBG-glucocorticoid complexes are disrupted specifically by the serine protease elastase allowing a massive and local release of glucocorticoids (1–4). Except for inflammation, CBG role in promoting glucocorticoid access to target tissues is often neglected under the assumption

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2012-1485 Received April 27, 2012. Accepted July 20, 2012.

* A.M.M. and R.D. contributed equally to this work.

Abbreviations: aCSF, Artificial cerebrospinal fluid; CBG, corticosteroid binding globulin; CORT, corticosterone; Ct, cycle threshold; KO, knockout; MR, mineralocorticoid receptor; Nur77, nuclear receptor 77; StAR, steroidogenic acute regulatory protein.

Behavioral task

Alternation behavior is a distinctive phylogenetic behavior in rodents, which does not require food reinforcement to occur. Mice were submitted to a delayed alternation task with a forced-trial procedure, performed in a T-maze (11). To sum up, 3 d before behavioral testing, mice were first allowed to freely explore the maze (one session per day, 10 min per session) so as to become familiar with the apparatus and conditions they were meant to encounter later on. On the fourth day, animals were submitted to an acquisition phase, during which mice were forced to enter twice the same goal arm of the maze, the other arm being closed. The test phase was performed 24 h after the acquisition phase. Mice remained 30 sec in the start box. The door was then opened, and animals were free to enter each goal arm of the maze and remained for 30 sec in the chosen arm. The alternation behavior implies to enter the arm opposite to that entered the day before. Choice latency was also measured in seconds. Mice were subjected to two sessions per condition (stress *vs.* nonstress and aCSF *vs.* CORT) separated by a 4-d interval, the blocked arm of the second session being opposite to the first one.

All animals were also tested for short-term memory. Thus, immediately after the 24-h test session was carried out, the animals were placed again in the start box during 30 sec for a new free choice trial, and short-term alternation rates were measured. Beyond the evaluation of short-term memory, this additional free choice trial allowed to determine whether change in the motivation to alternate varied among the groups at the time of testing.

Surgery and histology

As described previously (11), two stainless-steel guide cannulae (26-G, 8 mm in length) were implanted bilaterally 1 mm above the surface of the dorsal hippocampus (antero-posterior, -2 mm; medio-lateral, ± 1.4 mm; dorso-ventral, -0.9 mm; relative to bregma) on mice previously anesthetized with a ketamine/xylazine solution (1.10 mg/kg body weight, Rompun; ip) and placed on a stereotaxic frame. Mice were then allowed to recover in their home cage for at least 1 wk before behavioral

experiments. Mice were killed by decapitation to collect brains and to check the exact probe location in the dorsal hippocampus. Figure 1A shows the anterograde extent and the localization of the cannulae tips in the dorsal hippocampus. Figure 1B displays a representative photomicrograph of coronal brain section stained with cresyl violet. The cannulae tips were precisely located in the dorsal hippocampus, between Cornu Ammonis 1 and dentate gyrus areas. After histological analysis, five animals were excluded from analysis.

Pharmacological administration

aCSF [0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 12 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, and 3 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4)] for the control group or CORT (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) diluted at 1 mg/ml in aCSF solution was bilaterally injected (0.8 μ l per side) into the dorsal hippocampus using a constant flow rate pump (0.4 μ l/min) with a 32-G stainless-steel cannulae (9 mm in length). The cannulae were left in place for 3 min before removal to allow for the diffusion of the drugs from the cannulae tips.

Corticosterone measurement

Blood samples were collected either by tail nick (basal CORT) or by cardiac puncture after isoflurane (Aerrane, Baxter SA, Maureps, France) anesthesia (for free CORT after stress) and collected in tubes containing 10% EDTA. After 10 min of centrifugation at 10,000 rpm, plasma samples were stored at -80 C. Total plasma CORT was measured by an in-house RIA (for details, see Ref. 5). Briefly, after steroid extraction of plasma samples with absolute ethanol, total CORT was measured by competition between cold CORT and ³H-CORT by a specific anti-CORT antibody provided by H. Vaudry (University of Rouen, Rouen, France). Plasma free CORT was measured by isotopic dilution and plasma ultrafiltration using Centrifree filter device (YM membranes 30K; Millipore, Molsheim, France) as in Ref. 5 using 100 μ l of plasma. Free CORT percentage was calculated as the ratio of counts per minute filtrate (free CORT)/counts per minute retentate (bound CORT). Free CORT concentration was obtained as percentage free CORT multiplied by total CORT concentration measured by previous RIA as above. Intrahippocampal CORT was measured by an enzyme immunoassay commercial kit (Correlate-ELA; Assay Designs, Ann Arbor, MI) in the microdialysates (for detailed method, please see Ref. 11). The sensitivity of this assay is higher (18.6 pg/ml) than the RIA (5 ng/ml).

CORT was also measured from the supernatant of primary adrenal cell cultures by RIA as for plasma, except that the samples were not extracted by ethanol, and the PBS buffer was replaced by the KO DMEM culture medium (Life Technologies, Inc., Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in each sample, including the standards used for the reference curve.

Adrenal cell culture

Primary adrenal cell culture was performed following a previously described

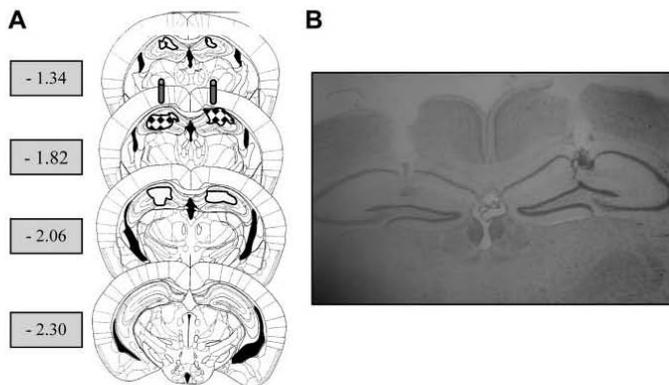


FIG. 1. Representative localization of the sites of CORT injections into the dorsal hippocampus. A, Reconstruction of the main sites of CORT injections (dotted black) and anteroposterior extent of the sites of injections (gray hashed areas). Stereotaxic coordinates are mentioned in millimeters from bregma. B, Histological controls of intrahippocampus microdialysis probe implantation. Photomicrographs ($\times 20$) of coronal brain section stained with cresyl violet.

protocol (15). Briefly, adrenal glands were removed, cleaned from surrounding fat, minced, and incubated at 37°C for 1 h in the digestion mixture (Hanks' balanced salt solution containing 2 mg/ml collagenase I, 0.05 mg/ml deoxyribonuclease I, and 5 mg/ml BSA). Cells were then counted and the viability assessed by trypan blue exclusion. Cells from four adrenal glands from two mice of the same genotype ($\sim 10^6$ cells) were then plated in a well of a 12-well polystyrene plate (Nunc, Roskilde, Denmark) in 500 μ l of KO DMEM medium containing 15% KO serum replacement, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 250 ng/ml amphotericin B. Cells were seeded on the wells for 24 h, 50 μ l of cell medium were then collected for basal CORT levels evaluation, and then, one half of the wells were exposed to ACTH (Synacthen, Sigma-Tau, Ivry sur Seine, France) by adding a 50- μ l solution for a final concentration of 10^{-12} M, whereas the other half of the wells had only cell culture medium added. After 24 h, the cell culture medium of each well was collected, and 200 μ l were used for CORT measurement by RIA in duplicates of 100 μ l.

Gene expression analysis in adrenals from stressed mice

To induce stress (experiment 5), mice were placed in a 50-ml conical tube (with holes allowing breathing) for 20 min. Control mice were left in their home cage but killed during the same session that took place between 1700 and 1900 h. After killing, adrenals were then dissected and immediately frozen at -80°C .

Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. RNA quality was evaluated with RNA Nano chips onto a Bioanalyzer 2100 (Agilent, Boeblingen, Germany). Two micrograms of total RNA were reverse transcribed with Superscript III (Invitrogen) and random hexamers according to the manufacturer's protocol. Five microliters of cDNA diluted 1:20 were PCR amplified using 10 μ l of Mesagreen QPCR MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgium) and 5 μ l of primer mix at 300 nM in a total volume of 20 μ l onto an ABI7500 thermocycler. PCR program consisted of 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Primers sequences were the following: *StAR* forward, ATGGGAGAGTGGAACCCAAAT and reverse, TGACCGTGTCTTTTCCAATCC; *Nur77* forward, CTGCCTTCTGGAACTCTTCA and reverse, CGGGTTTAGATCGGTATGCC. mRNA levels of target genes were normalized using 18S RNA expression for each sample (cDNA diluted 1:2000), because 18S proved not to vary between conditions in our experiments (18S forward, ACCGCAGCTAGGAATAATGGA and reverse, GCCTCAGTTCGAAAACCAA). The quantification of target mRNA levels was calculated with the SDS2.1 software (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). The expression values used in this study were calculated using the $[\Delta\text{cycle threshold (Ct)}]$ corresponding to the equation: $\Delta\text{Ct} = 2^{-(\text{target gene Ct} - \text{reference gene Ct})} \times 1000$.

Statistical analyses

Statistics were calculated with the software Stview version 5 (SAS Institute, Cary, NC). All results were expressed as mean \pm SEM. One- or two-way factorial ANOVA (or repeated-measures ANOVA when appropriate) was used followed by Fisher's least significant difference *post hoc* tests. The level of statistical significance was set as $P < 0.05$ in all tests.

Results

To evaluate memory performance under stress conditions, Cbg^{+/+} (n = 12) and Cbg^{-/-} (n = 12) male mice were tested in the delayed alternation task in nonstress condition and 15 min after an acute stress induced by footshocks (experiment 1) (Fig. 2). Repeated-measures ANOVA showed a significant genotype effect [$F_{(1,22)} = 8.04$; $P < 0.01$], a significant stress effect [$F_{(1,22)} = 6.2$; $P < 0.05$], and a significant genotype \times stress interaction [$F_{(1,22)} = 4.45$; $P < 0.05$]. Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} presented similar alternation performance in nonstress condition ($83.3 \pm 7.1\%$ and $75 \pm 7.5\%$, respectively; nonsignificant) in contrast to performance observed under stress condition ($33.3 \pm 9.4\%$ in Cbg^{+/+} and $70.8 \pm 9.7\%$ in Cbg^{-/-}; $P < 0.01$). Although stress dramatically and significantly decreased alternation rates in Cbg^{+/+} mice ($P < 0.001$), such a deleterious effect was not observed in Cbg^{-/-} animals.

To study the implication of glucocorticoids in the stress insensitivity of Cbg^{-/-} mice, plasma total (Fig. 3A) and free CORT (Fig. 3B) were measured under both nonstress and footshocks stress conditions in new groups of both genotypes (n = 5–6 per group) (experiment 2). Two-way ANOVA analysis performed on total CORT data showed a genotype [$F_{(1,18)} = 52.23$; $P < 0.001$], a stress [$F_{(1,18)} = 95.35$; $P < 0.001$], and a genotype \times stress interaction [$F_{(1,18)} = 25.92$; $P < 0.001$] effects. Although no difference between Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} was observed in nonstress conditions ($P = 0.15$), stress induced a substantial difference between genotypes ($P < 0.001$). Although stress led to a significant total CORT level increase in both Cbg^{+/+} ($P < 0.001$) and Cbg^{-/-} mice ($P < 0.01$), the

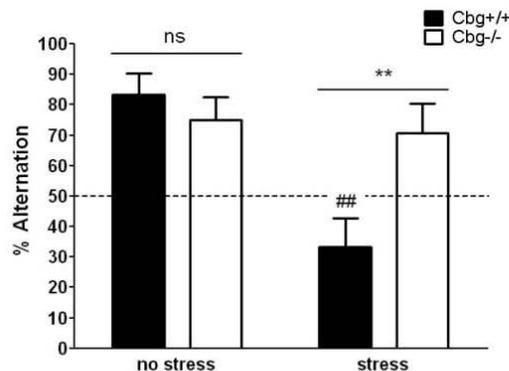


FIG. 2. Effects of stress (footshocks 15 min before test session) on delayed alternation performance in Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice; chance level: 50%; n = 12 per group. **, $P < 0.01$ Genotype effect; # vs. Cbg^{+/+} not stressed; ##, $P < 0.01$ vs. Cbg^{+/+} not stressed; ns, Not significant.

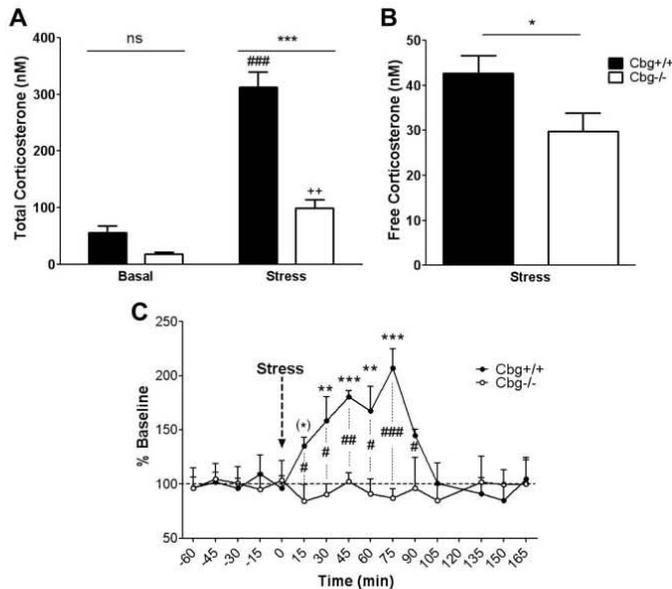


FIG. 3. CORT levels analysis before and after stress. **A**, Total plasma CORT (nm) before (basal) and 15 min after footshocks (stress) in Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice ($n = 5-6$ per group). *, Genotype effect; ***, $P < 0.001$ genotype effect; #, vs. Cbg^{+/+} basal; ###, $P < 0.001$ vs. Cbg^{+/+} basal; +, vs. Cbg^{-/-} basal; ++, $P < 0.01$ Cbg^{-/-} basal. ns, Not significant. **B**, Free plasma CORT (nm) 15 min after footshocks (stress) Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice ($n = 5-6$ per group). *, $P < 0.05$, Genotype effect. **C**, Time-course evolution of CORT levels changes in the dorsal hippocampus measured by microdialysis before (basal) and after footshocks (stress) in Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} mice ($n = 7-9$ per group). Values are expressed as percentage of basal values obtained before the footshock stress for each genotype. *, $P = 0.07$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs. Cbg^{+/+} at time = 0; #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.001$; ###, $P < 0.001$ genotype effect at each time point.

latter was blunted compared with the wild-type response. The measure of free plasma CORT under stress condition (Fig. 3B) showed that Cbg^{-/-} displayed a lower surge of free CORT than Cbg^{+/+} mice [$t_{(1,39)} = 5.19$; $P < 0.05$]; the free CORT fraction was 14.1% in Cbg^{+/+} and 30.4% in Cbg^{-/-} mice.

Hence, we determined how this reduced plasma CORT rise after stress in Cbg^{-/-} mice translates to brain CORT levels using two new groups of Cbg^{+/+} and Cbg^{-/-} (experiment 3). To such an end, intrahippocampus CORT rise was measured in mice by microdialysis before and after footshocks stress (Fig. 3C). Two-way repeated-measure ANOVA performed on time-course CORT evolution in the hippocampus evidenced significant genotype [$F_{(1,210)} = 17.87$; $P < 0.001$] and time [$F_{(14,210)} = 2.75$; $P < 0.001$] effects with a significant genotype x time interaction [$F_{(14,210)} = 3.44$; $P < 0.001$]. In Cbg^{+/+} mice, as expected, the acute stress induced a progressive and significant CORT levels increase from 15 to 90 min compared with $t = 0$ with a peak measured at 75 min

(+207.3%; $P < 0.001$). However, this stress-induced CORT rise was not observed in Cbg^{-/-} mice that presented significant differences with Cbg^{+/+} mice around the CORT peak ($P < 0.05$ at 30, 60, and 90 min; $P < 0.001$ at 75 min). The absolute values of intrahippocampal CORT in the different groups are shown in the Supplemental Fig. 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>.

Finally, to demonstrate that the absence of hippocampal CORT rise was accountable for the stress insensitivity of Cbg^{-/-} in the memory task, intrahippocampus CORT injections were performed before the delayed alternation task in new groups of mice (experiment 4) (Fig. 4). CORT was infused bilaterally into the dorsal hippocampus 15 min before testing to mimic the stress CORT rise observed in stressed Cbg^{+/+} mice, which is blunted in stressed Cbg^{-/-}. As observed previously in the nonstress groups, a similar alternation rate was revealed between Cbg^{+/+} ($n = 13$; $85.7 \pm 6.3\%$) and Cbg^{-/-} mice ($n = 9$; $90.0 \pm 6.7\%$) with a control ACSF injection. However, CORT injection decreased significantly the alternation rate regardless of

the genotype ($45.5 \pm 12.5\%$ for Cbg^{+/+}, $n = 8$; and $40.9 \pm 11.3\%$ for Cbg^{-/-}, $n = 11$). Accordingly, two-way ANOVA detected a significant injection effect [$F_{(1,39)} = 14.8$; $P < 0.001$] but no genotype effect [$F_{(1,39)} < 1.0$; $P > 0.1$] and no genotype x injection interaction [$F_{(1,39)} < 1.0$; $P > 0.1$].

Additional measures were performed during the behavioral task as part of experiments 1 and 4: the intent was to check thereby for biases possibly interfering with the results. We have thus evaluated 1) potential differences in the initial response to alternation, 2) choice latency, and 3) short-term memory. The data are presented in the Supplemental Fig. 2. These control experiments yielded no difference between genotypes.

The mechanism accounting for reduced free CORT response in Cbg^{-/-} was subsequently further examined. The level of CBG has been previously shown to greatly influence the clearance of CORT/cortisol from the plasma, which in itself may account for the lower CORT levels after stress in Cbg^{-/-} mice (14, 16). However, Cbg^{-/-}

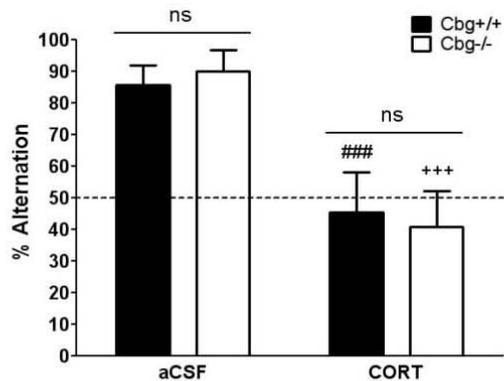


FIG. 4. Effects of CORT infusion in the hippocampus. aCSF or CORT were infused bilaterally in the dorsal hippocampus 15 min before test session on delayed alternation performance on Cbg+/+ and Cbg-/- mice. Chance level, 50% (n = 13 Cbg+/+ aCSF; 8 Cbg+/+ CORT; 9 Cbg-/- aCSF; 11 Cbg-/- CORT). ###, $P < 0.001$ vs. Cbg+/+ aCSF; + + +, $P < 0.001$ vs. Cbg-/- aCSF. ns, Not significant.

could also differ in sensitivity to the footshock stress or in the adrenal response to stress-induced ACTH. In experiment 2, mice were recorded during the three consecutive footshocks. In each experimental group, 100% of the mice exhibited immediate (<1 sec) startle response for each footshock, suggesting thereby that there was no difference

in stress sensitivity in this paradigm. To assess adrenal sensitivity, we first measured CORT response to an ACTH challenge in cultured adrenal cells from Cbg-/- and Cbg+/+ (Fig. 5A). There was no statistical difference as regards CORT response between genotypes [$F_{(1,8)} < 1.0$; $P > 0.1$]. To further investigate adrenal sensitivity, we submitted new groups of mice to a 20-min restraint stress and measured in adrenal cells the gene expression of two major transcription factors induced by ACTH and involved in steroidogenesis, *StAR* (17) and *Nur77* (experiment 5) (Fig. 5, B and C) (18). The mRNA levels of both *StAR* and *Nur77* were found to be identical in both genotypes in basal and stress conditions [$F_{(1,25)} < 1.0$; $P > 0.1$], although CORT levels in plasma were lower in the Cbg-/- group [$F_{(1,25)} = 79.2$; $P < 0.001$] (Fig. 5D).

Discussion

An inappropriate stress response embodied by a hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation (hyper- as well as hypoactivity) can lead to the development of stress vulnerability that greatly alters brain functions (19–21). Thus, access of glucocorticoids to the brain as well as intracerebral glucocorticoid signaling appears to be critical in stress sensitivity. In the present study, Cbg-/- mice were used in a memory task to investigate the implication of plasma CBG levels in glucocorticoid access to the brain. This memory task, previously shown to be hippocampal and glucocorticoid dependent, was a valuable means to reveal the impact of impaired glucocorticoid access to the brain on a cerebral function.

Our data confirmed that in Cbg+/+ control mice, acute stress delivered 15 min before the test session resulted in an impairment of memory retrieval associated with a plasma and brain CORT increase. These results are congruent with previous studies using either the same behavioral task (11) or the contextual serial spatial discrimination task also catered to measuring memory retrieval (22). In Cbg-/- mice, the lack of memory retrieval deficit occurring after stress cannot be ascribed to impaired motivation to alternate, because stressed Cbg-/- mice exhibited accurate and normal short-term memory, and the choice latency at the 24-h test

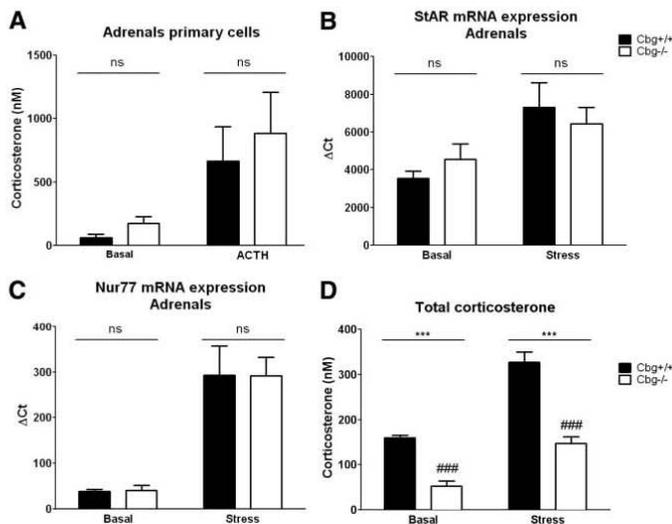


FIG. 5. Adrenal stress sensitivity evaluation of Cbg+/+ and Cbg-/- mice. A, Total CORT levels from culture media of primary adrenal cells from Cbg+/+ and Cbg-/- mice before and after 24 h of ACTH stimulation (n = 3). B, *StAR* mRNA expression in adrenals after a 20-min restraint stress (n = 7–9 mice per group). C, *Nur77* mRNA expression in adrenals after a 20-min restraint stress (n = 7–9 mice per group). D, Total plasma CORT (nM) at killing (n = 7–9 mice per group). *, Genotype effect. #, vs. Cbg+/+ in the same condition (basal or stress). ns, Not significant.

session was similar to that of stressed *Cbg*^{+/+} mice. Interestingly, this lack of stress effect on memory retrieval in *Cbg*^{-/-} mice was associated with a markedly reduced rise in plasma CORT levels. Thus, our data are congruent with our previous study (5), reporting that *Cbg*^{-/-} mice inability to promote the behavioral normal response to a stressful stimulus was associated with a suboptimal CORT surge.

To prove that this suboptimal CORT rise is indeed responsible for the absence of behavioral effects in *Cbg*^{-/-} mutants, we first checked that reduced plasma CORT translates into reduced brain levels in *Cbg*^{-/-} mice by measuring free CORT directly into the hippocampus. In control mice, we observed a rapid intrahippocampal CORT rise. However, in *Cbg*^{-/-} mice, no CORT elevation after stress was detected in the hippocampus. In plasma, the free CORT rise after stress was detected in *Cbg*^{-/-}, but the concentrations were 30% lower than in *Cbg*^{+/+} mice. The reason why these decreased levels in plasma result in even lower levels in the hippocampus has to be determined. A hypothesis is that it may rely on the absence of albumin in the brain. Indeed, in our previous article (5), we showed that in the plasma of CBG-deficient mice, there is a rise of CORT binding to albumin compared with *Cbg*^{+/+}. Therefore, the presence of albumin allows for the retention of a small pool of CORT in the plasma, despite the absence of CBG. In brain, where there is no binding protein, the differences in free CORT levels between *Cbg*^{-/-} and *Cbg*^{+/+} may thus be amplified.

Finally, to demonstrate that this suboptimal surge of CORT, due to CBG deficiency, is responsible for the absence of behavioral effects, we mimicked the stress-induced CORT rise in brain by direct injection of the hormone into the hippocampus. In *Cbg*^{+/+} as in *Cbg*^{-/-}, aCSF bilateral intrahippocampal injections did not disturb the alternation behavior as was the case under non-stress conditions. However, the intrahippocampal CORT injection resulted in both *Cbg*^{+/+} and *Cbg*^{-/-} mice, in a significant impairment of memory retrieval similar to the footshocks stress condition. Thus, by providing CORT into the hippocampus, we reversed the phenotype of stress insensitivity on memory retrieval caused by CBG deficiency. It is noteworthy that such an observation in *Cbg*^{-/-} mice is similar to the effect of metyrapone, a CORT synthesis inhibitor, which canceled out the intrahippocampal CORT rise that also abolished consequently the stress-induced impairment of retrieval memory (11, 12, 23).

This study demonstrated that CBG, a glycoprotein produced and secreted in blood by liver cells, is crucial for glucocorticoid transport and access into the brain under stress conditions and impacts indirectly on a cerebral func-

tion, which in this study is the rapid effect of stress on memory retrieval. We have demonstrated recently that, in wild-type mice, the rapid effect of stress on memory retrieval in the delayed alternation task is mediated by a membrane MR receptor in the dorsal hippocampus (11). It is thus most likely that the same nongenomic process occurred in the mice used in this work and submitted to the same behavioral test. Inasmuch as under stress conditions, the free CORT levels are suboptimal in *Cbg*^{-/-}, compared with *Cbg*^{+/+} controls, the membrane MR was either not or not enough activated in *Cbg*^{-/-} hippocampus to respond as was observed with wild-type mice.

Our investigations were conducted in the dorsal hippocampus only along with a specific memory task. However, we believe that reduced CORT pool size in *Cbg*^{-/-} will result in reduced free CORT after stress in the whole brain. This reduced glucocorticoid signaling under stress conditions may account for *Cbg*^{-/-} mice deficits in other phenotypes related to brain functions, such as increased immobility in forced swim, increased learned helplessness tests, or lack of sensitization to cocaine in keeping with our results presented in an earlier publication (5), involving brain structures and networks other than the hippocampus.

The mechanism by which CBG deficiency leads to reduced CORT surge after stress was hence examined. CBG was shown before to have a major role in the constitution of the plasma CORT pool size acting as a reservoir with free CORT being in dynamic equilibrium with CBG-bound CORT (5, 16, 24). Furthermore, CBG-deficient mice, developed by another research group but sharing the same specific *Cbg* gene deletion along with identical endocrine alterations as the mice used in this work, were shown to exhibit an increased clearance of CORT from plasma. The latter was evaluated by injection of tritiated CORT that was found four times lower in plasma of *Cbg*^{-/-} compared with *Cbg*^{+/+}, 5 min after injection (14). In this study, we have tested two other possible mechanisms: reduced sensitivity to footshock and reduced adrenal responsiveness. A reduced sensitivity to footshock stress is most unlikely, because mice within each group showed a similar startle response to the footshock. We provide evidence here that adrenal sensitivity to ACTH is normal in *Cbg*^{-/-} mice by implementing two independent approaches, namely ACTH challenge in cultured adrenal cells and *in vivo* stress-induced adrenal gene expression. Thus, the increased clearance of CORT seems to be the sole mechanism accounting for lower CORT response to stress in plasma, resulting in an undetectable rise in the hippocampus.

Our data are not in conflict with recently published observations whereby CBG was shown to be responsible

for the delayed rise of free CORT compared with total CORT after an acute stress (25). In addition to the authors' interpretation, we suggest that this rapid release of CBG protein from liver after stress increases the pool size of the hormone and thus the free concentration reaching target tissues. Such a finding further substantiates the fact that *Cbg*^{-/-} mice are unable to resort to such a mechanism, a distinctive feature, which most likely contributes to their impaired behavioral responses.

