



HAL
open science

Rôle d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans les processus de mémoire spatiale chez le rat

Thibault Cholvin

► **To cite this version:**

Thibault Cholvin. Rôle d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans les processus de mémoire spatiale chez le rat. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ044 . tel-01239312

HAL Id: tel-01239312

<https://theses.hal.science/tel-01239312v1>

Submitted on 7 Dec 2015

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.

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

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives

THÈSE présentée par :

Thibault CHOLVIN

soutenue le : **22 septembre 2014**

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

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

Rôle d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans les processus de mémoire spatiale chez le Rat

THÈSE dirigée par :

Mme PEREIRA DE VASCONCELOS Anne

Chercheur (HDR), université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mr POUCKET Bruno

Mr ROULLET Pascal

Directeur de recherche, université d'Aix-Marseille

Professeur, université Paul Sabatier - Toulouse

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mr VEINANTE Pierre

Professeur, université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du comité d'examen de ma thèse, le Dr. Bruno Poucet, le Pr. Pascal Rouillet et le Pr. Pierre Veinante : merci pour le temps que vous prendrez à lire et examiner mes travaux.

Je remercie le Dr. Christian Kelche, directeur du LINC et doyen de la Faculté de Psychologie, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Merci au Dr. Jean-Christophe Cassel de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire (LNCA). Merci pour tout ce que j'ai pu apprendre grâce à toi, que ce soit en matière de science, d'écriture et de publication, de tronçonneuse ou de Laguiole (*liste non exhaustive*).

Merci à Anne Pereira De Vasconcelos, ma directrice de thèse. Merci de ta disponibilité, de m'avoir fait confiance, d'être toujours de bonne humeur et motivée, quoi qu'il arrive, en toutes circonstances. Merci aussi d'avoir su me mettre sur la bonne voie quand je ne savais plus quoi faire ou écrire, d'avoir pris autant de temps et d'énergie pour encadrer ma thèse. J'ai beaucoup de chance de t'avoir eu comme directrice.

Merci à Michael Loureiro, qui m'a transmis de nombreuses connaissances aussi bien techniques que théoriques lors de mon arrivée au labo et a fortement contribué à ma formation au cours de cette thèse.

Merci beaucoup à Brigitte Cosquer et Karin Geiger pour leur aide précieuse durant toute ma thèse. Vous savez faire et transmettre ce savoir-faire, j'espère me rappeler longtemps de tout ce que vous m'avez appris.

Merci à mes collègues de bureau, Mathieu, Fanny, Mohamad, pour les bons moments passés ensemble, pour les coups de main opportuns, et nos grandes discussions sur la vie, l'univers et le reste. Et les manip' et l'après-thèse surtout, ok, j'avoue.

Je remercie l'ensemble des statutaires, étudiants et personnels du LNCA pour les discussions et échanges que nous avons pu avoir. Des petits riens qui, mis bout à bout, font beaucoup, pour ce qu'ils m'ont appris, mais aussi pour l'ambiance au labo et le plaisir d'en faire partie.

Je remercie ma famille, de m'avoir permis d'accéder aux études supérieures, de les avoir financées, et d'avoir toujours cru en moi, souvent plus que moi-même. Merci à mes amis, et en particulier Dorian et Audrey, qui même s'ils ne comprennent pas toujours bien ce que je fais (soyons honnêtes), ont été là pour moi au cours de ces trois années de thèse.

Et surtout, avant tout, merci à Phette.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
1. CADRE GENERAL DE LA THESE.....	1
2. OBJECTIFS DE LA THESE	3
3. STRUCTURE DE LA THESE.....	4
CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	5
1. CHAPITRE 1 : LA MEMOIRE ET LES SYSTEMES DE MEMOIRE	5
1.1. La mémoire : définition générale	5
1.2. Les différents systèmes de mémoire.....	5
1.3. La mémoire à long terme et ses sous-systèmes.....	7
1.3.1. La mémoire à long terme et ses sous-systèmes.....	7
1.3.2. Modèle d'organisation hiérarchique des systèmes de mémoire à long terme	8
1.3.3. La mémoire déclarative et ses sous-systèmes	9
1.3.4. La mémoire non-déclarative et ses sous-systèmes.....	10
1.3.5. Le modèle MNESIS.....	10
1.3.6. La mémoire spatiale au sein des sous-systèmes de mémoire à long terme...	12
2. CHAPITRE 2 : LA COGNITION SPATIALE	13
2.1. La mémoire spatiale : définition générale.....	13
2.2. Le codage des informations spatiales.....	14
2.2.1. Représentations allocentrique et égocentrique de l'environnement.....	14
2.2.2. Mémoire spatiale de référence et mémoire spatiale de travail	16
2.3. La flexibilité comportementale : du bon usage des informations contextuelles	17
2.3.1. La flexibilité comportementale : définition	17
2.3.2. La flexibilité mentale chez l'Homme	17
2.3.3. La flexibilité comportementale chez le Rongeur.....	18
2.4. Evaluation de la mémoire spatiale et de la flexibilité comportementale (Rat)	20
2.4.1. Le test de la piscine de Morris.....	21
2.4.2. Le test du labyrinthe en Double-H.....	23
3. CHAPITRE 3 : LE CIRCUIT HIPPOCAMPO-CORTICO-THALAMIQUE COMPRENANT LES NOYAUX	
VENTRAUX DE LA LIGNE MEDIANE DU THALAMUS.....	25
3.1. L'hippocampe	25
3.1.1. Description anatomique	25
3.1.2. Cytoarchitecture	26
3.1.3. Connexions	27
3.1.4. Implication dans les processus cognitifs et mnésiques.....	29
3.1.5. Le codage neuronal de l'environnement : rôle de la région hippocampique.	29
3.1.6. Lobe temporal médian, mémoire déclarative et mémoire spatiale : vers un	
modèle unifié des mécanismes neuronaux sous-jacents ?.....	31

3.2. Le cortex préfrontal médian	32
3.2.1. Description anatomique	32
3.2.2. Connexions	34
3.2.3. Implication dans les processus cognitifs et mnésiques.....	35
3.3. Les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus : les noyaux Reuniens (Re) et Rhomboïde (Rh).....	35
3.3.1. Description anatomique	37
3.3.2. Neurotransmission	38
3.3.3. Connexions	38
3.3.4. Modulation de l'activité corticale et hippocampique par les noyaux ReRh ...	44
3.3.5. Implication des noyaux ReRh dans les processus cognitifs et mnésiques	49
4. CHAPITRE 4 : LA CONSOLIDATION AU NIVEAU DES SYSTEMES	58
4.1. Généralités.....	58
4.2. La consolidation synaptique	59
4.3. La consolidation systémique	61
4.3.1. Données ayant permis l'émergence du concept de consolidation systémique : le gradient de Ribot et l'amnésie temporellement graduée du patient HM ..	61
4.3.2. La théorie standard de la consolidation systémique.....	62
4.3.3. La théorie des traces multiples.....	63
4.3.4. Le rôle prépondérant du mPFC dans le rappel d'une mémoire ancienne : propositions de Frankland et Bontempi, 2005	66
4.3.5. Le rôle prépondérant du mPFC dans le rappel d'une mémoire ancienne : propositions de Rudy et collaborateurs, 2005	68
4.3.6. La théorie de l'index hippocampique	69
4.3.7. La théorie des schémas	72
4.3.8. Consolidation vs. reconsolidation.....	74
4.3.9. La théorie de la transformation.....	77
4.3.10. La théorie du tagging et de la capture synaptique	80
4.3.11. Sommeil et consolidation mnésique.....	84
MATERIELS ET METHODES	88
1. ANIMAUX.....	88
2. INTERVENTIONS CHIRURGICALES	88
2.1. Lésions excitotoxiques	89
2.1.1. Principe	89
2.1.2. Protocole expérimental	90
2.2. Inactivations fonctionnelles réversibles	92
2.2.1. Implantation des guide-canules	92
2.2.2. Composés pharmacologiques.....	94
2.2.3. Protocole expérimental	95

3. EVALUATIONS COMPORTEMENTALES	97
3.1. Généralités.....	97
3.2. La piscine de Morris.....	98
3.2.1. Dispositif.....	98
3.2.2. Tâche comportementale	99
3.2.3. Phase d'acquisition	100
3.2.4. Test de rétention	101
3.3. Le Double-H	102
3.3.1. Dispositif.....	102
3.3.2. Tâche comportementale	103
3.3.3. Phase d'acquisition	103
3.3.4. Test de rétention	103
3.4. Le labyrinthe en croix surélevé.....	107
3.4.1. Dispositif.....	107
3.4.2. Tâche comportementale	108
3.4.3. Protocole expérimental	108
3.5. Le champ ouvert.....	108
3.5.1. Dispositif.....	108
3.5.2. Tâche comportementale	109
3.5.3. Protocole expérimental	109
3.6. L'actographie en cage d'élevage	110
3.6.1. Dispositif.....	110
3.6.2. Protocole expérimental	111
4. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES	111
4.1. Mise à mort des animaux et prélèvement des cerveaux	111
4.2. Cryostat : coupes coronales.....	111
4.3. Coloration au violet de Crésyl.....	112
4.4. Evaluation de la diffusion de la lidocaïne et du muscimol	112
4.4.1. De la nécessité d'évaluer la diffusion des composés instillés	112
4.4.2. Protocole.....	113
4.5. Evaluation de l'étendue des lésions des noyaux ReRh du thalamus :	
immunohistochimie de la protéine NeuN	113
4.5.1. Principe	113
4.5.2. Protocole immunohistochimique	114
4.5.3. Estimation de l'étendue des lésions	115
4.6. Evaluation de l'activité neuronale : immunohistochimie de la protéine c-Fos.....	115
4.6.1. Principe	115
4.6.2. Protocole immunohistochimique	117
5. EVALUATION DE L'ACTIVITE C-FOS : L'APPROCHE STEREOLOGIQUE	118
5.1. Principe	118

5.2. Echantillonnage et outils de mesure (dissecteur optique) non-biaisés et précision de l'estimation stéréologique.....	119
5.3. La station d'imagerie	123
5.4. Protocole expérimental (logiciel Mercator)	125
CONTRIBUTION EXPERIMENTALE	128
<u>PUBLICATION 1</u> : IMPLICATION DES NOYAUX VENTRAUX DE LA LIGNE MEDIANE DU THALAMUS (NOYAUX REUNIENS ET RHOMBOÏDE) DANS LA PERSISTANCE D'UNE MEMOIRE SPATIALE CHEZ LE RAT	128
<u>PUBLICATION 2</u> : LES NOYAUX VENTRAUX DE LA LIGNE MEDIANE DU THALAMUS CONTRIBUENT AU CHANGEMENT DE STRATEGIE DANS UNE TACHE MNESIQUE NECESSITANT A LA FOIS LE CORTEX PREFRONTAL ET L'HIPPOCAMPE.....	142
<u>PUBLICATION 3</u> : L'HIPPOCAMPE DORSAL ET LE CORTEX PREFRONTAL MEDIAN CONTRIBUENT TOUS DEUX AU RAPPEL D'UNE MEMOIRE RECENTE CHEZ LE RAT	155
<u>PUBLICATION 4</u> : L'ACTIVATION DU CORTEX PREFRONTAL MEDIAN DURANT LE RAPPEL D'UNE MEMOIRE ANCIENNE DEPEND DES NOYAUX RERH DU THALAMUS.....	178
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	207
DISCUSSION GENERALE	207
1. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES : L'INACTIVATION FONCTIONNELLE REVERSIBLE .	208
2. ROLE DES NOYAUX RERH DANS LA PERSISTANCE D'UNE MEMOIRE SPATIALE	214
2.1. APPROCHE COMPORTEMENTALE	214
2.2. APPROCHE EN IMAGERIE FONCTIONNELLE : MODULATION DE L'ACTIVITE DE L'HIP ET DU MPFC PAR LES NOYAUX RERH.....	217
3. ROLE DES NOYAUX RERH DANS LA FLEXIBILITE COMPORTEMENTALE	222
4. ROLE DU MPFC ET DE SES SOUS-REGIONS (IL, PL, ACC) DANS LE RAPPEL D'UNE MEMOIRE DECLARATIVE(-LIKE) RECENTE / ANCIENNE	225
4.1. MPFC ET RAPPEL D'UNE MEMOIRE DECLARATIVE(-LIKE)	225
4.2. ROLE DIFFERENTIEL DES SOUS-REGIONS DU MPFC DANS LA CONSOLIDATION ET LE RAPPEL D'UNE MEMOIRE DECLARATIVE(-LIKE) ?	227
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	231
ANNEXES	235
<u>PUBLICATION 5</u> : LES NOYAUX REUNIENS ET RHOMBOÏDE : NEUROANATOMIE, CARACTERISTIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS COMPORTEMENTALES..	235
BIBLIOGRAPHIE	255

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LA MEMOIRE ET LES SYSTEMES DE MEMOIRE

Figure 1 : Le patient H.M.....	8
Figure 2 : Modèle d'organisation hiérarchique des sous-systèmes de mémoire à long terme.....	9
Figure 3 : Le modèle MNESIS	11

CHAPITRE 2 : LA COGNITION SPATIALE

Figure 4 : Codages égocentrique et allocentrique de l'environnement spatial.....	14
Figure 5 : Le <i>Wisconsin Card Sorting Test</i>	18
Figure 6 : Flexibilité mentale dans le labyrinthe en T	19
Figure 7 : Labyrinthes aquatiques de la piscine de Morris et du Double-H	21

CHAPITRE 3 : LE CIRCUIT HIPPOCAMPO-CORTICO-THALAMIQUE

Figure 8 : L'hippocampe chez l'Homme et le Rat.....	26
Figure 9 : Principales connexions intrinsèques et extrinsèques de l'hippocampe.	28
Figure 10 : Champs d'activité des cellules de lieu et des cellules de grille	30
Figure 11 : Comparaison de l'anatomie du cortex frontal chez l'Homme, le Macaque et le Rat	33
Figure 12 : Organisation neuroanatomique des noyaux de la ligne médiane du thalamus (Rat)	37
Figure 13 : Afférences du noyau reuniens (Re) du thalamus.....	39
Figure 14 : Afférences du noyau rhomboïde (Rh) du thalamus.....	40
Figure 15 : Efférences du noyau reuniens (Re) du thalamus	42
Figure 16 : Efférences du noyau rhomboïde (Rh) du thalamus	43
Figure 17 : Projections des noyaux ReRh sur l'hippocampe et le cortex préfrontal médian.....	44
Figure 18 : Modèle de connexion entre le noyau Re et l'hippocampe	47
Figure 19 : Circuit hippocampo-thalamo-cortical	49
Figure 20 : Mémoire spatiale de travail dans le labyrinthe radial à 8 branches	55

CHAPITRE 4 : LA CONSOLIDATION AU NIVEAU DES SYSTEMES

Figure 21 : Décours temporels des consolidations synaptique et systémique.....	58
Figure 22 : Modèle standard de la consolidation synaptique.....	60
Figure 23 : Théorie standard de la consolidation systémique	62
Figure 24 : Théorie des traces multiples	64
Figure 25 : Activité cérébrale au cours du rappel d'une mémoire ancienne chez la Souris	66
Figure 26 : Propositions de Frankland et Bontempi concernant le rôle du PFC lors du rappel	67
Figure 27 : Propositions de Rudy et collaborateurs concernant le rôle du PFC lors du rappel	68
Figure 28 : Théorie de l'index hippocampique.....	70
Figure 29 : Modèle de la reconsolidation de Lewis.....	74

Figure 30 : Devenir d'une trace mnésique rappelée.....	76
Figure 31 : La théorie du tagging et de la capture synaptiques	81
Figure 32 : Rôle du sommeil dans la consolidation systémique	85

Matériels et méthodes

Figure 33 : Le Rat Long Evans	88
Figure 34 : Le récepteur NMDA.....	89
Figure 35 : Chirurgie stéréotaxique : lésions excitotoxiques des noyaux ReRh du thalamus.....	91
Figure 36 : Coordonnées stéréotaxiques pour l'implantation de guide-canules.....	92
Figure 37 : Dispositif d'instillation intracérébrale utilisé pour l'inactivation transitoire	93
Figure 38 : Sites d'implantation des guide-canules dans l'Hip, le mPFC et les noyaux ReRh	94
Figure 39 : Procédure de contention permettant l'instillation intracrânienne chez le Rat	97
Figure 40 : La piscine de Morris	99
Figure 41 : Protocole de la piscine de Morris.....	101
Figure 42 : Le labyrinthe en Double-H	102
Figure 43 : Protocole du labyrinthe en Double-H : l'acquisition	104
Figure 44 : Protocole du labyrinthe en Double-H : le test de rétention	106
Figure 45 : Le labyrinthe en croix surélevé	107
Figure 46 : Le champ ouvert.....	109
Figure 47 : L'actographie en cage d'élevage	110
Figure 48 : Comparaison entre une coloration au violet de Crésyl et un immunomarquage NeuN ..	114
Figure 49 : Evènements intracellulaires aboutissant à l'expression de gènes précoces tels c-fos	116
Figure 50 : Transformation 3D->2D et l'approche stéréologique	119
Figure 51 : Préparation du tissu cérébral pour un comptage stéréologique	120
Figure 52 : Les dissecteurs	121
Figure 53 : Le dissecteur et les zones de « sécurité »	121
Figure 54 : Station d'imagerie stéréologique Explora Nova au LNCA	123
Figure 55 : L'interface du logiciel Mercator - onglet stéréologie.....	124
Figure 56 : 3 étapes du comptage stéréologique à l'aide du logiciel Mercator.....	125
Figure 57 : Les règles de comptage stéréologique.....	126
Figure 58 : La navigation et le comptage dans le plan Z	127

Discussion générale

Figure 59 : Modèle de la consolidation d'une mémoire déclarative basé sur les propriétés anatomo-fonctionnelles d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique centré sur les noyaux ReRh et ILN.....	218
--	-----

ABREVIATIONS

ACC	Cortex Cingulaire Antérieur
AGm	Cortex AGranulaire Médian
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMv	Noyaux AntéroMédians Ventraux du thalamus
AP	Antéro-Postérieur
CA	Corne d'Ammon
CE	Coefficient d'Erreur
DG	Gyrus Denté
DH	Labyrinthe du Double-H
dHip	Hippocampe dorsal
DV	Dorso-Ventral
H.M.	Henry Molaison
Hip	hippocampe
IL	Cortex Infralimbique
ILN	Noyaux IntraLaminaires du thalamus
LIDO	Lidocaïne
LTM	Lobe(s) Temporal(aux) Médian(s)
LTP	Potentialisation à Long terme
MCT	Mémoire à Court-Terme
MD	Noyaux Médio-Dorsaux du thalamus
MDT	Mémoire De Travail
ML	Médio-Latéral
MLT	Mémoire à Long terme
MNESIS	Modèle NéoStructural InterSystémique
mPFC	Cortex PréFrontal Médian
MSCI	Muscimol
MWM	Piscine de Morris (<i>Morris Water Maze</i>)
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
OFC	Cortex Orbito-Frontal
PBS	Tampon Phosphate Salin (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFC	Cortex Préfrontal
PL	Cortex Prélimbique
pRe	noyau périReuniens
PRPs	Protéines/produits liés à la plasticité (<i>Plasticity-Related Proteins/products</i>)
Re	Noyau Reuniens du thalamus
REM	Sommeil paradoxal (<i>Rapid Eye Movement</i>)
Rh	Noyau Rhomboïde du thalamus
SPI	(Modèle) Sériel, Parallèle, Indépendant
SWS	Sommeil à ondes lentes (<i>Slow-Wave Sleep</i>)
TCS	Théorie du <i>Tagging</i> et de la Capture Synaptiques
vHip	Hippocampe ventral
WCST	Wisconsin Card Sorting Test

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS :

1. Loureiro M, **Cholvin T**, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC & Pereira de Vasconcelos A. The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *Journal of Neuroscience*, **2012**, 32(29):9947-59.
2. **Cholvin T**, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A & Cassel JC. The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. *Journal of Neuroscience*, **2013**, 33(20):8772-83.
3. **Cholvin T**, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC & Pereira de Vasconcelos A. Dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex each contribute to the retrieval of a recent spatial memory in rats. *En révision pour Brain Structure and Function*.
4. **Cholvin T**, Cosquer B, Bergmann V, Humo M, Kelche C, Jean-Christophe Cassel, Anne Pereira de Vasconcelos. Activation of the medial prefrontal cortex during remote memory retrieval depends on the nucleus reuniens. *En préparation*.
5. Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A, Loureiro M, **Cholvin T**, Dalrymple-Alford JC, Vertes RP. The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Progress in Neurobiology*, **2013**, 111:34-52.

POSTERS :

Cholvin T, Cassel R, Loureiro M, Lecourtier L, Pereira de Vasconcelos A & Cassel JC. Ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei, ReRh) and spatial cognition in rats. *Neurex annual meeting*, Strasbourg, 25/10/2012.

Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Pereira de Vasconcelos A & Cassel JC. The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to Strategy-Shifting in a Memory Task engaging Cortico-Hippocampal Interactions. *11^e meeting de la société française des neurosciences*, Lyon, 22-24/05/2013.

Cholvin T, Loureiro M, Lopez J, Wolff M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, Bontempi B, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, Dalrymple-Alford J & Cassel JC. The non-specific thalamus and spatial memory persistence. *Neurex meeting "the cognitive thalamus"*, Strasbourg, 09/12/13.

Cassel JC, **Cholvin T**, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A. Medial prefrontal cortex inactivation disrupts recent spatial memory retrieval in the water maze: art, fact or artefact? *11^e meeting de la société française des neurosciences*, Lyon, 22-24/05/2013.

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

1. CADRE GENERAL DE LA THESE

La mémoire se définit comme la capacité d'enregistrer, stocker et restituer les expériences passées et les informations que nous percevons. Elle nous permet de retenir ces informations et de les utiliser pour adapter notre comportement à notre environnement, façonnant ainsi notre identité. Ceci se fait en trois principales étapes que sont l'encodage, la consolidation et le rappel. La mémoire à long terme, qui est le sujet de ma thèse, se divise en mémoire déclarative (qui concerne les données qu'un individu peut faire émerger consciemment, puis exprimer par le langage) et non-déclarative (principalement la mémoire procédurale, ou mémoire des habiletés motrices, ne nécessitant pas un rappel conscient). Le cas du patient H.M. fut, en 1953, à l'origine de cette distinction : à la suite de l'ablation des deux hippocampes et des tissus avoisinants des lobes temporaux (intervention chirurgicale menée dans le but de le soustraire à de fréquentes crises d'épilepsie), il se mit à souffrir d'amnésie antérograde (impossibilité de former de nouveaux souvenirs) et d'amnésie rétrograde (oubli des souvenirs encodés avant l'opération). Un aspect singulier de ce cas clinique était la préservation de la mémoire procédurale du patient, toujours capable d'acquérir de nouvelles habiletés motrices malgré l'absence de rétention de souvenirs conscients au-delà de 20 sec (Scoville et Milner, 1957). A partir de ce moment, de nombreuses études en neuropsychologie et en imagerie cérébrale ont clairement montré que l'intégrité des lobes temporaux médians, et en particulier de l'hippocampe, est nécessaire au bon fonctionnement de la mémoire déclarative chez l'Homme (e.g. Spiers et al. 2001, Squire et al. 2004). Néanmoins, l'atteinte d'autres structures cérébrales, et en particulier du cortex préfrontal et/ou du thalamus, peut aussi être à l'origine de troubles de la mémoire. Les déficits mnésiques consécutifs à l'atteinte du cortex préfrontal ont longtemps été ignorés en raison de la présence conjointe d'autres symptômes plus saillants (désinhibition, impulsivité, désorganisation). Pourtant, les patients souffrant de lésions du cortex préfrontal présentent de déficits de mémoire déclarative, et cette structure est notamment fortement impliquée dans le rappel d'une mémoire ancienne (rev. Frankland et Bontempi 2005, Euston et al. 2012) ou d'une mémoire mettant en jeu une flexibilité comportementale (Floresco et al. 2008, Bissonnette et al. 2013). En effet, dans le cadre de la

consolidation de nos souvenirs, l'hippocampe, dépositaire initial de la trace mnésique, est en relation étroite avec le cortex, notamment le cortex préfrontal médian (mPFC), où la trace en mémoire va se stabiliser et être stockée durablement. Ce phénomène, appelé « consolidation au niveau des systèmes », nécessite une réorganisation progressive des circuits neuronaux au travers d'un dialogue hippocampo-cortical à la base de la persistance de nos souvenirs pendant des semaines, des mois, des années. Le cortex préfrontal et les lobes temporaux médians apparaissent ainsi comme des éléments essentiels d'un réseau distribué de structures impliquées dans la mémoire et dans l'utilisation optimale de l'information mnésique au cours du rappel.

Des lésions diencephaliques (exemples : syndrome de Korsakoff, tumeur, infarctus ou traumatisme affectant le thalamus) peuvent également entraîner des déficits mnésiques aux caractéristiques comparables à celles des amnésies de type hippocampique (rev. Van der Werf et al. 2003a). Sur le plan clinique, l'identification des substrats neuroanatomiques impliqués dans les amnésies diencephaliques est difficile en raison du nombre important de noyaux thalamiques généralement atteints, et de la fréquente co-occurrence de dommages extra-thalamiques (Van Der Werf et al. 2000 ; Carlesimo et al. 2011). Si le rôle du thalamus dans la mémoire déclarative est ainsi admis, les processus mnésiques concernés et l'implication précise de chaque noyau thalamique ne sont pas encore totalement élucidés.

Ma thèse se situe dans le cadre de l'étude du traitement de l'information mnésique chez le Rat. Dans le contexte des interactions hippocampo-corticales (mPFC) nécessaires à la formation d'une mémoire à long terme, des données anatomo-fonctionnelles ont permis de montrer qu'il existe une voie monosynaptique directe de l'hippocampe vers le mPFC, projection dont le rôle dans l'acquisition d'une mémoire a été démontré, mais il n'existe aucune connexion directe en retour (Jones et Wilson, 2005 ; Paz et al. 2008). L'existence d'au moins une voie indirecte apparaît donc comme une nécessité, et le thalamus comme une structure susceptible de contribuer au fonctionnement de ce réseau. En effet, les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) de la ligne médiane du thalamus sont fortement connectés à la fois à l'hippocampe et au mPFC, et ce de manière réciproque ; ils occupent une position neuroanatomique privilégiée permettant la convergence de multiples informations, corticales et sous-corticales (McKenna et Vertes, 2004). Le noyau reuniens (Re) est notamment à l'origine de la principale voie de sortie thalamique excitatrice vers la région

CA1 de l'hippocampe, le subiculum et le cortex entorhinal (Dolleman-Van der Weel et al. 1997 ; Bertram et Zhang, 1999). Il semble également capable d'exercer une action excitatrice à la fois sur le cortex préfrontal médian et l'hippocampe, se situant ainsi dans une position neuroanatomique idéale pour influencer ou coordonner l'activité de ces deux structures (Di Prisco et Vertes, 2006). Des données anatomiques et électrophysiologiques convergent ainsi vers la possibilité que les noyaux ReRh puissent jouer un rôle majeur dans l'un et/ou l'autre des processus mnésiques (encodage, consolidation et rappel) à l'œuvre dans la formation ou le rappel d'une mémoire à long terme en constituant une étape critique d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique. Mon travail de thèse a été essentiellement focalisé sur l'étude de ce circuit et la mise en évidence de la contribution des structures cérébrales le composant dans la consolidation et le rappel d'un souvenir spatial chez le Rat.

2. OBJECTIFS DE LA THESE

Cette thèse avait pour objectif l'étude du rôle possible des noyaux ReRh au sein d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique impliqué dans la consolidation et le rappel d'une mémoire spatiale récente ou ancienne chez le rat, ainsi que dans la flexibilité comportementale (c'est-à-dire les capacités d'adaptation à des modifications de l'environnement), à l'aide d'approches comportementales et anatomo-fonctionnelles. D'un point de vue comportemental, la mémoire spatiale a été étudiée dans le test de la piscine de Morris (labyrinthe aquatique circulaire) et celui du Double-H (labyrinthe aquatique dont la forme, vue du dessus, correspond à celle de 2 H contigus). La piscine de Morris est particulièrement adaptée à l'étude de la mémoire spatiale à long terme (mémoire de référence ; Morris, 1984 ; rev. Morellini, 2013), tandis que le test du Double-H permet notamment d'évaluer la flexibilité comportementale (Pol Bodetto et al. 2011 ; Cassel et al. 2012). Les approches expérimentales mises en œuvre comprennent la lésion excitotoxique (irréversible), l'inactivation fonctionnelle transitoire (réversible), et l'imagerie du gène précoce *c-fos* dans les structures d'intérêt que sont les noyaux ReRh, l'hippocampe et le mPFC. D'un point de vue fonctionnel, l'imagerie du gène précoce *c-fos*, dont l'expression est induite par l'activité neuronale, permet d'étudier l'implication d'une région cérébrale dans un processus donné. Le rôle des noyaux ReRh dans des processus non-mnésiques pouvant influencer la performance dans les tests de mémoire spatiale précédemment cités a également été évalué à l'aide des tests du champ ouvert et du labyrinthe en croix surélevé.

3. STRUCTURE DE LA THESE

La première partie intitulée « Contexte Scientifique » aborde les généralités concernant la mémoire à long terme (notamment spatiale), les structures cérébrales impliquées dans les processus mnésiques (et tout particulièrement le circuit hippocampo-cortico-thalamique sur lesquels mes travaux de thèse se sont focalisés) ainsi que les théories de la consolidation mnésique. Cette introduction est divisée en quatre chapitres, dont le premier est dédié à la présentation des différents systèmes de mémoire, le second à la cognition spatiale, le troisième aux structures composant le circuit hippocampo-cortico-thalamique étudié, et le quatrième chapitre concerne la consolidation au niveau des systèmes. Puis une partie « Matériels et Méthodes » présente les principaux outils méthodologiques et protocoles expérimentaux mises en œuvre dans mes expériences. La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus au cours de cette thèse sous forme d'articles publiés ou en préparation (Contribution Expérimentale). Enfin, la dernière partie, intitulée « Discussion Générale, Conclusion et Perspectives », consiste en une synthèse et une analyse des principaux résultats à la lumière de la littérature actuelle sur le sujet, et s'achève avec les conclusions et les perspectives ouvertes par ce travail de thèse.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

CHAPITRE 1 :

LA MEMOIRE ET LES SYSTEMES DE MEMOIRE

CHAPITRE 1 : LA MEMOIRE ET LES SYSTEMES DE MEMOIRE

1.1. LA MEMOIRE : DEFINITION GENERALE

La mémoire peut être définie comme l'ensemble des activités mentales qui permettent d'enregistrer, de stocker et de restituer des informations. Cette définition met immédiatement en évidence les trois étapes élémentaires du traitement mnésique : l'encodage, la consolidation et le rappel. La capacité d'enregistrer une information fait référence à la phase d'encodage de la trace mnésique (aussi appelée souvenir dans le cadre d'une mémoire de type déclaratif), c'est-à-dire le processus initial d'acquisition et de transformation de l'information en une représentation mentale. Cette représentation mentale va ensuite faire l'objet d'une consolidation, autorisant le stockage et la rétention à long terme sous la forme d'un souvenir. Enfin, la possibilité de restituer tout ou partie de ce souvenir préalablement acquis est appelée rappel (ou récupération) et fait référence au processus qui permet à une information d'être restituée.