CBG does not cross the blood brain barrier, but intrinsic expression was detected in hypothalamus (26) as well as other brain regions (27) at low levels. The role of intracerebral CBG is still unclear, because functional studies are lacking, but CBG expression in hippocampus could potentially have a role in the observed behavioral deficits of *Cbg*^{-/-} mice. However, our preliminary results from a brain-specific *Cbg* KO showed no alteration in stress CORT levels and no behavioral deficits as observed in *Cbg*^{-/-} mice (28). We believe therefore that the effects of CBG deficiency observed on the behaviors tested are due to plasma rather than brain CBG.

In conclusion, the work presented here contributes clear-cut evidence that CBG, by retaining glucocorticoids in plasma, endorses a critical role under stress conditions in promoting glucocorticoid access to the dorsal hippocampus and consequently influences the stress effect on memory retrieval. We further argue that such data illustrate a more general process whereby plasma CBG levels are crucial in the adaptive stress response, because they determine the glucocorticoid pool size and consequently the concentration of free glucocorticoid hormones. Unsurprisingly, *Cbg* gene was identified as the most likely causal gene in two independent nonhypothesis-driven genetic studies searching for genes involved in glucocorticoid stress responses variability (4, 29, 30).

CBG has received little attention in neurobiological and stress investigations because of its role taking place mainly in plasma and because its levels were thought to be relatively constant after stress. However, recent analyses have demonstrated that CBG is thermosensitive and its affinity for cortisol drops in case of fever (31). CBG is also strongly regulated by cytokines (such as IL-6 or TNF- α), insulin, and thyroxin (3). Furthermore, CBG levels are highly variable among individuals, both animal and humans, up to 10-fold differences (32, 33). Therefore, our work aims at fostering additional stress-related studies involving CBG variations and free glucocorticoid levels, as may be the case in stress-related psychiatric disorders whereby both hypo- and hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis may be involved.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Marie-Pierre Moisan, Institut National de la Recherche Agronomique, Nutrition et Neurobiologie Intégrée, Université de Bordeaux 2, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. E-mail: mpmoisan@bordeaux.inra.fr.

This work was supported by the Department of Animal Genetics, Institut National de la Recherche Agronomique, and by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Conseil Régional d'Aquitaine. Real-time PCR experiments presented in the present publication were performed at the Genotyping and Sequencing facility of Bordeaux (Conseil Régional d'Aquitaine Grants 20030304002FA and 20040305003FA and European Union Fond Européen de Développement Régional Grants 2003227).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Breuner CW, Orchinik M 2002 Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J Endocrinol* 175:99–112
- Lin HY, Muller YA, Hammond GL 2010 Molecular and structural basis of steroid hormone binding and release from corticosteroid-binding globulin. *Mol Cell Endocrinol* 316:3–12
- Gagliardi L, Ho JT, Torpy DJ 2010 Corticosteroid-binding globulin: the clinical significance of altered levels and heritable mutations. *Mol Cell Endocrinol* 316:24–34
- Moisan MP 2010 Genotype-phenotype associations in understanding the role of corticosteroid-binding globulin in health and disease animal models. *Mol Cell Endocrinol* 316:35–41
- Richard EM, Helbling JC, Tridon C, Desmedt A, Minni AM, Cador M, Pourtau L, Konsman JP, Mormède P, Moisan MP 2010 Plasma transcortin influences endocrine and behavioral stress responses in mice. *Endocrinology* 151:649–659
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M 1999 Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22:422–426
- Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS 2010 Memory formation under stress: quantity and quality. *Neurosci Biobehav Rev* 34:584–591
- de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL 1998 Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394:787–790
- de Quervain DJ, Roozendaal B, Nitsch RM, McGaugh JL, Hock C 2000 Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans. *Nat Neurosci* 3:313–314
- Chauveau F, Tronche C, Piéard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M, Béracochea D 2010 Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20:196–207
- Dorey R, Piéard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M, Béracochea D 2011 Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. *Neuropsychopharmacology* 36:2639–2649
- Tronche C, Piéard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Béracochea D 2010 Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* 93:343–351
- Beracochea D, Jaffard R 1985 Memory deficits subsequent to chronic consumption of alcohol in mice: an analysis based on spontaneous alternation behavior. *Behav Brain Res* 15:15–25

14. Petersen HH, Andreassen TK, Breiderhoff T, Bräsen JH, Schulz H, Gross V, Gröne HJ, Nykjaer A, Willnow TE 2006 Hyporesponsiveness to glucocorticoids in mice genetically deficient for the corticosteroid binding globulin. *Mol Cell Biol* 26:7236–7245
15. Chu Y, Wu BM, McCabe ER, Dunn JC 2006 Serum-free cultures of murine adrenal cortical cells. *J Pediatr Surg* 41:2008–2012
16. Bright GM 1995 Corticosteroid-binding globulin influences kinetic parameters of plasma cortisol transport and clearance. *J Clin Endocrinol Metab* 80:770–775
17. Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM 1995 Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 9:1346–1355
18. Wilson TE, Mouw AR, Weaver CA, Milbrandt J, Parker KL 1993 The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 13:861–868
19. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F 2005 Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463–475
20. Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, Lupien SJ, Roozendaal B, Seckl JR 2006 Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol* 18:393–411
21. Holsboer F, Ising M 2010 Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol* 61:81–109:C101–C111
22. Chauveau F, Piérard C, Tronche C, Coutan M, Drouet I, Liscia P, Béracochéa D 2009 The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions. *Neurobiol Learn Mem* 91:447–455
23. Roozendaal B, Phillips RG, Power AE, Brooke SM, Sapolsky RM, McGaugh JL 2001 Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. *Nat Neurosci* 4:1169–1171
24. Bright GM, Darmaun D 1995 Corticosteroid-binding globulin modulates cortisol concentration responses to a given production rate. *J Clin Endocrinol Metab* 80:764–769
25. Qian X, Droste SK, Gutiérrez-Mecinas M, Collins A, Kersanté F, Reul JM, Linthorst AC 2011 A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress. *Endocrinology* 152:3738–3748
26. Möpert B, Herbert Z, Caldwell JD, Jirikowski GF 2006 Expression of corticosterone-binding globulin in the rat hypothalamus. *Horm Metab Res* 38:246–252
27. Jirikowski GF, Pusch L, Möpert B, Herbert Z, Caldwell JD 2007 Expression of corticosteroid binding globulin in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat* 34:22–28
28. Helbling JC, Minni AM, Tridon C, Moisan MP, A new tool to study the putative role of transcortin in the brain. 36ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, Nice, France, 15–18 September, 2009 (Abstract no. 19, p65)
29. Solberg LC, Baum AE, Ahmadiyah N, Shimomura K, Li R, Turek FW, Takahashi JS, Churchill GA, Redei EE 2006 Genetic analysis of the stress-responsive adrenocortical axis. *Physiol Genomics* 27:362–369
30. Ousova O, Guyonnet-Duperat V, Iannuccelli N, Bidanel JP, Milan D, Genêt C, Llamas B, Yerle M, Gellin J, Chardon P, Emptoz-Bonneton A, Pugeat M, Mormède P, Moisan MP 2004 Corticosteroid binding globulin: a new target for cortisol-driven obesity. *Mol Endocrinol* 18:1687–1696
31. Cameron A, Henley D, Carrell R, Zhou A, Clarke A, Lightman S 2010 Temperature-responsive release of cortisol from its binding globulin: a protein thermocouple. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4689–4695
32. Guyonnet-Dupérat V, Geverink N, Plastow GS, Evans G, Ousova O, Croisetière C, Foury A, Richard E, Mormède P, Moisan MP 2006 Functional implication of an Arg307Gly substitution in corticosteroid-binding globulin, a candidate gene for a quantitative trait locus associated with cortisol variability and obesity in pig. *Genetics* 173:2143–2149
33. Lewis JG, Borowski KK, Shand BI, George PM, Scott RS 2010 Plasma sex hormone-binding globulin, corticosteroid-binding globulin, cortisol, and free cortisol levels in outpatients attending a lipid disorders clinic: a cross-sectional study of 1137 subjects. *Horm Metab Res* 42:274–279

**ANNEXES 2 : MEMBRANE
MINERALOCORTICOID BUT NOT
GLUCOCORTICOID RECEPTORS OF THE
DORSAL HIPPOCAMPUS MEDIATE THE
RAPID EFFECTS OF CORTICOSTERONE ON
MEMORY RETRIEVAL**



Open

Membrane Mineralocorticoid but not Glucocorticoid Receptors of the Dorsal Hippocampus Mediate the Rapid Effects of Corticosterone on Memory Retrieval

Rodolphe Dorey^{1,2,5}, Christophe Piérard^{2,5}, Svitlana Shinkaruk^{3,4}, Christophe Tronche^{1,2}, Frédéric Chauveau², Mathieu Baudonnat¹ and Daniel Béracochea^{*1}

¹CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA) UMR 5287, Universités de Bordeaux, Talence, France;

²Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA)—Unité Fatigue et Vigilance, Brétigny sur Orge, France; ³U862 Inserm Physiopathologie de la plasticité neuronale, Institut François Magendie, Universités de Bordeaux, Bordeaux, France; ⁴ENITA de Bordeaux, Gradignan, France

This study was aimed at determining the type of the glucocorticoid membrane receptors (mineralocorticoid receptors (MRs) or glucocorticoid receptors (GRs)) in the dorsal hippocampus (dHPC) involved in the rapid effects of corticosterone or stress on memory retrieval. For that purpose, we synthesized corticosterone–3-*O*-carboxymethylloxime–bovine serum albumin conjugate (Cort–3CMO–BSA) conjugate (a high MW complex that cannot cross the cell membrane) totally devoid of free corticosterone, stable in physiological conditions. *In a first experiment*, we evidenced that an acute stress (electric footshocks) induced both a dHPC corticosterone rise measured by microdialysis and memory retrieval impairment on delayed alternation task. Both the endocrinal and cognitive effects of stress were blocked by metyrapone (a corticosterone synthesis inhibitor). *In a second experiment*, we showed that bilateral injections of either corticosterone or Cort–3CMO–BSA in dHPC 15 min before memory testing produced impairments similar to those resulting from acute stress. Furthermore, we showed that anisomycin (a protein synthesis inhibitor) failed to block the deleterious effect of Cort–3CMO–BSA on memory. *In a third experiment*, we evidenced that intra-hippocampal injection of RU-28318 (MR antagonist) but not of RU-38486 (GR antagonist) totally blocked the Cort–3CMO–BSA-induced memory retrieval deficit. *In a fourth experiment*, we demonstrated that RU-28318 administered 15 min before stress blocked the stress-induced memory impairments when behavioral testing occurred 15 min but not 60 min after stress. Overall, this study provides strong *in vivo* evidence that the dHPC membrane GRs, mediating the rapid and non-genomic effects of acute stress on memory retrieval, are of MR but not GR type. *Neuropsychopharmacology* (2011) **36**, 2639–2649; doi:10.1038/npp.2011.152; published online 3 August 2011

Keywords: membrane glucocorticoid receptors; hippocampus; corticosterone; Cort–BSA; stress; memory retrieval

INTRODUCTION

The effects of glucocorticoids (GCs) on memory processes have been attributed to classic steroid mechanisms involving delayed transcriptional regulation (McEwen and Sapolsky, 1995; de Kloet *et al*, 1999; Sapolsky *et al*, 2000; Lupien and Lepage, 2001; McGaugh and Roozendaal, 2002; Donley *et al*, 2005; Joels *et al*, 2006). From a functional point of view, the molecular mechanisms mediating the effects of GCs on memory formation are largely unknown. However, AMPA receptor expression and trafficking have been implicated (Groc *et al*, 2008; Conboy and Sandi, 2010). In addition, recent findings in neuroendocrinology suggest

that steroids can rapidly modulate neuronal activity (within a few minutes) through a non-genomic pathway via an activation of membrane receptors (Borski, 2000; Falkenstein *et al*, 2000; Makara and Haller, 2001; Dallman, 2005; Tasker *et al*, 2006). It has also been shown that GCs increase the release of excitatory amino acids (Venero and Borrell, 1999), reduce unit discharge of hippocampal neuron in rat hippocampus via a rapid non-genomic action (Pfaff *et al*, 1971), and modulate neuronal activity and synaptic excitatory transmission (Chaouloff and Groc, 2011).

However, rapid effects of corticosterone on behavior and cognitive processes are seldom documented (Sajadi *et al*, 2006; Orchinik *et al*, 1991; Sandi *et al*, 1996; Breuner *et al*, 1998). Previous studies from our team provided first clearcut evidence in behaving animals of the involvement of dorsal hippocampal membrane receptors in the mediation of the rapid deleterious effects of stress on memory retrieval. More specifically, we showed that bilateral infusion into the dorsal hippocampus (dHPC) of corticosterone–bovine serum albumin conjugate (Cort–BSA), a high

*Correspondence: Dr D Béracochea, CNRS, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA) UMR 5287, Universités de Bordeaux, Talence 33400, France, Tel: +33 54 000 2439, Fax: +33 54 000 8743, E-mail: d.beracochea@cnic.u-bordeaux1.fr

⁵These two authors contributed equally to this work.

Received 24 March 2011; revised 5 July 2011; accepted 5 July 2011

MW complex that cannot cross the cell membrane, produced deleterious effects on memory retrieval similar to those resulting from an acute stress administration delivered 5 min before memory testing (Chauveau *et al.*, 2010).

Our previous study did not determine, however, the type of membrane GC receptors (GRs) involved in the rapid effects of Cort-BSA nor that of acute stress on memory retrieval. To our knowledge, only *in vitro* or electrophysiological studies have as yet demonstrated that the rapid effects of corticosterone or stress may be mediated through mineralocorticoid receptors (MRs) activity. Thus, it has been shown that MRs but not GRs are required for non-genomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone (Karst *et al.*, 2005). In contrast, in behaving animals, a recent study evidenced that Cort-BSA administered in the medial prefrontal cortex 1 h before memory testing enhances memory consolidation, but impaired working memory, and that these Cort-BSA-induced impairments were blocked by co-administration of a GR but not an MR antagonist (Barsegyan *et al.*, 2010). So far, the issue of the type of the membrane-bound steroid receptor involved in the rapid effects of GCs on cognitive processes remains seldom documented in behaving animals, and more particularly as regards the type of hippocampal membrane GRs involved in the rapid effects of corticosterone or stress on memory retrieval. Indeed, several studies have already evidenced the involvement of both types of hippocampus GRs in memory retrieval, but these experiments were not designed to evidence the involvement of MR or GR at the membrane level (Rozenendaal *et al.*, 2004; Khaksari *et al.*, 2007; Ferguson and Sapolsky, 2007).

Accordingly, as Cort-BSA directly acts on membrane receptors and induced memory retrieval impairments (Chauveau *et al.*, 2010), we intended in the study hereby to determine the ability of selective antagonists of the MRs or GRs to block the rapid effects of either acute stress or intra-hippocampus Cort-BSA infusions on memory retrieval. Hence, we synthesized, characterized, and purified a new Cort-BSA complex, that is, Cort-3CMO-BSA (Cort-3-O-carboxymethylxime-BSA conjugate) totally devoid of free corticosterone that could trigger non-membrane effects. The Cort-3CMO-BSA complex that we developed offers the advantage, as compared to commercial products, of having a higher corticosterone density on carrier BSA.

From a behavioral standpoint, to avoid the use of reinforcements that may interfere either with stress or with the pharmacological treatments, we evaluated memory retrieval processes using non-rewarded alternation behavior, in which the delayed alternation rate is an index of memory performance (Beracochea and Jaffard, 1985; Borde *et al.*, 1996; Chauveau *et al.*, 2005).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

Experiment 1 tested the impact of an acute stress delivered 15 min before the test session of the delayed alternation task. In parallel, the time course of the stress-induced corticosterone rise in the dorsal intra-hippocampus was

measured in independent groups of mice. Moreover, to evidence the causal role of the stress-induced hippocampal corticosterone rise on memory retrieval dysfunction, we also evaluated the effects of an intraperitoneal pre-test metyrapone administration (a corticosterone synthesis inhibitor) on both the behavioral and endocrinal measures.

In Experiment 2, corticosterone or Cort-3CMO-BSA was bilaterally administered into the dHPC 15 min before the test session, to determine if these compounds produced memory retrieval deficits similar to those resulting from stress, and the involvement of membrane GRs' activation in the mediation of the rapid deleterious effects of corticosterone on memory retrieval. Moreover, to ensure that the rapid effects of Cort-3CMO-BSA are not mediated by genomic pathway, we administered in independent groups of mice anisomycin (an inhibitor of protein synthesis) 45 min before the infusion of Cort-3CMO-BSA.

In Experiment 3, the GR antagonist RU-38486 (mifepristone) or the MR antagonist RU-28318 was injected into the dHPC 15 min before the injection of Cort-3CMO-BSA. The blockade of either MRs or GRs by selective antagonists should block the effects of intra-hippocampus Cort-3CMO-BSA injection on memory performance, and accordingly will allow determination of the type (MRs or GRs) of the membrane GRs mediating the effects of Cort-3CMO-BSA on memory retrieval.

In Experiment 4, given the results obtained in Experiment 3, the MR antagonist RU-28318 was bilaterally injected into the dHPC 15 min before acute stress delivery; the test session occurred, however, either 15 or 60 min after stress delivery. This experiment allowed us to determine if RU-28318 will block the effects of stress on memory retrieval similarly as for Cort-3CMO-BSA (Experiment 3) and the time course for such an effect.

Animals

The subjects were 6-month-old naive male mice of the C57BL/6 inbred strain obtained from Charles Rivers (L'Arbresle, France). At the time of the experiments, mice weighed between 28 and 32 g. They were housed individually with free access to water on a 12 h light-dark cycle in a temperature-controlled and ventilated room. Tests were conducted during the light phase of the cycle between 0800 and 1200 hours. The number of animals used in each group is given in the Result section.

Surgery and Histology

Mice were anesthetized with a ketamine (1 mg/kg body weight)-xylazine (10 mg/kg body weight) solution and placed on a stereotaxic frame. All stereotaxic coordinates are referenced in μm from the bregma (Paxinos and Franklin, 2001). For pharmacological administration, two stainless-steel guide cannulae (26 G, 8 mm length) were implanted bilaterally 1 mm above the surface of the dHPC (AP = -2000; L = \pm 1400; V = -1000). Guide cannulae were fixed in place with dental cement and two microscrews attached to the skull. All operated mice were allowed to recover in their home cages in the animal room for at least 7 days before the behavioral experiments began. After completing the behavioral test, all mice were killed to collect

brains. All the brains were coronally sectioned (50 μ m thickness). A cresyl violet stain was used to verify the exact probe location in dorsal HPC.

Pharmacological Administration

In Experiment 1, all subjects were habituated for prick effect in the animal room without perforating the skin during 5 consecutive days. On the day of experiment and 30 min before the acute stress delivery, mice received an intraperitoneal injection of metyrapone (Promochem; 35 mg/kg body weight dissolved in a solution of 5% ethanol in saline) in a room different from that used for behavioral testing.

In Experiment 2, a 32-G stainless-steel cannula (9 mm length) attached to a microsyringe with polyethylene catheter tubing was inserted into the guide cannula. The syringes were placed in a constant flow rate pump (0.4 μ l/min). Corticosterone (Sigma, France) or Cort-3CMO-BSA was diluted in mock CSF (vehicle) at the concentration of 1 mg/ml, and bilaterally injected (1 μ l per side) into the dHPC. The cannulae were left in place for 3 min before removal to allow the diffusion of the drugs from the cannulae tips. Corticosterone or Cort-3CMO-BSA was injected 15 min before behavioral testing. The control group was injected with BSA to verify the absence of any side effects of BSA alone on performance.

In a further step, anisomycin (Sigma) was dissolved in 1 M HCl, diluted in saline, and adjusted to pH 7.5 with NaOH. The concentration of the solution was of 160 μ g/ μ l. A measure of 0.8 μ l of solution (corresponding to 128 μ g) was injected in each hippocampus side. Anisomycin was injected *in situ* in the dHPC 45 min before the Cort-3CMO-BSA. The control group received the anisomycin solution followed 45 min later by BSA.

In Experiment 3, corticosterone receptors antagonists (RU-38486 and RU-28318; Tocris, St Louis, MO) at the concentration of 20 mg/ml or vehicle (mock CSF with the addition of a small amount of absolute ethanol) were injected 15 min before Cort-3CMO-BSA into the dHPC. The antagonists were injected in a volume of 0.40 μ l per hippocampus side (0.05 μ l/min during 8 min). Thus, the amounts of antagonists injected in hippocampus were eightfold higher (8 μ g) as compared to Cort-3CMO-BSA (1 μ g). A small amount of absolute ethanol was first used to dissolve the antagonists and the volumes were then brought up with mock CSF. Behavioral testing occurred 15 min after the Cort-3CMO-BSA injection.

In Experiment 4, the MR antagonist and vehicle solution were prepared similarly to Experiment 3 and injected bilaterally into the dHPC 15 min before stress. Behavioral testing occurred either 15 min ('MR antagonist + stress 15 min' group) or 60 min ('MR antagonist + stress 60 min' group) after the acute stress delivery. They were compared to a non-stressed group receiving the vehicle solution 30 min before the onset of the test session or to a stressed group also receiving the vehicle solution 15 min before stress delivery.

Microdialysis Experiments

At least 7 days before microdialysis experiments, mice were anesthetized with a ketamine (100 mg/kg body

weight)-xylazine (10 mg/kg body weight) mixture and placed on a stereotaxic frame. A single guide microdialysis cannula (CMA/7 Microdialysis probe, CMA Microdialysis, Solna, Sweden) was implanted in the bottom of the parietal cortex at the following coordinates from the bregma (Paxinos and Franklin, 2001): antero-posterior = -2000 μ m; lateral = +1400 μ m, and vertical = -800 μ m. The guide cannula was fixed with dental cement and three microscrews attached to the skull. All operated mice were allowed to recover in their home cages in the animal room. On the day of the experiment, the microdialysis probe was introduced through the guide cannula and lowered 1 mm below so that the microdialysis membrane was located into the dorsal HPC. At the end of the microdialysis experiment, mice were anesthetized and then transcardially perfused in the left ventricle with saline solution (NaCl 0.9%), followed by formaldehyde (4%). Brains were then post-fixed in a 4% formaldehyde solution for 10 days, and then in a saccharose-formaldehyde solution (30-4% (v/v)) for 2 days. All the brains were coronally sectioned (50 μ m thickness). A cresyl violet stain was used to locate the microdialysis probe with utmost accuracy.

In Experiment 1, microdialysis was performed in freely moving animals to determine corticosterone levels in the dHPC after acute stress or metyrapone administration. Probes (CMA/7, membrane length 1 mm; CMA Microdialysis) were perfused continuously with sterile filtered Dulbecco's solution at rate of 0.1 μ l/min. At 12 h after probe implantation and extracellular concentration equilibration (2 h at 1 μ l/min flow rate), baseline dialysates (15 min samples) were collected with a flow rate of 1 μ l/min during 2 h. Intraperitoneal metyrapone injections were carried out 30 min before the acute stress delivery. The dialysates were collected during 3 additional hours after stress (flow rate: 1 μ l/min; sampling delay: 15 min). The foot-shock delivery system was located in the dialysis cage. Samples were stored at -80 °C before analysis. Baseline dialysates were collected for 1 h before intraperitoneal injection of metyrapone or vehicle, and 30 min before acute stress delivery. Free corticosterone levels measured in the dialysates were expressed as the percentage of the averaged baseline values sampled before the injection.

Behavioral Task

Delayed alternation procedure. All tests were performed in a T-maze constructed of gray Plexiglas. Stem and arms were 35 cm long, 10 cm wide, and 25 cm high. Goal arms and the start box were separated from the central alley by horizontal sliding doors. Illumination inside the apparatus (about 50 lx) was provided by a lamp positioned 2 m above the stem. Testing was conducted between 0800 and 1200 hours to avoid circadian variations of corticosterone.

Mice were submitted to the delayed alternation task using a forced-trial procedure. In the acquisition phase, the subjects were forced to enter twice the same goal arm of the maze, as access to the other arm being blocked by the sliding door. The two forced trials were separated by a 30 s interval. The acquisition phase was followed by a test phase implemented 24 h later. During the delay separating the acquisition and test trials, mice were returned to their home cage in the animal room. During the test trial, animals

remained 30 s in the start box. The door was then opened, and animals were free to enter each goal arm within the maze. The correct choice (alternation behavior) is to enter the arm opposite to that entered the day before. In all experiments, animals remained for 30 s in the chosen arm, and were again returned during 30 s to the start box, for a second free choice trial. This additional trial aimed at assessing whether the treatments impaired or not the ability of mice to alternate as well as short-term memory.

In all pharmacological and behavioral experiments, mice were subjected to two forced-trial sessions, the blocked arm of the second session being opposite to the arm blocked at the first session. Each session was separated by at least 1 week (Figure 1).

Acute Stress

The acute stress was administered 15 min before the test trial (first and fourth experiments). Stress was delivered in a room different from the one used for behavioral testing. Mice remained during 1 min in a stress delivery cage. Stressed mice received three successive unavoidable electric footshocks (0.9 mA; 10 ms) in keeping with our previous studies (Celerier et al, 2004; Chauveau et al, 2010; Tronche et al, 2010). Non-stressed mice were placed in the cage in the same conditions, except that they received no footshock. Animals were then placed in their home cage for 15 min and subsequently assigned to the T-maze behavioral procedures.

Intra-Hippocampal Corticosterone Assay

An enzyme immunoassay commercial kit (Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor, MI) was used to measure HPC corticosterone concentrations in the microdialysates. The sensitivity of the assay was 18.6 pg/ml. Therefore, baseline sample concentration was more than 10-fold above the sensitivity threshold.

Synthesis of Cort-3CMO-BSA

Chemicals and experimental equipment. Corticosterone (+97.0%) and carboxymethoxylamine hemihydrochloride (+98.0%) were purchased from TCI Europe (Zwinjndrecht, Belgium). Anhydrous pyridine (99.8%), dichloromethane,

and methanol (Chromasolv grade) were supplied by Sigma-Aldrich Chemicals (Saint Quentin Fallavier, France). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker AC-300 FT (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 75 MHz). Chemical shifts (δ) and coupling constants (J) are expressed in p.p.m. and Hz, respectively. High-resolution mass spectrum was acquired by the CESAMO (Bordeaux, France) on a QStar Elite mass spectrometer (Applied Biosystems). Thin-layer chromatography (TLC) was performed on SDS TLC plates: thickness 0.25 mm, particle size 15 μm , and pore size 60 Å. Merck silica gel 60 (70–230 mesh and 0.063–0.200 mm) was used for flash chromatography. Spots were revealed with UV as well as KMnO_4 (0.05% in water).

Synthesis of Cort-3CMO. A solution of carboxymethoxylamine hemihydrochloride (82 mg, 0.75 mmol) and anhydrous pyridine (79 mg, 80 μl , 1 mmol) in methanol (5 ml) was added to a solution of corticosterone (173 mg, 0.5 mmol) in methanol (4 ml) at room temperature. The mixture was stirred for 5 h and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel chromatography, using dichloromethane/methanol (94:6 (v/v)) as an eluent, to afford the target compound as a white solid (157 mg, 75%, +95% purity by NMR, $R_f = 0.15$).

^1H NMR (MeOH- D_4) δ 0.91 (s, 3H, CH_3 -18), 0.91–1.22 (m, 3H, CH_2 -7b, CH-9, CH-14), 1.37 (s, 3H, CH_3 -19), 1.51–1.85 (m, 5H, CH_2 -1b, CH_2 -12b, CH_2 -15, CH_2 -16b), 1.91–2.55 (m, 9H, CH_2 -1a, CH_2 -2b, CH_2 -6, CH_2 -7a, CH-8, CH_2 -12a, CH_2 -16a, CH-17), 3.02 (apparent dt, 1H, $J = 17$ and 4 Hz, CH_2 -2a), 4.15 (d, 1H, $J = 19$ Hz, CH_2 -21a), 4.23 (d, 1H, $J = 19$ Hz, CH_2 -21b), 4.34 (m, 1H, CH-11), 4.56 (s, 2H, O- CH_2 -COOH), and 5.66 (s, 1H, CH-4).

^{13}C NMR (MeOH- D_4) δ 15.0 (CH_3 -18), 18.9 (CH_2 -2), 20.4 (CH_3 -19), 22.0 (CH_2 -16), 24.1 (CH_2 -15), 31.4 (CH_2 -6), 31.9 (CH-8), 33.0 (CH_2 -7), 33.7 (CH_2 -1), 38.5 (C-10), 43.5 (C-13), 47.7 (CH_2 -12), 56.5 (CH-9), 57.7 (CH-14), 59.0 (CH-17), 67.0 (CH-11), 68.6 (CH_2 -21), 69.7 (O- CH_2 -COOH), 114.5 (CH-4), 157.9 (C-3), 161.7 (C-5), 172.8 (COOH), and 210.4 (C-20).

HR-MS (ESI+): m/z 442.2200 for $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{Na}]^+$, 442.2206).

Synthesis of Cort-3CMO-BSA conjugate. Cort-3CMO was coupled to BSA by the activated ester method. Briefly, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (21 mg, 110 μmol , 1.1 equiv.) and *N*-hydroxysuccinimide (12.7 mg, 110 μmol , 1.1 equiv.) were added to a solution of Cort-3CMO (42 mg, 100 μmol , 50 equiv.) in anhydrous DMF (2 ml) at 0 °C. The mixture was stirred for 2 h and was then added to an ice-cooled solution of BSA (134 mg, 2 μmol) in 0.2 M borate-boric buffer, pH 8.7 (5 ml). The resulting mixture was allowed to warm at room temperature for 6 h, and then dialyzed against phosphate buffer saline (0.01 M, pH 7.4, 0.9% NaCl) and distilled water. The Cort-3CMO-BSA conjugate was lyophilized and stored at -20 °C. The corticosterone density on BSA was analyzed by matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS). The molecular ratio of covalently linked corticosterone was about 30 per molecule of BSA.

Stability of Cort-3CMO-BSA conjugate. To verify the stability of Cort-3CMO-BSA once administered *in vivo*, we diluted Cort-3CMO-BSA in mouse CSF at the concentration

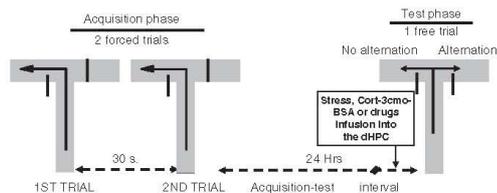


Figure 1 Memory testing procedure: animals are first submitted to an acquisition phase in which they are forced to enter twice the same arm of the maze (two forced trials); then, after a 24-h delay interval, they are submitted to the test phase in which they can freely enter either arm of the maze. An alternation is scored when the mouse enters the arm opposite to the one visited in the acquisition phase. Treatments (stress, and drug infusions in the dHPC) are delivered before the test phase, according to the experimental schedule described in the Materials and methods section.

of 1 mg/ml. Mouse CSF was sampled on 12 mice according to the technique described by Liu and Duff (2008). We analyzed the solution after 15, 60, and 120 min at a thermostated temperature of 37 °C. The solution was analyzed using ELISA technique (Arbor assays), allowing determination of only free corticosterone but not of conjugated forms. In each solution, free corticosterone concentrations were inferior to the limit of detection of the technique (16.9 pg/ml). Thus, we can assume that after 2 h in CSF at 37 °C, the concentration of free corticosterone was inferior to 0.0169 p.p.m. In consequence, the Cort-3CMO-BSA complex appears to be stable once administered *in vivo*.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Statview 5.0 software. The data were analyzed using one- or two-way

factorial analyses of variance (ANOVAs), followed, when adequate, by *post hoc* comparisons (Scheffe's test). Data were expressed as means ± SEM. Comparisons of retrieval performances with chance level were calculated with one-sample Student's *t*-test (with hypothesized mean = chance level = 50%). Microdialysis data were analyzed using one- or two-way repeated-measure ANOVA as appropriate, followed, when adequate, by *post hoc* testing (Bonferroni's test).

RESULTS

First Experiment: Effects of Acute Stress and Metyrapone on Delayed Alternation Rates and Hippocampal Corticosterone Concentrations

Effects of acute stress delivered 15 min before test session. Data are represented in Figure 2a. The data revealed a

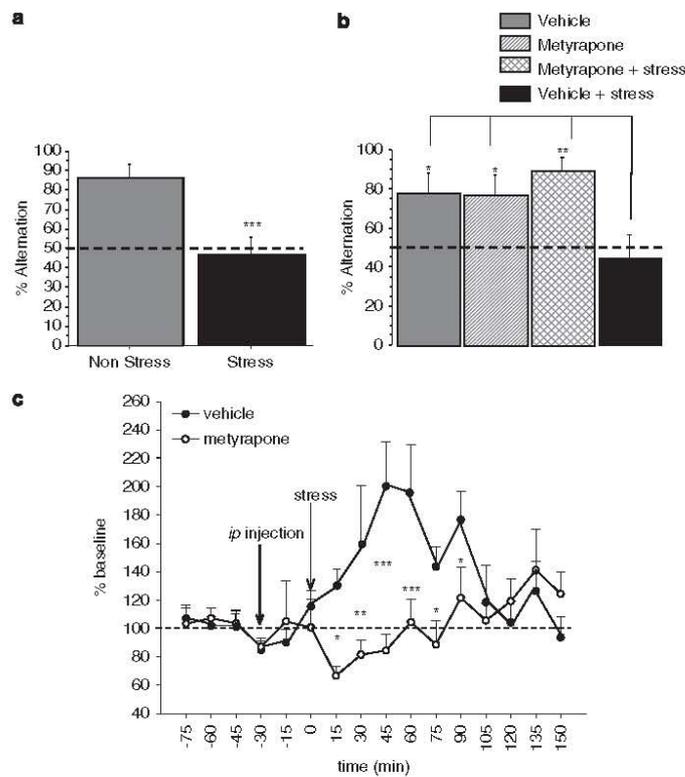


Figure 2 (a) Effects of stress on delayed alternation performance. Stress, delivered 15 min before test session, significantly reduced alternation rates: ****p* < 0.001; chance level: 50%. (b) Effects of stress and metyrapone (inhibitor of corticosterone synthesis) on delayed alternation rates. Metyrapone (35 mg/kg) injected intraperitoneally 30 min before stress delivery blocked the deleterious effects of stress on alternation rates; **p* < 0.05; ***p* < 0.01; chance level: 50%. (c) Time course evolution of corticosterone in the dorsal hippocampus measured by microdialysis in stressed animals pretreated or not with metyrapone (35 mg/kg). The peak of corticosterone is observed at about 60 min and return to baseline at about 90 min after stress delivery. Results are expressed in relative concentration; comparison to baseline: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. Metyrapone treated mice exhibit no difference after stress delivery as compared to baseline for each time.

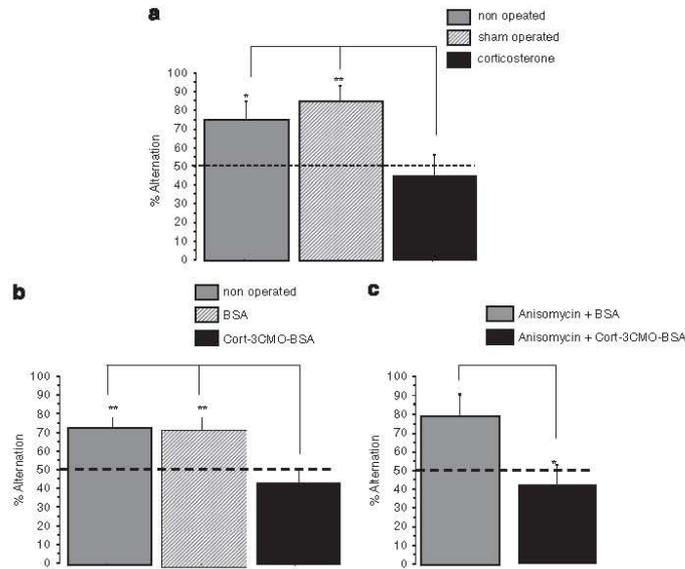


Figure 3 (a) Effect of corticosterone on delayed alternation performance. Corticosterone (1 mg/ml) was bilaterally injected in the dorsal hippocampus 15 min before the test session. Control groups were either non operated or received the vehicle solution. Corticosterone reduced alternation rates significantly as compared to control groups; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (b) Effect of Cort-3CMO-BSA (corticosterone-3 O carboxymethylloxime-BSA conjugate) on delayed alternation performance. Cort-3CMO-BSA (1 mg/ml) was bilaterally injected in the dorsal hippocampus 15 min before the test session. Control groups were either non operated animals or animals receiving BSA only to verify the absence of any side effect of BSA alone on performance. Cort-3CMO-BSA reduced alternation rates significantly as compared to control groups; ** $p < 0.01$; chance level: 50%. (c) Effect of anisomycin administered in dorsal hippocampus 45 min before Cort-3CMO-BSA on delayed alternation performance. Anisomycin (128 μ g per side) failed to block the deleterious effects of Cort-3CMO-BSA (1 mg/ml) bilaterally injected in the dorsal hippocampus 15 min before the test session. * $p < 0.05$.

(85.7 \pm 9.7%, 78.6 \pm 11.4%, 80.0 \pm 13.3%, and 88.7 \pm 6.3% for non-operated, vehicle, MR, and GR antagonists groups, respectively; $F(3,44) < 1.0$).

Effects of intra-hippocampus MR or GR antagonists administered before Cort-3CMO-BSA on delayed alternation rates. Data are represented in Figure 4b. The data revealed a significant between-group difference ($F(3,58) = 5.48$; $p = 0.002$). Significant between-group differences were observed between performance of vehicle + Cort-3CMO-BSA-injected mice ($N = 12$; 33.3 \pm 14.2%) as compared to vehicle + vehicle group ($N = 12$; 70.8 \pm 12.9%; $p < 0.02$) and to MR antagonist + Cort-3CMO-BSA group ($N = 16$; 84.4 \pm 6.0%; $p < 0.002$). In contrast, no significant difference was observed between the GR antagonist + Cort-3CMO-BSA group ($N = 22$; 43.2 \pm 8.9%) and vehicle + Cort-3CMO-BSA-injected mice (33.3 \pm 14.2%; NS).

All groups exhibited similar short-term alternation rates evaluated 30 s after the 24-h delayed test session (83.3 \pm 11.2%, 75.0 \pm 13.0%, 81.8 \pm 8.4%, and 87.5 \pm 8.5% for vehicle + vehicle, vehicle + Cort-3CMO-BSA, GR antagonist + Cort-3CMO-BSA, and MR antagonist + Cort-3CMO-BSA groups, respectively; $F(3,58) < 1.0$).

Fourth Experiment: Effects of Intra-Hippocampus MR Antagonist Administered before Acute Stress Delivery on Delayed Alternation Evaluated Either 15 or 60 min After Stress Delivery

Data are represented in Figure 5. The data revealed a significant between-group difference ($F(3,90) = 5.78$; $p = 0.001$). Significant between-group differences were observed between the non-stressed vehicle group ($N = 21$; 80.9 \pm 8.7%) and the vehicle + stress group ($N = 20$; 30.0 \pm 10.5%; $p < 0.001$). Moreover, the performance in 'MR antagonist + stress 15 min' group ($N = 25$; 68.0 \pm 9.5%) was significantly different as compared to the vehicle stressed group ($p < 0.01$), but did not differ from that of the vehicle-injected mice (NS). However, performance of the MR antagonist + stress 60 min group ($N = 28$; 39.2 \pm 9.3%) did not differ from that of stressed mice (NS), but were significantly lower as compared to both the MR antagonist + stress 15 min group ($p = 0.02$) and the non-stressed vehicle one ($p = 0.002$).

All groups exhibited similar short-term alternation rates evaluated 30 s after the delayed test session ($F(3,90) < 1.0$; vehicle: 66.6 \pm 10.5%; vehicle + stress: 70.0 \pm 10.5%; 'MR antagonist + stress 15 min': 68.0 \pm 9.5%; 'MR antagonist + stress 60 min': 67.8 \pm 8.9%).

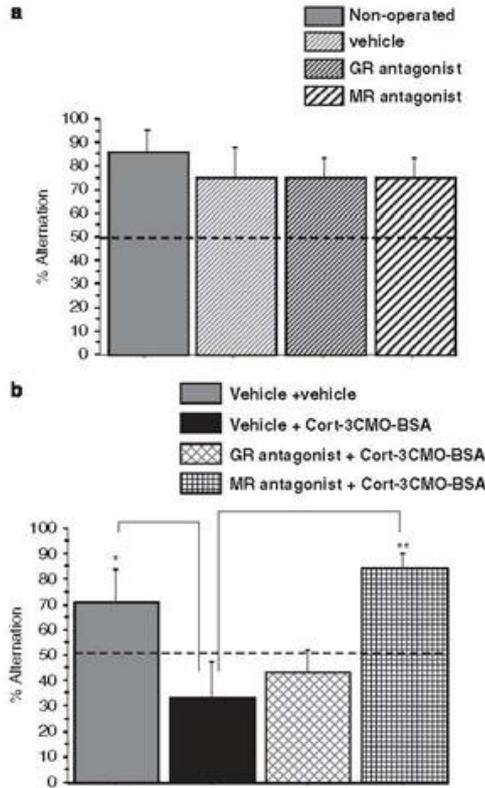


Figure 4 (a) Effects of glucocorticoid receptor (GR) antagonist (RU 38486 or mifepristone) and mineralocorticoid receptor (MR) antagonist (RU 28318) on delayed alternation rates. Both antagonists were injected bilaterally in the dorsal hippocampus at the dose of 20 μ g/ml each 15 min before behavioral testing. Control groups were either non operated animals or animals receiving vehicle only. The administration of both antagonists did not significantly modify alternation rates as compared to control groups. Chance level: 50%. (b) Effects of GR antagonist (RU 38486 or mifepristone) and MR antagonist (RU 28318) and Cort-3CMO-BSA (corticosterone-3 O carboxymethylxime-BSA conjugate) on delayed alternation rates. Both antagonists were injected bilaterally in the dorsal hippocampus at the dose of 50 μ g/ml each 15 min before the Cort-3CMO-BSA injection (1 mg/ml). Behavioral testing occurred 15 min after Cort-3CMO-BSA injection. Control groups were either animals receiving two vehicle injections separated by 15 min or animals receiving vehicle, followed 15 min later by Cort-3CMO-BSA injection. Results showed that the MR antagonist blocked the memory impairment observed in animals receiving Cort-3CMO-BSA only; in contrast, the GR antagonist did not block the deleterious effects of Cort-3CMO-BSA injection on alternation rates. Comparisons to Cort-3CMO-BSA treated animals: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; chance level: 50%.

Histological Analysis

Figure 6 shows the anterograde extent and the localization of the cannulae tips in the dHPC of mice. Black zones: main implantation sites; and black hashed areas: antero-retrograde extent of the cannulae tips implantation.

Neuropsychopharmacology

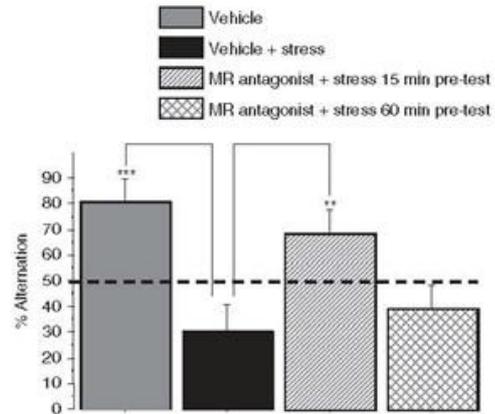


Figure 5 Effects of mineralocorticoid receptor (MR) antagonist (RU 28318) administered into the dorsal hippocampus 15 min before acute stress on delayed alternation rates. Behavioral test session occurred either 15 or 60 min after stress. Control groups were animals receiving vehicle only, followed or not by acute stress. The administration of the MR antagonist at the dose of 20 μ g/ml blocked the stress induced impairment on alternation rates 15 min but not 60 min after stress delivery. Comparisons to vehicle stressed animals: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; chance level: 50%.

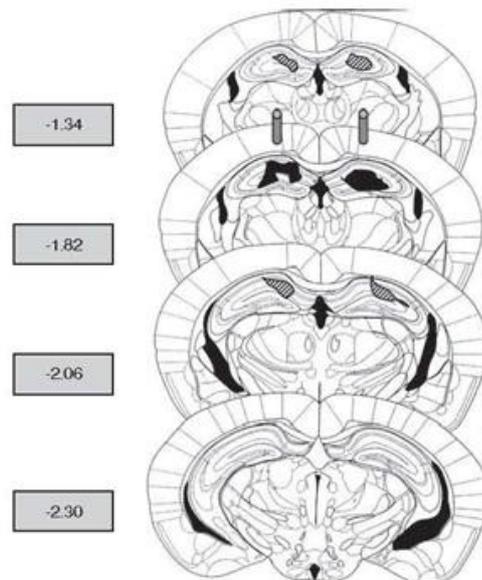


Figure 6 Representative localization of the sites of drug injections into the dorsal hippocampus. Reconstruction of the main sites of drug injections (black areas) and antero-posterior extent of the sites of injections (black hashed areas). Stereotaxic rostro-caudal coordinates are mentioned in mm from bregma.

DISCUSSION

The main findings of the study are as follows: *in a first experiment*, we evidenced that an acute stress (electric footshocks) induced both a dHPC corticosterone rise measured by microdialysis and a memory retrieval impairment in a non-rewarded spontaneous delayed alternation task. In addition, both the endocrinal and memory retrieval effects of stress were blocked by metyrapone (a corticosterone synthesis inhibitor; de Quervain *et al.*, 1998; Roozendaal *et al.*, 2001). *In a second experiment*, we showed that bilateral dHPC injections of either corticosterone or Cort-3CMO-BSA 15 min before memory retrieval produced impairments similar to those resulting from acute stress. Furthermore, we showed that anisomycin (a protein synthesis inhibitor) failed to block the deleterious effect of Cort-3CMO-BSA on memory. *In a third experiment*, we demonstrated that bilateral intra-hippocampal injection of RU-28318 (an MR antagonist) but not of RU-38486 (a GR antagonist) totally blocked the Cort-3CMO-BSA-induced memory retrieval deficit. *In a fourth experiment*, we found that the MR antagonist RU-28318 administered 15 min before acute stress blocked the stress-induced memory impairments when test occurred 15 min but not 60 min after stress delivery.

Overall, this study provides the first *in vivo* evidence that the dHPC membrane GRs involved in the rapid and non-genomic effects of acute stress on memory retrieval are of MR type.

The findings of the first two experiments are congruent with our previous study showing memory retrieval impairments associated to dHPC corticosterone rise 15 min but not 120 min after acute stress delivery (Chauveau *et al.*, 2010; Tronche *et al.*, 2010). Moreover, earlier studies stemming from our research team showed that stress effects on memory are only transient and were observed 15 min but not 120 min after stress delivery (Celerier *et al.*, 2004). As Cort-3CMO-BSA a high MW complex that cannot cross biological membranes and stable in physiological conditions produced deleterious effects on memory retrieval similar to those resulting from acute stress or dHPC corticosterone injections, we can conclude that the rapid effects of stress are mediated by membrane GRs (see Chauveau *et al.*, 2010). This finding is sustained by the fact that anisomycin (a protein synthesis inhibitor) was unable to block the deleterious effect of Cort-3CMO-BSA on memory retrieval (see Figure 3b and c). The lack of deleterious effect of anisomycin itself on memory retrieval is in agreement with studies showing that anisomycin impairs consolidation and reconsolidation processes that involve transcriptional factors (Stafford and Lattal, 2009). In contrast, in our experiment, anisomycin was administered just before the retrieval session, that is, 24 h after the acquisition of the to-be remembered information. Moreover, a genomic effect of stress or Cort-3CMO-BSA was unlikely because we evaluated memory retrieval 15 min after treatments, a time interval that excludes a genomic action that requires more than 30 min to develop (Sapolsky *et al.*, 2000).

Surprisingly, corticosterone covalently bound to a protein has been seldom used to evaluate the membrane effects of GCs on cognitive processes (Chauveau *et al.*,

2010; Barsegyan *et al.*, 2010). In this study, we synthesized, purified, and characterized Cort-3CMO-BSA. Repetitive dialysis was applied to eliminate non-reacted corticosterone and MALDI-MS was used to determine the binding efficiency of corticosterone-protein conjugate (number of covalently bound corticosterone entities per protein molecule, that is, 30:1). This well-characterized home-made Cort-BSA complex, totally devoid of free corticosterone and found to be stable in physiological conditions, allowed us to investigate the effects of membrane GRs activation.

In a further step, we attempted to characterize the type (MR vs GR) of GC membrane receptors involved in the rapid modulation of memory retrieval induced by stress or Cort-3CMO-BSA. Thus, this study demonstrated that GRs of MR type in the dHPC are responsible for these effects. Indeed, RU-28318, an MR antagonist, blocked the deleterious effects of Cort-3CMO-BSA or stress-induced dHPC corticosterone rise on memory retrieval. In contrast, RU-38486 (mifepristone), a GR antagonist, was unable to counteract such effects. Thus, this study provides pharmacological direct evidence that the membrane dHPC GRs responsible for the rapid cognitive impairments of stress and corticosterone on memory retrieval are of MR but not GR type (for a review, see Joels *et al.*, 2007).

It has already been suggested that central MRs are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval in rats. Thus, Khaksari *et al.* (2007) evidenced a non-genomic effect of corticosterone on memory retrieval using anisomycin. However, in contrast to this study, their data did not directly demonstrate the involvement of MR at membrane level. Moreover, in their study, the GC antagonists were injected intracerebroventricularly, precluding identification of the brain areas sustaining the pharmacological effects, as opposed to this study. Our current data however apparently contrast with recent findings from Barsegyan *et al.* (2010), who showed that Cort-BSA injected into the medial prefrontal cortex facilitated memory consolidation of emotional experiences and concurrently impaired working memory in a rewarded sequential alternation task in rats. In their study, these effects were antagonized by GR but not MR antagonists. Their pharmacological design differs from ours however as regards the brain site of drug injections and the time of drug injections before memory testing, that is, 60 min. Indeed, this delay can neither exclude a non-genomic mechanism nor the possible involvement of GRs. The results provided by the fourth experiment of this study clearly indicate that the injection of MR antagonist is unable to block the stress-induced memory retrieval impairment when the test session occurred 60 min after stress delivery. Interestingly, we showed in the first experiment (see Figure 2c) that the maximum level of corticosterone rise in dHPC is observed about 60 min after stress delivery. Therefore, one can suggest that the lack of effect of the MR antagonist RU-28318 on memory retrieval performance in stressed animals at the 60 min interval could rely on either an action of corticosterone on cytosolic receptors or an involvement of GRs, which exhibit low affinity for corticosterone, thus requiring high corticosterone concentration to be activated (for a review see Joels, 2008). The latter hypothesis fits well with the high corticosterone level observed in the dHPC 60 min after stress delivery. Indeed,

our data obtained with the MR antagonist at 60 min is in agreement with the findings of Barsegyan *et al* (2010), which evidenced that MR receptors are not involved on memory performance at this delay interval. In agreement with the study of Joels *et al* (2007), it can be suggested that low-affinity membrane version of the MR contributes to the initial phase of the stress reaction, followed by the GR involvement, which terminates the stress response.

Another finding within our study is that short-term memory (assessed by the second free choice trial of the test session procedure) was unaffected by stress, corticosterone, or GC antagonists administration. The effects of GCs on short-term memory are variable and depend on several factors such as the kind of task, the type of stressors, the brain structures sustaining task performances, and so on (Barsegyan *et al*, 2010; Yehuda *et al*, 2007; Brunner *et al*, 2006). In this study, the lack of deleterious effects of corticosterone on short-term memory may result from the different strength of memory for the to-be remembered information, which critically depends on the time interval elapsed between the acquisition and test trials. Moreover, the addition at the test session of the second short-term trial constitutes a shift in the behavioral procedure, which possibly engages the subject in a cognitive processing of information different from that sustaining memory retrieval performance upon the first trial. Thus, both short-term memory testing and the shift of behavioral procedure (forced choices *vs* discrete trial) may involve different brain circuitries, which could compensate the corticosterone-induced hippocampus dysfunction. Whatever the explanations, the high level of alternation rates observed in the short-term trial with the experimental mice show that both stress and the pharmacological treatments did not impair the ability to alternate *per se*. Thus, the deficit observed in the 24 h delayed test trial in experimental mice cannot be ascribed to an intrinsic impairment of alternation behavior.

In conclusion, our study provides strong *in vivo* evidence that the *membrane* GRs in the dHPC mediating the rapid and non-genomic effects of stress and GCs on memory retrieval are of MR but not GR type. Given the present results, we intend to investigate in a further study the functional role of the GRs of the ventral hippocampus in relation to the time-course evolution of the stress-induced corticosterone rise and associated memory retrieval impairments for short (15 min) and long (60 min) delays. Indeed, it has been shown that the dorsal and ventral hippocampus are functionally distinct structures (Fanselow and Dong, 2010), mainly as regards the density and balance of MRs and GRs and brain connectivity (Segal *et al*, 2010).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Frances Ash (ashberac@free.fr) for her language assistance. We are grateful to Dr Jean-Marie Schmitter from Universités de Bordeaux for MALDI analysis of Cort-3CMO-BSA. This research was supported by the CNRS and by a grant (Opération no. 03co015-05 PEA 010801) from DGA/DET/SCET/CEP/SHP, Paris, France.

DISCLOSURE

We wish to extend the following statements: except for income received from my primary employer, no financial support or any compensation has been received from neither any individual nor corporate entity over the past 3 years for either research or professional service. Further, no single personal financial holding may exist or be perceived as constituting a potential conflict of interest.

REFERENCES

- Barsegyan A, Mackenzie SM, Kurose BD, McGaugh JL, Roozendaal B (2010). Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16655–16660.
- Beracochea D, Jaffard R (1985). Memory deficits subsequent to chronic consumption of alcohol in mice: an analysis based on spontaneous alternation behavior. *Behav Brain Res* **15**: 15–25.
- Borde N, Jaffard R, Beracochea DJ (1996). Effects of methyl beta-carboline-3-carboxylate on memory impairments induced by chronic alcohol consumption in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **20**: 1377–1387.
- Borski RJ (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab* **11**: 427–436.
- Breuner CW, Greenberg AL, Wingfield JC (1998). Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Gen Comp Endocrinol* **111**: 386–394.
- Brunner R, Schaefer D, Hess K, Parzer P, Resch F, Schwab S (2006). Effect of high-dose cortisol on memory functions. *Ann NY Acad Sci* **1071**: 434–437.
- Celerier A, Pierard C, Rachbauer D, Sarrieau A, Beracochea D (2004). Contextual and serial discriminations: a new learning paradigm to assess simultaneously the effects of acute stress on retrieval of flexible or stable information in mice. *Learn Mem* **11**: 196–204.
- Chaouloff F, Groc L (2011). Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress. *Front Neuroendocrinol* **1**: 25–42.
- Chauveau F, Célérier A, Ognard R, Pierard C, Béracochea D (2005). Effects of ibotenic acid lesions of the mediodorsal thalamus on memory: relationship with emotional processes in mice. *Behav Brain Res* **156**: 215–223.
- Chauveau F, Tronche C, Piérard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M *et al*. (2010). Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* **1**: 196–207.
- Conboy L, Sandi C (2010). Stress at learning facilitates memory formation by regulating AMPA receptor trafficking through a glucocorticoid action. *Neuropsychopharmacology* **35**: 674–685.
- Dallman MF (2005). Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. *Front Neuroendocrinol* **26**: 103–108.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* **22**: 422–426.
- de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* **394**: 787–790.
- Donley MP, Schulkin J, Rosen JB (2005). Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav Brain Res* **164**: 197–205.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000). Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* **52**: 513–556.