Cette définition, basée sur le déroulement chronologique des processus principaux (encodage, consolidation et rappel) en permanence à l'œuvre pour nous permettre d'apprendre et de nous souvenir, pourrait laisser à penser que la mémoire est un système unitaire et à l'organisation relativement simple. Il n'en est rien. Que ce soit sur le versant neuropsychologique ou neurobiologique, il est actuellement admis que la mémoire se compose d'un ensemble de processus dynamiques sous-tendus par plusieurs circuits neuronaux mettant en jeu de nombreuses régions cérébrales. Une définition plus précise de la mémoire dans son ensemble implique alors de diviser celle-ci en types ou systèmes de mémoire, organisés et hiérarchisés, mais qui sont également en interaction permanente, de manière à assurer une performance optimale au système mnésique.

1.2. LES DIFFERENTS SYSTEMES DE MEMOIRE

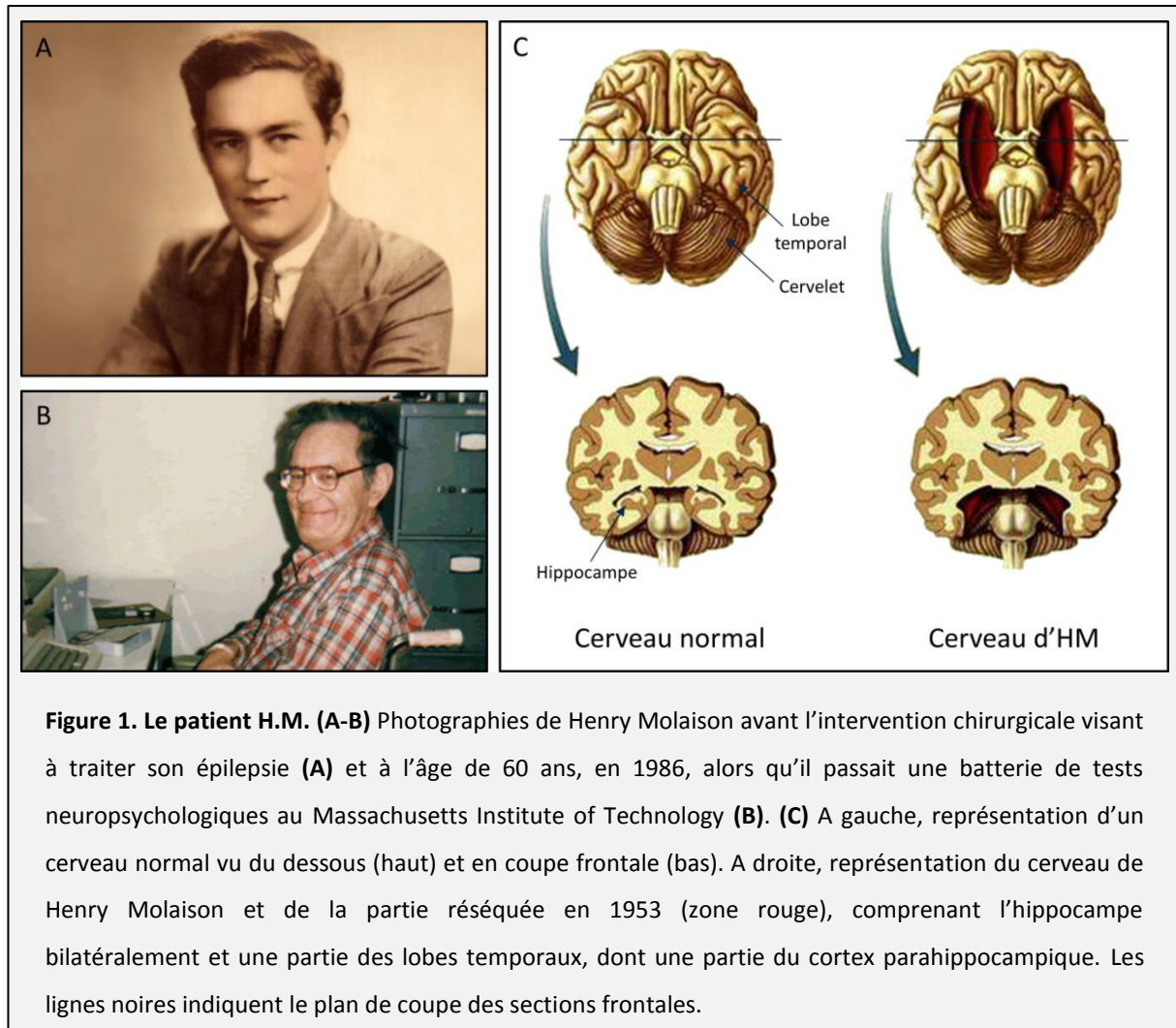
Un système de mémoire peut être défini comme un réseau neuronal anatomiquement et fonctionnellement à la fois distinct, intégré et spécialisé dans le traitement d'un type spécifique d'informations (Tulving, 1972). Différents systèmes de mémoire ont été mis en évidence et définis en fonction du critère de classification retenu : le registre sensoriel (visuel, auditif, tactile, etc.), le décours temporel (mémoire à court-terme et mémoire à long

terme), le format des représentations mnésiques (e.g. mémoire déclarative et non-déclarative) ou encore le mode de récupération de la trace (explicite ou implicite). Ces classifications, associées aux différents systèmes de mémoires correspondants, ne sont pas forcément exclusives entre elles, et encore moins indépendantes les unes des autres. La mémoire déclarative est par exemple explicite (c'est-à-dire que le rappel du souvenir en question est un phénomène conscient) et fait également partie du système de mémoire à long terme. La classification la plus ancienne et la plus connue est celle basée sur le décours temporel. Dès 1890, William James proposa une distinction entre mémoire primaire (aujourd'hui appelée mémoire à court-terme), qu'il définissait comme les événements conscients proches du présent, et la mémoire secondaire (ou mémoire à long terme), qui autorise le stockage des souvenirs. La mémoire à court terme (MCT) a une capacité limitée (ou empan mnésique) et permet le maintien des informations perçues de façon temporaire (quelques secondes à quelques minutes). L'exemple typique illustrant la MCT est celui d'un numéro de téléphone que l'on ne retient que le temps de le composer. Si au cours de ce maintien éphémère en mémoire, l'information est manipulée mentalement et fait l'objet d'une opération cognitive (par exemple mathématique ou logique), on parle de mémoire de Travail (MDT). C'est par exemple le cas lorsque l'on demande à un sujet de retenir une suite de chiffres puis de la restituer à l'envers. Si l'information stockée en MCT n'est pas particulièrement pertinente pour le sujet, associée à une charge émotionnelle forte et/ou répétée régulièrement, elle sera rapidement oubliée. Dans le cas contraire, elle sera consolidée pour être maintenue en mémoire à long terme (MLT) pour une durée beaucoup plus importante (jours, mois, années ; voire pour le reste de la vie de l'individu). La MLT est divisée en deux périodes en fonction du délai : une MLT récente (quelques jours à semaines chez l'Homme, généralement évaluée à 1 ou 5 jours chez le Rongeur) et une MLT ancienne (plusieurs mois / années chez l'Homme, évaluée à 25 ou 30 jours chez le Rongeur). Le passage d'une mémoire récente à une mémoire ancienne est le fruit de la consolidation systémique, mécanisme qui fera l'objet du chapitre 4 de cette introduction. Cette thèse porte sur la mémoire à long terme (récente et ancienne) et sur les processus et structures impliqués dans son fonctionnement.

1.3. LA MEMOIRE A LONG TERME ET SES SOUS-SYSTEMES

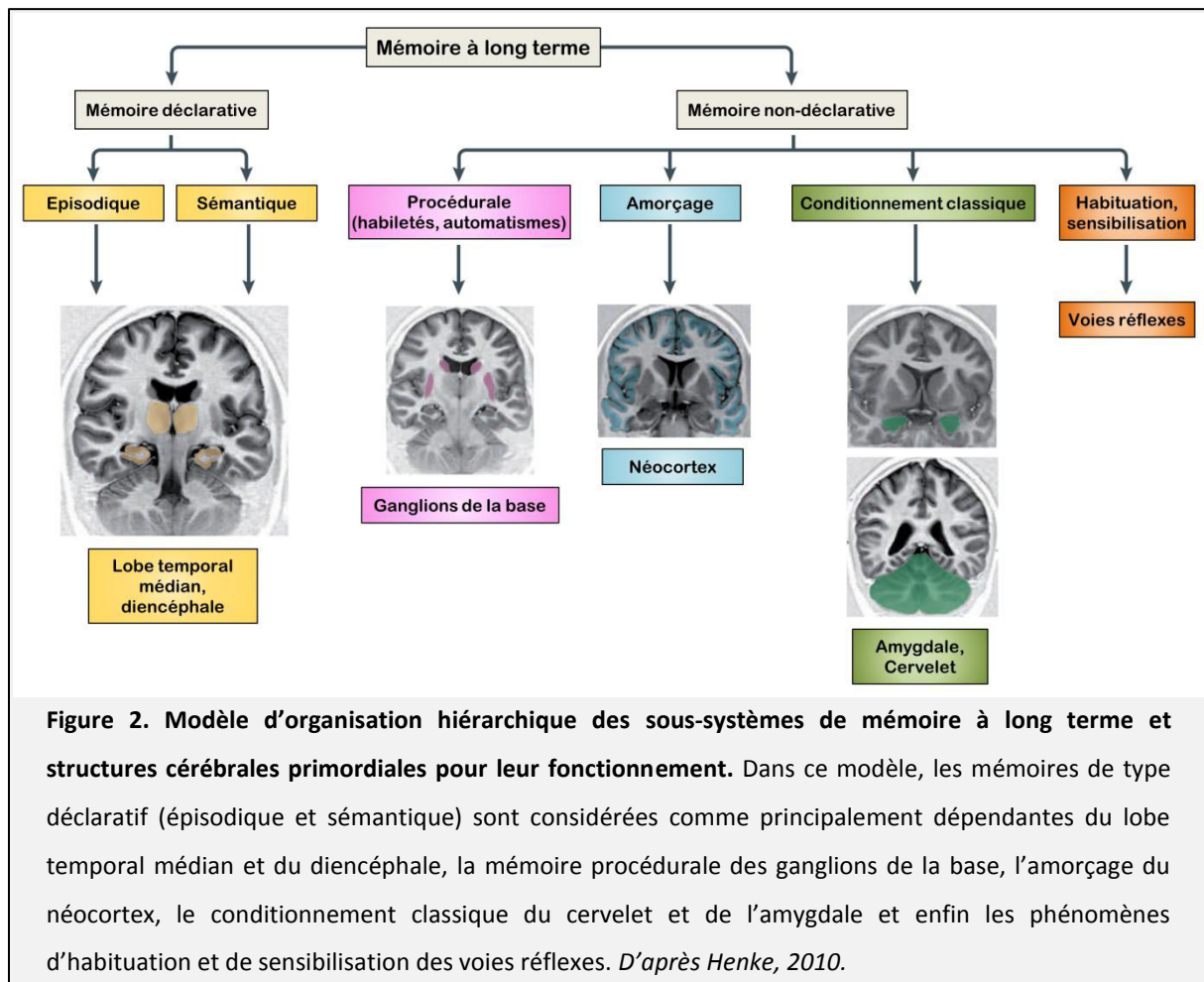
1.3.1. APPORTS DE LA NEUROPSYCHOLOGIE

Au cours du 20^e siècle, de nombreuses avancées capitales ont été réalisées dans la compréhension des fonctions cérébrales, et ce fut en premier lieu grâce aux apports de la neuropsychologie. Les études neuropsychologiques de patients amnésiques ont ainsi significativement contribué à l'élaboration des systèmes de mémoire actuellement admis et forment le socle de nos connaissances sur le fonctionnement mnésique. S'il ne fallait en citer qu'une, c'est sans aucun doute le cas du patient H.M. (de son vrai nom Henry Molaison, révélé à sa mort en 2008) qui a le plus influencé la recherche scientifique sur les systèmes de mémoire. En 1953, Henry Molaison, âgé de 27 ans, souffrait d'une épilepsie sévère et résistante aux médicaments. Il subit alors une opération chirurgicale destinée à le soigner : une lobotomie consistant à lui retirer bilatéralement une large portion des deux lobes temporaux, hippocampes compris (Fig. 1). Depuis ce jour et jusqu'à son décès, H.M. souffrit d'une amnésie antérograde (incapacité à former de nouveaux souvenirs) quasiment totale ainsi que d'une amnésie rétrograde (incapacité à se souvenir d'évènements préalables) d'environ 11 ans (Corkin, 2002). Néanmoins, sa mémoire à court-terme, tout comme sa mémoire de travail, ses capacités perceptives et intellectuelles, ainsi que ses habiletés motrices étaient préservées, suggérant que différentes fonctions cognitives mettent en jeu différentes aires cérébrales. Les lobes temporaux médians, et notamment l'hippocampe, sont donc fortement impliqués dans la MLT de type déclarative mais ne sont pas nécessaires au bon fonctionnement de la MCT. L'examen neuropsychologique de ce patient, publié en 1957 par Scoville et Milner (ainsi que les nombreuses études auxquelles a participé H.M. jusqu'en 2008), est probablement l'un des faits majeurs du 20^e siècle dans le domaine des neurosciences cognitives : il est à l'origine de la distinction entre les systèmes de MCT et de MLT, puis entre mémoire déclarative et non-déclarative (Tulving, 1972), et du rattachement de ces systèmes de mémoire à des substrats neuroanatomiques distincts, ouvrant la voie aux multiples recherches successives qui ont permis l'émergence du contexte scientifique actuel dans lequel s'inscrit cette thèse (pour une revue concernant l'apport du patient H.M. aux neurosciences, voir Squire, 2009).



1.3.2. MODELE D'ORGANISATION HIERARCHIQUE DES SYSTEMES DE MEMOIRE A LONG TERME

Depuis la caractérisation des troubles dont souffrait H.M. en 1957, de nombreux autres cas de patients amnésiques présentant des lésions cérébrales ont permis d'établir une classification hiérarchique des sous-systèmes de MLT en fonction du type d'information mémorisée. La mémoire déclarative, ou explicite, comprenant la mémoire sémantique et la mémoire épisodique, s'oppose ainsi à la mémoire non-déclarative, ou implicite, qui se subdivise en mémoire procédurale, apprentissages non-associatifs, amorçage et conditionnement classique. Au sein de cette thèse seront principalement abordés la mémoire déclarative et ses deux sous-systèmes de mémoire sémantique et épisodique.



1.3.3. LA MEMOIRE DECLARATIVE ET SES SOUS-SYSTEMES

La mémoire déclarative (ou explicite) concerne le stockage et la récupération d'informations qu'un individu peut faire émerger consciemment et exprimer par le langage. Elle est donc accessible à la conscience et verbalisable (Squire et al. 1993). Dès 1972, Tulving introduit la distinction entre mémoire sémantique et mémoire épisodique (Tulving, 1972) au sein de la mémoire déclarative (Fig. 2 ; rev Henke 2010).

La mémoire sémantique est celle des connaissances générales, des faits et des concepts théoriques qui n'ont pas de lien avec un contexte spatio-temporel précis (exemple : savoir que Paris est la capitale de la France, ou réaliser une multiplication). A l'inverse, la mémoire épisodique permet le stockage des événements personnellement vécus et du contexte dans lequel ceux-ci ont eu lieu (date, lieu, état émotionnel), comme par exemple la cérémonie de mariage de votre frère à laquelle vous avez assisté à Nantes en 1997. Un souvenir de type épisodique peut être défini comme comprenant 3 composantes : le « quoi », le « où » et le « quand » d'un événement. La mémoire épisodique permet ainsi de voyager mentalement

dans le temps : d'une part en nous remémorant les expériences passées, d'autre part en nous projetant dans l'avenir (Tulving et Lepage, 2000).

1.3.4. LA MEMOIRE NON-DECLARATIVE ET SES SOUS-SYSTEMES

Le rappel d'informations stockées en mémoire déclarative (sémantique ou épisodique) est ainsi conscient et verbalisable, par opposition à la mémoire non-déclarative, dont le rappel ne nécessite pas un accès conscient à l'information. Dans le modèle hiérarchique d'organisation de la mémoire à long terme présenté sur la figure 2, la mémoire non-déclarative comprend notamment la mémoire procédurale (ou mémoire des habiletés) qui permet la rétention d'habiletés motrices, de séquences de mouvements, de savoir-faire. Exemple : faire du vélo ou conduire une voiture sont des activités nécessitant une succession d'opérations acquises et stockées en mémoire procédurale. Elle est très durable et conserve ses informations même si elles ne sont pas utilisées pendant une longue période de temps. La mémoire non-déclarative comprend également les phénomènes d'amorçage (modification de la perception d'un stimulus en fonction d'un autre stimulus présenté juste avant ou en même temps), d'habituation (diminution de l'intensité ou de la fréquence d'apparition d'une réponse suite à la présentation répétée ou prolongée d'un stimulus), de sensibilisation (phénomène inverse amenant à l'augmentation temporaire d'une réponse), et enfin le conditionnement classique, ou pavlovien, qui définit l'association entre un élément neutre et un élément ayant une valence (par exemple émotionnelle), de telle manière que l'élément neutre finit par déclencher la même réaction chez le sujet que celui auquel il est associé.

1.3.5. LE MODELE MNESIS

Plus récemment, le modèle MNESIS (*Memory NEOStructural Inter-Systemic model*, ou *Modèle NEOStructural InterSystémique*) propose une synthèse des orientations théoriques actuelles en neuropsychologie de la mémoire (Fig. 3, Eustache et Desgrange, 2008). Inspiré du modèle de Tulving (ou modèle SPI, pour *sérial*, *parallèle* et *indépendant*), comprenant trois systèmes de mémoire à long terme, et du modèle de Baddeley (2000) en ce qui concerne le rôle de la mémoire de travail sur l'ensemble des systèmes de mémoires, le modèle MNESIS met en avant les relations entre les différents systèmes, proposant une vision dynamique, interactive et reconstructive de la mémoire. Selon ce modèle, la mémoire

est composée de cinq grands systèmes répartis en trois catégories : les mémoires à long terme (mémoires perceptives, sémantiques et épisodiques), la mémoire de travail et la mémoire procédurale. Au sein des trois catégories de MLT, la mémoire perceptive alimente la mémoire sémantique, qui approvisionne à son tour la mémoire épisodique. La mémorisation d'un événement débiterait ainsi par celle des images, des sons, des impressions rencontrées ou ressenties (mémoire perceptive), puis par le sens de ces informations (mémoire sémantique), pour finalement s'organiser en un souvenir de l'ensemble de l'évènement, comprenant faits, lieux et dates (mémoire épisodique). Ce modèle intègre également le passage de la mémoire épisodique vers la mémoire sémantique (sémantisation), un processus qui interviendrait au cours de la consolidation et à mesure de la perte de détails contextuels caractéristiques d'une mémoire épisodique, et le phénomène de reviviscence (littéralement, « retour à la vie ») qui caractérise le fait de se remémorer des souvenirs de nature épisodique. Ce rappel conscient réactive alors temporairement la

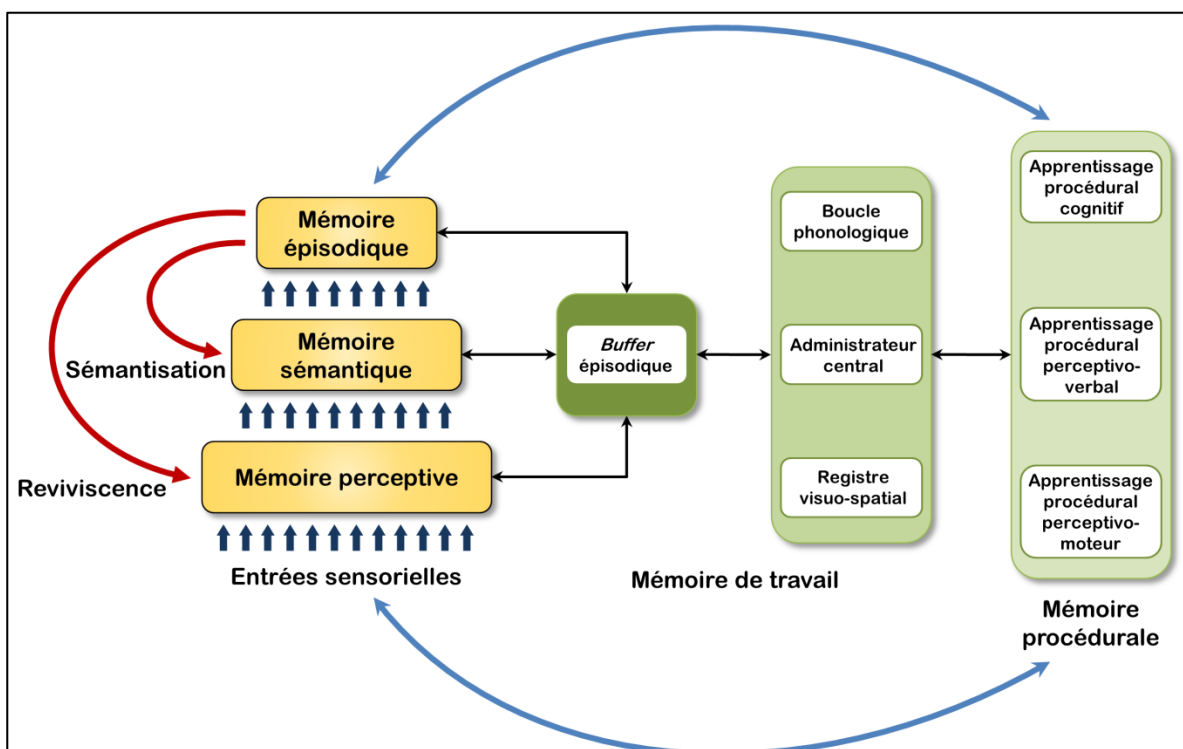


Figure 3. Le modèle MNESIS propose une organisation en 5 systèmes de mémoire. Il intègre les concepts développés par Tulving (1995, 2001) et Baddeley (2000) et met l'accent sur les relations entre les différents systèmes afin de tenir compte de la nature dynamique, interactive et reconstructive de la mémoire. *D'après Eustache et Desgranges, 2008.*

mémoire perceptives (sons, images, sensations) et pourrait participer au ré-encodage de la trace mnésique concernée, contribuant ainsi aux processus de reconsolidation. Ces phénomènes de consolidation/reconsolidation participeraient au renforcement de la trace mnésique, et probablement également à sa modification au fil du temps : le ré-encodage associé au fait de se remémorer est à même de modifier le souvenir initial. Cette dimension temporelle du devenir de la trace mnésique, qui n'est pas présente dans la plupart des modèles structuro-fonctionnels (SPI de Tulving ou modèle de Baddeley par exemple), apparaît essentielle lorsque l'on s'intéresse au fonctionnement de la mémoire à long terme.

1.3.6. LA MEMOIRE SPATIALE AU SEIN DES SOUS-SYSTEMES DE MEMOIRE A LONG TERME

La mémoire spatiale est généralement considérée comme partie intégrante de la mémoire épisodique. En effet, elle comprend les informations relatives aux composantes « quoi » et « où » qui, associées au contexte temporel (le « quand »), définissent un souvenir de type épisodique (O'Keefe et Nadel, 1978 ; Burgess et al. 2002). Une analogie entre la mémoire humaine et animale a ainsi été proposée par Rosenbaum et al., pour qui les mémoires contextuelles chez l'animal et épisodique chez l'Homme seraient comparables (Rosenbaum et al. 2001). Il a également été suggéré que les représentations spatiales détaillées (associées à une expérience riche en détails sur l'environnement) soient des analogues de la mémoire épisodique (et ce quel que soit l'âge du souvenir concerné), tandis que des représentations spatiales schématiques, correspondant à un ensemble d'indices et de caractéristiques moins spécifiques, seraient des analogues de la mémoire sémantique chez l'Homme (rev. Winocur et al. 2010a). La mémoire spatiale est considérée comme contextuelle au sens où elle n'est pas dissociable du lieu et du contenu « évènementiel » du souvenir associé ; mais étant donnée l'impossibilité d'évaluer, chez l'animal, l'aspect conscient du rappel d'une mémoire épisodique, la mémoire spatiale est définie comme une mémoire « de type épisodique », ou « *episodic-like* » (Clayton et al. 2007).

Cette thèse s'est focalisée sur la mémoire spatiale et les structures qui sous-tendent l'acquisition, la consolidation et le rappel de ce type d'informations chez le Rat.

CHAPITRE 2 :

LA COGNITION SPATIALE

CHAPITRE 2 : LA COGNITION SPATIALE

2.1. LA MEMOIRE SPATIALE : DEFINITION GENERALE

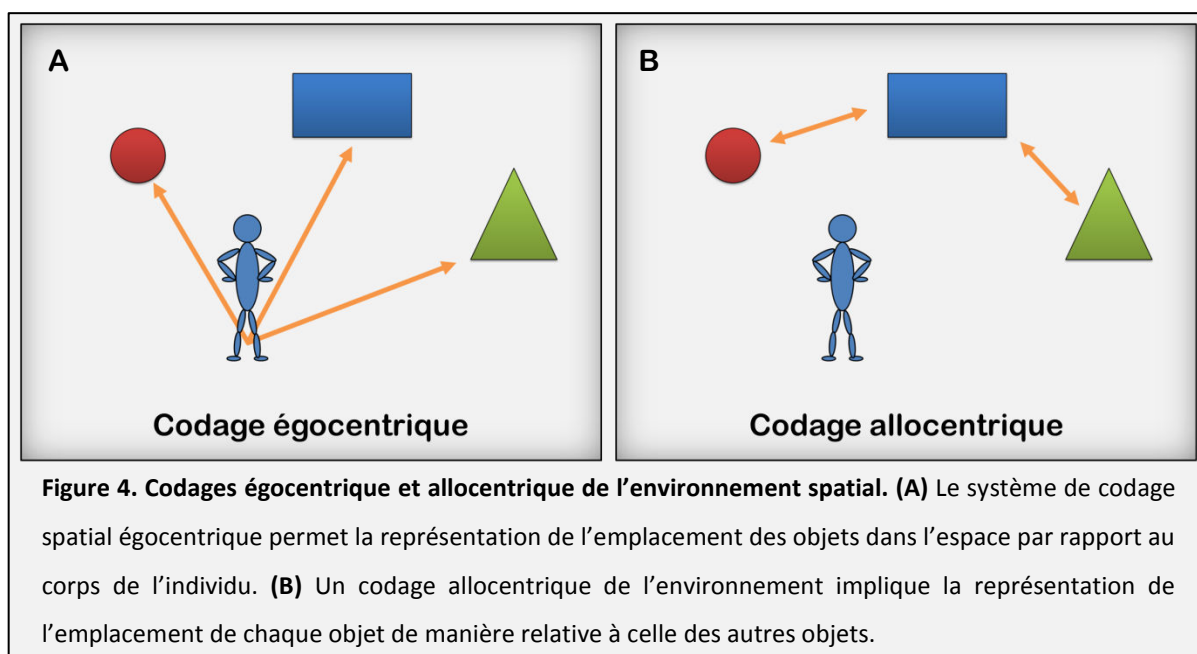
La mémoire spatiale désigne la capacité à former, stocker et restituer les informations relatives à l'espace qui permettent la navigation et l'orientation d'un individu dans son environnement. Elle définit le contexte spatial de nos souvenirs épisodiques. C'est la mémoire des lieux, mais aussi celle des parcours nous permettant de nous rendre efficacement d'un endroit à un autre. Elle permet de se souvenir d'environnements parcourus et de naviguer mentalement dans l'espace, de nous rappeler où nous avons garé notre voiture la veille au soir, ou plus formellement, de localiser un objectif et de déterminer quel chemin emprunter pour l'atteindre en tenant compte de la disposition des différents éléments de l'environnement. Cette mémoire est tout aussi indispensable à la majorité des espèces animales qu'elle ne l'est à l'Homme, puisqu'elle détermine la capacité à retrouver son nid, sa tanière ou son garde-manger, localiser un prédateur, une source de nourriture ou un congénère. La mémoire spatiale est ainsi un puissant mécanisme adaptatif favorisant la survie des individus et des espèces chez lesquelles elle est développée, et en dépit de la diversité du règne animal, il apparaît que les processus de traitement de l'information spatiale et les capacités de navigation et d'orientation associées pourraient être très comparables entre l'Homme et l'animal (Primates et Rongeurs notamment, groupes les plus étudiés). La mémoire spatiale fait aujourd'hui l'objet d'intenses recherches visant à mieux comprendre les processus cérébraux qui la sous-tendent. De plus elle fournit un modèle de choix pour aborder des questions relatives au fonctionnement d'un grand nombre de processus cognitifs : l'utilisation optimale de la mémoire spatiale implique aussi la mise en œuvre de processus de contrôle exécutif (attention, planification, flexibilité comportementale etc.) qui vont également pouvoir être étudiés chez l'animal.

Chez l'animal, on parle de **mémoire spatiale de référence** lorsqu'il est question du stockage en mémoire à long terme d'informations spatiales, comme le souvenir de la localisation d'une plateforme dans un labyrinthe par exemple. Lorsqu'il s'agit, pour l'animal, de traiter et de manipuler des informations spatiales au cours d'une tâche, on parlera de **mémoire spatiale de travail**.

2.2. LE CODAGE DES INFORMATIONS SPATIALES

2.2.1. REPRESENTATIONS ALLOCENTRIQUE ET EGOCENTRIQUE DE L'ENVIRONNEMENT

Tolman, en 1948, énonça pour la première fois l'hypothèse que les rats sont capables de former une représentation spatiale globale de leur environnement (Tolman, 1948). Puis Donald Hebb proposa l'idée selon laquelle deux neurones en activité au même moment créent ou renforcent leur connexion, facilitant d'éventuels échanges d'informations ultérieurs (Hebb, 1949). Cette notion a été fondatrice de celles de potentialisation à long terme et de plasticité, et source d'inspiration pour O'Keefe et Nadel, qui publièrent en 1978 un ouvrage fondamental intitulé « The Hippocampus as a Cognitive Map » dans lequel ils introduisirent la distinction entre deux systèmes de navigation spatiale (O'Keefe et Nadel, 1978). Le premier est un système de « cartes » intégrant des informations dites allocentriques et relatives aux relations entre des éléments distaux, la position de l'animal et le but à atteindre ; le second un système de « routes » ou « itinéraires », basé sur des informations dites égocentriques et relatives au placement du corps dans l'espace. Ces deux types d'informations, traités de manière parallèle et simultanée, vont permettre à l'individu de se repérer et de naviguer de manière optimale dans son environnement (Burgess, 2006).



Les informations **égocentriques** proviennent de la perception que l'individu a de son corps via les informations vestibulaires et kinesthésiques relatives à la position du corps dans l'espace et aux déplacements dans l'environnement (Fig. 4A). Une représentation

égocentrique est donc, comme son nom l'indique, centrée sur l'individu et sur son point de vue de l'environnement qui l'entoure. On parlera de stratégie égocentrique lorsque la démarche consiste à chercher à atteindre un but en réalisant une succession de mouvements. Par exemple, un individu perdu dans une ville qui lui est étrangère demande son chemin à un habitant, qui lui indique de continuer tout droit jusqu'au bout de la rue, puis de tourner à gauche deux fois de suite. S'il suit ses conseils, il aura fait appel à une approche égocentrique de la tâche lui permettant de se rendre au lieu désiré. Cette stratégie utilisant un itinéraire et basée sur des informations égocentriques est économique en termes de quantité d'informations à traiter et à mémoriser, mais peu flexible dans le sens où tout changement (obligeant à un détour par exemple) conduit à la désorientation.

Les **informations allocentriques** (parfois également appelées exocentriques) sont relatives à l'espace extracorporel et concernent la configuration d'éléments perceptibles (e.g. visuels) et leurs liens dans l'espace (Fig. 4B). La représentation en mémoire relative aux informations allocentriques est dégagée du corps, indépendante de la position de celui-ci dans l'environnement. Il a été proposé que le rat mémorise les informations allocentriques sous la forme de vues locales, à la manière de panoramas successifs qui, mis bout à bout, forment une représentation spatiale globale de l'environnement (Poucet et Benhamou, 1997). Cette représentation allocentrique est flexible : d'une part, elle peut être modifiée si certains éléments la composant viennent à changer, de manière à intégrer de nouveaux éléments à la représentation existante ; d'autre part, elle autorise la planification de plusieurs trajectoires permettant d'atteindre le même but. De plus, la prise en considération des points de vue consécutifs au cours de l'exploration permet à l'individu de déterminer sa position par rapport au but visé et d'ajuster ses déplacements en conséquence. Le plus haut niveau de codage de l'environnement sous sa forme allocentrique correspond à la « carte cognitive » d'O'Keefe et Nadel (1978). Il s'agit de la construction d'une représentation globale de l'environnement, incluant les relations spatiales entre un ensemble d'éléments, et indépendante de la position ou de la direction vers laquelle pointe l'individu. Cette représentation permet d'inférer l'emplacement du but à atteindre à partir de n'importe quel endroit de l'environnement. Par contre, elle implique le traitement et le stockage d'un grand nombre d'informations spatiales ; cette approche est donc peu économique sur le plan cognitif (Poucet et Benhamou, 1997).

2.2.2. MEMOIRE SPATIALE DE REFERENCE ET MEMOIRE SPATIALE DE TRAVAIL

Deux types de traitement de l'information spatiale ont été définis en 1979 par Olton et ses collaborateurs : la mémoire spatiale de référence et la mémoire spatiale de travail (Olton et al. 1979). La **mémoire spatiale de travail** concerne le stockage d'informations spécifiques à une situation et qui ne sont pertinentes que sur une durée de temps limitée. Au contraire, la **mémoire spatiale de référence** fait partie intégrante du système de mémoire à long terme : elle peut se définir comme la mémoire de ce qui est *à priori* intangible, durable. Elle concerne ainsi les informations qui restent constantes dans le temps, et dont l'utilisation est pertinente dans une situation donnée à chaque fois que celle-ci est rencontrée.

Par exemple, une tâche permettant de mettre en jeu ces deux traitements de l'information spatiale chez l'animal peut être mise en place dans un labyrinthe radial. Parmi les 8 branches de ce test, seules 4 sont renforcées à l'aide d'une récompense alimentaire, et ce sont toujours les mêmes d'un essai à l'autre. Pour l'animal, se rappeler quelles sont les branches renforcées est alors une tâche de mémoire de référence, tandis que se rappeler quelles branches il a déjà visité au cours de l'essai actuel fait appel à la mémoire à court-terme ; enfin, se rendre dans les branches non-visitées au cours de l'essai précédent, et uniquement dans celles-ci, relève de la mémoire spatiale de travail.

La distinction entre mémoire spatiale de travail et mémoire spatiale de référence est donc basée sur la contribution de l'une ou l'autre de ces mémoires à la réalisation de la tâche, et non sur les mécanismes physiologiques, le type de codage ou le substrat neuroanatomique de la mémoire considérée. Leur mise en œuvre respective dépend des contraintes environnementales (et dans un cadre expérimental, de la tâche). Il a été proposé que ces deux types de traitements mnésiques sont au moins partiellement indépendants (Van der Staay 1999, Schmitt et al. 2003).

2.3. LA FLEXIBILITE COMPORTEMENTALE : DU BON USAGE DES INFORMATIONS CONTEXTUELLES

2.3.1. LA FLEXIBILITE COMPORTEMENTALE : DEFINITION

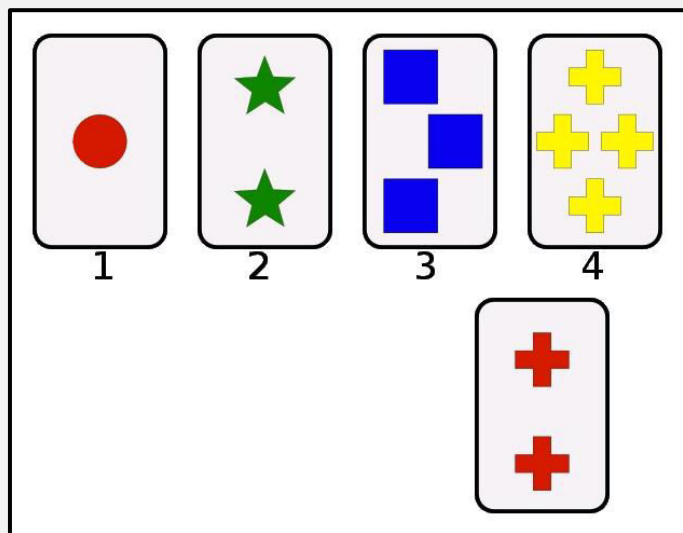
Quand une action est répétée, elle tend à devenir automatique, à prendre la forme d'une routine. Dans le cas d'une action impliquant une composante spatiale forte, comme la navigation d'un endroit A (exemple : votre domicile) à un endroit B (votre travail), ce phénomène se traduit par le passage de l'utilisation privilégiée d'une stratégie allocentrique (lors des premiers trajets domicile-travail) à une approche égocentrique, voire procédurale (automatismes). L'utilisation de routines a l'avantage de ne nécessiter que peu de charge cognitive, mais s'avère peu flexible. Heureusement, le retour à l'utilisation d'une approche allocentrique est possible à tout moment dès lors que la situation le nécessite (par exemple en cas de route barrée vous obligeant à définir un trajet alternatif). La flexibilité comportementale fait référence à la capacité de s'adapter rapidement et efficacement à un changement dans l'environnement interne ou externe (Brown et Tait, 2010). L'activité en cours (ce qui inclut l'inactivité) est arrêtée ou modifiée et un nouveau comportement est initié. La flexibilité comportementale reflète ainsi un changement d'état cognitif à la suite de la perception de la modification des contingences environnementales. Plusieurs processus cognitifs impliqués dans la flexibilité comportementale ont été identifiés. La flexibilité attentionnelle, c'est-à-dire l'identification et la sélection d'un changement interne ou externe, en est une composante essentielle. L'inhibition comportementale ensuite, représente l'aptitude à empêcher de produire une réponse qui n'est plus appropriée au contexte. Enfin, le contrôle cognitif désigne la capacité de comprendre le contexte d'une situation et de sélectionner une action appropriée (Ridderinkhof et al. 2004).

2.3.2. LA FLEXIBILITE MENTALE CHEZ L'HOMME

Le test le plus fréquemment utilisé pour évaluer la flexibilité mentale chez l'Homme est le *Wisconsin Card Sorting Test (WCST)*, un test neuropsychologique élaboré en 1948 par Grant et Berg dans lequel le sujet doit classer des cartes selon une règle qui lui est inconnue (Fig. 5 ; Grant et Berg, 1948). Il permet de calculer un indice de raisonnement abstrait, basé sur l'utilisation de concepts et de stratégies en réponse à l'évolution des contingences contextuelles (Milner, 1963). De nombreuses maladies peuvent altérer la flexibilité mentale, parmi lesquelles la schizophrénie, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, et de

manière plus général les pathologies altérant le fonctionnement des cortex frontaux et/ou préfrontaux (Milner, 1963 ; Bissonnette et al. 2013).

Figure 5. Situation initiale du *Wisconsin Card Sorting Test (WCST)*, un test neuropsychologique permettant d'évaluer la flexibilité mentale (Grant et Berg, 1948). Les cartes diffèrent en 3 points : les formes qui y figurent (étoiles, carrés etc.), la couleur et le nombre de ces formes. Le sujet doit associer une à une les cartes d'une pioche (cartes situées en bas à droite) avec l'une des quatre cartes de bases,

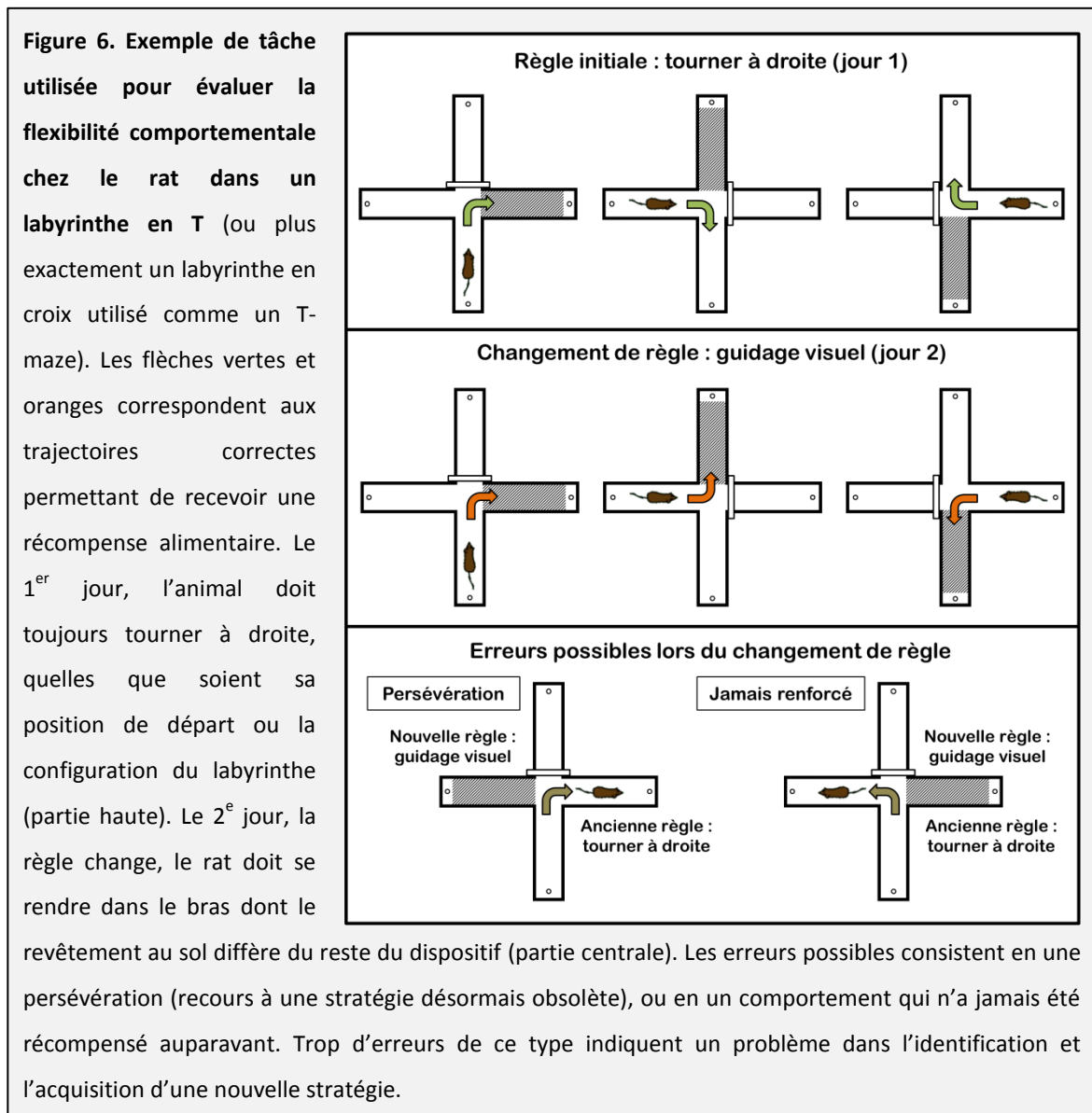


sachant que l'examineur a décidé d'une règle d'association (exemple : couleur) sans en informer le sujet, lui indiquant seulement si l'association qu'il réalise avec la carte de base est bonne ou mauvaise. Régulièrement, la règle d'association change (après plusieurs associations correctes), là encore sans en informer le participant. Une fois la nouvelle règle trouvée, le sujet doit inhiber l'ancienne, désormais non pertinente. Le WCST dure environ 12 à 20 min et comporte 128 cartes à associer.

2.3.3. LA FLEXIBILITE COMPORTEMENTALE CHEZ LE RONGEUR

Les tests les plus couramment utilisés pour estimer la flexibilité comportementale chez le rongeur évaluent le changement d'orientation attentionnel (*attentional shifting*), les capacités d'adaptation au changement de règle (*rule switching*), ou l'acquisition d'une nouvelle connaissance s'opposant à la précédente (*reversal learning*). Dans les trois cas, la notion clé est celle de capacité d'adaptation à un changement (Brown et Tait, 2010). Le terme de « *reversal learning* » est fréquemment utilisé de manière assez libre dans les études portant sur la flexibilité comportementale et se réfère souvent à un conditionnement instrumental (ou opérant) à l'aide d'une tâche de discrimination à 2 choix (*two-choice discrimination task*), par exemple dans une boîte de conditionnement équipée de 2 leviers (*two lever operant task*) ou dans un labyrinthe en T (*T-maze*). Dans ces tâches proposant de choisir entre deux réponses, l'une est renforcée par une récompense alimentaire, l'autre non. La flexibilité comportementale est alors évaluée par la capacité d'adaptation à une modification de la règle en vigueur. Dans ces deux tests, la motivation de l'animal à réaliser

la tâche est basée sur la récompense alimentaire, ce qui nécessite de mettre les animaux en restriction alimentaire. L'exemple du labyrinthe en T est illustré dans la figure 6.



Contrairement au test proposant à l'animal un choix entre deux leviers, ce labyrinthe en T comporte une composante spatiale ; il n'a néanmoins pas été développé pour étudier la mémoire spatiale à proprement parler, et s'avère notamment limité pour l'évaluation de la mémoire spatiale allocentrique. Dans les tests dédiés à l'évaluation de la mémoire spatiale allocentrique, comme la piscine de Morris ou le labyrinthe de Barnes, l'étude de la mémoire spatiale égocentrique et/ou de la flexibilité comportementale est compliquée par le fait que l'expérimentateur a peu de contrôle sur la stratégie que l'animal va spontanément développer durant l'apprentissage. Ceci est principalement lié à la structure circulaire et ouverte des deux tests précités. Pour pallier à ce problème, JC Cassel conçut en 2008 au

LNCA (ex-LINC) un nouveau test, appelé le labyrinthe en Double-H et développé dans le but de disposer d'un dispositif unique permettant de privilégier l'utilisation d'une stratégie spatiale allocentrique ou égocentrique chez le rat, en fonction du protocole expérimental mis en place au cours de l'acquisition (Pol-Bodetto et al. 2011 ; Cassel et al. 2012). De plus, à l'aide d'un test de rétention visant à induire l'animal en erreur sur sa position initiale dans le labyrinthe, ce dispositif rend possible l'évaluation de la flexibilité comportementale - à savoir, dans ce cas, la capacité de l'animal à basculer d'une approche égocentrique de la tâche à une approche allocentrique une fois le changement de configuration constaté. Au cours de cette thèse, c'est à l'aide de ce test que je me suis intéressé à la flexibilité comportementale chez le rat et à l'implication d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans ce processus.

2.4. EVALUATION DE LA MEMOIRE SPATIALE ET DE LA FLEXIBILITE COMPORTEMENTALE CHEZ LE RAT

La mémoire spatiale des rongeurs peut être évaluée à l'aide de nombreux tests. L'un des plus fréquemment utilisé dans la littérature est celui de la piscine de Morris. C'est également celui que j'ai utilisé dans une grande partie des expériences relatées ici. Le labyrinthe du Double-H, récemment mis au point au laboratoire (Pol Bodetto et al. 2011 ; Cassel et al. 2012), est le second test spatial utilisé au cours de cette thèse. Ayant brièvement évoqué dans le paragraphe précédent d'autres tests permettant d'évaluer la mémoire spatiale et la flexibilité comportementale chez le rat, cette section sera uniquement dédié aux tests de la piscine de Morris et du labyrinthe en Double-H (Fig. 7).

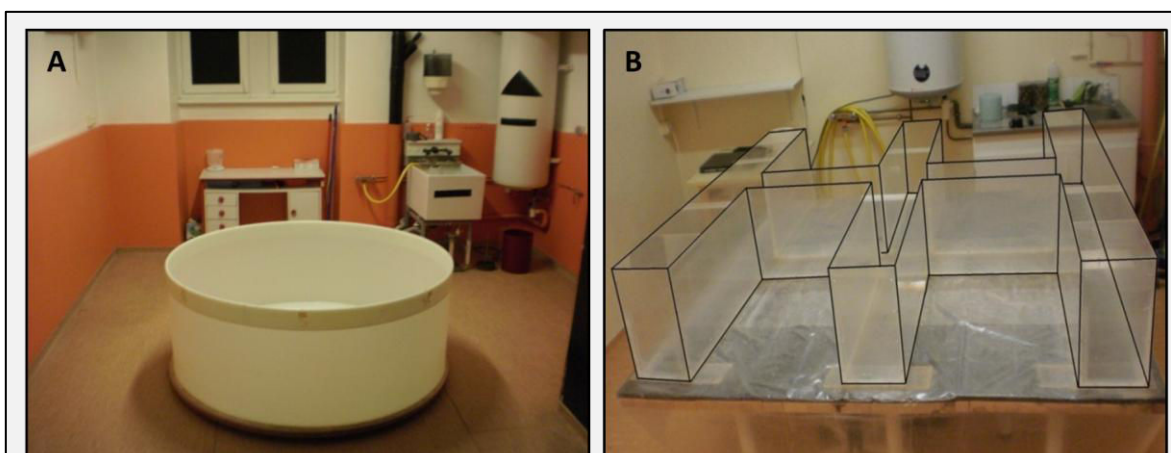


Figure 7. Photographies des labyrinthes aquatiques de la piscine de Morris (A) et du Double-H (B) utilisés au cours de cette thèse, dans leurs pièces respectives au laboratoire

2.4.1. LE TEST DE LA PISCINE DE MORRIS

Le test de la piscine de Morris (ou *Morris Water Maze*, MWM) a été inventé et développé par Richard Morris en 1981. Il se base sur l'aversion des rongeurs pour l'eau (lorsque celle-ci est fraîche) pour générer la motivation nécessaire à la réalisation de la tâche. Le rat profitant d'excellentes capacités natatoires, ce test ne requiert pas de préparation spécifique (contrairement aux tests basés sur le caractère appétitif d'une récompense alimentaire qui nécessitent une restriction préalable). Le dispositif consiste en un bassin d'1.60 m de diamètre rempli d'eau fraîche ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) opacifiée à l'aide de lait en poudre, de blanc de Meudon ou de peinture non toxique (Fig. 7A). La piscine de Morris permet, en fonction du protocole utilisé au cours de l'acquisition, d'évaluer deux processus mnésiques distincts : la mémoire spatiale de travail et la mémoire spatiale de référence.

Dans le cas d'un protocole visant à évaluer la mémoire spatiale de référence, une plateforme immergée juste sous la surface de l'eau est placée dans la piscine à un emplacement fixe, à distance du bord et du centre de celle-ci. L'objectif pour le rat est de nager vers la plateforme afin de sortir de l'eau. Durant la phase d'acquisition de la tâche, qui s'étend généralement sur plusieurs jours, le rat est introduit dans la piscine depuis des points de lâcher variables. Cette précaution évite tout recours à une stratégie égocentrique, celle-ci n'ayant aucune chance de s'avérer efficace ; l'animal est donc contraint de s'appuyer sur les indices (notamment visuels) externes à la piscine pour se situer et retrouver la plateforme (stratégie allocentrique). L'apprentissage se caractérise par une diminution progressive, au fil des essais et des jours, de la distance parcourue et de la latence d'accès à la plateforme. Le souvenir de la localisation de la plateforme est évalué ultérieurement (à un délai variable en fonction du processus étudié : généralement 1 ou 5 jours pour la mémoire récente, et 25 ou 30 jours pour la mémoire ancienne) au cours d'un test de rétention sans plateforme d'une durée de 60 secondes. La surface de la piscine est divisée en 4 quadrants virtuels et le temps passé dans chaque quadrant est mesuré. Un animal se souvenant de l'emplacement de la plateforme (et capable d'exprimer ce souvenir sous la forme d'une performance comportementale) passera plus de temps dans le quadrant cible (celui dans lequel se trouvait la plateforme au cours de l'acquisition) que dans les autres quadrants. On parle de préférence de place pour désigner ce biais de recherche induit par le rappel du souvenir de l'emplacement préalable de la plateforme. Un rat ne se rappelant pas de la position de la

plateforme passera un temps comparable dans chacun des quatre quadrants (environ 25 %). Au cours de ce test de rétention, d'autres variables sont couramment enregistrées dans le but de préciser un éventuel déficit de mémoire dans un groupe expérimental par rapport au groupe contrôle, comme le nombre de passages de l'animal au niveau de l'annulus. Celui-ci correspond à une zone virtuelle centrée sur la plate-forme et élargie de 10 cm. Cette mesure est utilisée comme un indice de la précision de la mémoire : un nombre élevé de croisements de cette zone indique que l'animal a un souvenir précis de l'emplacement de la plateforme. La latence d'arrivée à l'emplacement de la plateforme, c'est-à-dire le temps nécessaire à l'animal pour atteindre l'endroit exact où se trouvait la plateforme au cours de l'acquisition, est une autre mesure informant l'expérimentateur de la précision du souvenir spatial au cours du rappel. Ce type de protocole est utilisé pour étudier la mémoire à long terme, et c'est celui que j'ai utilisé au cours de cette thèse.

Dans le cas d'un test visant à évaluer la mémoire spatiale de travail, la localisation de la plateforme change d'un jour à l'autre, mais pas au cours des différents essais (généralement quatre) d'une même session. Ainsi, les informations acquises sur l'emplacement de la plateforme ne sont valables que pour la session en cours. Le rat est introduit dans la piscine depuis des points de lâcher variables de manière à favoriser l'utilisation d'une stratégie allocentrique. Il doit donc utiliser les informations acquises lors du premier essai de chaque jour pour retrouver la plateforme au cours des essais suivants.

Certains paramètres non-mnésiques pouvant influencer les performances des rongeurs dans les tests comportementaux comme la piscine de Morris, il peut être judicieux d'effectuer des évaluations complémentaires, comme un test avec une plateforme visible. Ce protocole particulier au cours duquel le rat doit simplement nager vers une plateforme émergée vise à vérifier l'absence d'impact de facteurs qui ne sont pas directement liés au rappel d'une mémoire et qui peuvent affecter les performances dans le test de la piscine de Morris, comme la motivation ou les capacités visuelles et sensorimotrices de l'animal (D'Hooge et al., 2001). La vitesse de nage et la thigmotaxie (comportement consistant à nager le long des parois du dispositif) sont également des indices de la motivation, des capacités natatoires et de l'anxiété qui peuvent être mesurés et dont l'absence de variation entre les groupes expérimentaux doit être vérifiée. Ces différentes mesures permettent de conforter l'interprétation des variables relatives à l'acquisition et au rappel de la mémoire spatiale,

comme la latence d'arrivée à la plateforme (durant l'acquisition) ou le temps passé dans le quadrant cible (lors du test de rappel sans plateforme), en s'assurant que les mesures ne sont pas biaisées par l'altération de fonctions non-mnésiques.

2.4.2. LE TEST DU LABYRINTHE EN DOUBLE-H

Le labyrinthe en double-H (DH) a été créé au sein du laboratoire par Jean-Christophe Cassel dans le but de disposer d'un test permettant de privilégier soit un apprentissage spatiale allocentrique, soit l'utilisation par l'animal d'une stratégie égocentrique, ce en fonction du protocole d'acquisition utilisé. De plus, ce test devait être suffisamment « simple » pour que la phase d'acquisition nécessite un nombre raisonnable de sessions et d'essais pour générer chez l'animal un souvenir durable (plusieurs semaines), en vue d'étudier les processus de consolidation d'une mémoire spatiale ou procédurale ancienne (Pol-Bodetto et al. 2011 ; Schumacher et al. 2011 ; Cassel et al. 2012). Enfin, ces caractéristiques rendent possible l'évaluation de la flexibilité comportementale en observant la capacité de l'animal à basculer d'une approche égocentrique de la tâche vers une approche allocentrique.

Techniquement, le double-H consiste en un labyrinthe aquatique basé, comme la piscine de Morris, sur l'aversion des rongeurs pour l'eau fraîche. Il se compose d'une allée horizontale reliant trois allées latérales (tels 2 H contigus vus du dessus ; Fig. 7B). La tâche pour l'animal consiste à apprendre la localisation d'une plateforme fixe et immergée en utilisant les indices visuels externes au dispositif pour se repérer (stratégie allocentrique) ou en répétant une séquence de mouvements définissant un trajet idéal (stratégie égocentrique). L'expérimentateur peut favoriser l'engagement d'une stratégie allocentrique ou égocentrique, en fonction du protocole d'apprentissage utilisé : si l'animal est introduit dans le dispositif depuis des points de départ variables d'un essai à l'autre, la stratégie allocentrique est la plus efficace pour l'animal. Si l'animal est systématiquement introduit au même endroit, la répétition de la tâche va favoriser l'utilisation d'une stratégie égocentrique.

Au cours du test de rétention sans plateforme d'une durée de 60 secondes, le rat est introduit dans le DH depuis une branche différente de celle(s) utilisée(s) au cours de l'acquisition, de manière à mettre en évidence l'utilisation d'une stratégie égocentrique ou d'une stratégie allocentrique, voire le passage de l'une à l'autre au cours de l'essai. Dès lors,

si le rat utilise une stratégie égocentrique, son trajet initial le mènera vers une branche différente (appelée branche « réponse ») de celle dans laquelle était localisée la plateforme durant l'acquisition (la branche « cible »). Si le rat utilise une approche allocentrique de la tâche, le premier trajet sera orienté vers la branche cible. La flexibilité comportementale peut s'observer par le passage d'une stratégie égocentrique à une stratégie allocentrique, par exemple lorsque le premier trajet de l'animal le mène vers la branche réponse, puis qu'il se dirige ensuite vers la branche cible (voir parties « matériels et méthodes » pour un protocole expérimental détaillé).

Ce nouveau test nous a permis de mettre en évidence l'implication des noyaux ReRh du thalamus dans les changements de stratégie et dans la flexibilité comportementale (Publication 2).

CHAPITRE 3 :

LE CIRCUIT HIPPOCAMPO-CORTICO- THALAMIQUE COMPRENANT LES NOYAUX VENTRAUX DE LA LIGNE MEDIANE DU THALAMUS

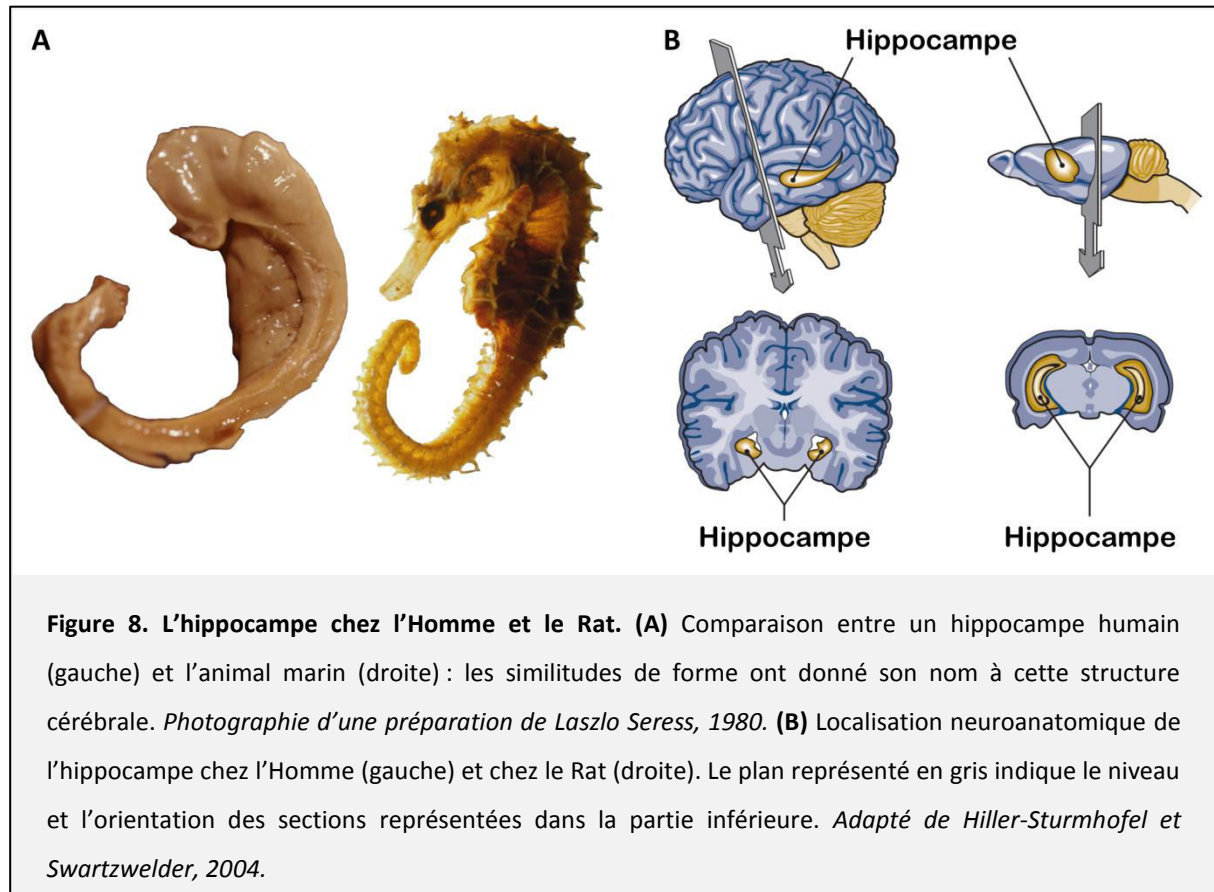
CHAPITRE 3 : LE CIRCUIT HIPPOCAMPO-CORTICO-THALAMIQUE COMPRENANT LES NOYAUX VENTRAUX DE LA LIGNE MEDIANE DU THALAMUS

3.1. L'HIPPOCAMPE

3.1.1. DESCRIPTION ANATOMIQUE

L'hippocampe (Hip) se situe dans le lobe temporal médian, sous les portions temporales et postérieures du néocortex. Tout comme le cortex avec lequel il est en étroite relation, c'est une structure paire, présente de manière symétrique dans chaque hémisphère. Il est placé dans le prolongement du fornix, et les amygdales sont situées à ses extrémités. Chez le Rat, ses dimensions sont de 10 mm de longueur, 3,5 mm de largeur et 1,5 à 2 mm d'épaisseur environ. Son nom lui vient de sa forme chez l'Homme, qui évoque celle d'un hippocampe marin (Fig. 8A). La formation hippocampique se compose de trois sous-structures : la corne d'Ammon (CA), le gyrus denté (DG) et le subiculum. Sur la base de différences morphologiques et connectiques, la corne d'Ammon est subdivisée en trois parties : CA1, CA2 et CA3. La région parahippocampique comprend les cortex entorhinal, périrhinal et postrhinal ainsi que le présubiculum et le parasubiculum (Andersen et al. 2007).