- Fanselow MS, Dong HW (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65: 7–19.
- Ferguson D, Sapolsky R (2007). Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci* 27: 8046–8052.
- Groc L, Choquet D, Chaouloff F (2008). The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 8: 868–870.
- Joëls M (2008). Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583: 312–321.
- Joels M, Karst H, DeRijk R, De Kloet ER (2007). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31: 1–7.
- Joels M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ (2006). Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci* 10: 152–158.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schütz G, Joëls M (2005). Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19204–19207.
- Khaksari M, Rashidy-Pour A, Vafei AA (2007). Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval. *Neuroscience* 149: 729–738.
- Liu L, Duff K (2008). A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *J Vis Exp* 10: pii: 960.
- Lupien SJ, Lepage M (2001). Stress, memory, and the hippocampus: can't live with it, can't live without it. *Behav Brain Res* 127: 137–158.
- Makara GB, Haller J (2001). Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* 65: 367–390.
- McEwen BS, Sapolsky RM (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5: 205–216.
- McGaugh JL, Roozendaal B (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* 12: 205–210.
- Orchinik M, Murray TF, Moore FL (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252: 1848–1851.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn. San Diego: Academic Press, pp 1–296.
- Pfaff DW, Silva MT, Weiss JM (1971). Telemetered recording of hormone effects on hippocampal neurons. *Science* 172: 394–395.
- Roozendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL (2004). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J Neurosci* 24: 8161–8169.
- Roozendaal B, Phillips RG, Power AE, Brooke SM, Sapolsky RM, McGaugh JL (2001). Memory retrieval impairment induced by hippocampal CA3 lesions is blocked by adrenocortical suppression. *Nat Neurosci* 4: 1169–1171.
- Sajadi AA, Samaei SA, Rashidy-Pour A (2006). Intra-hippocampal microinjections of anisomycin did not block glucocorticoid-induced impairment of memory retrieval in rats: an evidence for non-genomic effects of glucocorticoids. *Behav Brain Res* 173: 158–162.
- Sandi C, Venero C, Guaza C (1996). Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* 8: 794–800.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55–89.
- Segal M, Richter-Levin G, Maggio N (2010). Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: a hypothesis. *Hippocampus* 12: 1332–1338.
- Stafford JM, Lattal JM (2009). Direct comparisons of the size and persistence of anisomycin-induced consolidation and reconsolidation deficits. *Learn Mem* 16: 494–503.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R (2006). Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 147: 5549–5556.
- Tronche C, Piérard C, Coutan M, Chauveau F, Liscia P, Béracochéa D (2010). Increased stress-induced intra-hippocampus corticosterone rise associated with memory impairments in middle-aged mice. *Neurobiol Learn Mem* 3: 343–351.
- Venero C, Borrell J (1999). Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur J Neurosci* 11: 2465–2473.
- Yehuda R, Harvey PD, Buchsbaum M, Tischler L, Schmeidler J (2007). Enhanced effects of cortisol administration on episodic and working memory in aging veterans with PTSD. *Neuropsychopharmacology* 32: 2581–2591.



This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

**ANNEXE 3 : STRESS-INDUCED MEMORY
RETRIEVAL IMPAIRMENTS: DIFFERENT
TIME-COURSE INVOLVEMENT OF
CORTICOSTERONE AND GLUCOCORTICOID
RECEPTORS IN DORSAL AND VENTRAL
HIPPOCAMPUS**



Open

Stress-Induced Memory Retrieval Impairments: Different Time-Course Involvement of Corticosterone and Glucocorticoid Receptors in Dorsal and Ventral Hippocampus

R Dorey^{1,2,3}, C Piérard^{2,3}, F Chauveau², V David¹ and D Béracochéa^{*1}

¹CNRS, Universités de Bordeaux; Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA) UMR, Talence, France; ²Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) – Unité de Neuropsychopharmacologie Brétigny sur Orge Cedex, France

The present study was aimed at determining the relative contribution of the dorsal (DH) and ventral (VH) hippocampus in stress-induced memory retrieval impairments. Thus, we studied the temporal involvement of corticosterone and its receptors, i.e. mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) in the DH and VH, in relation with the time-course evolution of stress-induced memory retrieval impairments. In a first experiment, double microdialysis allowed showing on the same animal that an acute stress (electric footshocks) induced an earlier corticosterone rise in the DH (15–60 min post-stress) and then in the VH (90–105 min post-stress). The return to baseline was faster in the DH (105 min) than in the VH (120 min). Memory deficits assessed by delayed alternation occurred at 15-, 60-, and 105-min delays after stress and were closely related to the kinetic of corticosterone rises within the DH and VH. In a second experiment, the GR antagonist RU-38486 and the MR antagonist RU-28318 were administered in the DH or VH 15 min before stress. RU-38486 restored memory at 60 but not at 105 min post-stress delays in the DH, whereas the opposite pattern was observed in the VH. By contrast, RU-28318 had no effect on memory impairments at both the 60- and 105-min post-stress delays, showing that MR receptors are not involved at these delays. However, RU-28318 administered in the DH restored memory when administered at a shorter post-stress delay (15 min). Overall, our data are first to evidence that stress induces a functional switch from the DH to VH via different corticosterone time-course evolutions in these areas and the sequential GR receptors involvement in the DH and then in the VH, as regards the persistence of stress-induced memory retrieval deficits over time.

Neuropsychopharmacology advance online publication, 5 September 2012; doi:10.1038/npp.2012.170

Keywords: glucocorticoid MR and GR receptors; dorsal and ventral hippocampus; microdialysis; stress; memory-corticosterone

INTRODUCTION

The dorsal (DH) and ventral (VH) regions of the hippocampus (HPC) are anatomically and functionally distinct areas (Fanselow and Dong, 2010). More specifically, the DH is mainly connected through differential connections with the neocortex, whereas VH is mainly connected with the amygdala and hypothalamus (Moser and Moser, 1998; Naber and Witter, 1998; Segal *et al.*, 2010). On the other hand, the DH would be primarily involved in cognitive processes sustaining learning and spatial memory processes, whereas VH would be associated with motivational and emotional behaviors (Segal *et al.*, 2010).

Glucocorticoids (GCs) primarily act through glucocorticoid receptors (GR) and mineralocorticoid receptors (MR). Both types of receptors are highly co-localized in limbic

structures and particularly within the HPC (De Kloet *et al.*, 1986; Van Eekelen *et al.*, 1988). These two receptor types are, however, differentially distributed in the brain (Reul and de Kloet, 1985). Thus, MR are highly expressed in neurons of the hippocampal formation and the lateral septum and moderately expressed in subnuclei of the amygdala, the hypothalamic paraventricular nucleus, and the locus coeruleus (Joëls *et al.*, 2008). These regions define a circuit that is involved in the cognitive, emotional, and neuroendocrine processing of stressful events (McGaugh, 2004). GR are ubiquitously expressed in the brain, but mainly in the HPC, the lateral septum, and the paraventricular nucleus (Joëls and Baram, 2009). MR receptors have a high affinity for corticosteroids, so they are mostly occupied even when circulating corticosteroid levels are low, whereas GR have tenfold lower affinity and become more occupied as corticosteroid levels increase—for example, after stress (Joëls *et al.*, 2008).

From a functional point of view, steroids can rapidly modulate neuronal activity through a non-genomic pathway via an activation of membrane receptors (Borski, 2000; Falkenstein *et al.*, 2000; Makara and Haller, 2001; Dallman, 2005; Tasker *et al.*, 2006; Groc *et al.*, 2008; Conboy and

*Correspondence: Dr D Béracochéa, CNRS, Universités de Bordeaux; Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (INCIA), UMR CNRS, Univ Bordeaux I Bat Biologie Animale, Avenue des faculties, Talence, 5287-33400, France, Tel: +33 540002439, Fax: +33 5 40008743, E-mail: daniel.beracochea@u-bordeaux1.fr

³Both authors share the first place in the list of authors.

Received 3 April 2012; revised 25 July 2012; accepted 25 July 2012

Sandi, 2010) and synaptic excitatory transmission (Pfaff et al, 1971; Chaouloff and Groc, 2011). Steroids also increase the release of excitatory amino acids (Venero and Borrell, 1999). In addition to rapid membrane mechanisms, corticosteroid receptors could also translocate to the nucleus, where they act as regulators of gene transcription (Lu et al, 2006; Revest et al, 2010). Therefore, steroid effects on neuronal function usually require at least 1 h to develop and last hours to days. In the HPC, MR activation is a prerequisite for maintaining the ongoing information flow, whereas activation of GR—for example, after stress—causes a delayed suppression of neuronal excitability and synaptic plasticity (Joëls et al, 2007; Kim and Diamond, 2002), thus providing ‘negative-feedback regulation’ of behavioral aspects of the stress response (see Joëls and Baram, 2009).

From a cognitive point of view, it has been shown that GC receptors modulate spatial and non-spatial memory (De Quervain et al, 1998; Kim and Diamond, 2002; Roozendaal, 2003; Ferguson and Sapolsky, 2007). It has been proposed that GR receptors would sustain delayed effects on memory via transcriptional factors (McEwen and Sapolsky, 1995; De Kloet et al, 1999; Sapolsky et al, 2000; Lupien and Lepage, 2001; McGaugh and Roozendaal, 2002; Donley et al, 2005; Joëls et al, 2006; Joëls and Baram, 2009), whereas MR would be primarily involved in the rapid cognitive effects of stress. In particular, it has been shown that MR mediate the corticosterone-induced impairment of memory retrieval (Khaksari et al, 2007). However, the rapid effects of corticosterone on behavior and cognitive processes remain seldom documented (Orchinik et al, 1991; Sandi et al, 1996; Breuner et al, 1998; Sajadi et al, 2006).

We previously showed that acute stress induced a rapid (15 min) corticosterone rise in the DH associated to memory-retrieval deficits (Chauveau et al, 2010), which specifically implicated MR but not GR receptors via non-genomic membrane mechanisms (Dorey et al, 2011). However, as in our previous study, the memory deficit lasted at least 60 min after stress, and because one cannot exclude that stress could activate simultaneously both the VH and DH, we now intend to determine the relative involvement of the DH and VH and the GC receptor types in the rapid and delayed effects of stress on memory retrieval.

To these aims, experiment 1 was designed to measure simultaneously in both the DH and VH the stress-induced time-course evolution of corticosterone rise after acute stress. In a further step, experiment 2 was designed to determine the involvement of the GC receptors (MR and/or GR) on memory impairments associated with the stress-induced time-course evolution of corticosterone rise in the DH and/or VH.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

Experiment 1 was designed (i) to test the impact of an acute stress on the time-course evolution of corticosterone rises both in the DH and VH, measured in *the same mouse* by microdialysis and (ii) to evaluate the impact of stress on memory retrieval in independent groups of mice at different delays after stress delivery, according to data drawn from the microdialysis experiment.

Experiment 2 was designed to determine the type of GC receptors involved in the delayed (15, 60, and 105 min) stress-induced memory impairments. These delays were chosen according to the time-course evolution of corticosterone levels observed in the DH and VH after stress. The GR antagonist RU-38486 or the MR antagonist RU-28318 were injected into the DH or VH 15 min before stress delivery and memory was assessed at either 15-, 60-, or 105-min post-stress delay intervals.

Animals

The subjects were 6-month-old male mice of the C57BL/6 inbred strain obtained from Charles Rivers (France). At the time of the experiments, mice weighed between 28 and 32 g. They were housed individually with free access to water on a 12-h light-dark cycle in a temperature-controlled and ventilated room. Tests were conducted during the light phase of the cycle between 0800 and 1200 hrs. The number of animals in each group is given in the Results section.

Experiment 1

Surgery. Mice were anesthetized with a ketamine (1 mg/kg body weight)-xylazine (10 mg/kg body weight) solution and placed on a stereotaxic frame. Two microdialysis guide-cannulae (for CMA/7 microdialysis probes, CMA Microdialysis, Sweden) were implanted at the following coordinates from the bregma (Paxinos and Franklin, 2001): for the DH: AP = -2000 μ m, L = \pm 1300 μ m, and V = -1000 μ m; for the VH: AP = -3000 μ m, L = \pm 2900 μ m, and V = -3000 μ m). The laterality of implantation in the DH and VH was randomized as half of the animals were implanted in the right side for the DH and left side for the VH, whereas the other half were implanted in the opposite way.

Guide-cannulae were fixed with dental cement and three micro screws attached to the skull. All operated mice were allowed to recover in the animals room.

Microdialysis. Microdialysis was performed in freely moving animals to measure corticosterone levels in the DH and VH after acute stress. Indeed, *in vivo* microdialysis is an extremely powerful method to study the highly dynamic neurotransmitter responses in the field of stress physiology and behavior (Linthorst and Reul, 2008; Dorey et al, 2011).

On the day before the experiment, microdialysis probes (CMA/7, membrane length 1 mm; CMA Microdialysis, Sweden) were inserted through the guide-cannulae so that their membranes were lowered 1 mm below guide-cannulae into the DH or VH. Probes were continuously perfused with sterile, filtered Dulbecco's solution (mock CSF) at a rate of 0.1 μ l/min. Equilibration of extracellular concentrations lasted 12 h, i.e., in the night before the test day. After the equilibration phase, baseline dialysates (15-min samples) were collected in the morning with a flow rate of 1 μ l/min during 2 h. Then, the acute stress was applied using a footshocks delivery system located in the dialysis cage. The acute stress was constituted by three successive unavoidable electric footshocks (0.9 mA; 10 ms) in keeping with our previous studies (Chauveau et al, 2010; Dorey et al, 2011). The dialysates were collected during 3 additional hours after

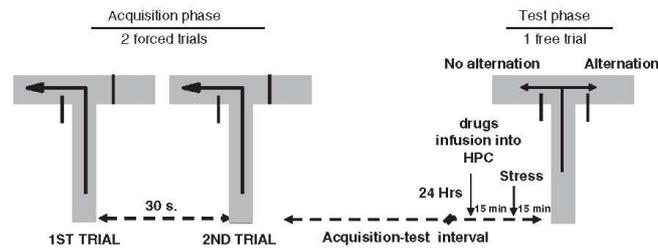


Figure 1 Memory testing procedure: during a session, animals were first submitted to an acquisition phase in which they were forced to enter twice the same arm of the maze (two forced trials). Then, after a 24-h delay interval, they were submitted to the test phase in which they can freely enter either in the right or in the left arm of the maze. An alternation was scored when the mouse entered the arm opposite to the one visited in the acquisition phase. Treatments (stress and antagonists injections in the DH and VH) were delivered before the test phase, according to the experimental schedule described in the Materials and Methods section.

stress (flow rate: 1 $\mu\text{l}/\text{min}$; sampling delay: 15 min). Samples were stored at -80°C before analysis. Free corticosterone levels measured in the dialysates were expressed as the percentage of the averaged baseline values.

At the end of the microdialysis experiment, mice were anesthetized and then transcardially perfused in the left ventricle with saline solution (NaCl 0.9%) followed by formaldehyde (4%). Brains were then post-fixed in a 4% formaldehyde solution for 10 days, and then in a saccharose-formaldehyde solution (30–40% v/v) for 2 days. All the brains were coronally sectioned (50 μm thickness). A cresyl violet stain was used to check the exactness of the microdialysis probes implantation.

Intra-hippocampal corticosterone assay. An Enzyme Immunoassay commercial kit (Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor, USA) was used to measure HPC corticosterone concentrations in the microdialysates. The sensitivity of the assay was 18.6 pg/ml. Therefore, baseline sample concentration was more than 10-fold above the sensitivity threshold.

Plasma corticosterone assay. Independent groups of mice were used (29 mice as a whole). Mice were placed in the footshocks delivery system located in the microdialysis cage, for at least 1 h before being administered with the electric footshocks used in the microdialysis experiment. After stress, they remained in the microdialysis cage and were decapitated to collect trunk blood after either 15 min ($N=4$), 30 min ($N=4$), 60 min ($N=4$), 90 min ($N=4$), 105 min ($N=4$), or 120 min ($N=4$) post-stress delays. Control animals were submitted to the same experimental conditions but did not receive footshocks ($N=5$). They were killed 1 h after being placed in the shock delivery system included in the microdialysis cage. Thus, these animals constitute a 'time 0' control group. After centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min, the supernatant was stored at -80°C until ELISA assay (Correlate-EIA, Assay Designs, Ann Arbor, USA).

Acute stress delivery. The same acute stress (0.9 mA; 10 ms) was applied for behavioral experiments. Stress was delivered in a room different from the one used for behavioral testing. Mice remained for 1 min in a stress delivery cage.

Non-stressed mice were placed in the cage in the same conditions except that they did not receive footshocks.

Behavioral task: delayed alternation procedure. The procedure and methods have been extensively described in a previous study (see Dorey et al, 2011 for detailed information). Memory was evaluated by delayed alternation rate in a T-maze used as an index of memory performance (Figure 1). Testing was conducted between 0800 and 1200 hrs, in order to minimize the circadian variations of corticosterone.

In the acquisition phase, the subjects were forced to enter twice the same arm of the maze. The two forced trials were separated by a 30-s interval. The acquisition phase was followed by a test phase implemented 24 h later. During the test trial, animals remained 30 s in the start box. The door was then opened, and animals were free to enter into one of the arms of the maze. The correct choice is to enter the arm opposite to that entered the day before. In all the experiments, animals were automatically confined for 30 s in the chosen arm by the closing of a slide door. Thus, this confinement period was imposed on the animals. The closing of the slide door was automatically triggered by the crossing of photoelectric cells placed at the middle of the arm, requiring that the subject completely entered the chosen arm. Thus, the closing of the door determines the criterion to score the choice of the mouse. The mouse remained 30 s into the chosen arm before being replaced for 30 s in the start-box for a subsequent free choice trial. This short-term trial was aimed at determining whether the intrinsic psychomotor ability and motivation of mice to alternate were spared by the treatments, so that any deficits observed at the previous 24 h test trial cannot be ascribed to either psychomotor or motivational impairments.

Mice were submitted to two forced trials sessions in the same experimental conditions. The blocked arm of the second session was opposite to the one blocked in the first session. Each session was separated by a 1-week period. Thus, each mouse served as its own control to avoid place preference bias in the alternation performance during the test sessions.

The test sessions took place 15, 60, or 105 min after the acute stress administration.

Experiment 2

Surgery. Mice were anesthetized with a ketamine (1 mg/kg body weight)-xylazine (10 mg/kg body weight) solution. Stereotaxic coordinates are referenced in μm from the bregma (Paxinos and Franklin, 2001). For pharmacological administration in the DH, two stainless-steel guide cannulae (26 gauge, 8 mm length) were implanted bilaterally 1 mm above the surface of the DH (AP = $-2000 \mu\text{m}$; L = $\pm 1300 \mu\text{m}$; and V = $-1000 \mu\text{m}$). For administration in the VH, two stainless-steel guide-cannulae (26 gauge, 8 mm length) were implanted bilaterally at the following coordinates (AP = $-3000 \mu\text{m}$; L = $\pm 2900 \mu\text{m}$; and V = $-3000 \mu\text{m}$). Guide-cannulae were fixed in place with dental cement and three micro screws attached to the skull. All operated mice were allowed to recover in the animal room for at least 7 days before behavioral experiments.

Antagonists were injected through two 32-gauge stainless-steel cannulae (9 mm length) attached to a microsyringe with polyethylene catheter tubing. The cannulae were inserted into the guide-cannulae. The syringes were placed in a constant flow rate pump (0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$). Corticosterone receptors antagonists (RU-38486 and RU-28318; Tocris, USA) at the concentration of 20 mg/ml or vehicle (mock CSF added with a small amount of absolute ethanol) were bilaterally injected 15 min before stress delivery in either the DH or VH. The antagonists were injected in a volume of 0.40 μl per side (0.05 $\mu\text{l}/\text{min}$ during 8 min). The choice of these doses was already validated according to the behavioral data described in a previous paper (Dorey et al, 2011). Moreover, we already showed that these MR and GR antagonists at the very same doses have no effects on memory in the same task in non-stressed mice (Dorey et al, 2011).

Experimental animals (i.e. animals receiving the MR or GR antagonists injections) were compared with animals which were implanted with cannulae and received the vehicle solution only, either in stress or non-stress conditions (stressed + vehicle or non-stressed + vehicle groups, respectively).

Behavioral schedule. The behavioral procedure was similar to that of Experiment 1. Behavioral testing occurred 15 min after stress. Independent groups of mice were tested for three post-stress delays according to the results obtained in Experiment 1 i.e. 15, 60, and 105 min. Mice were submitted to two forced trials sessions with the same antagonist dose and experimental conditions. The blocked arm of the second session was opposite to the one blocked during the first session. Each session was separated by a wash-out period of 1 week. Thus, each mouse served as its own control to avoid place preference biases. After behavioral testing, mice were killed, and their brains were removed and coronally sectioned (50 μm thickness). A cresyl violet stain was used to verify the exact probe location in the DH and VH.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statview 5.0 software. In the behavioral experiments, data drawn from the two test sessions were averaged and expressed as means \pm SEM. The data were analyzed using one-way or

two-ways factorial analyses of variance (ANOVA) followed, when adequate, by post-hoc comparisons (Bonferroni/Dunnnett test). Comparisons of retrieval performances with chance level were calculated with one sample Student's *t*-test (with hypothesized mean = chance level of 50%). Microdialysis data were analyzed using one- or two-ways repeated-measure ANOVA as appropriate, followed when adequate by post-hoc testing (Bonferroni/Dunnnett test).

One animal out of 10 in Experiment 1 and 5 animals out of 70 in Experiment 2 were excluded *a posteriori* from statistical analyses because of inaccurate implantation of cannulae for microdialysis or pharmacological injections.

RESULTS

1st Experiment: Effects of Acute Stress on Hippocampal and Plasma Corticosterone Concentrations and Delayed Alternation rates.

Stress-induced intra-HPC corticosterone rise. The absolute concentrations of corticosterone in baseline condition are not significantly different between the DH and VH (251.4 \pm 14.1 ng/l vs 275.0 \pm 14.5 ng/l respectively; $F(1,18) = 1.35$; $p = 0.26$, NS). Figure 2a represents corticosterone levels in the HPC areas, DH ($n = 10$) and VH ($n = 10$), in which results are expressed in relative concentrations (i.e. as percentage of variation of baseline). Two-way repeated-measures ANOVA performed on corticosterone kinetic evidenced a significant interaction between the HPC areas and time ($F(14,252) = 2.93$; $p \leq 0.0004$). Thus, the time-course evolutions of corticosterone in the DH and VH are overall significantly different.

Intergroup comparisons showed that corticosterone levels in the DH and VH significantly differed for 60 min (197.4 \pm 24.7 vs 110.9 \pm 7.5, respectively; $p < 0.05$) and 105 min (103.0 \pm 10.5 vs 165.0 \pm 19.2%, respectively; $p < 0.05$). Thus, our data show that rise in corticosterone in the DH appears to be earlier than in the VH.

Dorsal Hippocampus

As compared with the last pre-stress sample (97.1 \pm 6.7%; 'time = 0'), stress induced a progressive and significant increase in corticosterone levels from 15 min (137.6 \pm 20.2%; $t = 2.30$; $p \leq 0.05$) to 90 min (139.1 \pm 24.1%; $t = 2.32$; $p \leq 0.05$). Furthermore, the highest difference was observed 60 min after stress administration (197.4 \pm 24.7; $t = 3.57$; $p \leq 0.01$).

Ventral Hippocampus

As compared with the last pre-stress sample (97.3 \pm 4.9%; 'time = 0'), stress induced a significant increase in corticosterone levels for 90 min (129.4 \pm 19.6%; $t = 2.49$; $p \leq 0.05$) and 105 min (165.0 \pm 19.2%; $t = 3.82$; $p \leq 0.01$). Furthermore, the highest difference was observed 105 min after stress administration.

Stress-induced plasma corticosterone rise. ANOVA showed a significant global between-groups difference ($F(6,22) = 8.83$; $p < 0.001$; see Figure 2b). More specifically, stress induced a significant increase of plasma corticosterone

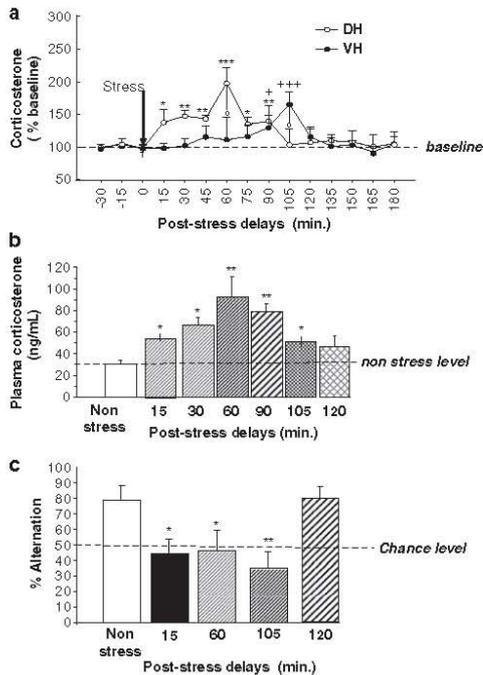


Figure 2 (a) Time course evolutions of stress induced corticosterone in the dorsal (DH) and ventral (VH) hippocampus measured by microdialysis in the same animal. In the DH, the corticosterone rise is significant at the 15 min post stress delay. The maximum corticosterone concentration occurred at 60 min post stress delay with a return to baseline level 105 min after stress delivery. In VH, a significant corticosterone rise is observed at the 90 min post stress delay, and the maximum corticosterone concentration is measured 105 min after stress delivery with a return to baseline at 120 min. Results are expressed in relative concentrations. Comparisons with baseline: for the DH: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; for the VH: + $p < 0.05$; ++ $p < 0.001$; between group comparisons: o $p < 0.05$; (b) Plasma corticosterone concentrations (ng/ml) at different post stress delays were measured in independent groups of mice. Plasma corticosterone concentrations are significantly increased from 15 to 105 min after stress with a maximum corticosterone concentration at the 60 min post stress delay. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ as compared with the non stressed animals. (c) Effect of stress on delayed alternation performance at several post stress delays. Stress significantly decreases alternation rates from 15 to 105 min after delivery, whereas no deficit was observed at the 120 min post stress delay. Comparison with non stressed group: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

level at the post-stress delays of 15 min (53.8 ± 2.4 ng/ml; $p < 0.05$), 30 min (66.6 ± 7.0 ng/ml; $p < 0.05$), 60 min (92.2 ± 19.7 ng/ml; $p < 0.01$), 90 min (78.5 ± 7.6 ng/ml; $p < 0.01$), and at 105 min (50.3 ± 0.65 ng/ml; $p < 0.05$) as compared with non-stressed animals (30.3 ± 3.6 ng/ml). By contrast, the increase in corticosterone at the 120 min (46.2 ± 7.6 ng/ml; NS) post-stress delay was not significantly different from non-stressed mice.

Effects of acute stress delivered 15, 60, 105, and 120 min before memory testing on alternation performance. Data are represented in Figure 2c. The data revealed a significant

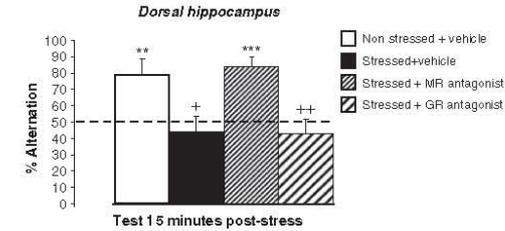


Figure 3 Effect of GR antagonist (RU 38486 or mifepristone) and MR antagonist (RU 28318 or oxprenolol) injections into the DH on delayed alternation performance in stressed mice tested 15 min after stress delivery. The doses of antagonists were selected according to a previous study (Dorey et al, 2011). The antagonists were bilaterally injected 15 min before stress and 30 min before the test session. Control groups received the vehicle solution. As can be observed, the MR but not GR antagonist reversed the stress induced decrease of alternation rates. Comparisons with non stressed vehicles; + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; Comparisons with chance level (50%): ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

between-group difference ($F(4,90) = 6.2$; $p = 0.017$). More precisely, non-stressed mice ($n = 19$) exhibited alternation rates ($79.1 \pm 9.8\%$) significantly above those observed in stressed ones tested 15 min after stress ($n = 20$; $44.4 \pm 8.9\%$; $p < 0.05$), 60 min after stress ($n = 18$; 46.2 ± 13.3 ; $p < 0.05$), and 105 min after stress ($n = 20$; $35.1 \pm 10.7\%$; $p < 0.01$). By contrast, stressed mice tested 120 min after stress exhibit performance similar to those of non-stressed ones ($n = 18$; $79.1 \pm 7.6\%$; NS). Only the non-stressed and stressed 120 min groups differed significantly from chance level (50%; $p < 0.01$ in each comparison).

All the groups exhibited similar short-term alternation rates evaluated 30 s after the delayed test session ($92.0 \pm 5.5\%$, 85.6 ± 6.4 , 90.7 ± 6.8 , 92.1 ± 4.9 , and 87.4 ± 5.8 for the non-stressed and stressed groups at 15, 60, 105, and 120 min, respectively; $F < 1.0$).

Second Experiment: Effects of Intra-DH or VH Antagonists Injections on Delayed Alternation Rates

Effects of MR and GR antagonists injections in DH at 15 min post-stress delay. Data are presented in Figure 3. The data revealed a significant between-group difference ($F(3,68) = 6.3$; $p < 0.01$). More precisely, the non-stressed + vehicle group exhibited significant higher alternation rates ($n = 19$; $78.8 \pm 10.0\%$) as compared with the performance of the stressed + vehicle group ($n = 18$; $44.7 \pm 8.8\%$; $p < 0.05$) and as compared with that of the stressed animals receiving the GR antagonist ($n = 19$; $43.5 \pm 8.8\%$; $p < 0.01$). By contrast, they did not differ from the stressed animals receiving the MR antagonist ($n = 16$; $84.1 \pm 5.9\%$; NS). Only the non-stressed + vehicle and stressed + MR antagonist groups differed significantly from chance level (50%; $p < 0.01$ and 0.001 , respectively).