Chez le rat, l'hippocampe a la forme d'un haricot, et occupe un volume considérable au sein du parenchyme ; bien plus élevé en proportion que chez l'Homme (Fig. 8B). La forme particulière de cette structure a amené les chercheurs à distinguer une partie dorsale (supérieure) et une partie ventrale (inférieure) de l'hippocampe ; il y est couramment fait référence sous les termes d'hippocampe dorsal (dHip) et d'hippocampe ventral (vHip). Une segmentation supplémentaire a récemment été introduite sur la base d'arguments génétiques et fonctionnelles, délimitant une partie médiane entre le dHip et le vHip, appelée hippocampe intermédiaire (iHip) ; celle-ci semble avoir des caractéristiques communes à la fois avec le dHip et le vHip (Fanselow et Dong, 2009).



3.1.2. CYTOARCHITECTURE

L'hippocampe se compose donc de trois sous-structures (la corne d'Ammon, le gyrus denté et le subiculum), et chacune de ces parties est organisée selon une structure laminaire en trois (DG) à six couches (CA3) dont trois couches peuvent être considérées comme principales. Je vais décrire ici un modèle simplifié de l'organisation cytoarchitecturale de l'hippocampe se limitant à la présentation de ses trois couches principales dans la corne d'Ammon et le DG. Dans la corne d'Ammon (CA1, CA2 et CA3), ces couches sont appelées moléculaire, pyramidale et polymorphe. La couche polymorphe (*stratum oriens*) est la plus profonde. Elle contient des fibres (afférentes et efférentes) ainsi que des interneurons (cellules en panier et cellules trilaminaires horizontales). Dans le gyrus denté, cette couche polymorphe est nommée le hile. La couche pyramidale (*stratum pyramidale*) est la plus visible sur des coupes cérébrales, car elle contient les corps cellulaires des neurones pyramidaux, les principaux neurones excitateurs de l'hippocampe. Dans la région CA3, cette couche inclut également des interneurons. Dans le DG, la couche la plus visible est la couche granulaire (*stratum granulosum*), qui contient les corps cellulaires des cellules granulaires (le DG n'abrite pas de neurones pyramidaux). Enfin, la couche superficielle est

appelée couche moléculaire (*stratum moleculare*) à la fois dans la corne d'Ammon et le DG. Elle est constituée des dendrites apicales des cellules granulaires et pyramidales ainsi que leurs afférences : dans la corne d'Ammon, la couche moléculaire reçoit les collatérales de Schaffer ainsi que les fibres de la voie perforante provenant des couches superficielles du cortex entorhinal. Dans le gyrus denté, la couche moléculaire reçoit notamment les projections du DG controlatéral et du septum médian.

3.1.3. CONNEXIONS

Les principales connexions intrinsèques et extrinsèques de la formation hippocampique sont représentées sur la figure 9.

Connexions intrinsèques

Au sein de la formation hippocampique, la circulation de l'information est principalement unidirectionnelle. La source d'afférences la plus importante provient du cortex entorhinal. C'est l'entrée de la voie polysynaptique, ou boucle trisynaptique. Via la voie perforante, le cortex entorhinal projette sur le gyrus denté. Les cellules granulaires du DG projettent ensuite vers la partie CA3 de l'hippocampe par les fibres moussues, puis les cellules pyramidales de CA3 projettent vers CA1 par les collatérales de Schaffer. La région CA1 reçoit également des projections directes du cortex entorhinal par la voie perforante. Les cellules pyramidales de CA1 projettent ensuite sur le subiculum, la principale voie de sortie de l'hippocampe, qui clôt la boucle locale de la formation hippocampique en projetant sur le cortex entorhinal (Van Strien et al. 2009 ; Henke 2010).

Connexions extrinsèques

La formation hippocampique est connectée de manière réciproque à toute les aires associatives néocorticales, soit directement, soit par les cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampique. La majorité des afférences en provenance du néocortex sont originaires des cortex périrhinal et parahippocampique via le cortex entorhinal, et la voie de sortie principale vers le néocortex passe par le subiculum. Le complexe amygdalien envoie également des projections vers CA1 et le subiculum. Le septum fournit la majeure partie des entrées sous-corticales que reçoit la région CA3, qui projette en retour vers le noyau septal latéral. Les principales afférences hypothalamiques ciblant l'hippocampe proviennent de la région supramammillaire et projettent sur la région CA2. L'hippocampe (corne d'Ammon) et

le DG reçoivent des projections noradrénergiques et sérotoninergiques des noyaux du tronc cérébral. La formation hippocampique reçoit également des afférences thalamiques, principalement en provenance des noyaux antérieurs et du noyau reuniens (Re). Le Re projette sur la couche stratum lacunosum-moleculare de CA1, où ses connections sont colocalisées avec celles en provenance du cortex entorhinal. Les synapses associées ont lieu à la fois sur des neurones pyramidaux et sur des interneurons GABAergiques. Ces projections passent par la capsule interne et le cingulum pour atteindre la région CA1 (Andersen, 2007 ; Henke, 2010).

Le subiculum est la principale voie de sortie de l'Hip, d'une part vers les cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampique, qui vont à leur tour projeter vers le néocortex (cortex préfrontal et cortex orbitofrontal notamment), et d'autre part via le fornix, vers des structures diencephaliques (noyau Re du thalamus et corps mammillaires de l'hypothalamus). L'Hip projette également sur le septum, qui renvoie des projections GABAergiques et cholinergiques sur la formation hippocampique.

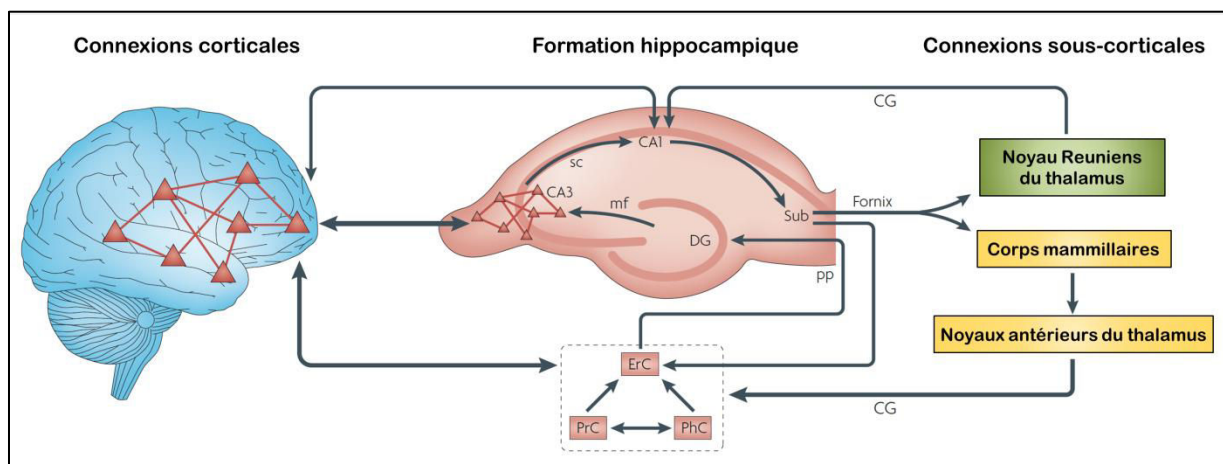


Figure 9. Représentation schématique des principales connexions intrinsèques et extrinsèques de l'hippocampe. La formation hippocampique est connectée de manière réciproque à toutes les aires associatives néocorticales, soit directement, soit par les cortex entorhinal (ErC), périrhinal (PrC) et parahippocampique (PhC). Les projections du cortex entorhinal ciblent le gyrus denté (DG) en passant par la voie perforante (pp). Le DG projette sur CA3 par le biais des fibres moussues (mf), CA3 sur CA1 via les collatérales de Schaffer (sc), et CA1 sur le subiculum (Sub), la principale voie de sortie de l'hippocampe. Le subiculum clôt le circuit interne à la formation hippocampique en projetant sur le cortex entorhinal, et cible également les corps mammillaires et le noyau Reuniens du thalamus via la fimbria-fornix. Ces deux dernières structures projettent en retour vers la formation hippocampique, directement ou indirectement, via le faisceau du cingulum (CG). *Adapté de Henke, 2010.*

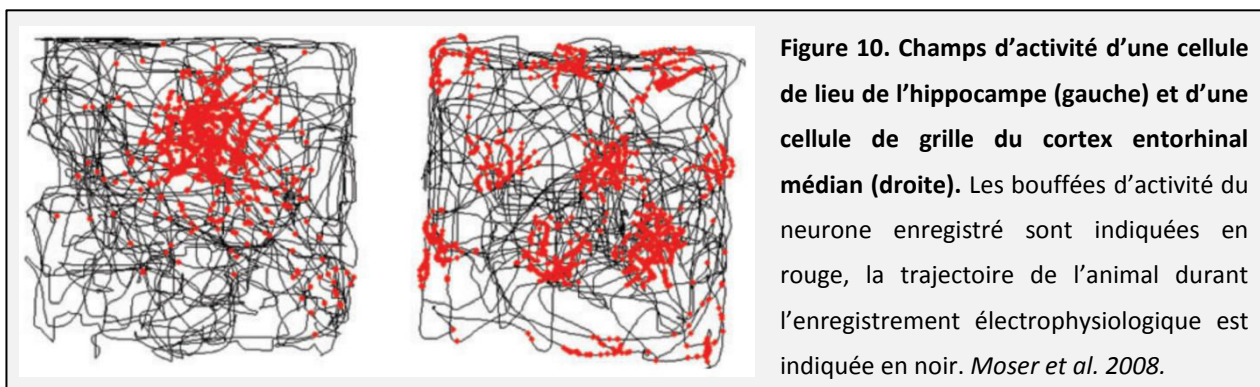
3.1.4. IMPLICATION DANS LES PROCESSUS COGNITIFS ET MNESIQUES

En 1900, Von Bechterew proposa, après avoir étudié le cerveau d'un patient devenu amnésique à la suite de lésions bilatérales affectant la formation hippocampique, que les lobes temporaux participent de façon essentielle à la mémoire. Ces résultats ont été négligés jusqu'aux travaux de Brenda Milner sur le patient H.M. en 1957. Depuis, l'hippocampe et son rôle dans les processus mnésiques ont fait l'objet de très nombreuses études. L'atteinte bilatérale de la formation hippocampique se solde, chez l'Homme, par une amnésie antérograde sévère touchant la mémoire épisodique (incapacité à former de nouveaux souvenirs relatifs aux événements personnellement vécus) et une amnésie rétrograde épisodique (oubli de souvenirs concernant des événements survenus avant l'atteinte hippocampique) généralement temporellement graduée et de sévérité très variable d'un individu à l'autre (Spiers et al. 2001). Dans le cas d'Henry Molaison par exemple, l'amnésie rétrograde dont il souffrait s'étendait sur une période d'environ 11 ans (Sagar et al. 1985, rev. Corkin 2002). L'existence de ce gradient temporel, qui indique que les lobes temporaux médians jouent un rôle limité dans le temps concernant le stockage et le rappel de souvenirs épisodiques, est d'ailleurs le point de départ des théories de la consolidation systémique que je développerai ultérieurement dans cette introduction. Ainsi, la région hippocampique est aujourd'hui unanimement considérée comme primordiale pour le bon fonctionnement de la mémoire épisodique chez l'Homme (Spiers et al. 2001, Squire et al. 2004). Cette région est également essentielle pour la mémoire spatiale, chez l'Homme (Kahana et al. 1999, Ekstrom et al. 2005) comme chez l'animal (rev. Moser et al. 2008, Lech et Suchan 2013, Aggleton 2014), notamment en raison de la présence de cellules spécialisées dans le codage neuronal de l'environnement au sein des lobes temporaux médians.

3.1.5. LE CODAGE NEURONAL DE L'ENVIRONNEMENT : ROLE DE LA REGION HIPPOCAMPIQUE

O'Keefe et Dostrovsky observèrent en 1971 que chez le rat, certaines cellules de l'hippocampe enregistrées durant l'exploration libre d'un environnement présentent des bouffées soudaines d'activité lorsque l'animal se trouve à un endroit donné. Ils constatèrent alors que cette activité neuronale particulière ne semble dépendre que du lieu où se trouve l'animal, et non de son orientation dans l'espace ou de sa trajectoire. Ils venaient de découvrir les « **cellules de lieu** », des neurones codant pour un endroit particulier de l'espace et dont l'activité dépend principalement de la position de l'animal dans

l'environnement (O'Keefe et Dostrovsky, 1971 ; Fig. 10). Les cellules de lieu ont été mises en évidence dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe chez le rat (rev. Muller 1996), puis ont également été observées chez l'Homme, chez qui elles semblent avoir des propriétés similaires à celles décrites chez l'animal (Ekstrom et al. 2003). Le champ d'activité (partie de l'environnement dans laquelle la cellule de lieu décharge fortement), qui peut être de forme et de taille variable, est différent pour chaque cellule de lieu. Il est formé en quelques minutes seulement et peut rester stable durant des semaines, tout en étant flexible en cas de modification de l'environnement (Moser et al. 2008). En 1985, Ranck mit en évidence dans le présubiculum dorsal une seconde population de neurones dont l'activité électrique est dépendante de l'orientation de la tête de l'animal (Ranck, 1985). Ces **cellules d'orientation de la tête** ne sont actives que lorsque la tête est orientée dans une position spécifique, telle une boussole, et ce indépendamment de la position de l'animal dans l'espace. Elles ont ensuite également été mises en évidence dans d'autres structures, notamment les noyaux thalamiques antérieurs, le cortex rétrosplénial et le striatum dorsal (Taube, 1998). Puis en 2005, des cellules aux propriétés fonctionnelles très particulières sont découvertes dans le cortex entorhinal médian : les **cellules de grille**. Celles-ci s'activent pour plusieurs points de l'environnement lors du déplacement de l'animal, en des lieux répartis régulièrement dans l'espace, de telle manière que leur activité dessine une grille, un maillage de l'environnement (Hafting et al. 2005 ; Fig. 10). Il existe même dans le cortex entorhinal médian des cellules à la fois de grille et de direction de la tête qui codent ces deux paramètres de l'environnement à la fois (Sargolini et al. 2006). Enfin, les **cellules de bordure** du cortex entorhinal sont actives lorsque l'animal est à proximité d'un mur ou d'une limite de l'environnement (Solstad et al. 2008). Ensemble, ces différentes cellules aux propriétés fonctionnelles spécifiques formeraient le substrat neuronal d'une représentation allocentrique de l'espace (Moser et al. 2008).



3.1.6. LOBE TEMPORAL MEDIAN, MEMOIRE DECLARATIVE ET MEMOIRE SPATIALE : VERS UN MODELE UNIFIE DES MECANISMES NEURONAUX SOUS-JACENTS ?

L'hippocampe et les structures adjacentes du lobe temporal médian ont longtemps été associés à la mémoire déclarative, sans distinction entre mémoire épisodique et mémoire sémantique (Tulving et Markowitsch, 1998). En 1997, la description de l'amnésie antérograde dont souffrent trois jeunes patients suite à l'atteinte bilatérale et focale de l'hippocampe est venue remettre en question ce postulat (Vargha-Khadem et al. 1997). Ces trois jeunes patients avaient de grandes difficultés à se rappeler des événements personnels qui animent leur quotidien (amnésie antérograde épisodique), mais leur QI était normal, et malgré leur pathologie, ils suivaient une scolarité classique, sans retard prononcé sur les autres enfants de leur âge. Ils étaient ainsi capables d'acquérir des connaissances abstraites, mais également concrètes sur le monde (mémoire sémantique préservée). L'examen radiologique montrait une sévère pathologie hippocampique chez ces trois patients, mais pas d'atteinte des structures corticales adjacentes, comme le cortex parahippocampique. Les auteurs ont conclu à une distinction entre mémoire épisodique, associée à l'intégrité de l'hippocampe, et mémoire déclarative dans son ensemble, également dépendante du cortex parahippocampique (Vargha-Khadem et al. 1997 ; voir aussi Tulving et Markowitsch, 1998).

D'autre part, les structures impliquées dans la mémoire épisodique, et notamment l'hippocampe et le cortex entorhinal, le sont également dans la mémoire spatiale. Si l'amnésie dont souffrait le patient H.M. et la présence de cellules de lieu dans l'Hip (et leur rôle dans la mémoire spatiale) apparaissent au premier abord comme deux événements distincts, et que les différentes fonctions sous-tendues par l'hippocampe peuvent sembler dissociables, une hypothèse émergente stipule que les processus de mémoire et de planification seraient, d'un point de vue évolutif, issus de ceux permettant la navigation. Les mécanismes neuronaux à l'œuvre lors de la navigation physique, dans le monde réel, seraient les mêmes que ceux en jeu dans la navigation mentale dans l'espace et dans le temps (Buzsaki et Moser, 2013). Cette hypothèse est appuyée par le fait que le réseau neuronal hippocampo-entorhinal est extrêmement développé et complexe chez les mammifères par rapport à des espèces inférieures (Menzel et al. 1996), et largement surdimensionné pour ne traiter que de l'information spatiale (Wilson et McNaughton 1993). De plus, chez l'Homme, la navigation, la remémoration, la projection dans le futur et même

la projection à la place d'autrui (ou théorie de l'esprit) sont des activités mentales engageant des réseaux neuronaux très similaires (Burgess et al. 2002, Buckner et Carroll 2007). L'ordonnement de la mémoire épisodique (chronologie) et la planification d'actions spatiales (trajet) seraient ainsi des processus basés sur les mêmes mécanismes neuronaux, rapprochant les séquences de mouvements nécessaires à une navigation optimale dans l'environnement aux séquences d'éléments successifs composant un souvenir épisodique (Buzsaki et Moser, 2013).

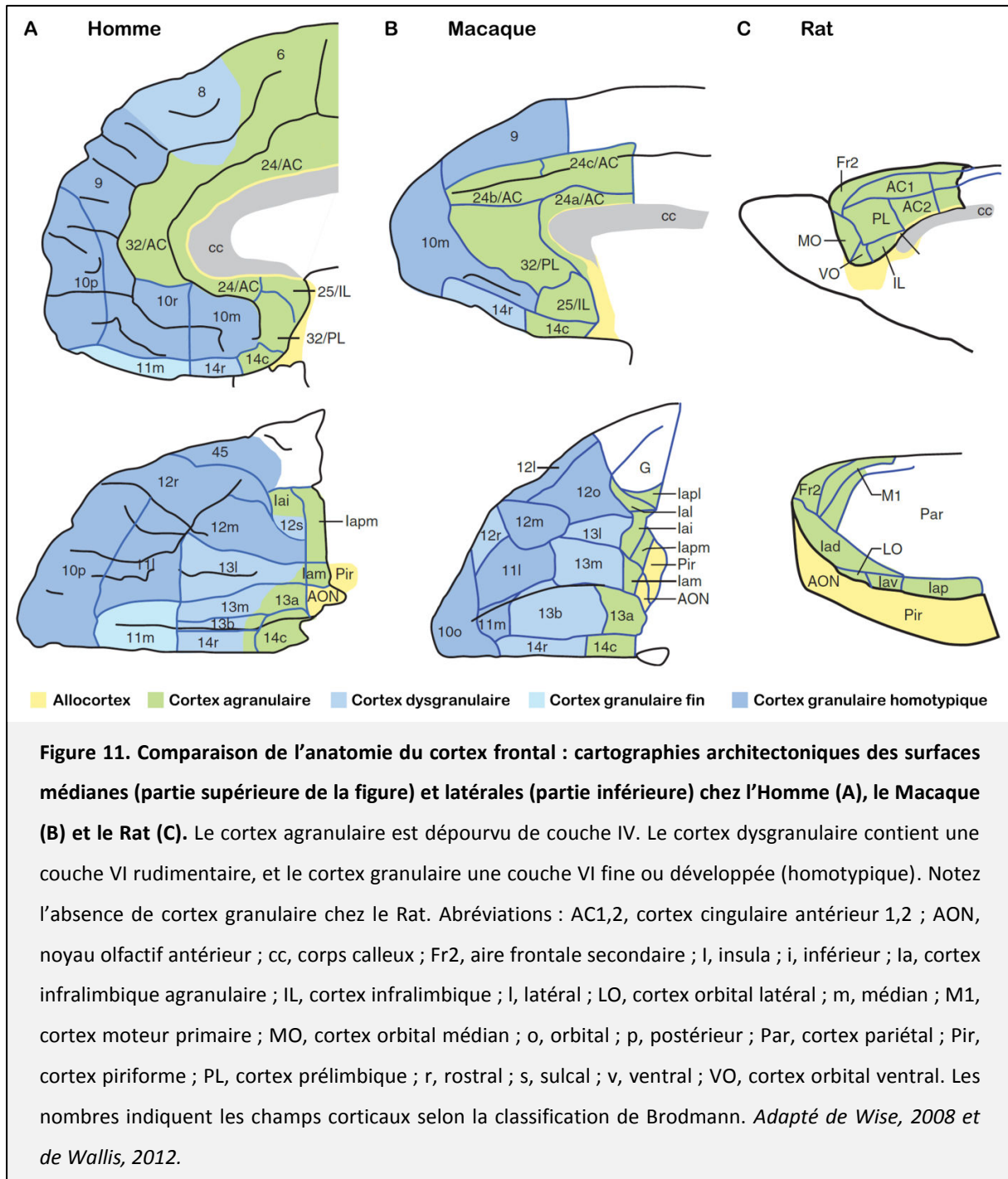
Dans cette thèse, l'étude de la partie dorsale de l'Hip a été privilégiée en raison de son rôle à la fois dans l'acquisition et le rappel d'informations spatiales (e.g. Loureiro et al. 2012), et de la taille inférieure des champs d'activité des cellules de lieu de l'Hip dorsal en comparaison des champs d'activité des cellules de lieu de l'Hip ventral (e.g. Jung et al. 1994 ; Kjelstrup et al. 2008), signe d'un codage spatial d'une résolution supérieure dans l'Hip dorsal. Le rôle de l'Hip dorsal a été étudié dans le rappel d'une mémoire spatiale de référence récente ou ancienne (publications 3 et 4) et dans une tâche de mémoire spatiale récente nécessitant de faire preuve de flexibilité comportementale (publication 2).

3.2. LE CORTEX PREFRONTAL MEDIAN

3.2.1. DESCRIPTION ANATOMIQUE

Le cortex préfrontal est la partie antérieure du lobe frontal du cerveau, située en avant des régions prémotrices (Fig. 11). Chez l'Homme, le cortex préfrontal est divisé en quatre grandes régions dites orbitale, dorsolatérale, ventrolatérale et médiane. Chez le Rat, le cortex préfrontal médian (*medial prefrontal cortex*, mPFC) peut être divisé en quatre sous-régions (de la plus ventrale à la plus dorsale) : le cortex infralimbique (IL), le cortex prélimbique (PL), le cortex cingulaire antérieur (ACC) et le cortex agrulaire médian (AGm ; aussi appelée aire frontale secondaire, Fr2) (Heidbreder et Groenewegen, 2003). Historiquement, le cortex préfrontal a été défini sur la base des projections du noyau médiodorsal du thalamus, qui semblait être le seul noyau thalamique à innerver cette partie du cerveau (Rose et Woolsey, 1948). Chez les primates, ce noyau envoie des projections vers les régions dorsolatérale, orbitale et médiane du cortex préfrontal ; chez le rat, seules les régions orbitale et médiane sont concernées par ces afférences. Mais cette définition n'est pas satisfaisante : on sait aujourd'hui que les noyaux intralaminaires et les noyaux ventraux

de la ligne médiane du thalamus projettent également sur le cortex préfrontal (Uylings et al. 2003). Quoiqu'il en soit, le cortex préfrontal de l'Homme et des primates est considérablement plus développé que celui des autres mammifères, ce qui se traduit par un volume plus important et la présence de cortex granulaire, absent chez le Rat (Fig. 11 ; Wise, 2008 ; Wallis, 2012).



Pour Uylings et al., il ne s'agirait pas d'une limite en soi à une possible homologie fonctionnelle : des espèces éloignées peuvent avoir des aires corticales à la cytoarchitecture

distincte remplissant la même fonction (cas du cortex primaire moteur par exemple, granulaire chez le Rat, agranulaire chez le Primate, et pourtant considérés comme homologues). Ces auteurs proposent ainsi que pour établir une homologie valable entre des aires corticales d'espèces différentes, il faille considérer 5 points : (1) les connexions neuroanatomiques, (2) les propriétés fonctionnelles (électrophysiologiques), (3) la neurotransmission, (4) le développement embryonnaire, (5) pour des espèces proches uniquement, la cytoarchitecture (Uylings et al. 2003). Après analyse, ils conclurent que le cortex préfrontal chez le Rat joue un rôle comparable à celui des aires orbitales et médianes, voire au cortex préfrontal dorsolatéral chez l'Homme (Uylings et al. 2003). A l'opposé, Brown et Bowman considèrent que le cortex préfrontal dorsolatéral pourrait être la région corticale la plus représentative de la singularité évolutive des Primates (Brown et Bowman, 2002). La question divise donc les chercheurs et reste ouverte (Preuss 1995, Uylings et al. 2003, Wise 2008, Seamans et al. 2008). En ce qui concerne le cortex préfrontal médian du Rat étudiée dans cette thèse, il semble comparable, selon Seamans, au cortex cingulaire antérieur chez les Primates et l'Homme (Seamans et al. 2008).

3.2.2. CONNEXIONS

Chez le rat, le cortex préfrontal médian (mPFC) dans son ensemble est connecté de manière réciproque aux cortex sensoriel, moteur et entorhinal, ainsi qu'aux noyaux médio-dorsaux (MD) et ventraux de la ligne médiane (ReRh) du thalamus. Les **afférences** communes aux quatre sous-régions du mPFC incluent en plus l'hippocampe (CA1 et subiculum), le noyau basal de l'amygdale, l'aire tegmentale ventrale, le claustrum et le locus coeruleus (Hoover et Vertes, 2007). Les quatre sous-régions du mPFC sont également fortement connectées entre elles. On observe un gradient dorso-ventral au sein du mPFC : les régions dorsales du mPFC (AGm et ACC) reçoivent davantage d'afférences sensorimotrices (surtout l'AGm, fortement connecté aux cortex somatosensoriels I et II, fronto-polaires et occipitaux), tandis que la partie ventrale (IL et PL) reçoit principalement des afférences du système limbique (formation hippocampique, cortex parahippocampique et cortex orbital notamment ; Hoover et Vertes, 2007). De même en ce qui concerne les **efférences** du mPFC, la partie dorsale, et particulièrement l'AGm, projette fortement sur les régions sensori-motrices du cerveau (cortex moteurs et somatosensoriels, striatum dorsal, noyaux ventraux et latéraux du thalamus, tectum, pretectum et formation réticulée notamment) mais peu sur les régions

limbiques (Gabbott et al. 2005, Vertes 2006). A l'opposé, le mPFC ventral (IL/PL) projette principalement sur les autres sous-régions du mPFC, le noyau du lit de la strie terminale, le noyau accumbens et l'amygdale (Gabbott et al. 2003, 2005, Vertes 2006). De par ses connexions anatomiques, le mPFC est donc idéalement positionné pour intégrer des informations provenant d'un grand nombre de régions cérébrales (Heidbreder et Groenewegen, 2003 ; Hoover et Vertes, 2007). Il est à noter qu'il n'y a pas de projection directe du mPFC vers l'hippocampe (Jay et Witter, 1991) ; c'est d'ailleurs un argument neuroanatomique fort pour la nécessité d'une boucle hippocampo-cortico-thalamique fonctionnellement impliquée dans les processus mnésiques.

3.2.3. IMPLICATION DANS LES PROCESSUS COGNITIFS ET MNESIQUES

Les études chez l'Homme, le Singe et le Rat s'accordent sur le fait que le cortex préfrontal contribue aux fonctions exécutives, c'est-à-dire à un ensemble de processus cognitifs nécessaires à la planification de séquences comportementales complexes. Le mPFC a ainsi été associé à des fonctions diverses qui comprennent les processus attentionnels, le contrôle viscéromoteur, la prise de décision, ou encore la planification et l'organisation d'une action orientée vers un but (rev Dalley et al. 2004) ; cette structure est fortement impliquée dans les processus liés à la flexibilité comportementale et au choix d'une stratégie optimale (Ragozzino et al. 1999a,b, 2003 ; Floresco et al. 2008, Bissonnette et al. 2013). Le mPFC joue aussi un rôle majeur dans la mémoire : son implication a d'abord été démontrée dans la mémoire de travail (rev. Funahashi et al. 2006), puis dans la mémoire ancienne (rev. Frankland et Bontempi 2005, Euston et al. 2012), et plus récemment, plusieurs publications semblent également indiquer sa participation dans le rappel d'une mémoire récente (Blum et al. 2006, Léon et al. 2010, Gonzalez et al. 2013).

Au cours de cette thèse, le rôle du mPFC chez le Rat a été étudié dans la flexibilité comportementale (publication 2) et dans la mémoire spatiale récente (publication 3) et ancienne (publication 4).

3.3. LES NOYAUX VENTRAUX DE LA LIGNE MÉDIANE DU THALAMUS : LES NOYAUX REUNIENS (RE) ET RHOMBOÏDE (RH)

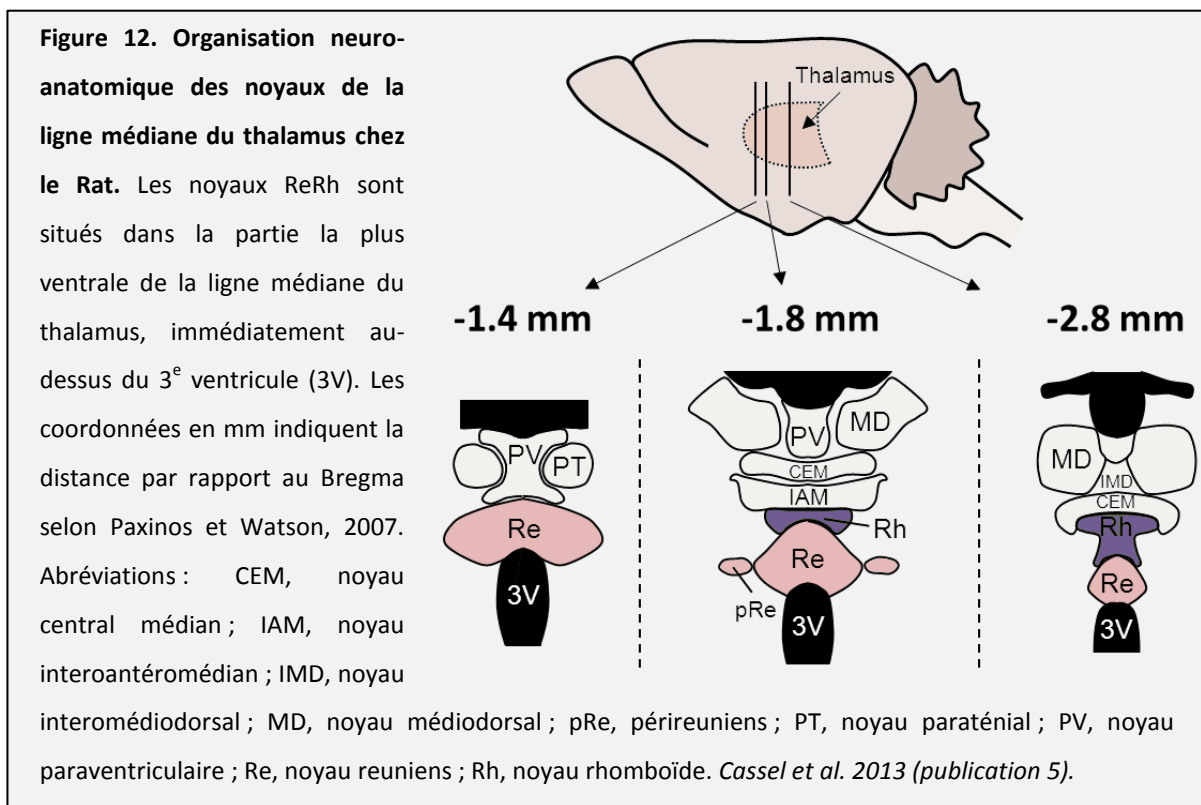
Sur la base de leurs connexions neuroanatomiques et en raison de la capacité de ces noyaux thalamiques à induire une modification globale de l'activité corticale lors de leur stimulation (Dempsey et Morrison, 1942), les noyaux ventraux de la ligne médiane sont classés dans le groupe des noyaux « non-spécifiques » associés aux mécanismes d'éveil cortical (Groenewegen et Berendse, 1994). A l'opposé, le groupe des noyaux spécifiques du thalamus (e.g. les noyaux de relais sensoriels) projette spécifiquement vers les aires corticales spécialisées dans le traitement de la modalité sensorielle associée (Dempsey et Morrison, 1942). Les noyaux non-spécifiques exercent une influence étendue sur le cortex et sont un élément clé du système réticulé activateur ascendant (ou *ascending reticular arousal system*) assurant l'éveil cortical et la capacité de réaction modulée aux stimuli environnants (rev. Jones 2003). Le concept de thalamus non-spécifique a été remis en question lorsqu'il a été montré que les noyaux ventraux de la ligne médiane (ReRh) et les noyaux intralaminaires ne projettent pas de manière diffuse à tout le néocortex, mais plutôt de manière spécifique à certaines régions corticales, principalement préfrontales (Macchi et Bentivoglio, 1999 ; Van der Werf et al. 2002 ; Vertes et al. 2003 ; Hsu et Price, 2007). En 2002, Van der Werf et ses collaborateurs ont ainsi proposé de distinguer quatre groupes fonctionnels au sein des noyaux non-spécifiques du thalamus :

- un groupe dorsal (noyaux paraventriculaire, paraténial et intermédiadorsal) impliqué dans les fonctions viscéro-limbiques ;
- un groupe latéral (noyaux central latéral, paracentral et partie antérieure du noyau central médian) impliqué dans les fonctions cognitives ;
- un groupe postérieur (noyaux parafasciculaire et centro-médian) impliqué dans les fonctions limbiques et motrices ;
- un groupe ventral (noyaux ReRh et partie postérieure du noyau central médian) impliqué dans le traitement sensoriel multimodal et les processus mnésiques.

Ces noyaux dits non-spécifiques joueraient ainsi tous un rôle dans l'éveil cortical, mais seraient spécialisés dans le traitement de certaines informations cognitives, émotionnelles, sensorielles et motrices (en fonction de leur groupe) et agiraient de concert pour maintenir un état cohérent d'éveil cortical (Van der Werf et al. 2002).

3.3.1. DESCRIPTION ANATOMIQUE

Les noyaux Reuniers (Re) et Rhomboïde (Rh) font partie d'un ensemble de noyaux localisés dans la partie médiane du thalamus qui couvre toute son étendue dorso-ventrale (Paxinos et Watson, 2007) et appelés les noyaux de la ligne médiane du thalamus. Dans la partie antérieure (ou rostrale) du thalamus se trouvent, sur l'axe dorso-ventral, le noyau paraventriculaire et le noyau paraténial, puis les noyaux Rh et Re, ce dernier étant localisé juste au-dessus du troisième ventricule (Fig. 12). Plus postérieurement, le noyau interantéromédian (puis encore plus postérieurement, le noyau intermédiodorsal) et le noyau central médian du thalamus viennent se placer entre le noyau paraventriculaire et le Rh, coiffant celui-ci. Dans sa partie antérieure, le Re est divisé en deux parties séparées par le troisième ventricule et le noyau paraventriculaire ; dans sa partie médiane, puis postérieure, ses deux parties gauche et droite se rejoignent et forment un noyau unique. Il est alors bordé latéralement par le périreuniers (pRe), ou ailes du Re. Le Rh apparaît plus postérieurement que le Re, et est situé juste au-dessus de ce dernier sur toute son étendue antéro-postérieure (Van der Werf et al. 2002 ; Paxinos et Watson 2007). Les noyaux ReRh sont composés d'un conglomérat de cellules sans cytoarchitecture particulière (Van der Werf et al. 2002).



3.3.2. NEUROTRANSMISSION

Les noyaux ReRh semblent utiliser principalement le glutamate comme neurotransmetteur : la plupart des neurones du Re projetant vers l'hippocampe (et le septum) sont aspartatergiques/glutamatergiques (Bokor et al. 2002). Une proportion importante de cellules du Re exprime à la fois la calrétinine et la calbindine (des protéines liant le calcium ; Arai et al. 1994), une caractéristique commune aux noyaux thalamiques en général (Winsky et al. 1992), mais pas ou très peu de cellules du Re expriment la parvalbumine (protéine liant le calcium caractéristique de certains interneurons GABAergiques, Arai et al. 1994). Il en est de même pour les neurones du noyau Rh, qui expriment la calbindine (mais de manière moins intense que dans le noyau Re), et pas ou peu la parvalbumine (Arai et al. 1994 ; Bokor et al. 2002).

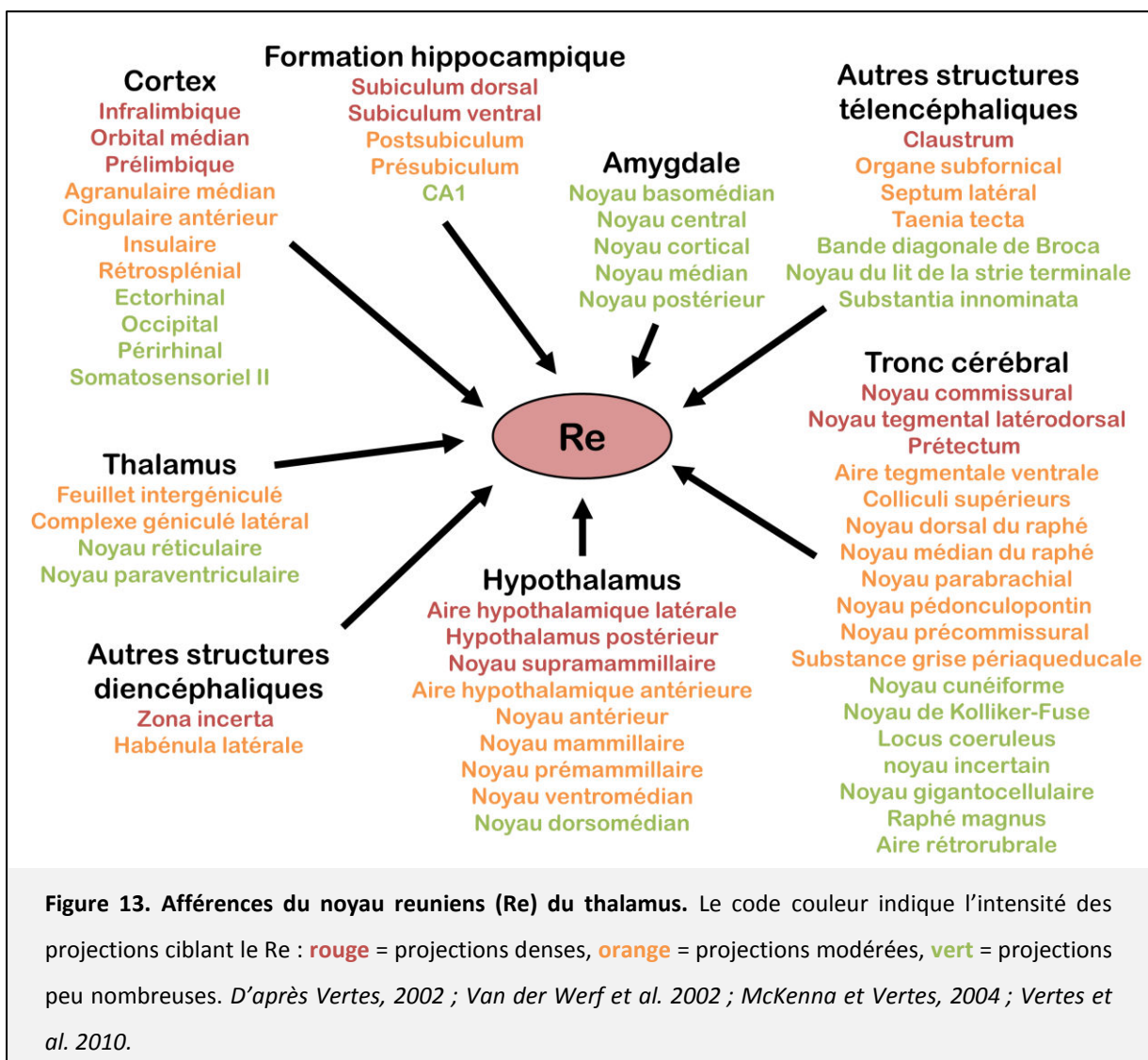
3.3.3. CONNEXIONS

Les noyaux ReRh du thalamus sont une zone de convergence de nombreuses afférences en provenance du télencéphale, du diencephale et du tronc cérébral (Mc Kenna et Vertes, 2004 ; Hoover et Vertes, 2007) ; ils projettent également sur de nombreuses structures, surtout le Rh, dont les projections sont plus diffuses que le Re (Vertes, 2002 ; Vertes et al. 2006, 2010). Dans cette partie concernant les connexions des noyaux Re et Rh du thalamus, seules les principales afférences et efférences seront décrites, avec un intérêt particulier pour les connexions avec l'Hip et le mPFC, qui seront détaillées dans la figure 17.

Afférences du noyau reuniens

Le noyau Re du thalamus reçoit des projections en provenance de nombreuses régions corticales et sous-corticales (Fig. 13). Les plus denses d'entre elles proviennent des quatre sous-régions du mPFC (Witter et al. 1990 ; Vertes, 2002 ; McKenna et Vertes, 2004). Les autres sources d'afférences corticales sont les cortex orbital médian, insulaire, ectorhinal, périrhinal, rétrosplénial, occipital et somatosensoriel secondaire. Le Re reçoit également des afférences de la formation hippocampique, principalement de fortes projections en provenance du subiculum (dorsal et ventral), du présubiculum et du postsubiculum ; dans une moindre mesure de la région CA1, mais aucune du gyrus denté (Witter et al. 1990 ; McKenna et Vertes, 2004). D'autres afférences proviennent également de l'amygdale, de la bande diagonale de Broca, du septum latéral et du claustrum (Van der Werf et al. 2002 ;

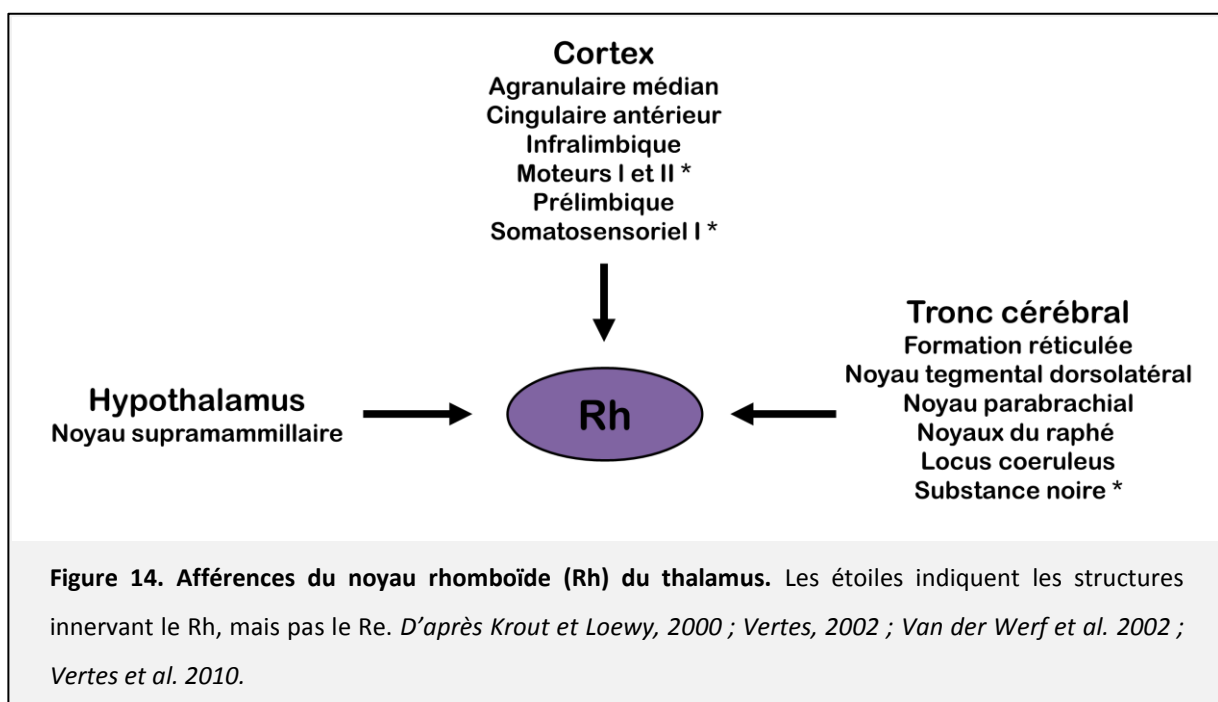
McKenna et Vertes, 2004). Le Re est aussi innervé par des noyaux diencéphaliques incluant d'autres régions thalamiques (le noyau réticulaire, le complexe géniculé latéral), sous-thalamiques (zona incerta) et hypothalamiques (l'aire hypothalamique antérieure, l'aire hypothalamique latérale, l'aire préoptique, les noyaux pré- et supra-mammillaires, les noyaux ventromédians et antérieurs). Enfin, le Re reçoit des afférences du tronc cérébral venant de la substance grise périaqueducale, des noyaux dorsaux et médian du raphé, du raphé magnus, du prétegmentum, de l'aire tegmentale ventrale et latérodorsale, du locus coeruleus, des colliculi supérieurs, du noyau précommissural et du noyau parabrachial (Krout et al. 2002, McKenna et Vertes, 2004 ; Vertes et al. 2010).



Afférences du noyau rhomboïde

Le noyau Rh a fait l'objet de moins d'attention dans l'étude et la description de ses connexions que le noyau Re (Groenewegen et Witter, 2004) ; c'est pourquoi la figure 14,

représentant les afférences du noyau Rh, n'indique pas l'intensité relative de celles-ci. Tout comme pour le Re, les afférences corticales du Rh proviennent de l'ensemble du mPFC (AGm, ACC, IL et PL) ainsi que du cortex somatosensoriel primaire et des cortex moteurs primaire et secondaire (Vertes, 2002 ; Van der Werf et al. 2002 ; Vertes et al. 2004). La majeure partie des structures cérébrales qui innervent le Rh se situent dans le tronc cérébral : les noyaux du raphé, la formation réticulée, la substance noire, le locus coeruleus, le noyau tegmental dorsolatéral et le noyau parabrachial (Krout et Loewy, 2000 ; Van der Werf et al. 2002 ; Vertes et al. 2010). Les seules entrées diencephaliques du Rh semblent provenir du noyau supramammillaire de l'hypothalamus (Vertes et al. 2010).

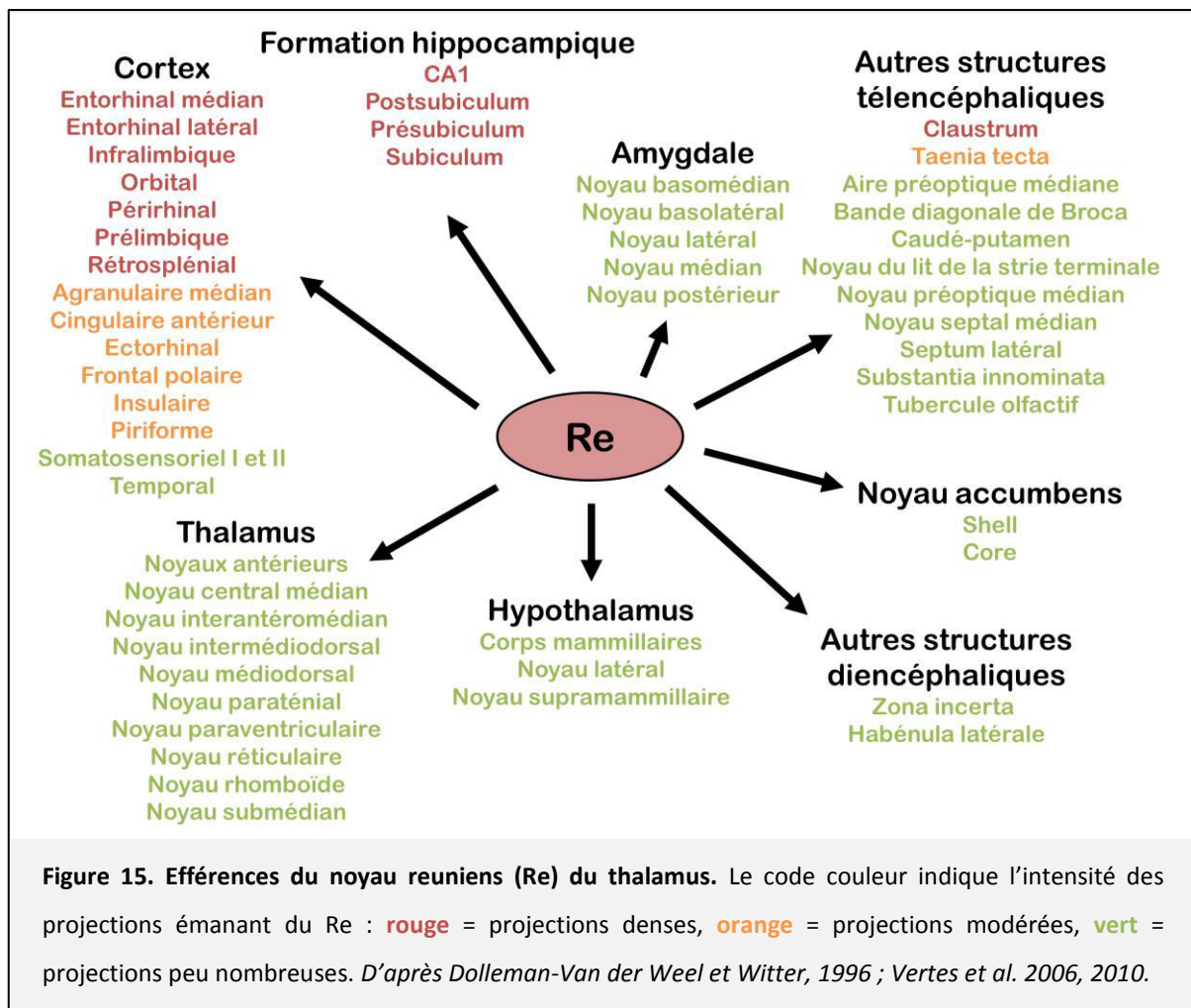


Afférences du noyau reuniens

Les projections du Re sont principalement dirigées vers le cortex (notamment préfrontal médian) et la formation hippocampique (Fig. 15). Les projections corticales ciblent le PL et l'IL de manière prononcée, l'ACC et l'AGm dans une moindre mesure, ainsi que les cortex entorhinal (latéral et médian), entorhinal, périrhinal, piriforme, orbital, insulaire, frontal polaire et somatosensoriels (Van der Werf et al. 2002, Vertes et al. 2006 ; Hoover et Vertes, 2007, Varela et al. 2014). D'autres structures télencéphaliques sont également innervées, dans une moindre mesure, par le Re : le claustrum, le tenia tecta, l'aire préoptique médiane, la bande diagonale de Broca, le caudé-putamen, le noyau du lit de la strie terminale, le noyau préoptique médian, le noyau septal médian, le septum latéral, la substantia

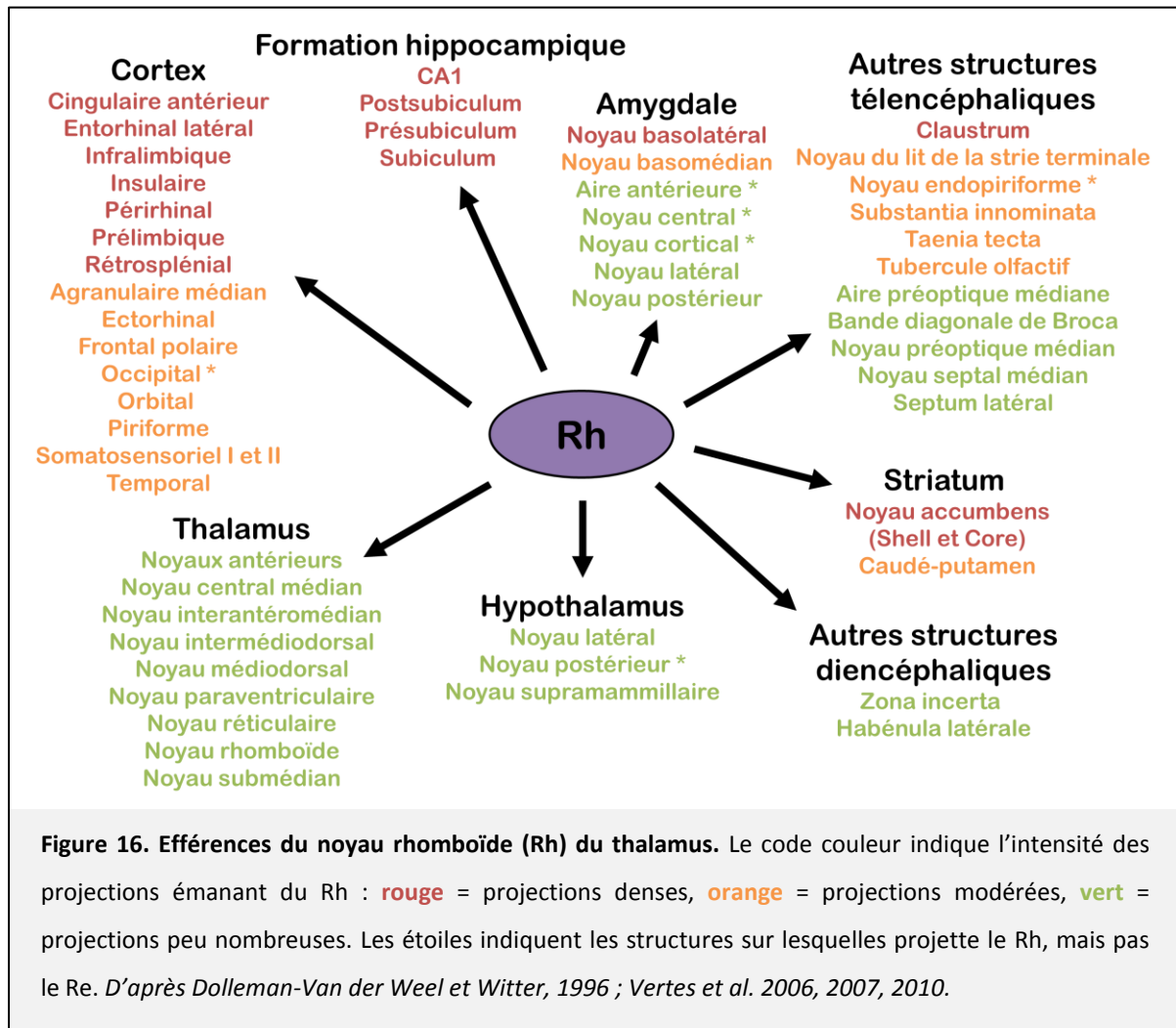
innominata et les tubercules olfactifs. La formation hippocampique, sur laquelle le Re projette abondamment, reçoit des connexions au niveau de CA1 (sur tout l'axe dorso-ventral), et de manière très dense dans le présubiculum, le parasubiculum et le subiculum, mais pas du tout au niveau de CA2/CA3 ou du DG. La densité des projections apparaît bien supérieure (jusqu'à 10x) dans la partie ventrale de l'Hip par rapport à sa partie dorsale, suggérant une connexion privilégiée du Re avec l'Hip ventral (Vertes et al. 2007 ; Hoover et Vertes, 2011). De manière intéressante, les équipes de Hoover et Vertes (2011) et Varela et al. (2014) ont toutes deux récemment mise en évidence, via une approche de double-marquage à l'aide de traceurs rétrogrades injectés dans le mPFC et l'Hip ou le subiculum, qu'une proportion non négligeable de neurones du Re projettent à la fois vers le mPFC et vers la formation hippocampique à l'aide de collatérales (3 à 6 % selon Hoover et Vertes, 2011 ; 8% selon Varela et al. 2014). De plus, les projections du Re dépendent en grande partie de populations cellulaires distinctes : les neurones de la partie dorsolatérale du Re projettent ainsi principalement vers la région CA1 de l'Hip, ceux du Re latéral vers le subiculum, ceux du Re médian vers le cortex entorhinal médian, ceux du Re ventral vers le cortex entorhinal latéral et enfin, les neurones du périreuniens (pRe) cibleraient surtout le cortex périrhinal (Dolleman-Van der Weel et Witter, 1996). Bokor et al. (2002) ont également décrit une ségrégation topographique des projections du Re vers l'Hip et le septum médian. Vertes et al. (2006) ont mis en évidence que les projections du Re vers le cortex entorhinal médian émanent principalement du Re rostral, tandis que celles ciblant le cortex entorhinal latéral proviennent surtout du Re caudal, et celles à destination du cortex périrhinal du pRe. Il semble donc que des populations distinctes de neurones du Re, bien que morphologiquement impossibles à distinguer, innervent de manière spécifique différentes régions hippocampiques et corticales (Dolleman-Van der Weel et Witter, 1996).

Enfin, le Re projette aussi, mais dans des proportions beaucoup plus restreintes, sur l'amygdale (noyaux basomédian, basolatéral, latéral, médian et postérieur), l'hypothalamus (corps mammillaires, noyau latéral et noyau supramammillaire), le noyau accumbens (shell et core), la zona incerta et l'habénula latérale (Dolleman-Van der Weel et Witter, 1996 ; Vertes et al. 2006, 2010).



Efférences du noyau rhomboïde

Les efférences du Rh sont globalement comparables à celles du Re (cf. Fig. 15 (pour le Re) et Fig. 16, synthétisant l'ensemble des projections du Rh, ainsi que leur intensité relative). Néanmoins, celles-ci sont plus diffuses, pas tant en ce qui concerne leurs cibles, mais surtout en terme d'intensité : là où seuls le cortex et la formation hippocampique sont fortement innervés par le Re, le Rh projette également de manière marquée sur l'amygdale et le striatum (noyau accumbens et caudé-putamen) notamment. En revanche, seule la partie dorsale de l'Hip (CA1) reçoit des projections du Rh, alors que le Re projette sur toute l'étendue dorso-ventrale de l'Hip (Vertes et al. 2006).