All groups exhibited similar short-term alternation rates evaluated 30 s after the 24 h delayed test session ($82.0 \pm 5.3\%$, $79.0 \pm 4.7\%$, 85.2 ± 7.1 , and $84.3 \pm 6.8\%$, respectively, for the non-stressed + vehicle, stressed + vehicle, stressed + MR antagonist, and stressed + GR antagonist groups, respectively; NS in all comparisons).

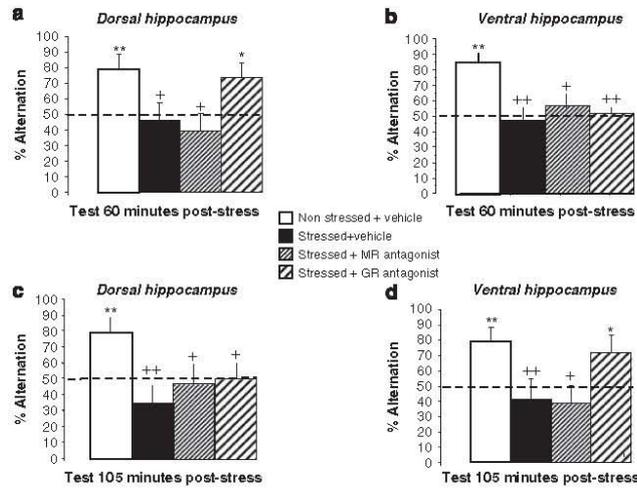


Figure 4 Effects of GR antagonist (RU 38486 or mifepristone) and MR antagonist (RU 28318 or oxprenone) injections into the DH or VH on delayed alternation rates at 60 and 105 min post stress delays. In all experiments described in Figure 4a-d, both MR and GR antagonists were bilaterally injected at the dose of 20 mg/ml 15 min before stress and 30 min before behavioral testing. (a) Injections into the DH, test at 60 min post stress: control groups' animals received the vehicle solution. The administration of GR but not of MR antagonist reversed the stress induced alternation deficit as compared to vehicle. (b) Injections into the VH, test at 60 min post stress: the same injections and doses of MR and GR antagonists did not reverse the stress induced memory impairments as compared with vehicle. (c) Injections into the DH, test at 105 min post stress: both MR and GR antagonists did not reverse the stress induced memory impairments as compared with vehicle; (d) injections into the VH, test at 105 min post stress. The administration of GR but not of MR antagonist reversed the stress induced alternation deficit as compared with vehicle. (a-d) Comparisons with non stressed vehicle: + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; comparisons with chance level (50%): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Effects of MR and GR Antagonists Injections in the DH and VH at 60 min Post-stress Delay

Dorsal hippocampus. Data are presented in Figure 4a. The data revealed a significant between-group difference ($F(3,72) = 7.1$; $p < 0.01$). More precisely, the non-stressed + vehicle group exhibited significant higher alternation rates ($n = 18$; $77.9 \pm 9.6\%$) as compared with the performance of stressed + vehicle group ($n = 18$; $45.9 \pm 11.0\%$; $p < 0.05$) and as compared with the stressed animals receiving the MR antagonist ($n = 20$; $39.2 \pm 11.0\%$; $p < 0.05$). By contrast, they did not differ from the stressed animals receiving the GR antagonist ($n = 20$; $73.2 \pm 9.6\%$; NS). Only the non-stressed + vehicle and stressed + GR antagonist groups differed significantly as compared with chance level (50%; $p < 0.01$ and 0.05 , respectively).

All groups exhibited similar short-term alternation rates evaluated 30 s after the 24 h delayed test session ($82.5 \pm 6.3\%$, $81.0 \pm 8.5\%$, $77.5 \pm 10.8\%$, and $86.7 \pm 7.3\%$, respectively, for the non-stressed + vehicle, stressed + vehicle, stressed + MR antagonist, and stressed + GR antagonist groups, respectively; NS in all comparisons).

Ventral hippocampus. Data are presented in Figure 4b. The data show that the injection of either the MR or GR antagonist was unable to restore memory performance in stressed animals.

The data revealed a significant between-group difference ($F(3,66) = 5.7$; $p < 0.001$). More precisely, the non-stressed + vehicle group exhibited significant higher alternation rates ($n = 17$; $85.3 \pm 5.6\%$) as compared with the performance of

the stressed + vehicle group ($n = 15$; $46.6 \pm 9.0\%$; $p < 0.01$) and as compared with the stressed animals receiving the MR antagonist ($n = 17$; $55.8 \pm 8.4\%$; $p < 0.05$) or the GR antagonist ($n = 21$; $52.3 \pm 5.4\%$; $p < 0.01$). Only the non-stressed + vehicle group differed significantly as compared with chance level (50%; $p < 0.01$).

All groups exhibited similar short-term alternation rates evaluated 30 s after the 24 h delayed test session ($90.8 \pm 4.3\%$, $87.6 \pm 8.1\%$, $83.2 \pm 6.9\%$, and $89.7 \pm 5.9\%$, respectively, for the non-stressed + vehicle, stressed + vehicle, stressed + MR antagonist, and stressed + GR antagonist groups, respectively; NS in all comparisons).

Effects of MR and GR Antagonists Injections in the DH and VH at 105 min Post-stress Delay

Dorsal Hippocampus. Data are presented in Figure 4c. The data revealed a significant between-group difference ($F(3,72) = 6.2$; $p < 0.05$). More precisely, the non-stressed + vehicle group exhibited significant higher alternation rates ($n = 20$; $79.0 \pm 10.2\%$) as compared with the performance of the stressed + vehicle group ($n = 19$; $35.0 \pm 10.8\%$; $p < 0.01$) and as compared with the stressed animals receiving the MR antagonist ($n = 18$; $46.5 \pm 12.7\%$; $p < 0.05$) and also as compared with the stressed animals receiving the GR antagonist ($n = 18$; $49.7 \pm 10.3\%$; $p < 0.05$). Only the non-stressed + vehicle group differed significantly as compared with chance level (50%; $p < 0.01$).

All groups exhibited similar short-term alternation rates evaluated 30 s after the 24 h delayed test session ($91.5 \pm 6.2\%$, $79.6 \pm 5.6\%$, $76.6 \pm 9.7\%$, and $87.3 \pm 6.1\%$,

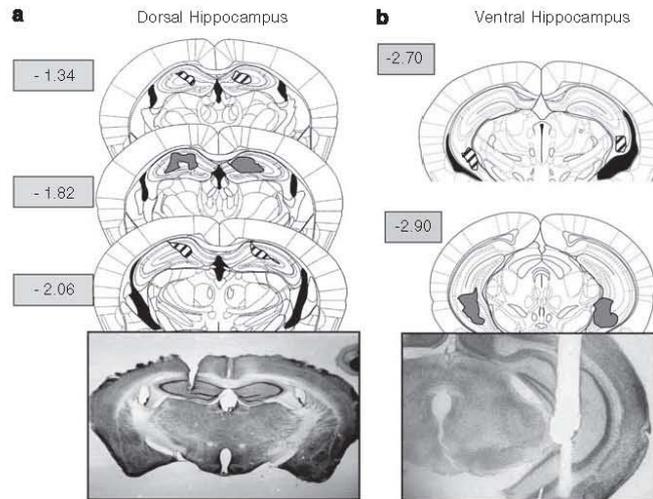


Figure 5 Representative localization of the microdialysis probes into the dorsal and ventral hippocampus in mice of Experiment 1. (a and b) Reconstruction of the antero posterior extent of probe locations (gray area: main sites; hashed areas: antero posterior extent from the main site). Stereotaxic rostro caudal coordinates are expressed in mm from bregma. Photomicrographs illustrate the location of the microdialysis probes in the dorsal and ventral hippocampus.

respectively, for the non-stressed + vehicle, stressed + vehicle, stressed + MR antagonist, and stressed + GR antagonist groups, respectively; NS in all comparisons).

Ventral Hippocampus. Data are presented in Figure 4d. The data revealed a significant between-group difference ($F(3,72) = 9.2; p < 0.01$). More precisely, the non-stressed + vehicle group exhibited significant higher alternation rates ($n = 19; 77.1 \pm 8.3\%$) as compared with the performance of the stressed + vehicle group ($n = 20; 40.8 \pm 6.8\%; p < 0.01$) and as compared with the stressed animals receiving the MR antagonist ($n = 18; 39.1 \pm 11.8\%; p < 0.05$) but not as compared with the stressed animals receiving the GR antagonist ($n = 18; 72.3 \pm 10.9\%; NS$). Only the non-stressed + vehicle group and the stressed + GR antagonist group differed significantly as compared with chance level (50%; $p < 0.01$ and $p < 0.05$).

All the four groups exhibited similar short-term alternation rates evaluated 30 s after the 24 h delayed test session ($F(3,73) < 1.0; NS$).

Histological Analyses

Figures 5 and 6 show the anterograde extent and the localization of the cannulae tips in the DH and VH of mice submitted either to the microdialysis (Figure 5) or to the pharmacological (Figure 6) experiments. Gray zones: main implantation sites; black hashed areas: antero-retrograde extent of the cannulae tips implantation.

DISCUSSION

The main findings of the study are summarized in Figure 7.

In the first experiment, we evidenced that an acute stress (electric footshocks) induced in the DH then in the VH a corticosterone rise measured by microdialysis. Indeed, we showed that the maximum corticosterone concentration in VH occurred 45 min later (105 min post-stress) as compared with the DH (60 min post-stress). On the other hand, we also observed a concomitant memory retrieval impairment in a non-rewarded delayed alternation task. Indeed, we found that stress-induced memory deficits occurred between 15 and 105 min, but were no longer observed at the 120-min post-stress delay. Thus, one of the main results of the study is that, at least up to the 60-min post-stress delay interval, the memory deficit does not depend on corticosterone rise into the VH. In the second experiment, we showed that the stress-induced memory deficit observed 15 min after stress was antagonized by injections of MR but not of GR antagonists (RU-28318 and RU-38486, respectively) in the DH. By contrast, with a 60-min post-stress delay, the GR but not the MR antagonist alleviated the memory impairment. However, both antagonists injected into the DH failed to restore memory performance at the 105-min post-stress delay. In addition, injections of the GR but not the MR antagonist into the VH blocked the stress-induced memory impairment observed at the 105-min post-stress delay.

From these data, two main questions arise: (i) what is the relative contribution of the time-dependent regional involvement of the DH and VH in the stress-induced memory deficits? (ii) What are the mechanisms underlying the sequential involvement of MR and GR within the HPC?

As regards the first issue, behavioral results obtained in the first experiment show that the time-course evolution of the memory impairments is concomitant with the stress-induced corticosterone rise within the DH and VH. Indeed,

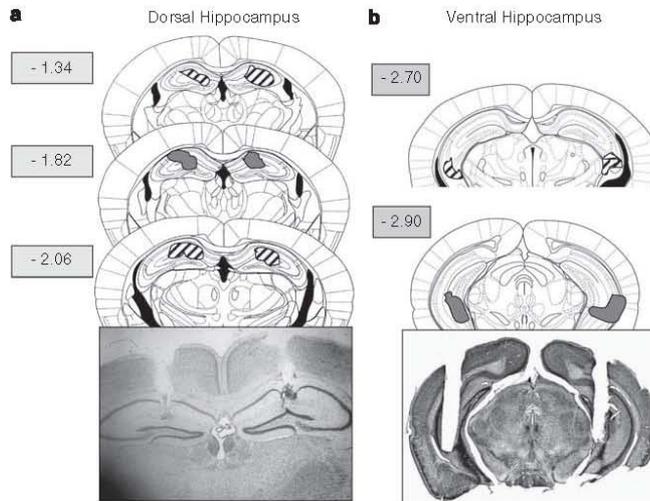


Figure 6 Representative localization of the cannulae into the dorsal and ventral hippocampus in mice of Experiment 2. (a and b) Reconstruction of the antero posterior extent of the sites (gray area: main sites; hashed areas: antero posterior extent from the main sites). Stereotaxic rostro caudal coordinates are expressed in mm from bregma. Photomicrographs illustrate the location of the cannulae in the dorsal and ventral hippocampus.

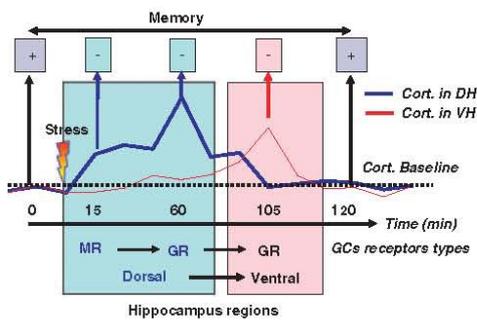


Figure 7 Synoptic representation of the main findings of the study. This figure points out a triple dissociation as regards the time course involvement of the hippocampus regions, corticosterone rises and glucocorticoid receptor types in relation with memory retrieval impairments after acute stress.

the findings drawn from microdialysis are congruent with our previous studies showing that memory retrieval impairments are associated to the DH corticosterone rise 15 but not 120 min after acute stress delivery (Chauveau *et al*, 2010; Tronche *et al*, 2010; Dorey *et al*, 2011). Surprisingly, however, data of the present study show that the stress-induced memory deficit observed from 15 to 60 min post-stress delays does not depend on the VH as corticosterone concentrations in the VH are not different from baseline for this time-window. By contrast, the memory deficit observed at the 105-min post-stress delay seems to depend on the maximum corticosterone level observed in the VH, insofar as corticosterone concentrations in the DH are not different from baseline at this delay. Thus, the different time-course

evolutions of corticosterone in the DH and VH could reflect a sequential involvement of both the HPC regions in the observed time-dependent stress-induced memory deficits. Such a view is also strengthened by the observations that GR antagonist administered in the DH is efficient at the 60-min post-stress delay, whereas inefficient when administered in the VH at the same delay. On the contrary, the GR antagonist administered in the VH is efficient at the 105-min post-stress delay, whereas being without effect when administered in the DH at the same delay.

Finally, from a functional point of view, our present data point out a temporal and spatial dissociation on stress-induced corticosterone rise and retrieval memory impairments.

It remains, however, to understand the mechanisms sustaining the emergence of the different time-course evolutions of corticosterone in the DH and VH after stress. Previous data from our team already evidenced the peripheral origin of corticosterone in the DH after stress. Indeed, we showed that systemic administration of metyrapone (an inhibitor of corticosterone synthesis) blocked the stress-induced rise of corticosterone in the DH (Chauveau *et al*, 2010) and that mice deprived of corticosterone-binding globuline (CBG^{-/-} KO mice) did not show any stress-induced corticosterone rise in the DH (Minni *et al*, 2012). In the present study, plasma and HPC corticosterone were measured in independent groups to avoid blood sampling stress, which could induce biases on HPC corticosterone quantification. We found that the maximum plasma corticosterone value occurring at 60 min after stress is in phase with the one observed in the DH, but not with the one observed in the VH (105 min post-stress). Given that, we could formulate the hypothesis of a diffusion of corticosterone from the DH to VH via a mechanism

remaining to be determined. For this purpose, we intend to lesion or inactivate the DH to investigate its role in the delayed corticosterone rise within the VH after stress.

From a functional point of view, it has been proposed that an acute stress would induce a disconnection between the DH and VH and so far could spare or even increase the functional activity of the VH and its main brain targets involved in emotional processes (amygdala and hypothalamus) (Segal *et al.*, 2010). Our data are in agreement with this hypothesis, as the maximum corticosterone concentrations emerged at different post-stress delays in the DH and VH. This suggests a different time-dependent involvement of both the HPC regions in the stress-induced memory deficits. According to our data, however, memory functions sustained by the DH are first affected by the acute stress. Indeed, in the present study, delayed alternation deficits are related to the earlier stress-induced corticosterone rise within the DH, then in the VH. This result is in agreement with previous studies from our group showing that an acute stress delivered 15 min before testing produced memory retrieval impairments in a serial discrimination task. Indeed, we found that the deficit was observed specifically for the information sustained by the DH, whereas the information sustained by the BLA-frontal cortex pathway (heavily connected with the VH) was unaffected (Chauveau *et al.*, 2008, 2009, 2010). Furthermore, the presently observed late involvement of the VH following acute stress is in agreement with relevant studies indicating that the DH would be much more involved in processing cognitive information, whereas the VH has a key role in late consolidation of emotional memory and/or anterograde memory processes (Segal *et al.*, 2010; Fanselow and Dong, 2010).

Even though speculative, we suggest that the late corticosterone rise into the VH could have a major role on anterograde memory processes and more particularly in the consolidation of emotional and/or traumatic memory. Indeed, according to our data, one can hypothesize that the delayed VH activation via GR receptors could be of importance for the establishment of long-term memory or even that excessive VH activation contributes to the development of PTSD. Thus, GR antagonists could be a relevant pharmacological perspective to avoid consolidation or reconsolidation of traumatic events (see Bonne *et al.*, 2004). So far, in further studies using animal models of PTSD, we intend to test such drugs in the VH-dependent emotional memory tasks, i.e. fear conditioning (McEown and Treit, 2009).

As regards the second issue, i.e. the mechanisms underlying the sequential involvement of MR and GR within the HPC, we show that the rapid (15 min) deleterious effects of stress on memory involved first the MR but not GR receptors in the DH. This result confirms our previous finding (Dorey *et al.*, 2011). In addition, lengthening the post-stress delay from 15 to 60 min involves GR but no longer MR in so far as only the GR antagonist is efficient to suppress memory impairments. The lack of memory effects of the MR antagonist at the 60- and 105-min delays cannot be explained by the fact that the MR antagonist is no longer bound to their receptors. Indeed, Kim *et al.* (1998) already reported that the *in vivo* MR receptor occupancy by RU 28318 was still observed in the rat HPC up to 2 h after systemic injection.

The sequential activation of MR then of GR is in agreement with the view that the rapid stress response involves first MR (Dorey *et al.*, 2011) and excitatory neurotransmitter receptors trafficking through GC action (Groc *et al.*, 2008; Chaouloff and Groc 2011,) which contribute to the rapid effect of GCs on memory. GC–glutamatergic interactions have been proposed to explain many of the diverse actions of GCs on cognition (Conboy and Sandi, 2010; Sandi, 2011). Furthermore, it has been suggested that NMDA receptors would be at the interface between cognition and emotion in both the hippocampal zones (Barkus *et al.*, 2010).

For longer delays, GCs act via a classic genomic action sustained by GR (Joëls, 2008). Moreover, given the high and low affinity of MR and GR for GCs, respectively, the sequential activation of these receptors could depend on the hormone concentration at the time of memory testing after stress. However, electrophysiological data, indicating that stress can also activate simultaneously GR and MR in different parts of the HPC, have challenged the widely accepted model, which suggests a time- and dose-dependent effect of steroid hormones on cellular functions in the HPC. Indeed, as shown by relevant studies on the interaction between LTP and LTD regulation, corticosteroid modulation of synaptic plasticity in the HPC is a complex process involving differential activation of MR and GR within the DH and VH (see in Segal *et al.*, 2010; Maggio and Segal, 2012). Nevertheless, our present data agreed overall with the view developed by Maggio and Segal (2012), suggesting that steroid hormones act as molecular switches: by changing the strength of synaptic connectivity in the HPC following stress, they regulate the routes by which the HPC is functionally linked to the rest of the brain. Indeed, our present data show that along with synaptic and molecular mechanisms induced by stress, the different time-course evolutions of corticosterone rises after stress in the DH and VH contribute to the functional switch from the DH to the VH. Indeed, MR are first involved at the 15-min post-stress delay when corticosterone concentration is low in the DH, whereas GR are activated when corticosterone concentration is higher i.e. at 60 min post-stress delay first in the DH and then at 105 min post-stress delay in the VH.

In conclusion, our study using a dynamic approach of the time-course evolution of corticosterone levels evidenced that stress impairs HPC -dependent memory retrieval via a mechanism dependent on post-stress delays (from 15 to 105 min), areas (DH *vs* VH), and of GC receptor types (MR *vs* GR). Such a triple dissociation emphasizes the complexity of the stress–memory interaction, particularly as regards the relationships between the DH and VH.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the CNRS and by a grant (Opération n° 03co015-05 - PEA 010801) from DGA/DET/SCET/CEP/SHP, Paris, France. We also thank Nadia Henkous for her help in corticosterone dosages and Laurence Decorte for her help in histological analyses. This work has benefited from the facilities and expertise of the imagery platform Imag'In (www.incia.u-bordeaux1.fr) which is supported by CNRS and Région Aquitaine. We also

like to thank Dr. Frances Ash for language proofreading (contact: ashberac@free.fr).

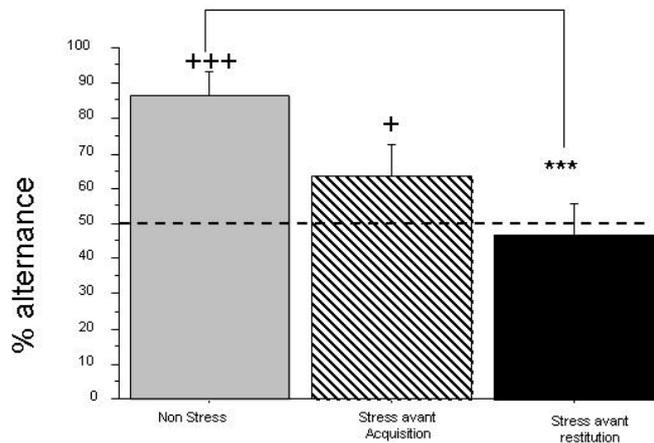
DISCLOSURE

We wish to extend the following statements: except for income received from primary employers, no financial support nor any compensation has been received from either any individual or corporate entity over the past 3 years for either research or professional service in relation with this study. Further, no single personal financial holding may exist nor be perceived as constituting a potential conflict of interest.

REFERENCES

- Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM (2010). Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between emotion and cognition. *Eur J Pharmacol* **626**: 49–56.
- Bonne O, Grillon C, Vythilingam M, Neumeister A, Charney DS (2004). Adaptive and maladaptive psychobiological responses to severe psychological stress: implications for the discovery of novel pharmacotherapy. *Neurosci Biobehav Rev* **28**: 65–94.
- Borski RJ (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab* **11**: 427–436.
- Breuner CW, Greenberg AL, Wingfield JC (1998). Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Gen Comp Endocrinol* **111**: 386–394.
- Chaouloff F, Groc L (2011). Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress. *Front Neuroendocrinol* **1**: 25–42.
- Chauveau F, Piérard C, Coutan M, Drouet I, Liscia P, Béracochéa D (2008). Prefrontal cortex or basolateral amygdala lesions blocked the stress-induced inversion of serial memory retrieval pattern in mice. *Neurobiol Learn Mem* **2**: 395–403.
- Chauveau F, Piérard C, Tronche C, Coutan M, Drouet I, Liscia P et al (2009). The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions. *Neurobiol Learn Mem* **91**: 447–455.
- Chauveau F, Tronche C, Piérard C, Liscia P, Drouet I, Coutan M et al (2010). Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* **1**: 196–207.
- Conboy L, Sandi C (2010). Stress at learning facilitates memory formation by regulating AMPA receptor trafficking through a glucocorticoid action. *Neuropsychopharmacology* **35**: 674–685.
- Dallman MF (2005). Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future. *Front Neuroendocrinol* **26**: 103–108.
- De Kloet ER, Reul JM, de Ronde FS, Bloemers M, Ratka A (1986). Function and plasticity of brain corticosteroid receptor systems: action of neuropeptides. *J Steroid Biochem* **5B**: 723–731.
- De Kloet ER, Oitzl MS, Joels M (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* **22**: 422–426.
- De Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* **394**: 787–790.
- Donley MP, Schalkin J, Rosen JB (2005). Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav Brain Res* **164**: 197–205.
- Dorey R, Piérard C, Shinkaruk S, Tronche C, Chauveau F, Baudonnat M et al (2011). Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval. *Neuropsychopharmacology* **36**: 2639–2649.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M (2000). Multiple actions of steroid hormones—a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* **52**: 513–556.
- Fanselow MS, Dong HW (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* **65**: 7–19.
- Ferguson D, Sapolsky R (2007). Mineralocorticoid receptor over-expression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci* **27**: 8046–8052.
- Groc L, Choquet D, Chaouloff F (2008). The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* **8**: 868–870.
- Joëls M (2008). Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* **583**: 312–321.
- Joëls M, Baram TZ (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* **10**: 459–466.
- Joëls M, Karst H, DeRijk R, De Kloet ER (2008). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* **31**: 1–7.
- Joëls M, Pu Z, Wiegert O, Oitzl MS, Krugers HJ (2006). Learning under stress: how does it work? *Trends Cogn Sci* **10**: 152–158.
- Joëls M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ (2007). Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* **28**: 72–96.
- Khaksari M, Rashidy-Pour A, Vafei AA (2007). Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval. *Neuroscience* **149**: 729–738.
- Kim PJ, Cole MA, Kalman BA, Spencer RL (1998). Evaluation of RU28318 and RU40555 as selective mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor antagonists, respectively: receptor measures and functional studies. *J Steroid Biochem Molec Biol* **67**: 213–222.
- Kim JJ, Diamond DM (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Rev Neurosci* **3**: 453–462.
- Linthorst ACE, Reul JM (2008). Stress and the brain: Solving the puzzle using microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav* **90**: 163–173.
- Lu NZ, Wardell SE, Burnstein KL, Defranco D, Fuller PJ, Giguere V et al (2006). The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol Rev* **58**: 782–797.
- Lupien SJ, Lepage M (2001). Stress, memory, and the hippocampus: can't live with it, can't live without it. *Behav Brain Res* **127**: 137–158.
- Makara GB, Haller J (2001). Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* **65**: 367–390.
- Maggio N, Segal M (2012). Steroid modulation of hippocampal plasticity: switching between cognitive and emotional memories. *Front Cell Neurosci* **6**: 1–5.
- McEown J, Treit D (2009). The role of the dorsal and ventral hippocampus in fear and memory of a shock-probe experience. *Brain Res* **1251**: 185–194.
- McEwen BS, Sapolsky RM (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* **5**: 205–216.
- McGaugh JL, Roozendaal B (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol* **12**: 205–210.
- McGaugh JL (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* **27**: 1–28.
- Minni A, Dorey R, Piérard C, Dominguez G, Helbling JC, Foury A et al (2012). Critical role of plasma corticosteroid-binding-globulin to deliver glucocorticoids to the brain during stress: impact on memory retrieval. *Endocrinology*. *submitted*.

ANNEXE 4 : EFFET DU STRESS AIGU AVANT L'ACQUISITION SUR LES PERFORMANCES D'ALTERNANCE



Il existe une différence significative entre les groupes $F(2,87)=5,8$; $p= 0,004$

Comparaison par rapport au hasard : + : $p< 0,05$; ++ : $p< 0,001$

Comparaison par rapport au groupe contrôle (non stressé) : *** : $p< 0,001$

Pour chaque groupe, le nombre d'effectifs est égal à 20 individus.

L'administration d'un stress aigu avant la phase d'acquisition ne perturbe pas le rappel mnésique. Par contre, le stress aigu administré 15 min avant le rappel perturbe les performances mnésiques.

ANNEXE 5 : RÉGIONS CÉRÉBRALES IMPLIQUÉES DANS LES EFFETS RAPIDES DU STRESS SUR LA MÉMOIRE CONTEXTUELLE

Les données précédemment obtenues grâce au test d'alternance forcée différée dans un labyrinthe en T ont été confirmées dans un test de mémoire contextuelle réalisé dans une planche à trous. Ces données confirment l'implication de l'HD (Chauveau et al, 2008 ; 2009) mais non de l'HV (cf infra) dans les effets rapides du stress sur le rappel mnésique.