Efférences des noyaux ReRh : zoom sur les projections hippocampiques et corticales

Les noyaux ReRh du thalamus sont donc idéalement positionnés pour intégrer et distribuer des informations en provenance de nombreuses structures mésencéphaliques, diencéphaliques et télencéphaliques. En raison de leurs connexions conjointes avec des noyaux du tronc cérébral et des régions corticales impliquées dans le traitement des informations sensorielles, il a notamment été proposé que les noyaux ReRh jouent un rôle dans la perception consciente polysensorielle (Van der Werf et al. 2002). Mais de par leurs connexions réciproques et prononcées avec le mPFC et l'Hip (Fig. 17), ils sont également très bien situés pour traiter et relayer l'information en provenance et à destination de ces deux structures (Hoover et Vertes 2007, Vertes et al. 2010).

C'est cette seconde caractéristique qui a principalement guidé les travaux réalisés au cours de cette thèse, centrée sur ce circuit hippocampo-cortico-thalamique.

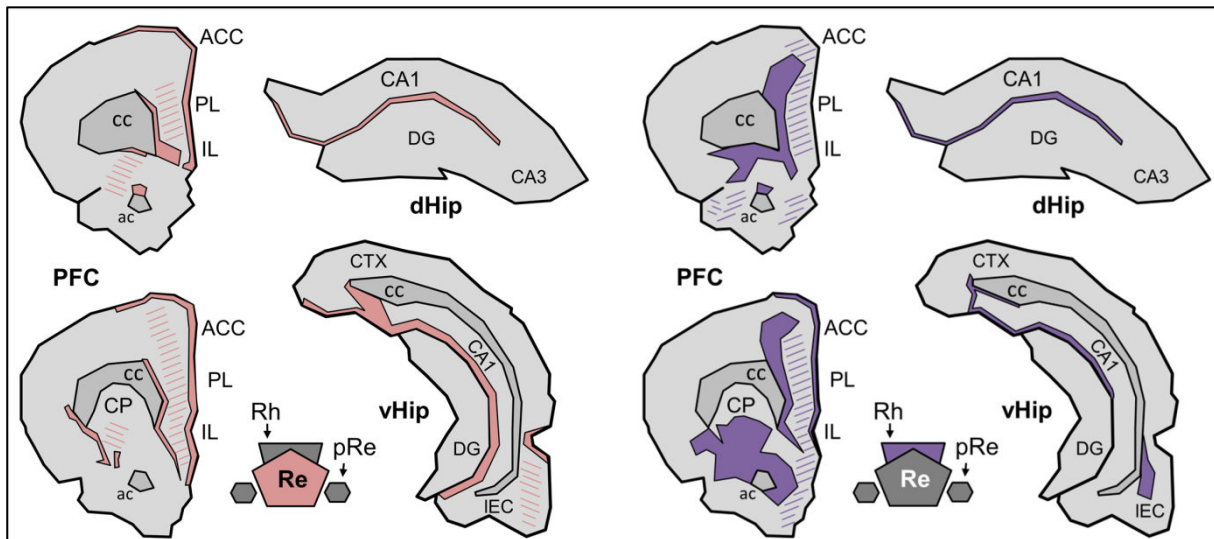


Figure 17. Zones de projection des efférences des noyaux Re (gauche) et Rh (droite) du thalamus sur le cortex préfrontal (PFC) et l'hippocampe (dorsal, dHip ; ventral, vHip). Localisation et étendue des champs terminaux des fibres en provenance des noyaux ReRh : les projections denses sont indiquées par des zones pleines, les projections plus éparses par des hachures. Au niveau du cortex préfrontal médian, les terminaisons des fibres en provenance des noyaux ReRh finissent principalement dans les couches I, V et VI des cortex PL et IL, ainsi que dans l'ACC et l'AGm, mais de manière moins dense. Les projections sur l'Hip sont confinées à la couche lacunosum-moléculaire de CA1 (pas de projections sur CA2/CA3 ou le DG), tout comme celles ciblant le subiculum, le présubiculum et le parasubiculum qui terminent dans la couche moléculaire. Au niveau de la région hippocampique, les noyaux ReRh innervent aussi les cortex ectohippocampique, périrhinal et entorhinal latéral et médian. Ces illustrations ont été réalisées pour une revue sur les noyaux ReRh publiée en 2013 par notre équipe dans *Progress in Neurobiology* (Cassel et al. 2013, publication 5), sur la base d'une étude des projections de ces noyaux réalisée à l'aide du marqueur antérograde PHA-L (*Phaseolus vulgaris* leucoagglutinine) par l'équipe de Vertes et collaborateurs (Vertes et al. 2006). Abréviations : ac, commissure antérieure ; ACC, cortex cingulaire antérieur ; CA1/CA3, régions 1 et 3 de la corne d'Ammon de l'hippocampe ; cc, corps calleux ; CP, caudé putamen ; CTX, cortex ; DG, gyrus denté ; IL, cortex infralimbique ; IEC, cortex entorhinal latéral ; pRe, périréuniens ; PL, cortex prélimbique ; Re, noyau reuniens ; Rh, noyau rhomboïde.

3.3.4. MODULATION DE L'ACTIVITE CORTICALE ET HIPPOCAMPIQUE PAR LES NOYAUX RE RH

Eu égard aux connexions entre les noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus, le mPFC et l'Hip, il est probable que les noyaux ReRh puissent influencer l'activité corticale et hippocampique. A l'heure actuelle, les études ayant mis en évidence l'effet de la stimulation ou de l'inactivation fonctionnelle des noyaux ReRh sur l'Hip ou le mPFC sont encore peu nombreuses, et à ma connaissance, aucune n'a analysé l'effet d'une stimulation ou d'une inactivation du mPFC ou de l'Hip sur le fonctionnement des noyaux ReRh.

Modulation de l'activité du mPFC par les noyaux ReRh

En 2006, Di Prisco et Vertes examinèrent l'effet de la stimulation des noyaux ReRh sur l'activité du mPFC chez le rat. Ils implantèrent d'une part une électrode de stimulation sur la ligne médiane du thalamus, d'autre part des électrodes d'enregistrement dans les quatre sous-régions du mPFC (AGm, ACC, PL et IL). La stimulation du noyau paraventriculaire (noyau le plus dorsal de la ligne médiane) ou des noyaux ReRh (noyaux ventraux) entraînent toutes deux des potentiels évoqués de large amplitude dans les quatre sous-divisions du mPFC. Les potentiels évoqués à l'amplitude la plus large sont observés au niveau des cortex IL et PL à la suite de la stimulation des noyaux ReRh. De plus, la latence des réponses évoquées enregistrées indique que les connexions mises en jeu sont monosynaptiques, et les caractéristiques de ces potentiels évoqués sont similaires à celles des potentiels évoqués obtenus à la suite de la stimulation des noyaux médiadorsaux du thalamus, de l'hippocampe ou du mPFC controlatéral, structures dont l'influence sur l'activité du mPFC est avérée. Les auteurs concluent ainsi que les noyaux ReRh représentent une source directe d'afférences excitatrices pour le mPFC dont les propriétés laissent à penser qu'elle pourrait jouer un rôle fonctionnel non-négligeable dans la modulation de l'activité de cette région corticale (Di Prisco et Vertes, 2006). En 2011, Eleore et al. ont également montré que chez la souris, des stimulations appariées (*paired-pulse stimulation*) du noyau Re entraînent la facilitation de la seconde réponse dans le mPFC, preuve supplémentaire que l'activité du noyau Re peut moduler celle du mPFC.

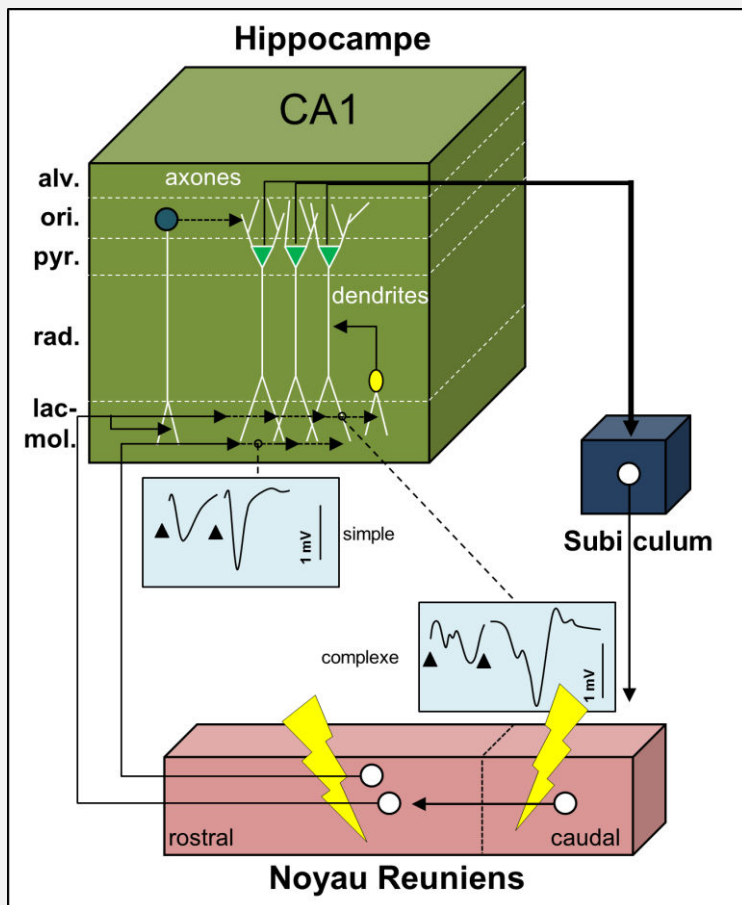
Modulation de l'activité de l'hippocampe par les noyaux ReRh

En 1997, Dolleman-van der Weel et al. ont analysé l'effet d'une stimulation du noyau Re sur l'activité de la région CA1 de l'hippocampe chez le rat anesthésié à l'uréthane, via des enregistrements unitaires et de potentiels évoqués. Ils ont observé que la stimulation du Re entraîne des déflexions négatives dans la couche lacunosum-moleculare, et des déflexions positives dans la couche radiatum. Ils ont également constaté une facilitation de la seconde réponse en cas de stimulations appariées (comme Eleore et al. en 2011 dans le mPFC), qu'ils considèrent comme robuste, mais qui n'entraîne néanmoins pas de décharge des cellules pyramidales. Par contre, ces neurones sont à l'origine de décharges dans les couches oriens/alveus et radiatum, indiquant l'activation d'interneurones locaux. Le noyau Re est donc capable de moduler l'activité de CA1, d'une part au travers d'une dépolarisation des

neurones pyramidaux (qui à elle seule ne suffit pas à atteindre le seuil de décharge de ces neurones), et d'autre part via l'excitation d'interneurones (d'une intensité suffisante pour les amener à décharger) (Fig. 18). Ils ont également mis en évidence une ségrégation anatomique entre le Re rostral et Re caudal. La stimulation du Re rostral entraîne des potentiels de champ évoqués dont les caractéristiques indiquent une connexion monosynaptique entre cette partie du Re et la région CA1 de l'hippocampe. Le Re caudal projette quant à lui sur le Re rostral, et est ainsi en lien avec CA1 via une connexion disynaptique (Fig. 18). La partie caudale du Re recevant des projections de la formation hippocampique via le subiculum, ces résultats mettent en évidence une boucle fonctionnelle hippocampo-thalamique à même de moduler l'activité de CA1 (Dolleman-Van der Weel et al. 1997).

Puis en 1999, Bertram et Zhang se sont intéressés aux effets de la stimulation des noyaux de la ligne médiane du thalamus ou de CA3 sur l'activité de CA1. Ils observèrent que la stimulation du noyau Re a un effet excitateur sur la région CA1 d'amplitude comparable à la stimulation de la région CA3 controlatérale (caractérisé par des potentiels post-synaptiques excitateurs similaires), mais avec un décours temporel différent. De manière intéressante, la latence est plus faible lors de la stimulation du noyau Re que lors de celle de CA3, et la facilitation observée lors de stimulations appariées est plus importante dans le cas du Re. De plus, des stimulations répétées à haute fréquence du noyau Re induisent une potentialisation à long terme dans CA1, ce qui n'est pas le cas lors de stimulations similaires de CA3. Contrairement à Dolleman-Van der Weel et al. en 1997, Bertram et Zhang n'ont pas observé d'indices d'une possible action inhibitrice de la stimulation du noyau Re sur la région CA1 de l'hippocampe (Bertram et Zhang, 1999) ; ce qui pourrait être due à une localisation et/ou une étendue de la stimulation du Re différente(s) d'une étude à l'autre. La stimulation des noyaux de la ligne médiane (à quelque niveau que ce soit de l'axe dorso-ventral) a également une action excitatrice sur l'amygdale (Zhang et Bertram, 2002), suggérant une voie indirecte via cette structure permettant également le passage d'informations vers l'hippocampe.

Figure 18. Représentation schématique du modèle des connexions entre le noyau Re et l'Hip proposé par Dolleman-Van der Weel et ses collaborateurs en 1997 sur la base des enregistrements électrophysiologiques obtenus dans CA1 à la suite de la stimulation du noyau Re. Le noyau Re caudal projette sur le noyau Re rostral. Les neurones du Re rostral projettent ensuite directement dans la couche lacunosum-moléculaire, sur les dendrites de cellules pyramidales de CA1 dont les corps cellulaires se situent dans la couche pyramidale (symbolisés ici par un triangle



vert), ainsi que sur des interneurones dont le corps cellulaire réside dans les couches oriens et radiatum (en bleu et en jaune respectivement). Les cellules pyramidales de CA1 projettent sur le subiculum, qui clôt le circuit via une projection sur le Re caudal. La plupart des connexions indiquées ici sont excitatrices, exceptée celle entre les interneurones inhibiteurs présents dans la couche oriens et les cellules pyramidales de CA1. Les éclairs jaunes symbolisent une stimulation du Re. La stimulation de la partie rostrale du Re entraîne la genèse, dans CA1, de potentiels évoqués au profil « simple », tandis que la stimulation de sa partie caudale produit des potentiels évoqués au profil « complexe ». Le profil simple est associé à une connexion monosynaptique, le profil complexe à une connexion disynaptique. Schéma tiré de Cassel et al. 2013 (publication 5) sur la base des résultats obtenus par Dolleman-Van der Weel et al. 1997, et notamment d'après la figure 6 de ce dernier article. Abréviations : alv, couche alveus ; lac-mol, couche lacunosum-moléculaire ; ori, couche oriens ; pyr, couche pyramidale, rad, couche radiatum.

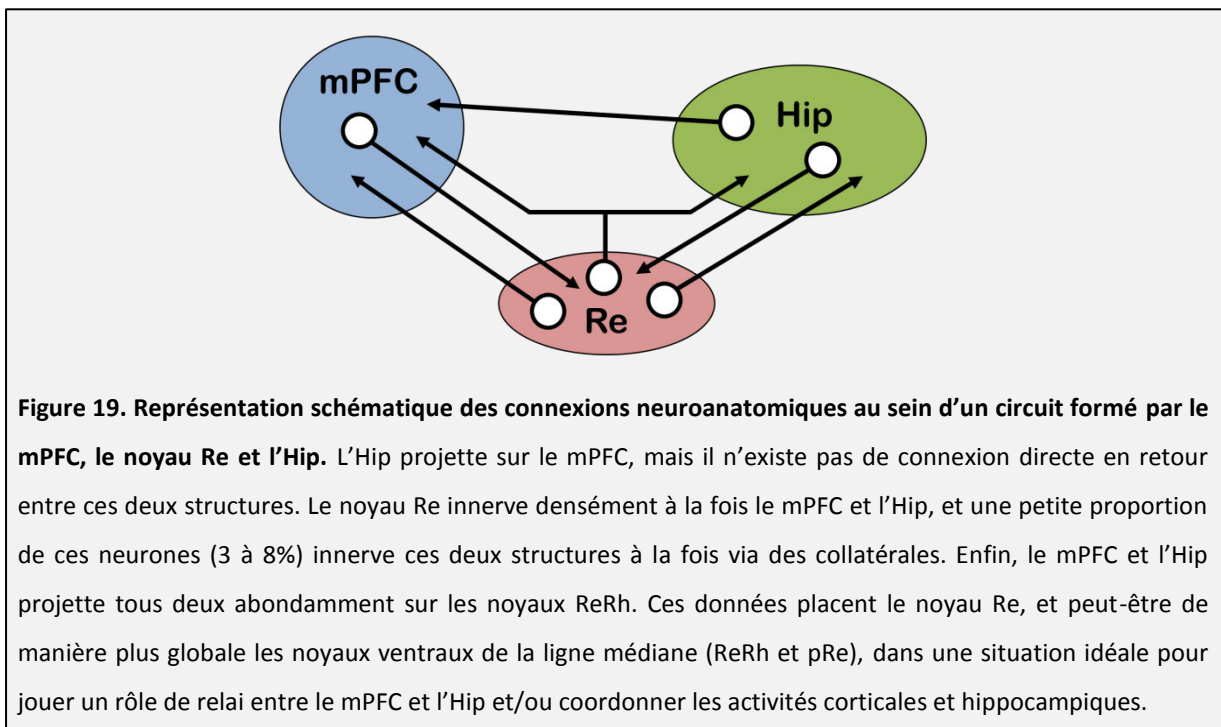
La spécificité des interactions entre l'hippocampe et le noyau Re est appuyée par le lien entre l'activité thêta-hippocampique et celle de ce noyau thalamique. Chez le rat, le rythme thêta est présent durant un comportement moteur actif, comme l'exploration, ainsi que pendant le sommeil paradoxal, et il joue un rôle important dans les fonctions mnésiques hippocampiques (Vertes 2005, Buzsaki et Moser, 2013). En 2007, Morales et al. ont stimulé

des neurones du Re et enregistré des potentiels évoqués au niveau de la région CA1 (chez des rats anesthésiés à l'uréthane) en présence ou en absence de rythme thêta dans l'Hip. L'activité thêta pouvait survenir spontanément ou par le pincement de la queue de l'animal. Ils mirent en évidence que les neurones du Re augmentent leur fréquence de décharge en présence du rythme thêta hippocampique, que celui-ci ait été généré par une stimulation ou qu'il soit apparu spontanément (comparé aux niveaux de décharges enregistrés juste avant ou juste après l'apparition de ce rythme dans l'Hip). Les auteurs soulignent aussi que l'activité des neurones du Re est régulière et stable (indiquant un fonctionnement tonique), et n'est pas soumise à de fortes variations en bouffées de décharges (ou *bursts*, révélatrices d'un fonctionnement phasique). Enfin, leurs résultats confirment ceux de Dolleman-Van der Weel et al. qui, en 1997, proposaient que la latence des potentiels évoqués dans CA1 par la stimulation du Re soit compatible avec une connexion monosynaptique entre ces deux structures, et les étayent en découvrant que cette latence est plus faible en cas d'activité thêta hippocampique (Morales et al. 2007). Ces données indiquent que l'activité de CA1 est influencée par celle du noyau Re, et que l'interaction entre ces deux structures est conditionnée par le rythme thêta.

Récemment (2012), Zhang et al. se sont intéressés à un possible lien entre rythme delta, neurotransmission glutamatergique, schizophrénie et activité du noyau Re et de l'Hip. Le rythme delta est composé d'oscillations générées par des boucles thalamo-corticales et normalement prédominantes durant le sommeil à ondes lentes (McCormick et Bal, 1997), mais présentes durant des périodes d'éveil chez les patients atteints de schizophrénie (Clementz et al. 1994). Cette augmentation des oscillations delta dans le thalamus et le cortex peut être artificiellement provoquée par l'injection d'un antagoniste des récepteurs NMDA (kétamine par exemple) de manière systémique (Buzsaki, 1991) ou directement dans le thalamus (Zhang et al. 2009). Zhang et al. (2012) ont constaté que l'administration systémique de kétamine (50 mg/kg IP) induit une augmentation de la décharge des neurones du Re et de CA1, ainsi qu'une augmentation de la puissance des oscillations delta dans le Re et leur apparition dans l'Hip. Dans ce cas, ces oscillations sont à la fois corrélés en amplitude et cohérentes en terme de phase, indiquant que le rythme delta qui prend son origine dans le thalamus est ensuite imposé à l'Hip. De manière encore plus intéressante, des oscillations delta peuvent être induites dans l'Hip par l'instillation de kétamine dans le Re, et

l'inactivation de ce noyau à l'aide de muscimol peut bloquer ces oscillations quand celles-ci sont successives à l'injection systémique de kétamine. Sur la base de ces résultats, les auteurs suggèrent que l'hyperactivité de la région CA1 observée chez les patients schizophrènes (Schobel et al. 2009) pourrait résulter d'une augmentation de l'activité du noyau Re (Zhang et al. 2012).

Ces résultats neuroanatomiques et électrophysiologiques indiquent que les noyaux ventraux de la ligne médiane (ReRh) sont à même de moduler l'activité du mPFC et de l'Hip, et que ces trois structures s'inscrivent dans un circuit hippocampo-cortico-thalamique qui pourrait jouer un rôle majeur dans les fonctions cognitives, et notamment mnésiques (Fig. 19). L'influence de ces connexions, si elle mérite d'être approfondie dans de futures études, trouve déjà de sérieux arguments dans la littérature actuelle (voir paragraphes suivants).



3.3.5. IMPLICATION DES NOYAUX RERH DANS LES PROCESSUS COGNITIFS ET MNESIQUES

Généralités et résultats obtenus chez l'Homme

Les études menées avec des patients atteints de lésions thalamiques suggèrent que le thalamus est impliqué dans plusieurs processus cognitifs comprenant les fonctions exécutives, l'attention et la mémoire (Van der Werf et al. 2003a,b ; Carlesimo et al. 2011). Les lésions d'encéphaliques provoquées par un syndrome de Korsakoff ou un accident

vasculaire cérébral thalamique entraînent des déficits cognitifs, et en particulier de mémoire, dont les caractéristiques sont proches de celles des amnésies hippocampiques ou préfrontales (Kopelman, 2002 ; Aggleton et al. 2011). En ce qui concerne les fonctions mnésiques, l'étude de patients souffrant d'une atteinte du thalamus fait état de troubles disparates comme des déficits du rappel, de la reconnaissance, de la mémoire épisodique, de la planification, de l'inhibition, de l'attention, ou encore des réactions émotionnelles (e.g. Kopelman, 2002 ; Schmahmann, 2003 ; Pergola et Suchan, 2013). Ces patients souffrent de pathologies diverses dont l'étiologie varie (ischémie, tumeur, traumatisme, dégénérescence), et dont l'étendue et la sévérité sont spécifiques à chaque individu. Ces atteintes concernent le plus souvent une zone comprenant plusieurs noyaux thalamiques, voire une ou des région(s) extrathalamique(s) (De Witte et al. 2011 ; Kril et Harper, 2012), ce qui rend difficile la mise en évidence du rôle d'un noyau donné. Il n'y aurait ainsi aucun cas connu de lésion restreinte au ReRh chez l'Homme (Van der Werf et al. 2002). Dès lors, l'implication des noyaux ReRh dans les processus cognitifs, et notamment mnésiques, a été abordée chez le Rongeur, modèle animal chez lequel il est possible de réaliser des interventions focales (lésions, inactivations et approches électrophysiologiques notamment) et d'étudier leurs conséquences à différents moments de la formation ou du rappel d'une mémoire.

Noyaux ReRh et motivation

Les patients atteints de pathologies thalamiques peuvent souffrir de distractibilité et de déficits dans le contrôle de l'inhibition (Kopelman 2002 ; Schmahmann 2003 ; Aggleton et al. 2011). Ces troubles seraient le résultat d'une dénervation préfrontale consécutive à l'atteinte thalamique, et la preuve de l'implication du thalamus dans les processus exécutifs et l'attention (Van der Werf et al. 1999, 2003a,b). Chez le rat, les mécanismes attentionnels peuvent être étudiés à l'aide du test du temps de réaction en série à 5 choix (*5-choice serial reaction time test*, ou 5-CRSTT). Ce test évaluant l'attention visuelle soutenue permet notamment de mettre en évidence des troubles de l'impulsivité ou de la persévération (Bari et al. 2008 ; rev. Bari et Robbins, 2013). A l'heure actuelle, une seule publication s'est intéressée à l'effet de la lésion des noyaux ReRh sur ces processus. Dans cette étude récente, les rats lésés présentent une diminution des comportements de persévération (baisse de l'impulsivité), une augmentation des réponses prématurées (déficit d'inhibition),

une baisse des omissions et une diminution de la latence de récupération de la récompense alimentaire en comparaison avec des animaux contrôles (Prasad et al. 2013). Les auteurs montrent que ces résultats ne sont pas imputables à une modulation de l'activité générale (hypo- ou hyperactivité), qui n'est pas affectée, et proposent que les noyaux ReRh interviennent dans la modulation de la motivation. Prasad et al. font l'hypothèse que le déficit d'inhibition observé est lié à l'interruption des connexions réciproques entre le Re et le mPFC (Vertes, 2002, 2004), structure dont la lésion entraîne des troubles similaires (Chudasama et al. 2003, 2012 ; rev. Dalley et al. 2004). Néanmoins, la lésion des noyaux ReRh entraîne des troubles moins prononcés que la lésion du mPFC, qui provoque également une augmentation de l'impulsivité (Chudasama et al. 2003). Les noyaux ReRh pourraient donc jouer un rôle dans les mécanismes motivationnels.

Apprentissage associatif : conditionnement classique

A ma connaissance, seules deux études à ce jour se sont intéressées à l'implication des noyaux ReRh du thalamus dans l'apprentissage associatif. En 2011, Davoodi et al. ont étudié l'implication des noyaux ReRh du thalamus dans l'acquisition, la consolidation et le rappel de l'association entre un choc électrique (stimulus aversif) et un contexte à l'aide du test d'évitement passif. Placé dans un dispositif constitué de deux compartiments, l'un faiblement éclairé, l'autre fortement, un Rat a naturellement tendance à préférer la pénombre du compartiment sombre. Une fois entré dans le compartiment sombre, le Rat reçoit un choc électrique à travers le sol, tandis qu'une porte guillotine l'empêche de s'échapper. Le Rat doit donc apprendre à réfréner ce comportement instinctif. Pour évaluer la rétention, l'animal est replacé dans le compartiment le plus éclairé, et la latence d'entrée dans le compartiment sombre est mesurée. Des instillations de tétracaïne (un inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants) visant à inactiver les noyaux ReRh ont été réalisées soit juste avant la phase d'acquisition de la tâche, soit à différents délais après la fin de l'acquisition (5, 90 ou 360 min), soit juste avant un test de rétention réalisé 24h après l'acquisition. Les performances au rappel sont diminuées à la suite d'instillations effectuées juste avant l'acquisition, 5 min après la fin de l'acquisition, ou avant le test de rétention (à 24h), indiquant l'implication des noyaux ReRh dans l'acquisition, la consolidation et le rappel d'une mémoire associative (Davoodi et al. 2011).

Une autre étude récente a montré qu'à la suite de la lésion des noyaux Re et/ou antéromédians ventraux (AMv) du thalamus (noyaux qui reçoivent tous deux des afférences du système hypothalamique impliqué dans les réactions de défense), tous les rats expriment des comportements défensifs prononcés, et notamment une immobilisation comportementale normale, lors de l'exposition à une situation dangereuse (présence d'un chat). Lors de la réexposition au contexte associé à ce prédateur, les animaux lésés au niveau des noyaux AMv seuls ou AMv et Re conjointement expriment des réponses conditionnées de défense réduites, ce qui n'est pas le cas des animaux porteurs d'une lésion Re seule (Carvalho-Netto et al. 2010). Dans cette étude, la mémoire de l'association entre le danger et le contexte n'est pas affectée par la lésion du noyau Re.

Une implication des noyaux ReRh dans les processus associatifs ne peut donc pas être exclue, mais la littérature très restreinte ne permet pas de conclure.

Mémoire (spatiale) de travail : le labyrinthe radial à 8 branches

La mémoire de travail se caractérise par un traitement des informations (spatiales ou non) qui la composent, et par la nécessité de mettre à jour ces informations en fonction des contingences environnementales. Chez l'animal, l'évaluation de cette mémoire se déroule généralement en deux temps, au cours de deux essais distants de quelques sec/min. Les informations obtenues lors du premier essai servent alors à réaliser la tâche présentée durant le second essai. En fonction du protocole utilisé, et notamment de la prépondérance de la composante spatiale au sein de la tâche, les performances en mémoire de travail peuvent être principalement dépendantes du mPFC, de l'hippocampe, ou nécessiter un engagement conjoint de ces deux structures (Floresco et al. 1997 ; Porter et al. 2000 ; rev. Laroche et al. 2000 ; Marshuetz et Smith, 2006). La mémoire de travail chez le Rat est couramment évaluée à l'aide d'un labyrinthe radial à 8 branches.

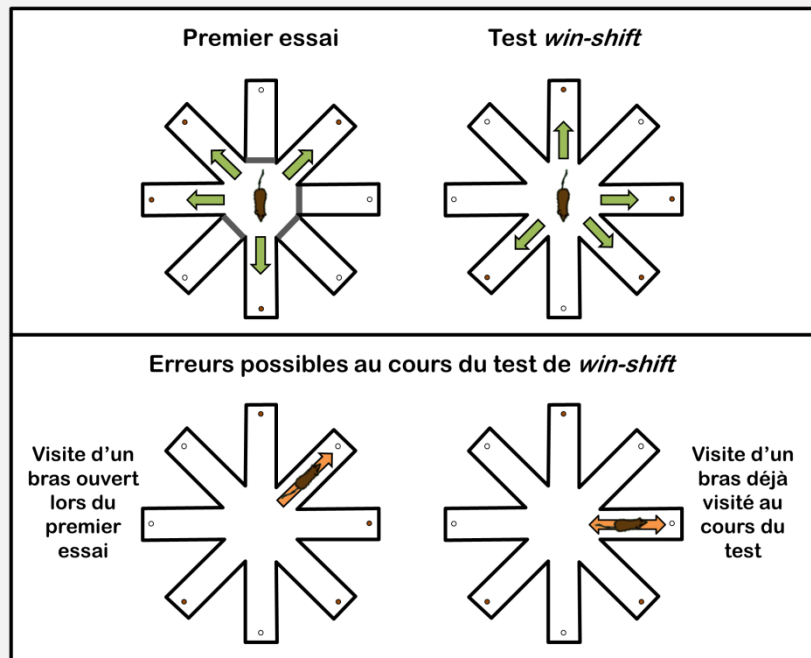
En 2000, Vann et al. ont évalué l'expression du gène précoce *c-fos*, révélatrice de l'activité neuronale, à la suite de plusieurs tâches mettant en jeu la mémoire spatiale de travail. Dans le labyrinthe radial à 8 branches, leur protocole consiste à placer le rat au centre du dispositif, lui donner accès aux 8 bras appâtés, et le laisser choisir un bras dans lequel entrer. Une fois la pastille de nourriture récupérée, le rat retourne au centre, et tous les bras se ferment à l'aide de portes-guillotines pour une durée de 5 secondes. Puis toutes les portes

s'ouvrent à nouveau, le rat doit choisir un bras, peut consommer la pastille y figurant et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il ait visité tous les bras. Ce protocole définit la condition 1. La condition 2 est identique, si ce n'est que le labyrinthe radial est changé de pièce d'expérimentation le jour du test, introduisant un nouvel environnement extérieur au labyrinthe et de nouveaux indices visuels distaux. La condition 3 est une condition contrôle dans laquelle les animaux n'ont accès qu'à un seul bras, appâté ou non en fonction des résultats des animaux des conditions 1 ou 2, de manière à équilibrer le nombre de récompenses et le temps passé dans le labyrinthe. Les auteurs ont choisi ces trois conditions pour moduler la demande spatiale de la tâche : faible (condition 3), modérée (condition 1), et forte (condition 2). Les résultats montrent une augmentation de l'expression de c-Fos dans le noyau Re dans les conditions 1 et 2. Cette augmentation était aussi visible dans le cortex PL et dans le complexe subiculaire (post-, pré- et parasubiculum) lors de la tâche la plus exigeante d'un point de vue spatial (condition 2). Enfin, le profil d'activation neuronale est similaire dans le noyau Re, le PL, le complexe subiculaire et l'Hip : l'expression c-Fos est plus élevée dans la condition 2 (forte charge spatiale) que dans la condition 1 (charge spatiale modérée), et l'activité neuronale la plus faible est observée dans la condition 3 contrôle (Vann et al. 2000a,b). Ces résultats constituent la première mise en évidence d'une implication fonctionnelle du noyau Re dans la mémoire spatiale.

En 2011, Hembrook et Mair se sont intéressés à une possible implication des noyaux ReRh dans la mémoire de travail à l'aide du labyrinthe radial. La lésion des noyaux ReRh a été comparée à celle des noyaux intralaminaires (ILN). Deux tâches comportementales ont été utilisées. Les rats ont été testés dans un protocole permettant d'évaluer leurs capacités à suivre un guidage visuel [impliquant les aires corticales frontales (Bailey et Mair, 2004), les noyaux intralaminaires du thalamus (Burk et Mair, 2001) et le striatum (Mair et al. 2002)] ou dans une tâche de *Win-Shift* (Fig. 20), qui requiert la mémorisation d'informations spécifiques à l'essai en cours et est affectée par des lésions hippocampiques et/ou préfrontales (Porter et Mair, 1997 ; Mair et al. 1998). Dans ce deuxième test, les performances des animaux lésés ReRh étaient significativement dégradées en comparaison de celles des animaux contrôles ou de celles des animaux porteurs d'une lésion ILN. Ce test sollicitant des interactions fortes entre l'Hip et le mPFC, les auteurs en concluent une implication spécifique des noyaux ReRh dans les processus au cours desquels un

engagement conjoint de ces deux structures est nécessaire. Cette hypothèse est appuyée par le fait que dans leur tâche de guidage visuel, tâche dépendante du mPFC mais pas de l'Hip, la lésion des noyaux ReRh n'entraîne pas de diminution des performances, contrairement à celle des ILN (Hembrook et Mair, 2011). Dans une seconde étude, le même groupe (Hembrook et al. 2012) a étudié les effets d'une inactivation réversible (à l'aide de muscimol à trois concentrations différentes ; 0.4, 1.0 et 2.5 nmol) des noyaux ReRh dans deux tests dont l'un est considéré comme dépendant de l'Hip uniquement, et l'autre d'un dialogue entre l'Hip et le mPFC. Les auteurs ont ici utilisés une chambre opérante équipée de deux leviers rétractables. La tâche dépendante de l'intégrité fonctionnelle conjointe de l'Hip et du mPFC se compose de deux essais. Lors du premier essai, seul un levier est accessible. L'appui sur celui-ci déclenche la mise à disposition d'une récompense alimentaire. Lors du deuxième essai (intervenant après un délai de 1, 5 ou 25 secondes), l'animal a le choix entre les deux leviers, et seul celui précédemment absent donne accès à la nourriture. L'inactivation des noyaux ReRh juste avant cette tâche altère les performances des animaux, et ce quels que soient le délai entre les deux essais et la dose de muscimol. La seconde tâche avait lieu dans un labyrinthe radial à 8 bras. Contrairement au protocole utilisé dans leur publication de 2011 décrit ci-dessus, ils ont ici privilégié l'utilisation d'indices allocentriques au cours d'essais successifs où l'animal doit choisir le bras qu'il a visité le plus longtemps auparavant par rapport aux deux ou trois bras disponibles, une tâche dépendante de l'Hip, mais pas du mPFC (Porter et al. 2000 ; Hembrook et al. 2012). Dans ce cas, l'inactivation des noyaux ReRh n'a pas eu d'effet sur les performances, sauf à la dose de muscimol la plus élevée de 2.5 nmol. Les auteurs considèrent qu'à cette dernière dose, l'effet ne peut plus être considéré comme spécifique des noyaux ReRh ciblés (en raison d'une possible inactivation de la région environnante).

Figure 20. Exemple de tâche utilisée pour évaluer la mémoire spatiale de travail dans le labyrinthe radial à 8 branches. Lors du premier essai, le Rat est placé au centre du labyrinthe radial à 8 branches, dont quatre sont ouvertes et appâtées à leurs extrémités (points bruns). Les quatre autres bras sont fermés à l'aide d'une porte-guillotine (et non appâtés, points blancs). Une fois les



quatre récompenses alimentaires récupérées, le Rat est replacé dans sa cage pendant quelques secondes. Durant le test de rétention win-shift, les huit bras sont ouverts, mais seuls les quatre précédemment fermés sont appâtés. L'entrée dans un bras non-appâté ou la visite répétée d'un bras sont considérées comme des erreurs. *D'après le protocole de Hembrook et Mair, 2011.*

Enfin, une étude récente de Hallock et al. (2013a) a évalué l'effet de l'inactivation des noyaux ReRh sur la mémoire spatiale de travail à l'aide de muscimol (trois doses différentes : 0.5, 0.25, et 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Dans un labyrinthe en T, deux tâches distinctes ont été utilisées : l'une faisant appel à la mémoire de travail (*working memory-dependent conditional discrimination task*, ou CDWM), l'autre non (*working memory-independent conditional discrimination task*, ou CD). Les deux tâches utilisent le même labyrinthe, le même nombre d'essais, et les mêmes indices visuo-tactiles au sol. Dans la tâche de mémoire de travail (CDWM), l'indice permettant à l'animal de déterminer quelle direction (droite ou gauche) emprunter à l'intersection est présent sur la première moitié de la base du T ; dans la condition CD, il est inséré sur toute la surface au sol du labyrinthe. Une fois le niveau de performance requis atteint (> 80% de choix justes) au cours de la phase d'acquisition, les animaux sont testés 20 minutes après une instillation de muscimol. L'inactivation des noyaux ReRh entraîne une diminution significative des performances dans la tâche de mémoire spatiale de travail (CDWM), quelle que soit la dose de muscimol. Aucun effet de l'inactivation n'a été constaté dans la tâche CD (Hallock et al. 2013a). Les auteurs ont également montré que cette dernière tâche (CD) est dépendante du striatum dorsal, mais

pas de l'Hip (Hallock et al. 2013b) ; ils proposent donc que leur tâche de CDWM est dépendante à la fois de l'Hip et du mPFC. Ces résultats étayent l'hypothèse selon laquelle ces noyaux jouent un rôle prépondérant spécifiquement lorsque des interactions entre l'Hip et le mPFC sont nécessaires (Hembrook et al. 2011 ; Hembrook et Mair, 2012).

Mémoire spatiale de référence : la piscine de Morris

Deux études se sont intéressées à l'implication des noyaux ReRh du thalamus dans la mémoire spatiale de référence (mémoire à long terme de l'emplacement de la plateforme dans la piscine de Morris). En 2009, Dolleman-Van der Weel et al. ont comparé l'effet de lésions (à l'acide iboténique) du noyau Re, des noyaux médio-dorsaux (MD) du thalamus ou de l'Hip. L'acquisition (3 jours à raison de 6 essais / jour) est normale chez les animaux Re et les animaux Sham ; les animaux MD souffrent de comportements thigmotaxiques prononcés qui ralentissent l'apprentissage ; et comme attendu, les animaux Hip sont déficitaires lors de cette phase. Lors du test de rétention (sans plateforme) effectué 24h après la fin de l'acquisition, les rats Sham et les rats Re se comportent initialement de la même façon (approche rapide de l'emplacement de la plateforme), mais seuls les animaux Sham insistent à cet endroit et expriment ainsi une préférence de place pour le quadrant cible. Ces résultats indiquent d'une part l'utilisation de stratégies distinctes entre les animaux Re et Sham, d'autre part que ces deux groupes se souviennent et sont capables de rappeler l'emplacement préalable de la plateforme. Dolleman van der Weel et al. ont alors proposé que la lésion du noyau Re entraîne une augmentation de la flexibilité comportementale, qui se manifesterait ici par la suppression rapide d'un comportement inadapté (rechercher en vain une plateforme absente). Or le mPFC est impliqué dans la flexibilité comportementale et le changement de stratégie pour adapter au mieux son comportement au contexte (Ragozzino et al. 2003 ; Floresco et al. 2008 ; Haddon et Killcross, 2011), et récemment, Chudasama et al. ont mis en évidence que le contrôle de l'inhibition comportementale implique à la fois le mPFC et l'Hip (Chudasama et al. 2012). Ces résultats suggèrent donc un rôle du Re dans la flexibilité comportementale au cours d'une tâche spatiale, processus impliquant à la fois l'Hip et le mPFC.

Une seconde étude concernant l'implication des noyaux ReRh dans la mémoire spatiale de référence et utilisant également la piscine de Morris a été publiée en 2009 par Davoodi et al. Ces auteurs ont montré que l'instillation de tétracaïne dans les noyaux ReRh avant la phase

d'acquisition altère l'apprentissage de la tâche, mais sans en empêcher le rappel ; qu'une instillation après l'acquisition empêche le rappel ultérieur ; et enfin qu'une instillation réalisée 75 minutes avant un test de rappel à 24h empêche celui-ci. Néanmoins, cette étude souffre de sérieuses limites méthodologiques. Les canules implantées à demeure dans le but d'inactiver les noyaux ReRh sont d'un très gros diamètre, ce qui a provoqué d'importantes lésions unilatérales de l'Hip dorsal et du thalamus (*cf.* Fig. 1 de Davoodi et al. 2009). De plus, et peut-être à cause de ce premier point ou en raison d'une phase d'acquisition unique et courte (8 essais en une seule session), les animaux contrôles n'expriment pas de préférence de place pour le quadrant cible, invalidant toute comparaison entre les groupes expérimentaux (*cf.* Fig. 2-4 de la publication en question). Les résultats de cette étude sont donc soumis à caution.

Ces résultats (basés sur une seule étude de qualité) suggèrent que les noyaux ReRh n'influencent pas directement le rappel d'une mémoire spatiale de référence, mais joueraient plutôt un rôle dans le bon usage de l'information spatiale, notamment au travers de la sélection d'une stratégie adaptée à la situation de rappel.

Ainsi, la position neuroanatomique privilégiée des noyaux ReRh, à l'interface entre l'Hip et le mPFC, et les résultats expérimentaux de Dolleman-Van der Weel et al. (2009) nous ont incité à étudier le rôle du circuit hippocampo-cortico-thalamique dans la flexibilité comportementale (publication 2).

CHAPITRE 4 :

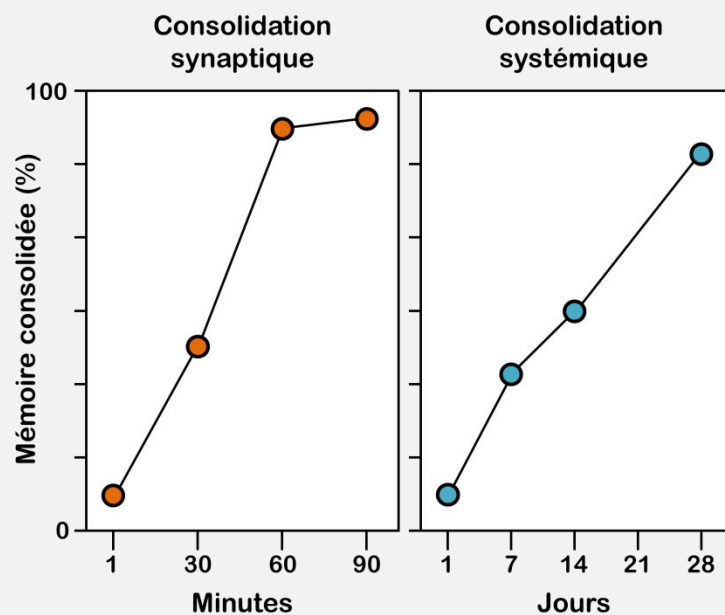
LA CONSOLIDATION AU NIVEAU DES SYSTEMES

CHAPITRE 4 : LA CONSOLIDATION AU NIVEAU DES SYSTEMES

4.1. GENERALITES

Nos souvenirs définissent qui nous sommes et modulent notre perception du monde, nous permettant de comprendre, de croire, de décider, et *in fine*, d'agir. Ces souvenirs ne se fixent pas instantanément sous une forme « définitive » lorsque nous les vivons : ils sont soumis à un processus progressif de stabilisation visant à en assurer le stockage à long terme, et appelé consolidation mnésique (rev. Dudai, 2004 ; Nadel et Hardt, 2011 ; Nadel et al. 2012). Ce processus comprend deux mécanismes distincts mais étroitement liés : la **consolidation synaptique**, qui intervient dès les premières minutes/heures, et la **consolidation systémique**, dont le décours temporel est de l'ordre des jours/mois, voire années chez l'Homme (Fig. 21). Ces mécanismes vont permettre le passage d'une trace mnésique labile, instable et fragile, à l'état de souvenir consolidé, stable et durable.

Figure 21. Décours temporels de la consolidation synaptique (gauche) et de la consolidation systémique (droite). Ces données ont été obtenues à la suite de l'administration intracrânienne d'un inhibiteur de la synthèse protéique (puromycine ou acetoxycyclohexomide) chez le poisson rouge, qui empêchent la formation du souvenir dans une tâche d'évitement actif (Agranoff et al. 1966 ; consolidation synaptique) ; et à l'aide d'expériences de lésion de l'Hip chez le



Rat (Kim et Fanselow, 1992 ; consolidation systémique) : après un conditionnement de peur au contexte, différents groupes d'animaux ont subi une lésion bilatérale de l'Hip aux temps indiqués par les points bleus sur le schéma (1, 7, 14 et 28 jours). Chez les rats opérés 28 jours après le conditionnement, le temps d'immobilité comportementale constaté lors de la réexposition au contexte ne différait plus entre animaux Sham et lésés : le rappel de la mémoire ne dépendait plus de l'Hip (Kim et Fanselow, 1992). *D'après Dudai et al. 2004.*

4.2. LA CONSOLIDATION SYNAPTIQUE

La consolidation synaptique est le mécanisme universel (elle a été décrite chez de nombreuses espèces animales) permettant le stockage d'informations à l'échelle de la synapse. Les synapses (contacts fonctionnels entre deux neurones, ou entre un neurone et une autre cellule) sont « plastiques », fonctionnellement et morphologiquement, c'est-à-dire que leur activité et leur structure sont sujettes à variation (e.g. Milner et al. 1998 ; Dudai, 2004 ; Redondo et Morris, 2011). Un changement de l'activité d'une synapse peut durer plus ou moins longtemps, notamment en fonction de l'intensité avec laquelle elle a été sollicitée. On distingue trois types de modifications de l'activité synaptique : la plasticité à court-terme, lorsque la modification ne dure quelques minutes ; la plasticité à long terme précoce, lorsqu'elle dure jusqu'à quelques heures ; et la plasticité synaptique à long terme tardive, lorsque cette modification dure au moins 10h (durée moyenne des expérimentations l'ayant mise en évidence). Les changements apportés par ce dernier type de plasticité sur l'activité synaptique pourraient en réalité perdurer des jours, voire des mois ou des années (rev. Clopath, 2012). L'arrivée d'informations à la synapse déclenche une cascade de réactions intracellulaires pouvant notamment activer des facteurs de transcription qui vont moduler l'expression de gènes, conduisant à la modification de la configuration de la synapse et, *in fine*, à la modulation de l'excitabilité synaptique en fonction des sollicitations (Fig. 22). Ces cascades d'événements intracellulaires ont lieu durant une courte période pendant et juste après un apprentissage, définissant la fenêtre temporelle de la consolidation synaptique (Fig. 21). Ces processus impliquent la synapse, mais également le corps cellulaire des neurones (Milner et al. 1998 ; Dudai, 2004 ; voir également la figure 22). Si elle est suffisamment sollicitée, la synapse va ainsi être modifiée, remodelée, et cette plasticité appliquée à l'échelle de réseaux neuronaux est considérée comme le support de la mémoire à long terme (Clopath, 2012). La consolidation synaptique n'étant pas au centre de mon travail de thèse, je ne développerai pas davantage ces mécanismes.

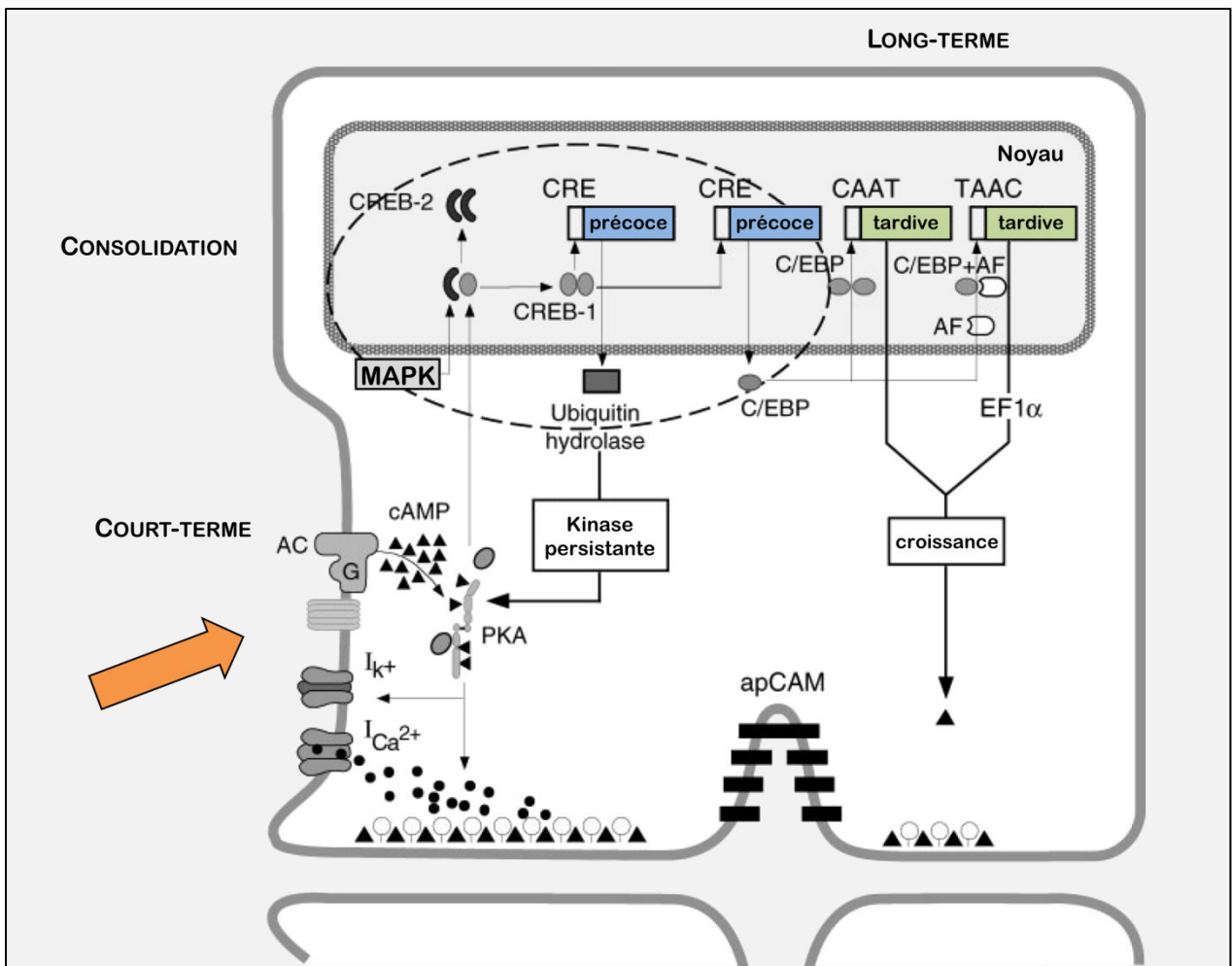


Figure 22. Représentation schématique (et simplifiée) du modèle standard de la consolidation synaptique.

L'arrivée d'informations (flèche orange) déclenche un ensemble de cascades intracellulaires amenant à la modification des protéines synaptiques et à la modulation de l'excitabilité synaptique et de la quantité de neurotransmetteur(s) libérés (court-terme). Ces mêmes mécanismes de transduction du signal peuvent activer des facteurs de transcription (CREB notamment) capables de moduler l'expression génique (dans un premier temps de gènes précoces (bleu), puis de gènes tardifs (vert)). Ces mécanismes n'impliquent donc pas seulement la synapse, mais la cellule entière, noyau compris (long terme). Cette succession d'évènements intracellulaires aboutit à la modification et à la croissance de la synapse en fonction des sollicitations, processus appelé plasticité synaptique ; quand ces changements sont durables dans le temps, on parlera de consolidation synaptique. Abréviations : AC, adénylate cyclase (enzyme responsable de la synthèse de l'AMPc) ; AF, facteur d'activation (régule la transcription) ; apCAM, une molécule d'adhésion cellulaire (impliquée dans le remodelage de la synapse) ; CAAT, une séquence de nucléotides (régulant la transcription) ; cAMP, adénosine monophosphate cyclique (un messager intracellulaire ubiquitaire) ; CRE, cAMP response element (régule l'expression génique) ; C/EBP, enhancer binding protein (une autre protéine capable de réguler l'expression génique) ; CREB, la protéine se liant à CRE ; (une protéine essentielle de la régulation génique) ; EF1 α , facteur d'élongation 1 α (requis pour la synthèse protéique) ; I_{K^+} , canal potassium (module l'excitabilité synaptique) ; $I_{Ca^{2+}}$, canal calcium (module l'excitabilité synaptique, les cascades de transduction du signal et la libération de neurotransmetteurs) ; kinase, une enzyme capable de phosphoryler des protéines ; MAPK, mitogen activated protein kinase (une famille de kinases qui répondent (indirectement) aux stimulations extracellulaires) ; ubiquitin hydrolase, une enzyme impliquée dans la dégradation de protéines. *Adapté de Dudai et al. 2004.*

4.3. LA CONSOLIDATION SYSTEMIQUE

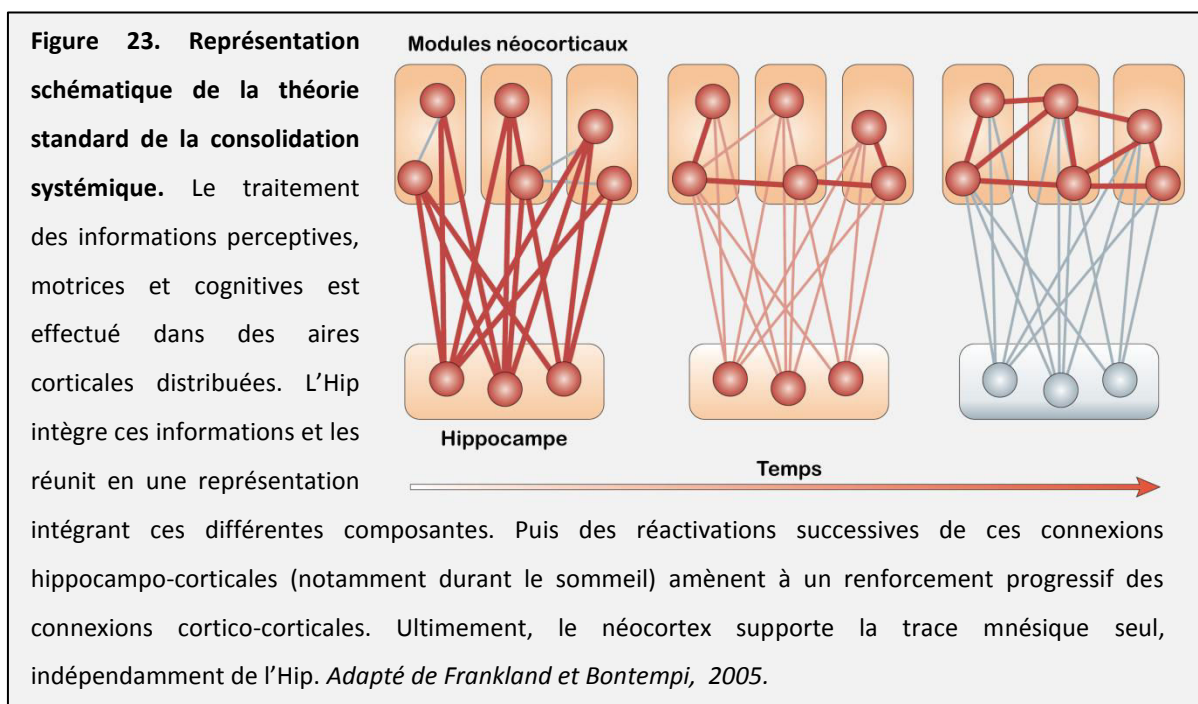
Alors que la consolidation synaptique conduit en quelques heures à des modifications neuronales renforçant les connexions synaptiques sous-tendant les traces mnésiques, la consolidation systémique se déroule sur des jours, des mois, voire des années, et peut se définir comme la réorganisation de la trace mnésique au fil du temps à l'échelle des structures cérébrales. Une définition précise de ce que pourrait être la consolidation systémique nécessite de prendre en considération les différents modèles théoriques dont elle a fait l'objet, et en particulier les propositions les plus récentes à ce sujet.

4.3.1. DONNEES AYANT PERMIS L'EMERGENCE DU CONCEPT DE CONSOLIDATION SYSTEMIQUE : LE GRADIENT DE RIBOT ET L'AMNESIE TEMPORELLEMENT GRADUEE DU PATIENT H.M.

Dans son ouvrage de 1882, Ribot décrit que les patients amnésiques à la suite d'un événement spécifique (tel un accident) oublient également souvent le déroulement des heures précédant cet événement. Chez certains d'entre eux, cette amnésie rétrograde s'étend sur plusieurs années, mais les souvenirs plus anciens restent intacts. La loi de Ribot formule ainsi l'existence d'un gradient temporel au sein de l'amnésie rétrograde : les souvenirs récents sont davantage affectés que les souvenirs anciens (Ribot, 1882). Le cas du patient H.M., qui souffrait d'amnésie rétrograde temporelle graduée, a eu une grande importance en remettant sur le devant de la scène scientifique la théorie de Ribot (Scoville et Milner, 1957). Au cours de la seconde moitié du 20^e siècle, de nombreuses études menées chez des patients amnésiques ont confirmé la présence de ce gradient temporel (Russell et Nathan, 1946 ; Squire et al. 1975 ; Kapur et Brooks, 1999). Ces résultats ont suggéré l'existence d'une réorganisation de la trace mnésique au fil du temps à l'échelle de plusieurs structures cérébrales, et un rôle initial important mais transitoire de l'Hip, ouvrant la voie à la théorie standard de la consolidation systémique.

4.3.2. LA THEORIE STANDARD DE LA CONSOLIDATION SYSTEMIQUE (MARR, 1971)

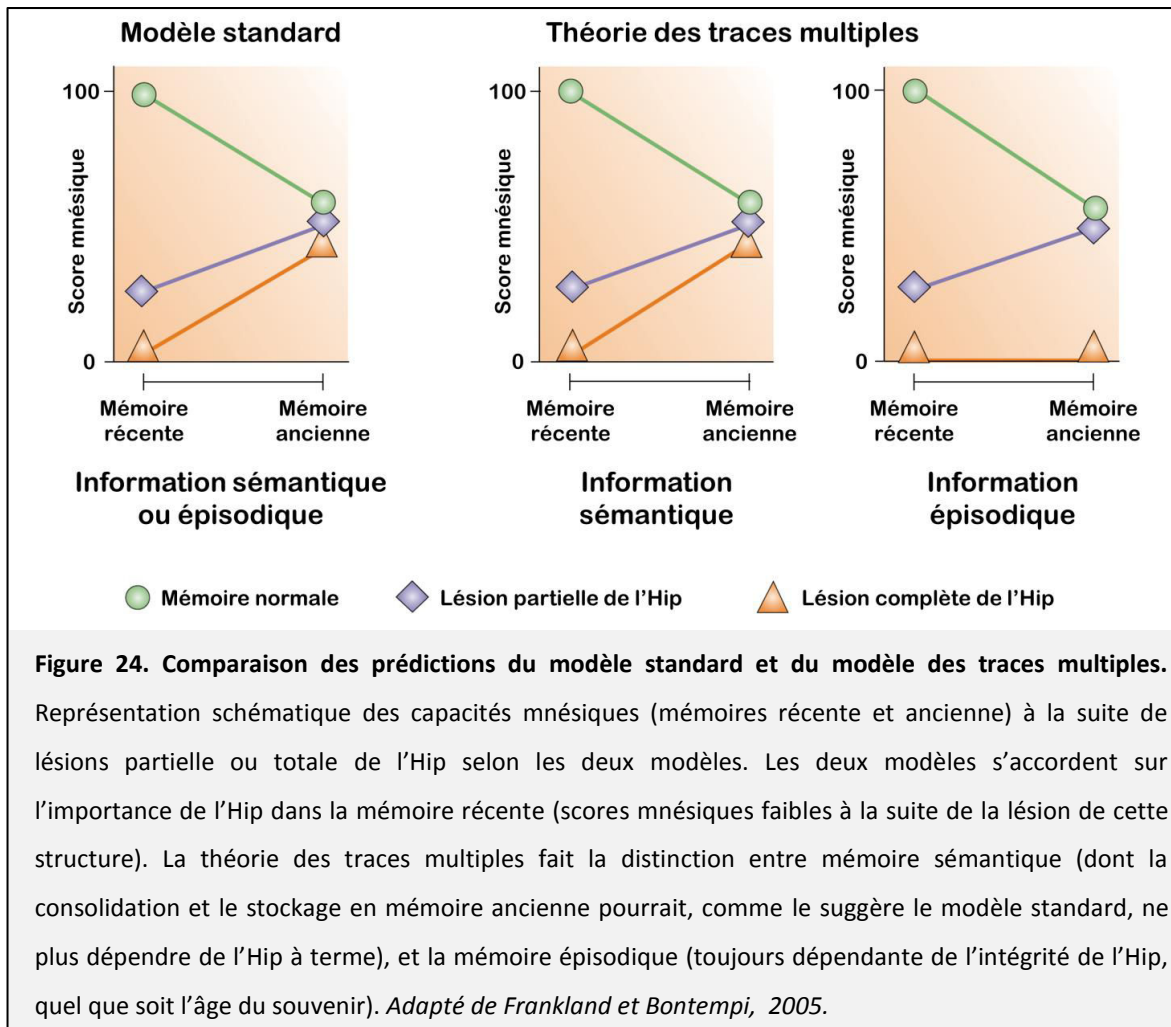
Marr fut le premier, au début des années 70, à proposer un modèle de la consolidation systémique (Marr, 1970, 1971 ; voir aussi Willshaw et Buckingham, 1990). Il suggéra que l'Hip permet de maintenir en mémoire les évènements récents (jours), jouant le rôle d'un espace de stockage temporaire, avant que ces informations ne soient transférées au néocortex, où elles seraient stockées à long terme (non sans avoir subi une réorganisation qu'il proposait déjà comme basée sur une classification, évoquant les processus de sémantisation et de généralisation). Il faisait également l'hypothèse que le transfert de ces informations de l'Hip au néocortex, nécessaires selon ce modèle à une rétention à long terme, intervienne au cours du sommeil, durant lequel aurait lieu une réactivation des circuits hippocampo-corticaux impliqués dans l'encodage des informations formant la trace mnésique. Marr suggéra donc dès 1971 l'importance des interactions hippocampo-corticales et du sommeil dans la mémorisation, ainsi qu'un désengagement de l'Hip au fil du temps au profit d'un stockage néocortical des souvenirs (Fig. 23). Ce modèle est aujourd'hui appelé « standard » car il a posé avec brio les premiers éléments de compréhension et de réflexion concernant la consolidation systémique et a été abondamment repris, étayé et discuté (e.g. Squire et Alvarez, 1995 ; McClelland et al. 1995 ; Frankland et Bontempi, 2005). Il aura fallu attendre 1997 pour que Nadel et al. proposent une évolution de ce modèle, preuve s'il en est de la pertinence des propositions de Marr en son temps.