Test de Discriminations Spatiales Contextuelles et Sérielles (DSCS)

a)Appareil :

La boîte à quatre trous est une enceinte carrée en Plexiglas opaque, de 50 cm de côté et de 35 cm de hauteur (cf. Image 2). Le plancher de l'appareil est percé de quatre trous de 3 cm de diamètre, situés à chaque coin de l'enceinte à une distance de 4 cm des parois. L'appareil est muni de deux planchers interchangeables de couleurs et de textures différentes : un plancher blanc rugueux et un plancher noir lisse. Des cellules photoélectriques placées au fond de chaque trou et reliées à un ordinateur situé dans une pièce adjacente permettent de mesurer la durée et le nombre de visites par trous. Le bruit de fond (bruit blanc de 10 dB) et l'éclairage (40 lux au centre de la boîte à trous, 20 lux dans les quatre coins) de la pièce sont maintenus constants. Au début du test, l'animal est placé dans un cylindre de Plexiglas opaque (16 cm de hauteur et 13 cm de diamètre) au centre de l'appareil pendant dix secondes afin de permettre à la souris une orientation aléatoire de départ. La boîte à quatre trous est soigneusement nettoyée à l'alcool à 50% v/v après chaque passage afin de limiter l'utilisation de traces olfactives.

Des indices visuels (papiers hachurés), positionnés sur les murs à un mètre au dessus de la boîte à quatre trous, sont laissés en place pendant les phases d'apprentissage et de restitution.



Image 2 : la boîte à quatre trous

b) Principe général du test DSCS : figure 36

Cette épreuve est basée sur le comportement exploratoire de l'animal. Celui-ci apprend à discriminer la localisation spatiale de trous appâtés par un agent renforçant (pastilles alimentaires de saccharose, 10 mg ; Bioserv, France). Dans l'épreuve DSCS, l'animal est soumis à deux apprentissages successifs dans deux contextes différents. Le plancher, spécifique à chaque discrimination, modélise le contexte interne de la boîte à trous. Au cours de ces apprentissages, l'animal apprend à discriminer la localisation spatiale d'un trou appâté parmi les quatre trous de l'appareil. Chaque discrimination (D1 et D2) s'effectue sur un plancher de couleurs et textures différentes, et dure 6 minutes. L'agent renforçant est constitué par dix pastilles alimentaires placées dans un trou spécifique de l'appareil.

L'expérience est réalisée avec des souris présentant une perte pondérale comprise entre 10 et 13 % de la masse corporelle initiale afin de motiver l'animal pour explorer l'appareil.

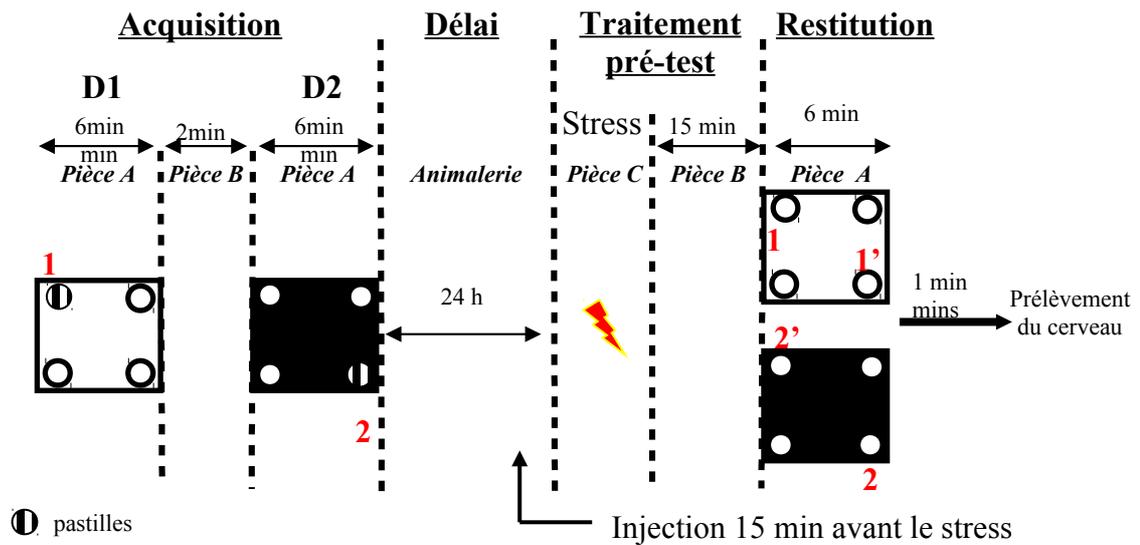


Figure 36 : Description du protocole comportemental du test DSCS et types de réponses émises lors de la phase de rappel.

(D1 : 1^{ère} discrimination ; D2 : seconde discrimination).

Le traitement pré-test consiste en l'administration d'un stress aigu (3 chocs électriques aux pattes d'une intensité de 0,9mA)

1 : réponse correcte ; 1' : réponse interférente

2 : réponse correcte ; 2' : réponse interférente

c) Types de réponse et de mémoire évaluée

Lors de la phase de rappel, aucun trou n'est appâté et les souris sont évaluées une seule fois sur un des deux planchers. Dans cette épreuve, on distingue trois types de réponses : a) les réponses « correctes » constituées par les explorations du trou appâté sur le même plancher entre les phases d'acquisition et de rappel; b) les réponses dites « interférentes » constituées par les explorations du trou appâté dans l'autre contexte ; c) les réponses « fausses » constituées par les explorations des trous n'ayant jamais été appâtés, dans aucun des deux contextes. A partir de ces données, on peut mesurer le pourcentage de réponses correctes (Nombre de réponses correctes / nombre total d'explorations multiplié par 100), le hasard étant de 25% (une chance sur quatre de visiter le trou appâté; cf. Figure 36). Les visites des trous appâtés sur le plancher inapproprié sont considérées comme des réponses interférentes. Les visites des deux autres trous sont considérés comme fausses.

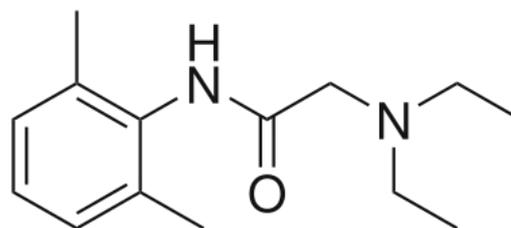
Les réponses spatiales se réfèrent aux visites des trous appâtés indépendamment du plancher utilisé. L'analyse des réponses spatiales est effectuée en réalisant la somme entre le nombre de réponses correctes et le nombre de réponses interférentes (deux chances sur quatre, le hasard est fixé à 50%). Ainsi, dans cette analyse, les performances dépendent exclusivement de la localisation spatiale allocentrique (indices visuels externes à la boîte à trous). Cette forme de rappel refléterait une forme générale du souvenir (mémoire de référence).

Inversement, les réponses correctes dépendent de l'association entre un contexte interne et un ordre sériel (D1 puis D2). Cet index reflète l'utilisation lors du rappel des attributs flexibles ou variant à chaque discrimination. Les réponses correctes reflètent donc une forme de mémoire sérielle contextuelle de type « épisodique » (Célérier et al., 2004 ; Béracochéa et al, 2007 ; Tronche et al., 2010 ; cf partie I. B. 2).

Une étude précédente menée au sein de l'équipe a montré que l'HD était impliqué dans les effets délétères rapides du stress sur le rappel mnésique puisque l'injection de corticostérone au sein de l'HD reproduisait les effets délétères du stress aigu sur la mémoire (Chauveau et al, 2008 ; 2009).

Nous avons ici essayé de déterminer si l'hippocampe ventral (HV) était ou non impliqué dans les effets rapides du stress sur le rappel mnésique. Pour ce faire, nous avons injecté une solution de lidocaïne au sein de l'HV (0,3 µl par hippocampe ventral) 15 minutes avant l'administration du stress et 30 minutes avant le rappel mnésique.

d) Inactivation de l'hippocampe ventral.



lidocaïne

Afin d'inactiver l'hippocampe ventral, nous avons injecté de la lidocaïne, un anesthésique local qui bloque l'activation des canaux sodiques. La lidocaïne a été injectée bilatéralement (0,3 µl par hippocampe ; 0,1 µl/min pendant 3 min). La lidocaïne est injectée 15 minutes avant l'administration du stress.

Les résultats ont montré que l'injection de lidocaïne ne modifie pas le profil de réponse chez le groupe non stressé ($D1 > D2$) et stressé ($D1 < D2$).

Réponses correctes (figure 37)

Les résultats ont montré une interaction statistiquement significative entre le contexte ($D1$, $D2$) et le traitement (injection de lidocaïne ou de solvant) ($F(3,65) = 7,81$; $p < 0,001$). Le groupe de souris « non stressé + solvant » (NS+s) se rappelle mieux $D1$ ($41,24 \pm 3,11\%$) que $D2$ ($28,63 \pm 3,28\%$) ($t = 2,12$; $p < 0,037$). Le groupe « non-stressé + lidocaïne » (NS+L) présente le même pattern de réponses correctes ($39,22 \pm 3,66\%$ et $26,72 \pm 3,28\%$; respectivement pour $D1$ et $D2$). Par ailleurs, ces deux groupes présentent des performances mnésiques significativement différentes du hasard pour la discrimination $D1$ ($t = 5,53$; $p \leq 0,001$ et $t = 3,29$; $p = 0,005$ respectivement pour les groupes « NS+s » et « NS+L ») mais pas pour $D2$. Par contre les performances des groupes « stressé + solvant (S+s) et « stressé + lidocaïne » (S+L) sont significativement différentes du hasard pour la deuxième discrimination $D2$ ($39,68 \pm 3,40\%$ $t = 5,04$; $p \leq 0,001$ et $37,63 \pm 2,71\%$ $t = 3,10$; $p = 0,006$ respectivement pour S+s et S+L). Ces groupes stressés rappellent mieux $D2$ ($t = 3,17$; $p = 0,002$ et $t = 2,45$; $p = 0,017$ respectivement pour S+s et S+L) que $D1$. De façon intéressante, 15 min après l'administration du stress aigu (ou 30 min après l'injection de lidocaïne), les souris stressées montrent un pattern de réponses inversé par rapport à celui observé chez les groupes NS+s et NS+L.

Réponses interférentes (figure 38)

Les groupes NS+s et NS+L présentent, de façon significative, un pourcentage de réponses interférentes plus élevé pour $D2$ ($35,61 \pm 2,32\%$; $p < 0,001$ et $23,24 \pm 4,58\%$; $p < 0,01$; respectivement pour NS+s et NS+L) que pour $D1$ ($41,24 \pm 3,11\%$ et $39,22 \pm 3,66\%$, respectivement). Au contraire, les groupe S+s et S+L présentent un pourcentage de réponses interférentes plus élevé pour $D1$ ($43,28 \pm 3,50\%$; $p < 0,001$ et $38,59 \pm 3,24$; $p = 0,001$ respectivement) que pour $D2$.

Réponses spatiales (Figure 39)

L'analyse statistique a révélé une différence significative dans l'effet du traitement ($F(3,65) = 9,90$; $p < 0,001$).

Les performances spatiales sont significativement supérieures au hasard dans tous les groupes à l'exception du groupe S+L évalué en D2 ($55,53 \pm 3,81\%$; $p = 0,19$). De plus, les résultats montrent une différence significative pour D2 entre le groupe S+L et le groupe NS+s ($t = 4,03$; $p < 0,001$ respectivement)

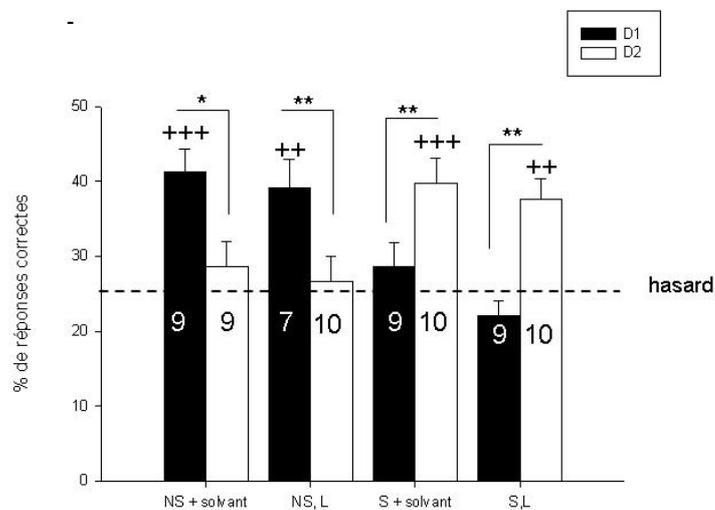


Figure 37 : Effet de l'injection intrahippocampique ventrale de lidocaïne sur les performances mnésiques

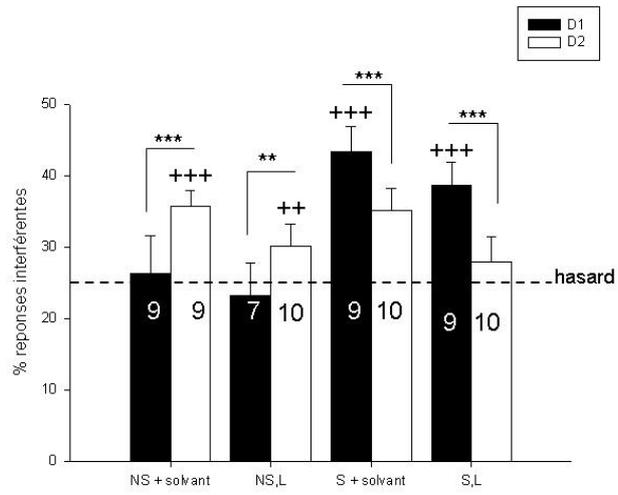


Figure 38 : Effet de l'injection intrahippocampique ventrale de lidocaïne sur les réponses interférentes

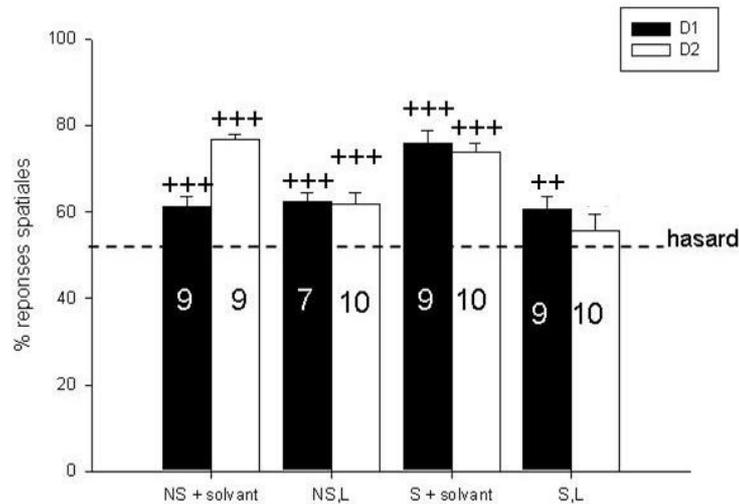


Figure 39 : Effet de l'injection intrahippocampique ventrale de lidocaïne sur les réponses spatiales

Pour les trois figures ci-dessus :

Comparaison intra-groupe (effet de la discrimination) : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Comparaison par rapport au hasard (25% et 50% pour les réponses spatiales) : ++ : $p < 0,01$; +++ : $p < 0,001$

La ligne en pointillée représente le niveau de hasard. Le nombre d'animaux est mentionné dans chaque graphe.

Légende : NS : non stressé ; S : stressé ; L : lidocaïne

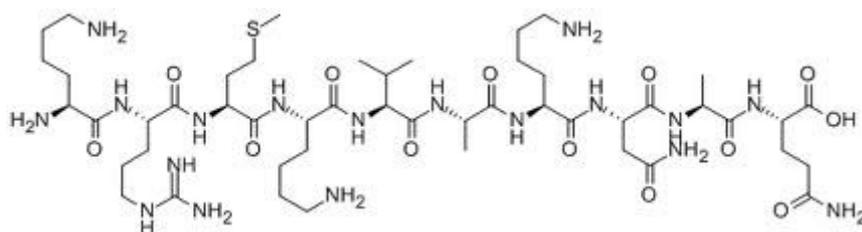
Conclusion :

Les effets délétères rapides du stress impliquent l'HD, alors que l'HV ne paraît pas impliqué. En effet, l'inactivation réversible de l'HV par l'injection de lidocaïne ne modifie pas le profil de réponse des souris stressées.

ANNEXE 6 : DÉTERMINATION DE L'IMPLICATION DES RÉCEPTEURS AMPA DE SURFACE DE L'HIPPOCAMPE DORSAL DANS LES EFFETS DU STRESS SUR LA MÉMOIRE CONTEXTUELLE

Compte tenu des relations entre la corticostérone et les récepteurs AMPA (cf Conboy et Sandi, 2010 ; Groc et al, 2008), nous avons essayé de déterminer si ces derniers étaient impliqués dans les effets rapides du stress au sein de l'HD. A cet effet, préalablement à l'administration du stress aigu, nous avons injecté dans l'HD un peptide (pep2m) connu pour inactiver la sous unité Glu A2 du récepteur AMPA, bloquant le trafic de surface de ces récepteurs (Conboy et Sandi, 2010). Enfin, nous avons voulu savoir si l'injection dans l'hippocampe dorsal de pep2m modulait la cinétique de corticostérone.

Détermination de l'implication des récepteurs AMPA de surface de l'hippocampe dorsal.



pep2m

Nous avons injecté in situ dans l'HD le **neuropeptide pep2m** (0,05 µl/min pendant 9 min; 19,17 µmol/ml). Ce neuropeptide de synthèse interfère avec le « N-ethylmaleimide-Sensitive-Factor » (NSF) impliqué dans le trafic des sous-unités GluA2 des récepteurs AMPA (Conboy et Sandi, 2009). Le jour de l'expérience, 15 min avant l'administration du stress aigu, l'animal reçoit une injection intrahippocampique de pep2m ou de scramble-pep2m (Scr-

pep2m). Ce dernier est une molécule identique au pep2m mis à part que les atomes sont réarrangés de façon à ce qu'il soit inactif. L'effet de l'injection du pep2m dans l'hippocampe dorsal sur les concentrations en corticostérone est également évalué par microdialyse.

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Dr Carmen Sandi (Ecole Polytechnique de Lausanne, Suisse).

Expérience 1 : comportement : effet de l'injection intrahippocampique dorsal du pep2m sur le rappel mnésique dans le DSCS, 15 min après un stress aigu

Performances spatiales : (Figure 40 A)

Tous les groupes (NS+Ssp2m, S+Ssp2m, NS+pep2m, S+pep2m, n = 76) ont montré des performances spatiales (supérieures à 70 % pour les deux discriminations) significativement différentes du hasard. Aucune différence n'a été observée entre les groupes ($F(2 ; 34) = 0,46$; non significatif)

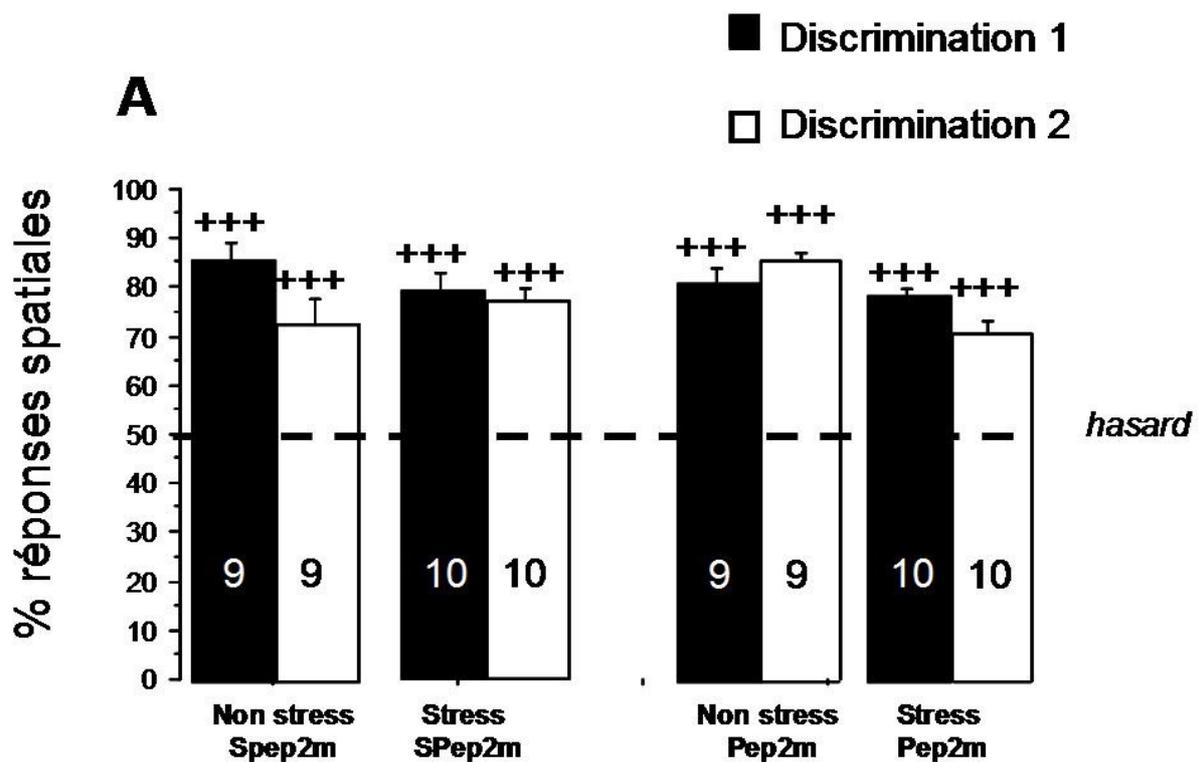
Pourcentage de réponses correctes : (Figure 40 B)

Les souris contrôles non stressées, injectées avec le Scr-pep2m, (NS+Ssp2m) présentent des performances mnésiques significativement différentes du hasard pour la discrimination D1 ($57,11 \pm 3,35$ % ; $t = 4,03$; $p < 0,001$). Les souris non stressées, injectées avec le pep2m, (NS+pep2m) présentent des performances mnésiques qui sont également significativement différentes du hasard pour D1 ($54,58 \pm 5,58$ % ; $p < 0,001$). Par contre les performances de ces deux groupes ne sont pas significativement différentes du hasard pour la deuxième discrimination D2 ($23,57 \pm 2,19$ % et $20,39 \pm 1,94$ %, respectivement pour NS+Ssp2m et NS+pep2m respectivement). De façon intéressante, 15 min après l'administration du stress aigu, les souris stressées montrent un profil de réponses inversé à celui observé chez les groupes NS+Scr-pep2m et NS+pep2m. Plus précisément, le groupe stressé ayant reçu l'injection de Scr-pep2m (S+Ssp2m) présentent des performances mnésiques significativement différentes du hasard pour D2 ($52,33 \pm 3,01$ % ; $p < 0,001$) mais non pour D1 ($24,15 \pm 4,49$ %). Par contre, les souris stressées, injectées avec le pep2m (S+pep2m) présentent un pattern de réponse semblable aux groupes non stressés (NS+Ssp2m et NS+pep2m). En effet, 15 min après le stress aigu, le groupe S+pep2m

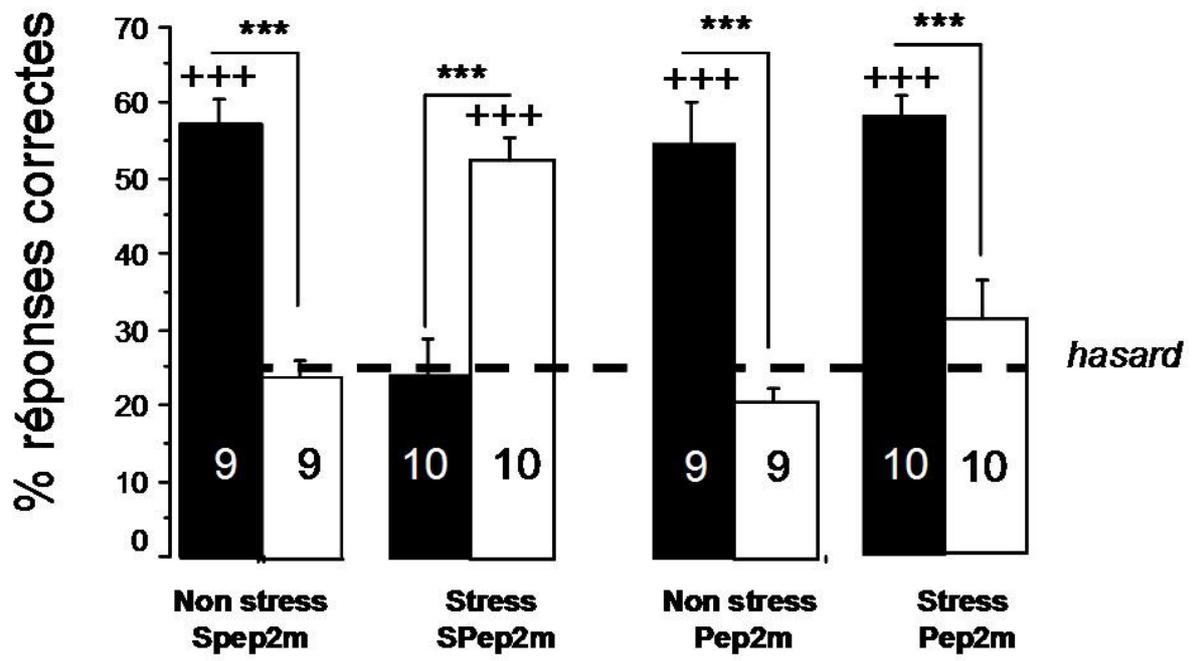
présentent un % de réponses correctes significativement différent du hasard pour D1 ($58,07 \pm 2,54\%$; $p < 0,001$) mais non pour D2 ($30,54 \pm 5,17\%$).

Pourcentage de réponses interférentes : (figure 40 C)

Les groupes NS+Ssep2m et NS+pep2m présentent, de façon significative, un pourcentage de réponses interférentes plus élevé pour D2 ($48,93 \pm 3,75\%$; $p < 0,001$ et $65,10 \pm 2,11\%$; $p < 0,001$; respectivement pour NS+Ssep2m et NS+pep2m) que pour D1 ($28,50 \pm 4,61\%$ et $26,05 \pm 4,96\%$, respectivement). Au contraire, le groupe S+Ssep2m présente un pourcentage de réponses interférentes significativement différent du hasard pour D1 ($54,75 \pm 3,21\%$; $p < 0,001$) mais pas pour D2 ($24,41 \pm 3,10\%$). Cependant, le groupe S+pep2m ne présente pas le même schéma de réponses. En effet, ce groupe présente un pourcentage de réponses interférentes significativement différent du hasard pour D2 ($40,36 \pm 5,73\%$; $p = 0,015$) mais non pour D1 ($20,02 \pm 2,30\%$).



B



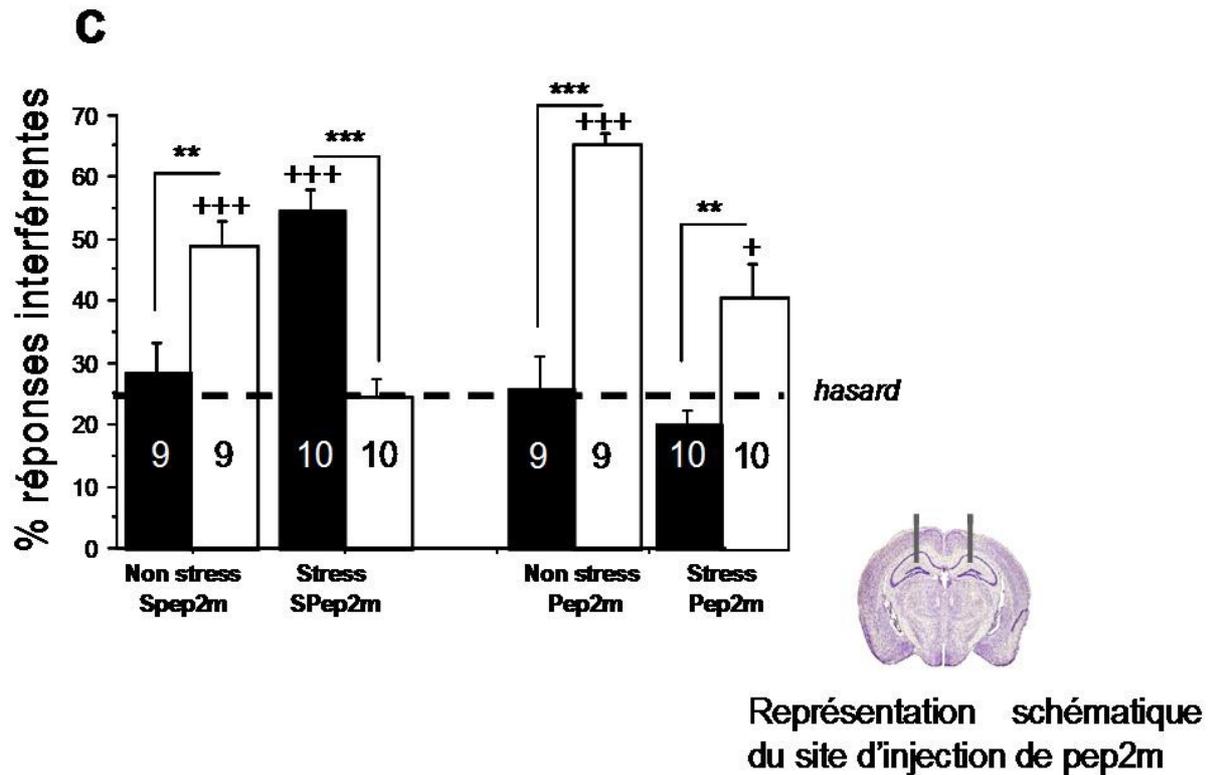


Figure 40 : Effet de l'injection intrahippocampique du pep2m sur les performances mnésiques, évaluées 15 min après un stress aigu, dans l'épreuve du DSCS.

Comparaison intra-groupe (effet de la discrimination) : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Comparaison par rapport au hasard (25%) : + : $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$; +++ : $p < 0,001$

La ligne en pointillée représente le niveau de hasard. Le nombre d'animaux est mentionné dans chaque graphe.

Expérience 2 : effet de l'injection intrahippocampique du pep2m sur la cinétique de la corticostérone hippocampique.

Les résultats présentés précédemment ont montré que l'administration d'un stress aigu 15 min avant le test inverse le profil normal des performances mnésiques ($D1 < D2$) observé chez les animaux NS ($D1 > D2$). Mais les résultats n'ont pas montré d'inversion chez le groupe S+pep2m. Ces résultats indiquent également que les performances mnésiques, suite au stress aigu, sont associées à l'activation des récepteurs AMPA. Afin de déterminer l'implication de ces récepteurs sur la libération de la corticostérone, le pep2m a été injecté in situ dans l'HD 30 min avant le stress.

Concentrations basales en corticostérone

Les concentrations basales en corticostérone hippocampique, calculées sur la moyenne des dialysats recueillis sur 1 heure, ne diffère pas du niveau de base (100 % ; student t test : NS). Le groupe ayant reçu l'injection intrahippocampique de pep2m ($289,97 \pm 129,68$ pg/ml ; n = 6) ne présente aucune différence significative par rapport au groupe solvant ayant reçu l'injection de scr-pep2m ($291,94 \pm 130,56$ pg/ml ; n = 6 ; p = 0,992).

Effet du stress : (figure 41)

La figure 41 représente les concentrations en corticostérone dans l'HD. Les résultats sont exprimés en pourcentage de variation de la ligne de base. Une ANOVA à deux facteurs met en évidence une interaction significative entre le traitement et le délai post-stress ($F(2 ; 204) = 2,07$; p = 0,003). Aucune différence significative n'a été révélée durant la période pré-stress ($F(2 ; 40) = 0,62$; p = 0,652).

Groupe solvant (scr-pep2m)

Comparé au dernier point pré-stress ($95,8 \pm 8,5\%$; « temps = 0 »), le stress induit une augmentation rapide et importante de concentration en corticostérone à partir du premier point post-stress (15 minutes : $133,6 \pm 10,5\%$; t = -2,4 ; p = 0,037) qui perdure jusqu'au délai de 90 minutes post-stress ($147,3 \pm 11,1\%$; t = 3,1 ; p = 0,002). La concentration maximale de corticostérone a été mesurée au délai de 60 minutes après l'administration du stress ($186,3 \pm 17,6\%$; t = 3,8 ; p < 0,001). Par contre, les concentrations mesurées aux délais de 105 et 120 minutes post-stress ne sont pas significativement différentes des concentrations mesurées avant le stress ($108,5 \pm 14,2\%$; t = 33,9 ; p = 0,134 et $105,1 \pm 17,4\%$; t = 1,7 ; p = 0,084 respectivement).

Groupe pep2m

Les résultats ne montrent aucune différence significative entre la période pré-stress et la période post-stress.

Comparaisons des groupes

L'augmentation de la concentration en corticostérone induite par le stress dans l'HD n'est pas observée pour le groupe pep2m. En revanche, on observe une différence significative entre le groupe pep2m et le groupe solvant dès le premier point post-stress à 15 minutes, ($133,6 \pm 10,5\%$ et $44,3 \pm 13,0\%$ respectivement ; $t = 3,2$; $p = 0,02$). Cette différence significative entre ces deux groupes se prolonge jusqu'à 90 minutes après le stress ($83,7 \pm 14,9\%$ et $140,0 \pm 17,1\%$ respectivement pour le groupe pep2m et scr-pep2m ; $t = 2,8$; $p = 0,005$). Par contre, les points de la cinétique à 105 et 120 minutes ne sont pas significativement différents entre les deux groupes.

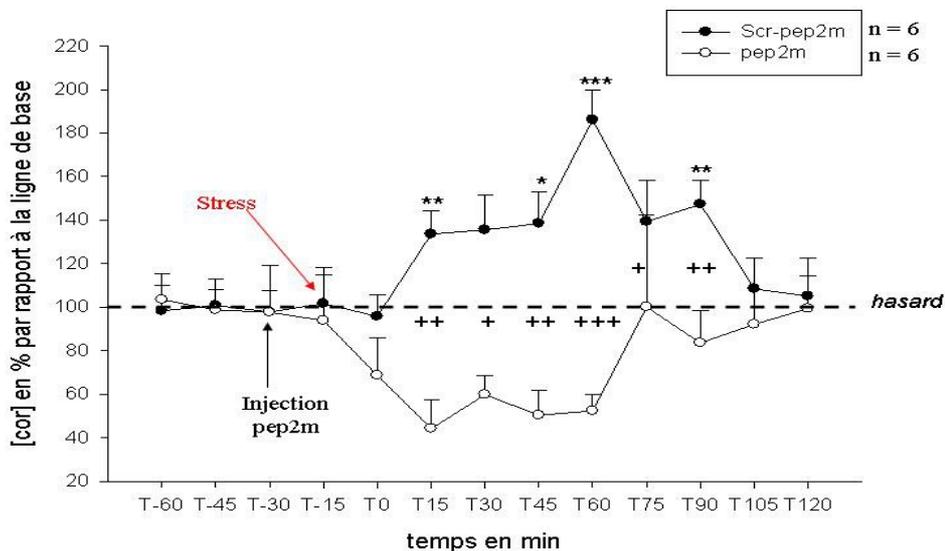


Figure 41 : Effet du pep2m et d'un stress aigu sur les niveaux de corticostérone intrahippocampique

Effet du stress (par rapport à la ligne de base 100%) : * : $p < 0,005$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$

Effet du pep2m (par rapport au groupe contrôle) : + : $p < 0,05$; ++ : $p < 0,01$; +++ : $p < 0,001$

Conclusion :

Les résultats de cette étude sont en accord avec les travaux de l'équipe (Chauveau et al, 2009). En effet, notre étude montre que les animaux testés 15 minutes après le stress expriment un profil de réponse inversé ($D2 > D1$) par rapport aux animaux non stressés ($D1 > D2$). Les résultats neurobiochimiques ont montré que l'administration d'un stress aigu

induit une augmentation rapide de la concentration en corticostérone dans l'hippocampe dorsal, 15 minutes après le stress. De plus, l'injection de pep2m dans l'HD bloque l'augmentation de corticostérone hippocampique après un stress, ainsi que les effets rapides délétères du stress sur la mémoire. Ainsi cette étude a permis de mettre en évidence la relation existante entre la corticostérone hippocampique et l'activité des récepteurs glutamatergiques de surface AMPA de l'HD, dans le rappel d'une information contexte-dépendante.

Toutefois, le type des récepteurs stéroïdiens membranaires (MR et/ou GR) impliqués dans les effets non-génomiques du stress sur le rappel mnésique n'est pas déterminé.

Dans le cadre de notre étude, nous avons voulu déterminer le type de récepteurs aux GCs impliqués dans les effets non-génomiques du stress sur le rappel mnésique dans l'HD. Pour cela, nous avons utilisé le test d'alternance forcée différée (cf partie expérimentale D.2) qui, contrairement au DSCS, permet l'utilisation d'effectifs plus réduits.

BIBLIOGRAPHIE

Adam, C. T. and E. S. Epel (2007). "Stress, eating and the reward system." Physiology and Behavior **91**: 449-458.

Adamec, R., A. Holmes, et al. (2008). "Vulnerability to lasting anxiogenic effects of brief exposure to predator stimuli: sex, serotonin and other factors-relevance to PTSD." Neuroscience biobehavioural review **32**: 1287-1292.

Addis, D. R., A. R. McIntosh, et al. (2004). "Characterizing spatial and temporal features of autobiographical memory retrieval networks: a partial least squares approach." Neuroimage **23**: 1460-1471.

Admon, R., D. Leykin, et al. (2012). "Stress-induced reduction in hippocampal volume and connectivity with the ventromedial prefrontal cortex are related to maladaptative responses to stressful military service." Hum Brain Mapp.

Aggleton, J. P. and J. M. Pearce (2001). "Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research." Phil. Trans. R. Soc London. B **356**(1413): 1467-1482.

Akil, H. (2005). "Stressed and depressed." nature medecine **11**(2): 116-118.

Alfarez, D. N., O. Wiegert, et al. (2002). "Corticosterone and stress reduce synaptic potentiation in mouse hippocampal slices with mild stimulation." Neuroscience **115**(4): 119-1126.

Alonso, A., M. De Curtis, et al. (1990). "Postsynaptic Hebbian and non-Hebbian long-term potentiation of synaptic efficacy in the entorhinal cortex in slices and in the isolated adult guinea pig brain." Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 9280-9284.

Amaral, D. G. and M. P. Witter (1995). "Hippocampal formation. In: The rat nervous system." **Paxinos G, ed. San Diego, CA: Academic Press: 443-493.**

Antelman, S. M., H. Szechtman, et al. (1975). "Tail pinch-induced eating, gnawing and licking behavior in rats: dependence on the nigrostriatal dopamine system." Brain research protocols **99**: 319-337.

Apfel, B. A., J. Ross, et al. (2011). "hippocampal volume differences in Gulf War veterans with current versus lifetime posttraumatic stress disorder symptoms." Biology and psychiatry **69**(6): 541-548.

- Aston-jones, G. and J. D. Cohen (2005). "An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptative gain and optimal performance." Annu Rev Neurosci **28**: 403-450.
- Avital, A., M. Segal, et al. (2006). "Contrasting roles of corticosteroid receptors in hippocampal plasticity." Journal of neuroscience **26**(36): 9130-9134.
- Babb, J. and D. Crystal (2006). "Episodic-like Memory in the Rat." Current biology **16**: 1317-1321.
- Baddeley, A. (2003). "Working memory: looking back and looking forward." Nature review of neuroscience **4**(10): 829-839.
- Baddeley, A. and G. J. Hitch (1974). "Working memory." The psychological of learning and motivation **8**: 47-90.
- Bannerman, D. M., R. M. Deacon, et al. (2002). "Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia." Behav Neurosci **116**(5): 884-901.
- Bannerman, D. M., J. N. P. Rawlinsa, et al. (2004). "Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety." Neuroscience and Biobehavioral Reviews **28**: 273-283.
- Bannermann, D. M., M. Grubb, et al. (2003). "Ventral hippocampus lesion affect anxiety but not spatial learning." Behavioural brain research **139**: 197-213.
- Bannermann, D. M., B. K. Yee, et al. (1999). "Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral and complete hippocampal cytotoxic lesions." Behav. Neurosc **113**: 1170-1188.
- Bardgett, M. E., G. T. Taylor, et al. (1994). "Chronic Corticosterone Treatment Impairs Spontaneous Alternation Behavior in Rats." Behavioral and neural biology **61**: 186-190.
- Barsegyan, A., S. M. Mackenzie, et al. (2010). "Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism." Procedure of national academy of science **107**: 16655-16660.
- Bast, T. and J. Feldon (2003). "Hippocampal modulation of sensorimotor processes." Prog Neurobiol **70**(4): 319-345.
- Baxter, M. G. and E. A. Murray (2002). "The amygdala and reward." Nature review neuroscience **3**: 563-573.
- Belzung, C. (2007). "Biologie des émotions."
- Belzung, C., W. El Hage, et al. (2001). "Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice." Neuropharmacology **41**(3): 400-408.
- Béracochéa, D. (2005). "Interaction between emotion and memory: importance of mammillary bodies damage in a mouse model of the alcoholic Korsakoff syndrome." Neuronal plasticity **12**(4): 275-287.

Bitran, D., M. Shiekh, et al. (1998). "Corticosterone is permissive to the anxiolytic effect that results from the blockade of hippocampal mineralocorticoid receptors." Pharmacology biochemistry and behavior **60**(4): 879-887.

Blair, H. T., G. E. Schafe, et al. (2001). "Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning." Learning memory **8**(5): 229-242.

Blank, T., I. Nijholt, et al. (2002). "Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotrophin-releasing factor and acute stress: implication for hippocampus-dependent learning." Journal of neuroscience **22**: 3788-3794.

Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. ." Journal of physiology **232**: 331-356.

Bonne, M. Vythilingam, et al. (2008). "Reduced posterior hippocampal volume in posttraumatic stress disorder." J Clin Psychiatry **69**(7): 1087-1091.

Bonne, O., C. Grillon, et al. (2004). "Adaptive and maladaptive psychobiological responses to severe psychological stress: implications for the discovery of novel pharmacotherapy." Neurosci Biobehav Rev **28**: 65-94.

Born, J., E. R. DeKloet, et al. (1991). "Glucocorticoid and antimineralocorticoid effects on human sleep: a role of central corticosteroid receptors." American journal of physiology **260**: 183-188.

Bossini, L., M. Tavanti, et al. (2007). "Changes in hippocampal volume in patients with post-traumatic stress disorder after sertraline treatment." J Clin Psychopharmacology **27**(2): 233-235.

Bradbury, M., S. Akana, et al. (1991). "Regulation of basal ACTH secretion by corticosterone is mediated by both type I and type II receptors in rat brain." Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology **40**(1-3): 133-142.

Bremner, J. D. (2003). "Functional neuroanatomical correlates of traumatic stress revisited 7 years later, this time with data." Psychopharmacology bulletin **37**(2): 6-25.

Brinks, V., M. H. v. d. Mark, et al. (2007). "Differential MR/GR activation in mice results in emotional states beneficial or impairing for cognition." Neural Plasticity **2007**: 1-11.

Broadbent, N. J., L. R. Squire, et al. (2010). "Sustained Dorsal Hippocampal Activity is Not Obligatory for Either the Maintenance or Retrieval of Long-Term Spatial Memory." Hippocampus **20**: 1366-1375.

Burgess, N. (2008). "Spatial Cognition and the Brain." Annals of the New York Academy of Sciences **1124**: 77-97.

Burgess, N., E. A. Maguire, et al. (2002). "The human hippocampus and spatial and episodic memory." Neurone **35**(4): 652-641.

- Burianova, H., A. R. McIntosh, et al. (2010). "A common functional brain network for autobiographical, episodic, and semantic memory retrieval." Neuroimage **49**: 865-874.
- Burton, B. G., V. Hok, et al. (2009). "Lesion of the ventral and intermediate hippocampus abolishes anticipatory activity in the medial prefrontal cortex of the rat." Behavioural brain research **199**: 22-234.
- Calfa, G., D. Bussolino, et al. (2007). "Involvement of the lateral septum and the ventral Hippocampus in the emotional sequelae induced by social defeat: Role of glucocorticoid receptors." Behavioural brain research **181**: 23-34.
- Cannon, W. (1929). "Organisation for physiological homeostasis." Physiology review **9**: 399-431.
- Caudal, D., B. P. Godsil, et al. (2010). "Acute Stress Induces Contrasting Changes in AMPA Receptor Subunit Phosphorylation within the Prefrontal Cortex, Amygdala and Hippocampus." PLOS one **5**(12): 1-6.
- Cazakoff, B. N. and J. G. Howland (2010). "Acute stress disrupts paired pulse facilitation and long-term potentiation in rat dorsal hippocampus through activation of glucocorticoid receptors." HIPPOCAMPUS **20**: 1327-1331.
- Célérier, A., C. Piérard, et al. (2004). "Contextual and serial discriminations: a new learning paradigm to assess simultaneously the effects of acute stress on retrieval of flexible or stable information in mice." Learning and memory **11**(2): 196-204.
- Cenquizca, L. A. and L. W. Swanson (2007). "Spatial organisation of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex." Brain research reviews **56**(1): 1-26.
- Chao, H., P. Choo, et al. (1989). "Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain." Neuroendocrinology **50**(4): 365-371.
- Chaouloff, F. and L. Groc (2011). "Temporal modulation of hippocampal excitatory transmission by corticosteroids and stress." Frontiers and neuroendocrinology **32**: 25-42.
- Chapman, P. F., E. W. Kairiss, et al. (1990). "Long-term synaptic potentiation in the amygdala." Synapse **6**: 271-278.
- Chauveau, F., C. Piérard, et al. (2009a). "The hippocampus and prefrontal cortex are differentially involved in serial memory retrieval in non-stress and stress conditions." Neurobiology learning and memory **91**(4): 447-455.
- Chauveau, F., C. Tronche, et al. (2009b). "Rapid stress induced corticosterone rise in the hippocampus reverse serial memory retrieval pattern." Hippocampus **11**.
- Chen, Y., R. A. Bender, et al. (2001). "novel and transient populations of corticotropin-releasing hormone-expressing neurons in developing hippocampus suggest unique functional roles: a quantitative spatiotemporal analysis." Journal of neuroscience **21**: 7171-7181.

- Chiba, T. (2000). "Collateral projection from the amygdalo–hippocampal transition area and CA1 to the hypothalamus and medial prefrontal cortex in the rat." Neuroscience research **38**: 373-383.
- Choi, J., I. Hwang, et al. (2008). "Immunoreactivities and levels of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the hippocampal CA1 region and dentate gyrus of adult and aged dogs." Neurochemistry Research **33**(3): 562-568.
- Chronister, R. B. and L. E. J. White (1975). "Limbic lobe morphology: an old approach to a new system." Adv Neurol **11**: 15-25.
- Clayton, N. S. and A. Dickinson (1998). "Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays." Nature **395**: 272-274.
- Clayton, N. S., D. Griffiths, et al. (2001). "Elements of episodic-like memory in animals." Phil. Trans. R. Soc London. B: 1483-1491.
- Colombo, M., T. Fernandez, et al. (1998). "Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys." Journal of Neurophysiology **80**: 1002-1005.
- Conboy, L. and C. Sandi (2010). "Stress at learning facilitates memory formation by regulating AMPA receptor trafficking through a glucocorticoid action." Neuropsychopharmacology **35**(3): 674-685.
- Conrad, C. D. (2005). "The relationship between acute glucocorticoid levels and hippocampal function depends upon task aversiveness and memory processing stage." Non linearity in biology, toxicology and medicine **3**: 57-78.
- Conte-Devolx, B., V. Guillaume, et al. (1993). "Stress. Neuroendocrine aspects." Encephale **19**(1): 143-146.
- Conway-campbell, B. L., M. A. McKenna, et al. (2007). "Proteasome-dependent downregulation of activated nuclear hippocampal glucocorticoid receptors determines dynamic responses to corticosterone." Endocrinology **148** 8(5470-5477).
- Cordero, M. I., J. J. Merino, et al. (1998). "Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning." Behavioural neuroscience **112**: 885-891.
- Corkin, S. (2002). "What's new with the amnesic patient H.M.?" Nature reviews neuroscience **3**: 153-160.
- Crystal, D. (2009). "Elements of episodic-like memory in animal models." Behavioural processes **80**: 269-277.
- Czerniawski, J., T. Yoon, et al. (2009). "Dissociating Space and Trace in Dorsal and Ventral Hippocampus." Hippocampus **19**: 20–32.
- Dallman, M. F. (2005). "Fast glucocorticoid actions on brain: back to the future." Frontiers and neuroendocrinology **26**: 103-108.

Damasio, A. R. (2001). "Fundamental feelings." Nature **413**: 781.

De Kloet, E. R. and J. M. Reul (1987). "Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems." Psychoneuroendocrinology **12**(2): 83-105.

De Kloet, E. R. and R. A. Sarabdjitsingh (2008). "Everything has rhythm :focus on glucocorticoid pulsatility." Endocrinology **149**: 3241-3243.

de Quervain, D. J.-F. (2006). "Glucocorticoid-induced inhibition of memory retrieval. Implications for Posttraumatic stress disorder." Annals of the New York Academy of Sciences: 216-220.

de Quervain, D. J., K. Henke, et al. (2003). "Glucocorticoid-induced impairment of declarative memory retrieval is associated with reduced blood flow in the medial temporal lobe." European Journal of neuroscience **17**(6): 1296-1302.

de Quervain, D. J., B. Roozendaal, et al. (2000). "Acute cortisone administration impairs retrieval of long-term declarative memory in humans." Nature neuroscience **3**(4): 313-314.

DeJong, R. N. (1973). "The Hippocampus and Its Role in Memory." Journal of the neurological Sciences **19** 73-83.

deKloet, E. R. (2003). "Hormone, brain and stress." Endocrine regulations **37**: 51-68.

deKloet, E. R., M. S. Oitzl, et al. (1999). "Stress and cognition:are corticosteroids good or bad guys?" Trends Neuroscience **22**(10): 422-426.

deKloet, E. R., W. Sutanto, et al. (1993). "Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications." Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology **47**(1-6): 183-190.

deQuervain, D. J.-F., B. Roozendaal, et al. (1998). "Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory." Nature **394**: 787-790.

Dere, E., J. P. Huston, et al. (2005a). "Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory." Brain research protocols **16**: 10-19.

Dere, E., J. P. Huston, et al. (2005b). "Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice
" Neurobiology learning and memory **84**: 214-221.

Dere, E., E. Kart-Teke, et al. (2006). "The case for episodic memory in animals." Neuroscience and biobehavioral reviews **30**: 1206-1224.

Devan, B. D. and N. M. White (1999). "Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function." Journal of neuroscience **19**: 2789-2798.

- Diamond, D. M., M. C. Bennett, et al. (1992). "Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation." Hippocampus **2**(4): 421-430.
- Dodt, C., W. Kern, et al. (1993). "Antimineralocorticoid canrenoate enhances secretory activity of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in humans." Neuroendocrinology **58**(5): 570-574.
- Donley, M. P., J. Schulkin, et al. (2005). "Glucocorticoid Receptor Antagonism in the Basolateral Amygdala and Ventral Hippocampus Interferes with Long-term Memory of Contextual Fear." Behavioural Brain Research **164**: 197-205.
- Dorey, R., C. Piérard, et al. (2011). "Membrane mineralocorticoid but not glucocorticoid receptors of the dorsal hippocampus mediate the rapid effects of corticosterone on memory retrieval." Neuropsychopharmacology: 1-11.
- Douma, B. R. K., S. M. Korte, et al. (1998). "Repeated Blocade of Mineralocorticoid Receptors, but not Glucocorticoid receptors Impairs Food Rewarded Spatial Learning." Psychoneuroendocrinology **23**(1): 33-44.
- Dusek, J. A. and H. Eichenbaum (1997). "The hippocampus and memory for orderly stimulus relations." Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 7109-7114.
- Edwards, C. R., P. M. Stewart, et al. (1988). "Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor." Lancet **2**: 986-989.
- Eichenbaum, H. (1999). "The hippocampus and mechanisms of declarative memory." Behavioural brain research **103**: 123-133.
- Eichenbaum, H. (2001). "The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes." Behavioural brain research **127**: 199-207.
- Eichenbaum, H. and N. J. Fortin (2003). "Episodic memory and the hippocampus. It's about time." Current directions in psychological science **12**: 53-57.
- Eichenbaum, H., G. Schoenbaum, et al. (1996). "Functional organisation of the hippocampal memory system." Procedure National academic Science **93**: 13500-13507.
- El Hage, W., G. Griebel, et al. (2006). "Long-term impaired memory following predatory stress in mice." Physiology and Behavior **87**(1): 45-50.
- Fang Han, Hitoshi Ozawa, et al. (2005). "Colocalisation of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus." Neuroscience research **51**: 371-381.
- Fanselow, M. S. and H.-W. Dong (2010). "Are the Dorsal and Ventral Hippocampus functionally Distinct structures?" Neuron **65**(7-19).

- Ferguson, D. and R. Sapolsky (2007). "Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory." The Journal of Neuroscience **27**(30): 8046-8052.
- Foa, E. B., R. Zinbarg, et al. (1992). "Uncontrollability and unpredictability in posttraumatic stress disorder: an animal model." Psychol Bull **112**: 218-238.
- Follenius, M., G. Brandenberger, et al. (1982). "Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals." J Clin Endocrinol Metab **55**: 757-761.
- Foy, M. R., M. E. Stanton, et al. (1987). "Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus." Behav Neural Biol **48**(1): 138-149.
- Furay, A. R., A. E. Bruestle, et al. (2008). "The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress." Endocrinology **149**(11): 5482-5490.
- Gallagher, J. P., L. F. Orozco-Cabal, et al. (2008). "Synaptic physiology of central CRH system." European journal of pharmacology **583**: 215-225.
- Gerlai, R. (1998). "Contextual learning and cue association in fear conditioning in mice: a strain comparison and a lesion study." Behavioural brain research **95**: 191-203.
- Gesing, A., A. Bilang-bleuel, et al. (2001). "Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone." The Journal of Neuroscience **21**(13): 4822-4829.
- Gilbert, P. E., R. P. Kesner, et al. (2001). "Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1." Hippocampus **11**: 626-636.
- Golub, Y., S. F. Kaltwasser, et al. (2010). "Reduced hippocampus volume in the mouse model of posttraumatic stress disorder." J Psychiatr res **45**(5): 650-659.
- Gorosito, S. V., A. G. Lorenzo, et al. (2008). "Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons." Neuroscience **154**: 1173-1177.
- Goto, Y., S. Otani, et al. (2007). "The yin and yang of dopamine release: a new perspective." Neuropharmacology **53**: 583-587.
- Gray, J. A. and N. McNaughton (2000). "The Neuropsychology of Anxiety." 2nd ed Oxford: Oxford University Press.
- Griffiths, D., A. Dickinson, et al. (1999). "Episodic memory: what can animals remember about their past?" Trends in cognitive sciences **3**(2): 74-80.
- Groc, L., D. Choquet, et al. (2008). "The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation." Nature neuroscience **11**(8): 868-870.
- Groeneweg, F. L., H. Karst, et al. (2011a). "Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response." Journal of endocrinology **209**: 153-167.

- Groeneweg, F. L., H. Karst, et al. (2011b). "Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling." Molecular and cellular endocrinology.
- Gross, C. M., A. Flubacher, et al. (2012). "Early life stress stimulates hippocampal reelin gene expression in a sex-specific manner: evidence for corticosterone-mediated action." Hippocampus **22**(3): 409-420.
- Hall, G. and M. Symonds (2006). "Overshadowing and latent inhibition of context aversion conditioning in the rat." Auton Neurosci **129**: 42-49.
- Hammes, S. R. and E. R. Levin (2007). "Extranuclear steroid receptors: nature and actions." Endocrinology **28**: 726-741.
- Hammond, G. L., C. L. Smith, et al. (1991). "Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function." J Steroid Biochem Mol Biol **40**: 755-762.
- Hampton, A. N., R. Adolphs, et al. (2007). "Contributions of the amygdala to reward expectancy and choice signals in human prefrontal cortex." Neuron **55**: 545-555.
- Heckers, S. (2001). "Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia." Hippocampus **11**(5): 520-528.
- Heidbreder, C. A. and H. J. Groenewegen (2003). "The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics." Neuroscience biobehavioural review **27**: 555-579.
- Hellal-Levy, C., J. Fagart, et al. (2000). "Mechanistic aspects of mineralocorticoid receptor activation." Kidney International **57**: 1250-1255.
- Herman, J. P., J. M. McKlveen, et al. (2012). "Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms." Brazilian journal of medical and biological research **45**(4): 292-298.
- Hock, B. J. and M. D. Bunsey (1998). "Differential Effects of Dorsal and Ventral Hippocampal Lesions." The Journal of Neuroscience **18**(17): 7027-7032.
- Hu, W., M. Zhang, et al. (2010). "Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network." neuropsychopharmacology **35**(8): 1693-1707.
- Hunsaker, M. R., P. M. Fieldsted, et al. (2008). "Dissociating the roles of dorsal and ventral CA1 for the temporal processing of spatial locations, visual objects and odors." Behavioural neuroscience **122**(3): 643-650.
- Ishikawa, A. and S. Nakamura (2003). "Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat." Journal of neuroscience **23**: 9987-9995.

Ishikawa, A. and S. Nakamura (2006). "Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat." Journal of neurophysiology **96**: 2134-2138.

Ito, T., N. Morita, et al. (2000). "In vitro and in vivo immunocytochemistry for the distribution of mineralocorticoid receptor with the use of specific antibody." Neuroscience Research **37**: 173-182.

Jackson, M. E. and B. Moghaddam (2004). "Stimulus-specific plasticity of prefrontal cortex dopamine neurotransmission." Journal of neurochemistry **88**: 1327-1334.

Jaffard, R. (1994). "Les systèmes de mémoire." In: Les mémoires. Journées internationales sur les sciences cognitives. Orsay (France).

Jaffard, R. and M. Meunier (1993). "Role of the hippocampal formation in learning and memory." Hippocampus **3**: 203-217.

Jarrard, L. E. (1993). "On the role of the hippocampus in learning memory in the rat " Behavioral and Neural Biology **60**: 9-26.

Jerman, T., R. P. Kesner, et al. (2006). "Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task." Learning and memory **13**: 458-464.

Jinks, A. L. and I. S. McGregor. (1997) "Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat." Brain research **772**: 181-190.

Joels, M. (2008). "Functionnal actions of corticosteroids in the hippocampus." European journal of pharmacology **583**: 312-321.

Joels, M. and T. Z. Baram (2009). "The neuro-symphony of stress." Nature reviews neuroscience **10**: 459-466.

Joëls, M., H. Karst, et al. (2007). "The coming out of the brain mineralocorticoid receptor." Trends in neurosciences **31**(1): 1-7.

Joels, M., Z. Pu, et al. (2006). "Learning under stress: how does it work?" Trends cognitive science **10**: 152-158.

Jung, M. W., J. Larson, et al. (1990). "Long-term potentiation of monosynaptic EPSPs in rat piriform cortex in vitro." Synapse **6**: 279-283.

Karazek, R. A. (1979). "Job demands, job decision latitude, and mental strain: Implications for job redesign." Administrative Science Quartely **24**: 285-308.

Karst, H., S. Berger, et al. (2010). "Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone." Proc Natl Acad Sci USA **107**(32): 14449-14454.

Karst, H., S. Berger, et al. (2005). "Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone." PNAS **102**(52): 19204-19207.

- Kenney, J. W., J. D. Raybuck, et al. (2012). "Nicotinic receptors in the dorsal and ventral hippocampus differentially modulate contextual fear conditioning." Hippocampus **8**: 1681-1690.
- Khaksari, M., A. Rasshidy-Pour, et al. (2007). "Central mineralocorticoid receptors are indispensable for corticosterone-induced impairment of memory retrieval in rats." Neuroscience and Biobehavioral Reviews **149**: 729-738.
- Kitchener, P., F. Di Blasi, et al. (2004). "Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and circadian cycle." European journal of neuroscience **19**: 1837-1846.
- Kjelstrup, K. B., T. Solstad, et al. (2008). "Finite Scale of Spatial Representation in the Hippocampus." Science **321**: 140-143.
- Kjelstrup, K. G., F. A. Tuvnes, et al. (2002). "Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 10825-10830.
- Kolber, B. J., L. Wiczorek, et al. (2008). "HPA axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered GR or MR function." Stress **11**(5): 321-338.
- Koob, G. F. (2008). "A role for brain stress systems in addiction." Neurons **59**: 11-34.
- Koob, G. F. and N. D. Volkow (2010). "Neurocircuitry of addiction." Neuropsychopharmacology **35**: 217-238.
- Krugers, H. J., D. N. Alfarez, et al. (2005). "Corticosterone shifts different forms of synaptic potentiation in opposite directions." Hippocampus **15**(6): 697-703.
- Krugers, H. J., C. C. Hoogenraad, et al. (2010). "Stress hormones and AMPA receptor trafficking in synaptic plasticity and memory." Nature review neuroscience **11**: 675-681.
- Lalonde, R. (2002). "The neurobiological basis of spontaneous alternation." Neuroscience and biobehavioral reviews **26**: 91-104.
- Laroche, S., T. M. Jay, et al. (1990). "Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region." Neuroscience Letters **114**: 184-190.
- Lazarus, R. S. (1999). "Stress and emotion : A new synthesis." New York, springer publishing and Co.
- Lee, I., M. R. Hunsaker, et al. (2005). "The role of hippocampal subregions in detecting spatial novelty." Behav. Neurosc **119**: 145-153.
- Leonardo, E. D., J. W. Richardson-Jones, et al. (2006). "Molecular heterogeneity along the dorsal-ventral axis of the murine hippocampal CA1 field: a microarray analysis of gene expression." Neuroscience **1**: 177-186.

- Levine, S.-. (2000). "Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." European journal of pharmacology **405**: 149-160.
- Lightman, S. L. and B. L. Conway-Campbell (2010). "The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration." Nature review neuroscience **11**: 710-718.
- Lightman, S. L., C. C. Wiles, et al. (2008). "The significance of glucocorticoid pulsatility." European journal of pharmacology **583**: 255-262.
- Lorenzini, C. G. A., E. Baldi, et al. (1997). "Role of Ventral hippocampus in Acquisition, consolidation and Retrieval of Rat's passive Avoidance Response Memory trace." Brain research **768**: 242-248.
- Lou, S. J. and Y. Z. Chen (1998). "The rapid inhibitory effect of glucocorticoid on cytosolic free CA²⁺ increment induced by high extracellular K⁺ and its underlying mechanism in PC12 cells." Biochem Biophys Res **244**(2): 403-407.
- Loureiro, M., L. Lecourtier, et al. (2011). "The Ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory." Brain Strucutre Functional.
- Lupien, S. J., F. Maheu, et al. (2007). "the effects of stress and stress hormones on human cognition: implications for field of brain and cognition." Brain and cognition **65**: 209-237.
- Lupien, S. J. and B. S. McEwen (1997). "The acute effects of corticosteroids on cognition: integratio of animal and human model." Brain research reviews **24**: 1-27.
- Lupien, S. J., B. S. McEwen, et al. (2009). "Effects of stress troughout the lifespan on the brain, behaviour or cognition." Nature review neuroscience **10**(6): 434-445.
- Lynch, G., C. S. Rex, et al. (2007). "LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance." Neuropharmacology **52**: 12-23.
- Maggio, N. and M. Segal (2009a). "Differential Corticosteroid Modulation of Inhibitory Synaptic Currents in Dorsal and Ventral Hippocampus." The Journal of Neuroscience **29**(9): 2857-2866.
- Maggio, N. and M. Segal (2009b). "Differential Modulation of Long-Term Depression by Acute Stress in the rat Dorsal and Ventral Hippocampus." The Journal of Neuroscience **29**(27): 8633-8638.
- Maggio, N. and M. Segal (2012). "Steroid modulation of hippocampal plasticity: switching between cognitive and emotionnal memories." Frontiers in cellular neuroscience **6**(12): 1-5.
- Maguire, E. A. (2001). "Neuroimaging studies of autobiographical event memory." Phil. Trans. R. Soc London. B **356**: 1441-1451.
- Maillet, F., H. Qi, et al. (2008). "Protection of stressed-induced impairment of hippocampal/prefrontal LTP through blockade of glucocorticoid receptors. Implication of MEK signaling." Experimental Neurology **211**: 593-596.

- Makara, G. B. and J. Haller (2001). "Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system evidence, mechanisms and implications." Progress in neurobiology **65**: 367-390.
- Maller, J. J., Z. J. Daskalakis, et al. (2007). "Hippocampal volumetrics in depression: the importance of the posterior tail." Hippocampus **17**(11): 1023-1027.
- Martel, G., J. Blanchard, et al. (2007). "Dynamic interplays between memory systems depend on practice: the hippocampus is not always the first to provide solution." Neuroscience **150**: 743-753.
- Martin, S., J. M. Henley, et al. (2009). "Corticosterone Alters AMPAR Mobility and Facilitates Bidirectional Synaptic Plasticity." PLOS one **4**(3): 1-8.
- Mason, J. W., J. V. Brady, et al. (1961). "Patterns of corticosteroid and pepsinogen change related to emotional stress in the monkey." Science **133**: 1596-1598.
- McEown, K. and D. Treit (2009). "The Role of The Dorsal and Ventral Hippocampus in Fear and Memory of a Shock-Probe Experience." Brain research **1251**: 185-194.
- McEown, K. and D. Treit (2010). "Inactivation of the Dorsal or Ventral Hippocampus with Muscimol Differentially Affects Fear and Memory." Brain research **1353**: 145-151.
- McEwen, B. S. (2000). "Effects of adverse experiences for brain structure and function." Biology and psychiatry **48**: 721-731.
- McEwen, B. S., E. A. Gould, et al. (1992). "The vulnerability of the hippocampus to protective and destructive effects of glucocorticoids in relation to stress." Br J psychiatry suppl **15**(18-23).
- McEwen, B. S. and R. M. Sapolsky (1995). "Stress and cognitive function." Current opinion neurobiology **5**: 205-216.
- McGaugh, J. L. and B. Roozendaal (2002). "Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain." Current opinion neurobiology **12**(2): 205-210.
- McHugh, S. B., M. Fillenz, et al. (2011). "Brain Tissue Oxygen Amperometry in Behaving Rats Demonstrates Functional Dissociation of Dorsal and Ventral Hippocampus During Spatial Processing and Anxiety." European Journal of Neuroscience **33**: 322-337.
- Micevych, P. and R. Dominguez (2009). "Membrane estradiol signaling in the brain." Frontiers and neuroendocrinology **30**: 315-327.
- Middei, S., L. Restivo, et al. (2004). "Reversible Inactivation of Hippocampus and Dorsolateral Striatum in C57BL/6 and DBA/2 Inbred Mice Failed to Show Interaction Between Memory Systems in these Genotypes." Behavioural Brain Research **154**: 527-534.
- Minni, A., R. Dorey, et al. (2012). "Critical Role of Plasma Corticosteroid-Binding-Globulin During Stress to Promote Glucocorticoid Delivery to the Brain: Impact on Memory Retrieval." Endocrinology **153**(10).

- Morris, R. G. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." Journal of Neuroscience Methods **11**(1): 47-60.
- Moser, E., M. Moser, et al. (1993). "Spatial learning impairment parallels magnitude of dorsal hippocampal lesions but is hardly present following ventral lesions." Journal of neuroscience **13**: 3916-3925.
- Moser, E., M. Moser, et al. (1995). "Spatial learning with minislab in the dorsal hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 9697-9701.
- Moser, M.B. and E. I. Moser (1998). "Functional Differentiation in the Hippocampus." Hippocampus **8**: 608-619.
- Muller, M. (2003). "Limbic corticotropin-releasing hormone receptor-1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress." nature neuroscience **6**: 1100-1107.
- Muller, M., H. Faber-Zuschratter, et al. (2012). "Synaptology of ventral CA1 and subiculum projections to the basomedial nucleus of the amygdala in the mouse: relation to GABAergic interneurons." Brain struc funct **217**: 5-17.
- Muller, R. (1996). "A quarter of a century of place cells." Neurons **17**: 813-822.
- Myers, B. and B. Greenwood-Van Meerveld (2010). "Elevated corticosterone in the amygdala leads to persistent increases in anxiety-like behavior and pain sensitivity." Behav Brain Res **214**(2): 465-469.
- Nadel, L. and M. Moscovitch (2001). "The Hippocampal Complex and Long-Term Memory Revisited." Trends in Cognitives Sciences **5**(6): 228-230.
- Nyberg, L., A. R. McIntosh, et al. (1998). "Functional brain imaging of episodic and semantic memory with positron emission tomography." J Mol Med **76**(1): 48-53.
- O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." Brain research reviews **34**(1): 171-175.
- O'Keefe, J. and L. Nadel (1978). "The hippocampus as a cognitive map."
- Oei, N. Y. L., B. M. Elzinga, et al. (2007). "Glucocorticoids decrease hippocampal and prefrontal activation during declarative memory retrieval in young men." Brain imaging and behavior **1**: 31-41.
- Oitzl, M. S. and E. R. De Kloet (1992). "Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning." Behav. Neurosc **106**: 62-71.
- Olijslagers, J. E., E. R. deKloet, et al. (2008). "Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors." European Journal of Neuroscience **27**: 2542-2550.

- Orchinik, M., N. Hastings, et al. (1997). "High affinity binding of corticosterone to mammalian neuronal membranes: possible role of corticosteroid binding globulin." Journal of steroid biochemistry **60**: 229-236.
- Orchinik, M., T. F. Murray, et al. (1991). "A corticosteroid receptor in neuronal membranes." Science **252**(5014): 1848-1851.
- Packard, M. G. and B. J. Knowlton (2002). "Learning and memory functions of the Basal Ganglia." Annu Rev Neurosci **25**: 563-593.
- Pandis, C., E. Sotiriou, et al. (2006). "Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus." Neuroscience **140**: 163-175.
- Papez, J. W. (1995). "A proposed mechanism of emotion. 1937." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **7**(1): 103-112.
- Patel, P. D. (1989). "Molecular cloning of a mineralocorticoid (type 1) receptor complementary DNA from rat hippocampus." molecular endocrinology **3**(11): 1877-1885.
- Patel, P. D., M. Katz, et al. (2008). "Stress-induced changes in corticosteroid receptor expression in primate hippocampus and prefrontal cortex." Psychoneuroendocrinology **33**(3): 360-367.
- Phelps, E. A. and J. E. LeDoux (2005). "Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior." Neurons **48**: 175-187.
- Pikkarainen, M., S. Ronkko, et al. (1999). "Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat." J. Comp Neurol. **403**: 229-260.
- Pitkanen, A., M. Pikkarainen, et al. (2000). "Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat." A review. Ann N Y Acad Sci **911**(369-391).
- Ponnusamy, R., A. M. Poulos, et al. (2007). "Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning." neuroscience **147**: 919-927.
- Pothuizen, H. H. J., W.-N. Zhang, et al. (2004). "Dissociation of Function Between the Dorsal and the Ventral Hippocampus in Spatial Learning Abilities of the Rat: a Within-subject, Within-task comparison of Reference and Working Spatial Memory." European Journal of Neuroscience **19**(705-712).
- Poucet, B., C. Thinus-Blanc, et al. (1994). "Place cells in the ventral hippocampus of rats." NeuroReport **5**: 2045-2048.
- Qian, X., S. K. Droste, et al. (2011). "A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress." Endocrinology **152**: 3738-3748.

- Racine, R. J., N. W. Milgram, et al. (1983). "Long-term potentiation phenomena in the rat limbic forebrain." Brain research reviews **260**: 217-231.
- Raggenbass, M. (2008). "Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin." European journal of pharmacology **583**: 243-254.
- Ramon y Cajal, S. (1911). "Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés. Paris : Maloine".
- Raybuck, J. D. and T. J. Gould (2010). "The Role of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus in Trace Fear Conditioning." Neurobiology Learning and Memory **94** (3): 353-363.
- Razandi, M., A. Pedram, et al. (2010). "Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane." Molecular and cell biology **23**: 1633-1646.
- Reul, J. M. H. and E. R. de Kloet (1985). "Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation." Endocrinology **117**(6).
- Revest, J. M., F. Di Blasi, et al. (2005). "The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids." Nature neuroscience **8**: 664-672.
- Ribot, T. (1881). " Les maladies de la mémoire." **Paris : Ballière.**
- Ridley, R. M., J. A. Harder, et al. (1996). "Neurochemical modulation of the hippocampus in learning, remembering and forgetting in primates." Neurodegeneration **5**(4): 467-471.
- Riggins, T., K. Caci, et al. (2012). "Memory ability and hippocampal volume in adolescents with prenatal drug exposure." Neurotoxicology Teratol **34**(4): 434-441.
- Robertson, D. A. F., Beattie, J. E., Reid, I. C. and Balfour, D. J. K. (2005). "Regulation of corticosteroid receptors in the rat brain: the role of serotonin and stress." European Journal of Neuroscience **21**: 1511-1520.
- Rolls, E. T. (2000). "Precis of the brain and emotion." Behavioural brain science **23**(2): 177-191.
- Rolls, E. T., Y. Miyashita, et al. (1989). "Hippocampal neurons in the monkey with activity related to the place in which a stimulus is shown." Journal of neuroscience **9**: 1835-1845.
- Roosendaal, B., J. A. Golier, et al. (2003a). "Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval." Programm neuropsychopharmacology biology psychiatry **27**(8): 1213-1223.
- Roosendaal, B., Q. K. Griffiths, et al. (2002). " The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: Dependence on the basolateral amygdala." PNAS **100**(3): 1328-1333.

Roozendaal, B., A. Hernandez, et al. (2010). "Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification." The journal of neuroscience **30**(14): 5037-5046.

Roozendaal, B., B. S. McEwen, et al. (2009a). "Stress, memory and the amygdala." Nature review neuroscience **10**(6) : 423-433.

Roozendaal, B., J. R. McReynolds, et al. (2009). "Glucocorticoid effects on memory consolidation depend on functional interactions between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala." Journal of neuroscience **29**(45): 14299-14308.

Roozendaal, B., G. L. Quirarte, et al. (1997). "Stress-activated hormonal systems and the regulation of memory storage." Ann NY Acad Sci **21**(821): 247-258.

Roozendaal, B., G. L. Quirarte, et al. (2002). "Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala beta-adrenoceptor--cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation." Eur J Neurosci **15**(3): 553-560.

Roumestan, C., C. Gougat, et al. (2004). "Les glucocorticoides et leur récepteurs : mécanismes d'action et conséquences cliniques." La revue de medecine interne **25**: 636-647.

Rugg, M. D., L. J. Otten, et al. (2002). "The neural basis of episodic memory: evidence from functional neuroimaging." Phil. Trans. R. Soc London. B **357**(1424): 1097-1110.

Sajadi, A. A., S. A. Samaei, et al. (2006). "Intra-hippocampal microinjections of anisomycin did not block glucocorticoid-induced impairment of memory retrieval in rats: an evidence for non-genomic effects of glucocorticoids." Behav Brain Res **173**(1): 158-162.

Sakamoto, T., L. L. Porter, et al. (1987). "Long-lasting potentiation of synaptic potentials in the motor cortex produced by stimulation of the sensory cortex in the cat: a basis of motor learning." Brain research reviews **413**: 360-364.

Sandi, C. and M. T. Pinelo-Nava (2007). "Stress and memory: behavioral effects and neurobiological mechanisms." Neural Plast **2007**: 1-20

Sandi, C. and S. P. Rose (1994). "Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks." Eur J Neurosci **6**(8): 1292-1297.

Sapolsky, R. M. (1996). "Glucocorticoids, stress, and damage to the nervous system: the current state of confusion." Stress **1**(1): 1-19.

Sapolsky, R. M. (1999). "Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging." Experimental gerontology **6**: 721-732.

Sawchenko, P. E., E. R. Brown, et al. (1996). "The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress." Prog Brain res **107**: 201-212.

Sawchenko, P. E., H. Y. Li, et al. (2000). "Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms." Prog Brain res **122**: 61-78.

- Sawyer, K., E. Corsentino, et al. (2012). "Depression, hippocampal volume changes and cognitive decline in a clinical sample of older depressed outpatients and non-depressed controls." Aging mental health **16**(6): 753-762.
- Schacter, D. L., K. A. Norman, et al. (1998). "The cognitive neuroscience of constructive memory." Annual review psychology **49**: 239-318.
- Schulkin, J., M. A. Morgan, et al. (2005). "A neuroendocrine mechanism for sustaining fear." Trends neuroscience **28**: 629-635.
- Schwabe, L., S. Dalm, et al. (2008). "Chronic stress modulates the use of spatial and stimulus-response learning strategies in mice and man." Neurobiology of Learning and Memory **90**: 495-503.
- Schwabe, L. and O. T. Wolf (2011). "Stress-induced modulation of instrumental behavior : from goal-directed to habitual control of action." Behavioral Brain and Research **219**: 321-328.
- Scoville, W. B. and B. Milner (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." European journal of neuroscience **20**: 11-21.
- Segal, M., G. Richter-Levin, et al. (2010). "Stress-Induced Dynamic Routing of Hippocampal Connectivity: A Hypothesis." Hippocampus **0**: 0.
- Selye, H. (1936). "A syndrome produced by diverse noxious agents." Nature **32**: 138-139.
- Siiteri, P. K., J. T. Murai, et al. (1982). "The serum transport of steroid hormones." Recent Prog Horm Res **38**: 457-510.
- Smythe, J. W., D. Murphy, et al. (1997). "Hippocampal mineralocorticoid, but not glucocorticoid, receptors modulate anxiety-like behavior." Pharmacology Biochemistry and Behavior **56**(3): 507-513.
- Souquet, A. M. and M. Fantino (1993). "Stress and dexfenfluramine: effects on the immune response and energy balance in the rat." Pharmacol Biochem Behav **45**: 495-500,.
- Spencer, R. L., P. J. Kim, et al. (1998). "Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity." Endocrinology **139**(6): 2718-2726.
- Squire, L. R. (1992). "Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans." Psychological review **99**(2): 195-231.
- Squire, L. R. and (2004). "Memory systems of the brain: a brief history and current perspective." Neurobiology learning and memory **82**: 171-177.
- Squire, L. R. and S. M. Zola (1996). "Structure and function of declarative and non declarative memory systems." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13515-13522.
- Steckler, T. (2005). "The neuropsychology of stress." Handbook of stress end the brain **15**: 25-42.

- Takahashi, M., J. Lauwereyns, et al. (2009). "Behavioral state-dependent episodic representations in rat CA1 neuronal activity during spatial alternation." Cogn Neurodyn **3**: 165-175.
- Talmi, M., E. Carlier, et al. (1996). "Chronic RU-486 treatment reduces age-related alterations of mouse hippocampal function." Neurobiology of Aging **17**(1): 9-14.
- Tanti, A., Q. Rainer, et al. (2012). "Diferential environmental regulation of neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus." Neuropharmacology **63**: 374-384.
- Tasker, J. G., S. Di, et al. (2006). "Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors." Endocrinology **147**(12): 5549-5556.
- Tehovnik, E. J. and M. A. Sommer (1997). "Effective Spread and Timecourse of Neural Inactivation Caused by Lidocaine Injection in Monkey Cerebral Cortex." Journal of Neuroscience Methods **74**: 17-26.
- Tischler, L., S. R. Brand, et al. (2006). "The relationships between hippocampal volume and declarative memory in population of combat veterans with and without PTSD." Annals of the New York Academy of Sciences **1071**: 405-409.
- Tolman, E. C. (1948). "Cognitive map in rats and man." Psychological review **55**(189-208).
- Trivedi, A. M. and G. D. Cover (2004). "Lesions of ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze." Neurobiology learning and memory **81**: 172-184.
- Tronche, C., P. Lestage, et al. (2010). "Pharmacological modulation of contextual "episodic-like" memory in aged mice." Behavioural brain research: 1-6.
- Tulving, E. (1972). "Episodic and semantic memory." NY USA: academic press.
- Tulving, E. (1995). "Organization of memory: Quo vadis? In: Gazzaniga MS, ed." The cognitive neurosciences. Cambridge, MA: MIT Press: 839-847.
- Tulving, E. and H. J. Markowitsch (1997). "Memory beyond the hippocampus." Current Opinion in Neurobiology **7**: 209-216.
- Tulving, E. and H. J. Markowitsch (1998). "Episodic and Declarative Memory: Role of the Hippocampus." Hippocampus **8**: 194-204.
- Uno, M. and N. Ozawa (1991). "Long-term potentiation of the amygdalo-striatal synaptic transmission in the course of development of amygdaloid kindling in cats. ." Neurosci Res **12**: 251-262
- Valentino, R. J. and E. Van Bockstaele (2008). "Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptative response to stress." European journal of pharmacology **583**: 194-203.

- van Eekelen, J. A., N. Y. Rots, et al. (1991). "Brain corticosteroid receptor gene expression and neuroendocrine dynamics during aging." The journal of steroid biochemistry and molecular biology **40**(4-6): 679-683.
- van Eekelen, J. A. M. and E. R. de Kloet (1992). " Co-localisation of brain corticosteroid receptors in the rat hippocampus." Progress in histochemistry and cytochemistry **26**: 250-257.
- van Eekelen, J. A. M., W. Jiang, et al. (1988). "Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus." Journal of Neuroscience Research **21**: 88-94.
- van Steensel, B., E. P. van Binnendijk, et al. (1996). "partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons." Journal of cell science **109**: 787-792.
- van Steensel, B., E. P. van Binnendijk, et al. (1996). "Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons." Journal of Cell Science **109**: 787-792.
- Vargha-Khadem, F., D. G. Gadian, et al. (1997). "Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory." Science **277**: 376-380.
- Venero, C. and J. Borell (1999). "Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus : a microdialysis study in freely moving rats " European journal of neuroscience **11**: 2465-2473.
- Vertes, R. P. (2004). "Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat." Synapse **51**: 32-58.
- Vertes, R. P. (2006). "Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in rat." Neuroscience **142**: 1-20.
- Viengchareun, S., D. L.-. Menuet, et al. (2005). "The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (path)physiological biology." Nuclear receptor signaling **5**: 1-16.
- Voronin, L. L., A. V. Bashkis, et al. (1984). "Prolonged potentiation of responses of the neocortex of the intact brain and in vitro cortical slices." Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova **70**(1167-1177).
- Vouimba, R. M. et Maroun, M. (2011) "Learning-induced changes in mPFC-BLA connections after fear conditioning, extinction, and reinstatement of fear." Neuropsychopharmacology. **36** (11):2276-85
- Vythilingam, M., E. Vermetten, et al. (2004). "Hippocampal volume, memory and cortisol satus in major depressive disorder: Effect of treatment." Biological psychiatry **56**(2): 101-112.
- Wallis, J. D. (2007). "Neuronal mechanisms in prefrontal cortex underlying adaptive choice behavior." Annals of the New York Academy of Sciences.

- Wang, C. C. and S. J. Wang (2009). "Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals." Synapse **63**(9): 745-751.
- Wang, H. L., M. J. Wayner, et al. (1998). "corticotrophin-releasing factor produces a long lasting enhancement of synaptic efficacy in the hippocampus." European journal of pharmacology **10**: 3428-3437.
- Wheeler, M. A., D. T. Stuss, et al. (1997). "Toward a theory of episodic memory: the frontal lobes and auto-noetic consciousness." Psychol bull **121**(3): 331-354.
- White, N. M. and R. J. McDonald (2002). "Multiple parallel memory systems in the brain of the rat." Neurobiology learning and memory **77**: 125-184.
- Wiltgen, B. J., M. Zhou, et al. (2010). "The Hippocampus Plays a Selective Role in the Retrieval of Detailed Contextual Memory." Current Biology **20**(1336-1344).
- Windle, R. J., S. A. Wood, et al. (1998a). "The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses." Endocrinology **139**: 4044-4052.
- Windle, R. J., S. A. Wood, et al. (1998b). "Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress." Endocrinology **139**: 443-450
- Wolf, O. T. (2009). "Stress and memory in humans: Twelve years of progress?" Brain research **1293**: 142-154.
- Wolf, O. T., A. Convit, et al. (2001). "Cortisol differentially affects memory in young and elderly men." Behaviour neuroscience **105**: 1002-1011.
- Woon, F. L., S. Sood, et al. (2010). "Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis." Program of neuropsychopharmacology biology and Psychiatry **34**(7): 1181-1188.
- Xiao, L., A. Qi, et al. (2005). "Cultured embryonic hippocampal neurons deficient in glucocorticoid (GC) receptor: a novel model for studying nongenomic effects of GC in the neural system. ." Endocrinology **146**: 4036-4041.
- Yang, C. H., C. C. Huang, et al. (2005). "Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake." J Neurosci **25**(17): 4288-4293.
- Yau, J. L. and J. R. Seckl (2012). "Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory." Front Aging Neurosc **4**(24).
- Zhe, D., H. Fang, et al. (2008). "Expressions of hippocampal mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid receptor (GR) in the single-prolonged stress-rats." Acta histochemical and cytochemistry **41**(8): 89-95.

Zhou, J., J. A. Cidlowski, et al. (2005). "The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses." Steroids **70**: 407-417.

Zhou, M., M. Kindt, et al. (2010). "Blocking mineralocorticoid receptors prior to retrieval reduces contextual fear memory in mice." PLOS one **6**(10): 1-9.