4.3.3. LA THEORIE DES TRACES MULTIPLES (NADEL ET MOSCOVITCH, 1997)

La théorie des traces multiples est une évolution de la théorie standard principalement basée sur la constatation que l'amnésie antérograde provoquée par l'atteinte des lobes temporaux médians n'est pas toujours temporellement graduée. En 1997, Nadel et Moscovitch ont passé en revue la littérature concernant l'évaluation de la mémoire ancienne dans les amnésies du lobe temporal (depuis le patient H.M.). Il en ressort une dissociation entre mémoire épisodique et mémoire sémantique : la lésion des lobes temporaux médians entraîne généralement une amnésie antérograde non graduée en ce qui concerne la mémoire épisodique, mais une amnésie rétrograde graduée de la mémoire sémantique. Les souvenirs épisodiques seraient ainsi perpétuellement dépendants de l'intégrité de la région hippocampique, les souvenirs de type sémantique pouvant quant à eux être stockés intégralement au niveau cortical, indépendamment de l'Hip (Fig. 24). Nadel et Moscovitch proposent alors la théorie des traces multiples, qui stipule que la formation, le maintien et le rappel d'un souvenir épisodique implique les neuf processus suivants (Nadel et Moscovitch, 1997) :

- (1) la région hippocampique encode rapidement et systématiquement l'information,
- (2) l'information est encodée de manière distribuée dans la région hippocampique,
- (3) les neurones de la région hippocampique concernés sont en relation avec les neurones néocorticaux à l'origine du traitement de l'information,
- (4) l'ensemble cortico-hippocampique constitue la trace mnésique de l'évènement, lié par le contexte spatio-temporel dans lequel il s'est déroulé,
- (5) chaque réactivation de cette trace intervient forcément dans un contexte environnemental et/ou neuronal différent de celui d'encodage,
- (6) la réactivation d'une trace mnésique entraîne la création d'une nouvelle trace distincte qui est à nouveau distribuée à la fois dans l'Hip et le néocortex,
- (7) chacune des traces formée à la suite de la réactivation d'une trace antérieure partage tout ou partie de son information avec cette dernière,
- (8) la création de multiples traces ayant un lien entre elles facilite l'extraction de l'information factuelle et son intégration en mémoire sémantique,
- (9) l'accès au contexte spatio-temporel associé à l'information, et lui donnant sa qualité épisodique, nécessite l'engagement de l'Hip.



Le rappel détaillé de souvenirs de type épisodique, riches en détails contextuels (et notamment spatiaux), serait donc toujours dépendant des lobes temporaux médians. Au cours de la décennie qui a suivi la publication de ce modèle, il a effectivement été mis en évidence que la lésion de la région hippocampique entraîne des amnésies rétrogrades étendues, non temporellement graduées, pour les souvenirs de type épisodique chez l'Homme (Viskontas et al. 2000 ; Cipolotti et al. 2001) et les souvenirs contextualisés (notamment la mémoire spatiale) chez le Rat (Martin et al. 2005 ; Winocur et al. 2005 ; Clark et al. 2005). Il a également été montré à l'aide d'études d'imagerie chez l'Homme que le rappel détaillé de souvenirs épisodiques engage toujours l'Hip (Maguire et Frith, 2003), et que le facteur prédictif de l'engagement de cette structure est davantage la richesse en détails contextuels que l'âge du souvenir (Addis et al. 2004 ; rev. Rosenbaum et al. 2001).

Le début des années 2000 est ainsi marqué par un débat scientifique intense à ce sujet, sans pour autant qu'un consensus puisse réellement émerger. Le cas du patient E.P., souffrant de

lésions bilatérales étendues du lobe temporal médian et pourtant capable de rappeler avec une précision comparable à des sujets sains l'environnement spatial dans lequel il a grandi (50 ans auparavant), semble indiquer que pour des mémoires très anciennes, y compris spatiales, l'Hip pourrait ne plus être nécessaire (Teng et Squire, 1999). La question de la précision des souvenirs anciens est soulevée en réponse à ces résultats en désaccord avec la théorie des traces multiples (Rosenbaum et al. 2000). Niki et Luo montrent alors à l'aide de l'imagerie fonctionnelle cérébrale que le rappel d'une mémoire topographique ancienne (lieux visités plus de sept ans auparavant) n'entraîne pas une activation de la région hippocampique aussi importante que lors du rappel de lieux récemment visités. De plus, le rappel de souvenirs récents n'est pas accompagné par davantage de détails que celui de souvenirs anciens (Niki et Luo, 2000). Les auteurs concluent à un rôle limité dans le temps des lobes temporaux médians dans la mémoire autobiographique des lieux.

Les études menées sur des modèles animaux sont globalement en accord avec la théorie des traces multiples en ce qui concerne la mémoire spatiale : les lésions de l'Hip entraînent, chez le rongeur, des déficits de rappel dans le test de la piscine de Morris, à la fois en mémoire récente et en mémoire ancienne (Bolhuis et al. 1994 ; Mumby et al. 1999 ; Sutherland et al. 2001 ; Martin et al. 2005). En ce qui concerne un apprentissage contextuel dont la composante spatiale est moins prépondérante, comme le conditionnement de peur à un contexte, les résultats sont plus disparates : certaines études indiquent un rôle de l'Hip quel que soit le délai (Sutherland et al. 2008 ; Sutherland et al. 2010), d'autres uniquement pour le rappel d'une mémoire récente (Kim et Fanselow, 1992 ; Maren et al. 1997 ; Wang et al. 2009). Une publication récente utilisant une approche optogénétique pour inactiver spécifiquement CA1 permet de réconcilier cette littérature : le rappel d'un conditionnement de peur au contexte ancien implique normalement CA1, mais si cette région est inactivée suffisamment longtemps, comme c'est le cas lors d'une inactivation pharmacologique, le rappel peut être assuré par d'autres structures (Goshen et al. 2011).

Ces données indiquent globalement l'implication, si ce n'est la nécessité, de l'Hip dans le rappel d'une mémoire ancienne de type épisodique, et notamment lorsqu'il s'agit de rappeler des informations contextuelles détaillées. Le rôle des lobes temporaux médians dans la mémoire spatiale semble également avéré quel que soit l'âge de la trace.

4.3.4. LE RÔLE PREPONDERANT DU MPFC DANS LE RAPPEL D'UNE MÉMOIRE ANCIENNE : PROPOSITIONS DE FRANKLAND ET BONTEMPI, 2005

En parallèle du débat concernant l'implication de l'Hip en mémoire ancienne en fonction du type de mémoire considéré s'est posée, à l'aube de 21^e siècle, la question des régions corticales impliquées dans le traitement de la mémoire spatiale ancienne. Pour identifier les régions extra-hippocampiques engagées lors du rappel d'une mémoire ancienne, Bontempi et al. ont, en 1999, visualisé l'activité cérébrale chez la souris dans l'ensemble du parenchyme à l'aide de la méthode autoradiographique au 2-déoxyglucose marqué au carbone 14. A la suite d'un apprentissage spatial dans un labyrinthe radial à 8 branches (trois mêmes branches toujours appâtées), les souris étaient testées à 5 jours (mémoire récente) ou 25 jours (mémoire ancienne). L'augmentation du délai provoque une baisse du métabolisme dans le dHip, et une augmentation de celui-ci dans le cortex frontal et le cortex cingulaire antérieur (Bontempi et al. 1999 ; Fig. 25).

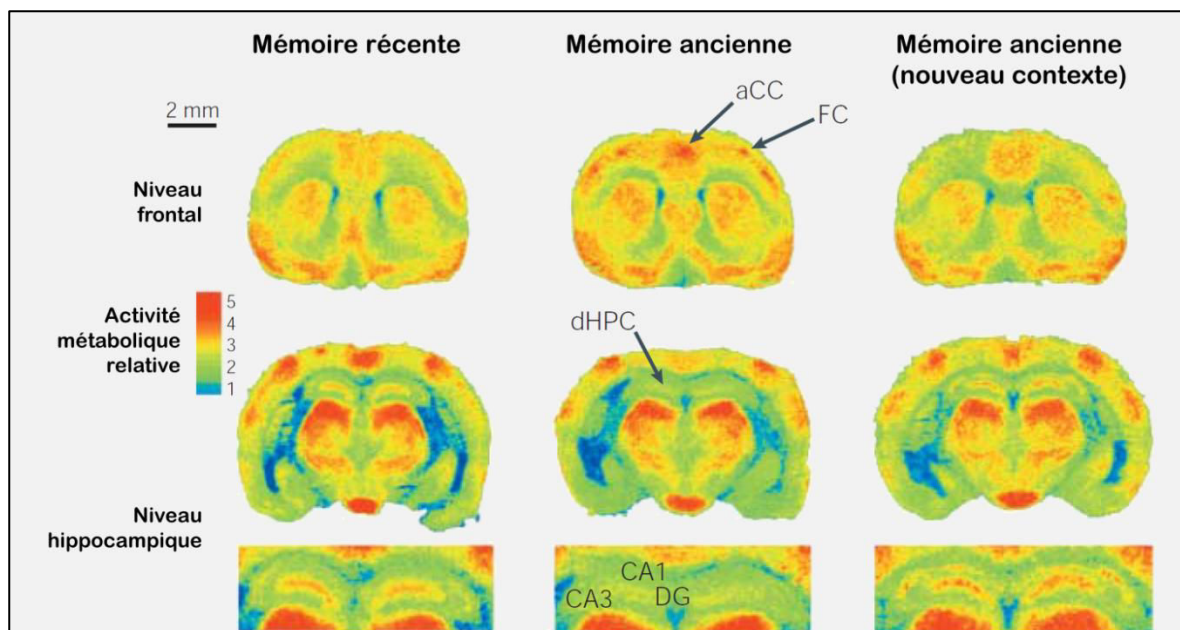
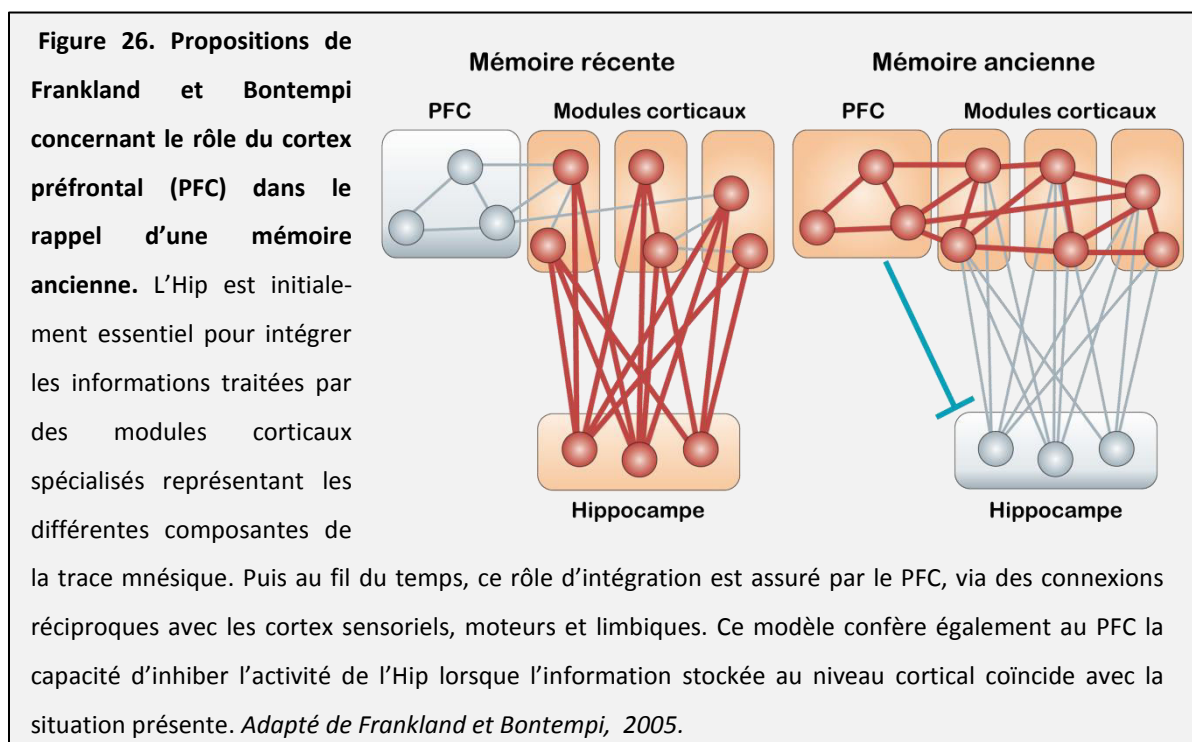


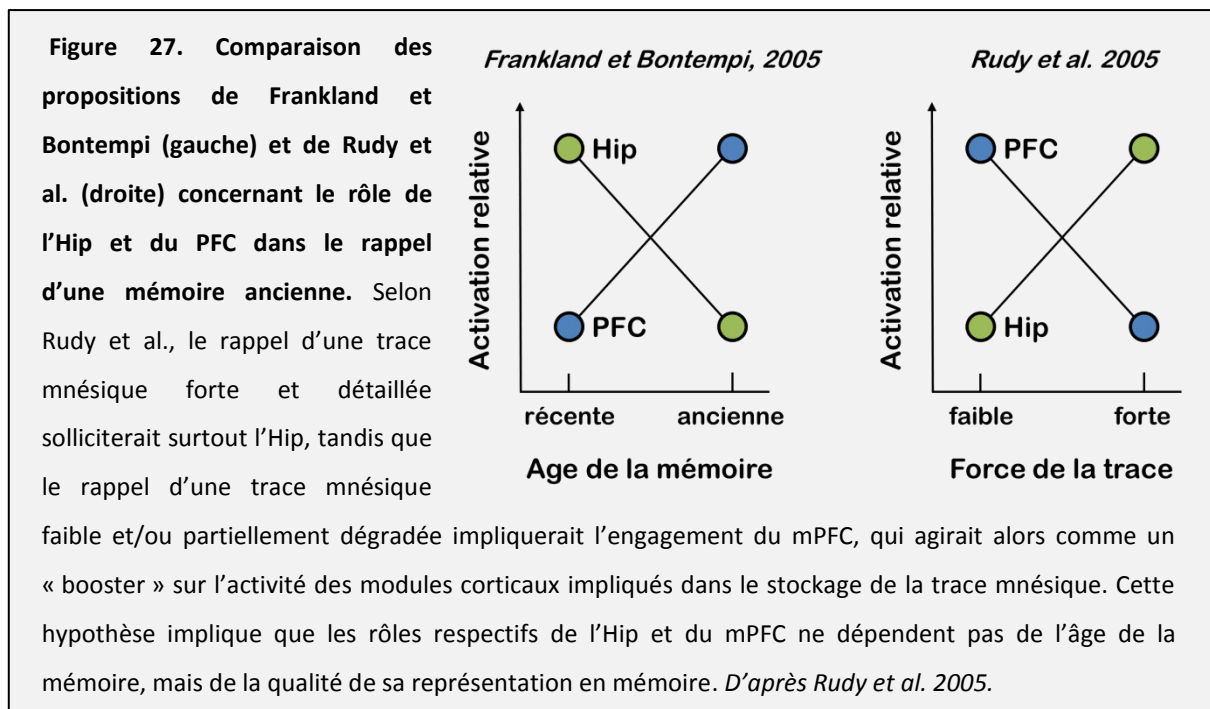
Figure 25. Activité cérébrale au cours du rappel d'une mémoire ancienne chez la Souris. Coupes coronales de cerveaux recolorées selon l'intensité de l'activité métabolique (évaluée à l'aide de la méthode autoradiographique au $[^{14}\text{C}]2$ -déoxyglucose) à la suite de tests de rétention d'une mémoire (spatiale) récente (gauche, 5j), ancienne (centre, 25j) ou ancienne dans un nouveau contexte (droite). L'augmentation du délai entre l'apprentissage et le rappel résulte en une diminution de l'activité métabolique dans l'hippocampe dorsal (dHPC), et une augmentation de celle-ci dans le cortex frontal (FC) et le cortex cingulaire antérieur (aCC). Tester les souris dans un nouvel environnement provoque l'activation de l'Hip, montrant son implication dans l'encodage d'une nouvelle information. *Adapté de Frankland et Bontempi 2005, d'après Bontempi et al. 1999.*

En 2004, Maviel et al. ont obtenu des résultats similaires en observant l'expression de deux gènes précoces (*zif268* et *c-fos*), expression révélatrice de l'activité neuronale, au cours d'une tâche mnésique spatiale chez la souris. Dans un labyrinthe à 5 branches, les animaux devaient retrouver la seule branche appâtée sur la base d'indices allocentriques distaux. La mémoire récente a été évaluée à 1 jour, la mémoire ancienne à 30 jours. Le rappel d'une mémoire ancienne active fortement le cortex préfrontal, et notamment le cortex cingulaire antérieur. L'Hip, au contraire, se désengage (est moins activé) lors du rappel d'une mémoire ancienne par rapport au rappel d'une mémoire récente. Enfin, l'inactivation du cortex préfrontal ou du cortex cingulaire antérieur à l'aide de lidocaïne entraîne une baisse significative des performances de rappel d'une mémoire ancienne, mais pas récente (Maviel et al. 2004). L'implication du cortex préfrontal, et notamment du cortex cingulaire antérieur, dans la persistance d'un souvenir a ensuite été mise en évidence chez le rongeur dans différentes tâches mnésiques : le conditionnement de peur au contexte (Frankland et al. 2004), le conditionnement de clignement des paupières (Takehara et al. 2004), l'aversion gustative conditionnée (Ding et al. 2008), et la mémoire spatiale (Teixeira et al. 2006 ; Lopez et al. 2012). L'hypothèse du rôle majeur du mPFC dans la persistance d'un souvenir a été soulignée par Frankland et Bontempi en 2005 : ils ont proposé que cette structure inhibe l'Hip lorsque l'information stockée au niveau cortical est similaire à la situation en cours, de manière à éviter l'encodage d'informations redondantes (Fig. 26).



4.3.5. ROLE PREPONDERANT DU MPFC DANS LE RAPPEL D'UNE MEMOIRE ANCIENNE : PROPOSITIONS DE RUDY ET COLLABORATEURS, 2005

En marge des modèles théoriques dominants, et notamment des propositions de Frankland et Bontempi, Rudy et al. ont proposé en 2005 que l'implication du mPFC lors du rappel dépende non pas du délai (mémoire récente vs ancienne), mais de la difficulté d'accès à la trace et/ou de la qualité de la représentation mnésique. Le mPFC serait ainsi fortement impliqué dans le rappel d'une information dont la force, ou le degré de précision, serait faible, et/ou partiellement dégradée, indépendamment du délai. L'engagement du mPFC serait alors une réponse à l'oubli spontané et viserait à pallier à la difficulté de rappeler une information ; il agirait comme un « booster » mnésique (Rudy et al. 2005 ; Fig. 27).

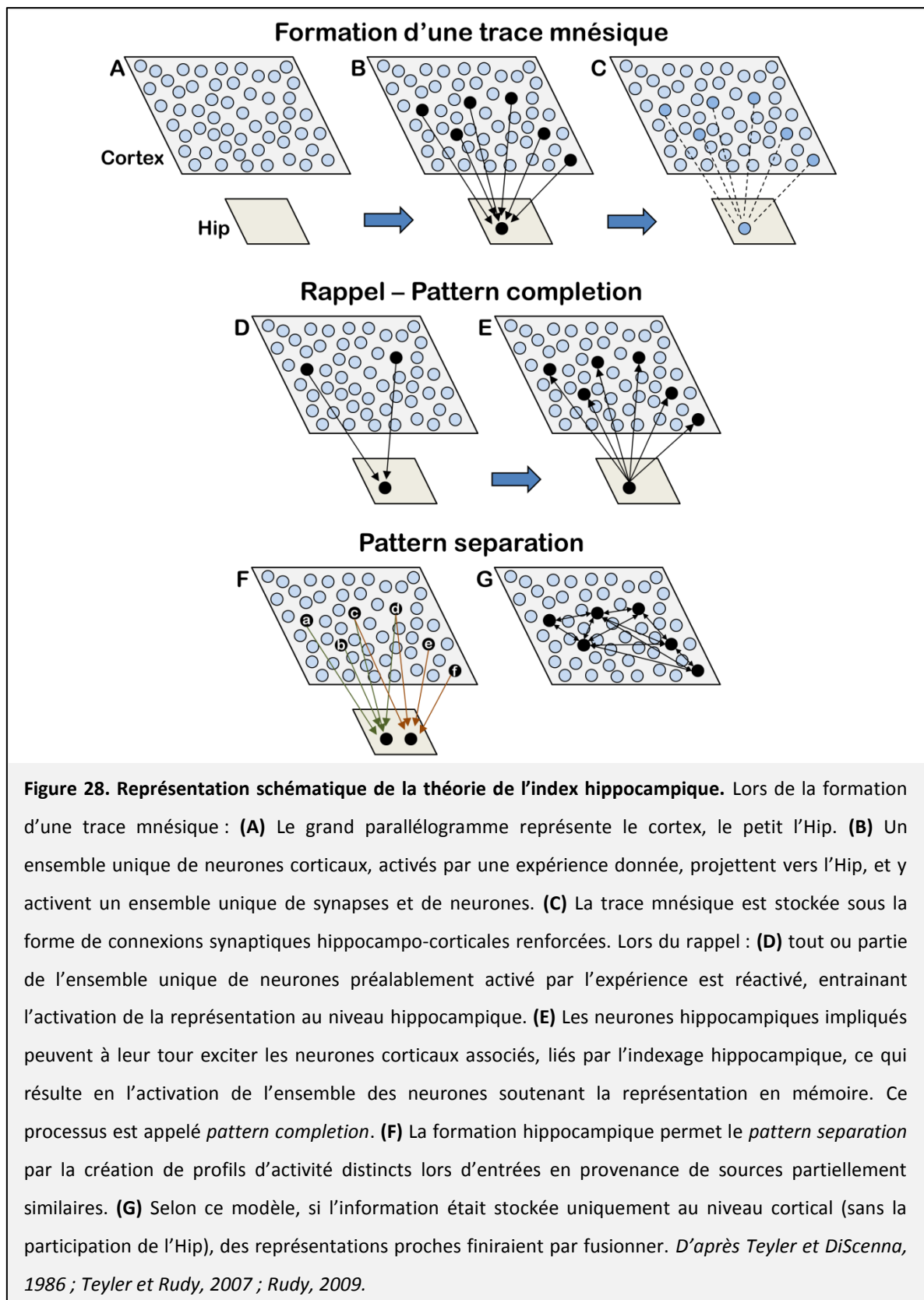


Cette théorie a notamment été testée au laboratoire par Lopez et al. (2012). Ces auteurs ont utilisé un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris dans deux salles distinctes. La première salle disposait d'indices visuels plus saillants et contrastés (salle 1) que la seconde salle (salle 2). Les performances de rappel se dégradèrent avec le temps (5j vs 25j) uniquement dans la salle 2 (Lopez et al. 2008, 2012). L'expression de la protéine c-Fos au cours du rappel d'une mémoire récente (5j) ou ancienne (25j) a été évaluée dans les sous-régions de l'Hip et du mPFC. L'activité neuronale était plus élevée dans l'Hip (CA1) en mémoire ancienne, et dans le mPFC (ACC notamment) en mémoire récente et en mémoire ancienne dans la salle 1 (pas de dégradation des performances avec le temps) par rapport à

la salle 2 (dégradation des performances avec l'augmentation du délai). De plus, dans la salle 1, l'activité de CA1 et de l'ACC était significativement plus élevée lors du rappel d'une trace mnésique ancienne que lors du rappel d'une trace mnésique récente. Ainsi, l'Hip et le mPFC semblent tous deux impliqués lorsque de bonnes performances en mémoire ancienne sont observées (salle 1 à 25j). Ces résultats suggèrent que l'engagement de l'Hip et du mPFC dépendent à la fois du délai de rappel et de la qualité de la représentation en mémoire (Lopez et al. 2012). Je n'ai pas connaissance d'autres études appuyant le modèle de Rudy, et l'intérêt suscité par sa publication en 2005 semble s'être aujourd'hui considérablement tari.

4.3.6. LA THEORIE DE L'INDEX HIPPOCAMPIQUE (TEYLER ET DISCENNA, 1986)

Selon ce concept que l'on doit à Teyler et DiScenna (1986), l'Hip stocke l'accès aux informations relatives aux souvenirs épisodiques sous la forme d'une carte de l'ensemble des autres régions cérébrales. Cette carte, ou index, autoriserait l'accès aux informations stockées dans des unités fonctionnelles extra-hippocampiques, notamment néocorticales, et ce en conservant la ségrégation anatomique (Fig. 28). Les neurones hippocampiques permettraient l'intégration des informations corticales, de telle manière qu'un profil d'activité neuronale spécifique serait associé à chaque expérience, avec ses détails sensoriels, émotionnels, cognitifs (Teyler et DiScenna, 1986). L'activation d'une partie de ce profil d'activité neuronale (par exemple lors de la perception d'une odeur déjà rencontrée dans un autre contexte) résulterait en l'activation de l'index hippocampique idoine. L'Hip pourrait alors activer à son tour des modules corticaux associés avec cette odeur, faisant ré-émerger le reste des informations relatives à l'expérience, et indirectement connectées par le biais de l'index hippocampique (telle la madeleine de Proust, en somme ; Fig. 28). Il est à noter que selon ce modèle, l'expérience est représentée uniquement sous la forme de synapses renforcées au niveau hippocampique, et non par la modification de l'activité des neurones corticaux impliqués. Cette théorie de l'index hippocampique est avant tout un modèle des interactions hippocampo-corticales à l'œuvre dans la mémoire épisodique, et non à proprement parler un modèle explicatif de la consolidation systémique.



La théorie de l'index implique que les synapses hippocampiques soient très plastiques (elles doivent pouvoir être modifiées très rapidement et de manière réversible), tandis que les synapses corticales requièrent d'être davantage sollicitées pour être modifiées, au profit

d'une meilleure stabilité. Trois différentes formes de LTP (potentialisation à long terme) pourraient satisfaire ces exigences (Raymond, 2007). Celles-ci se distinguent notamment par l'intensité requise pour induire la LTP et par la durée de cette potentialisation, deux facteurs qui semblent positivement corrélés. Par rapport à ce qui a déjà été évoqué au préalable dans le chapitre 4.2., Raymond distingue la LTP1, 2 et 3. La LTP1 correspond à la plasticité à long terme précoce, la LTP2 à une phase intermédiaire de la plasticité synaptique à long terme tardive, et la LTP3 à la phase durable de la plasticité synaptique à long terme tardive. Notamment car elles sont sous-tendues par des mécanismes cellulaires différents (voir Fig. 2 de Raymond, 2007), ces différentes formes de LTP pourraient jouer un rôle distinct dans les processus mnésiques. La LTP3 intervient plus lentement, mais de manière plus stable, et sa mise en place implique les canaux calcium voltage-dépendant (VDCCs) (Moosmang et al. 2005 ; Raymond, 2007). Un fonctionnement altéré de ces canaux affecte uniquement la mémoire à long terme, sans influence sur l'apprentissage et la mémoire de travail (Borroni et al. 2000 ; Woodside et al. 2004 ; Moosmang et al. 2005). La LTP3, dépendante des VDCCs, pourrait ainsi être impliquée dans le renforcement des connexions au niveau cortical. Ces différentes formes de LTP sont toutefois présentes partout, aussi bien dans le cortex que dans l'Hip. Mais il semblerait que les mécanismes de contrôles inhibiteurs soient particulièrement puissants dans le cortex, ce qui augmenterait l'excitation requise pour provoquer la dépolarisation des neurones corticaux, stabilisant leur profil d'activation (Werk et Chapman, 2003).

De cette théorie de l'indexage hippocampique découlent les concepts de *pattern completion* et de *pattern separation*. Le terme de *pattern completion* fait référence au fait que l'activation d'une partie seulement des connexions cortico-hippocampiques impliquées dans le codage d'une expérience suffit à réactiver l'ensemble des neurones soutenant la représentation en mémoire (grâce aux neurones hippocampiques sous-tendant l'index). Le concept de *pattern separation* renvoie à l'idée que l'architecture de la formation hippocampique permet le stockage de représentations en provenance de sources corticales similaires, tout en préservant la singularité de chaque représentation, de manière à limiter la survenue d'interférences (Fig. 28 ; Rudy, 2009).

4.3.7. LA THEORIE DES SCHEMAS (*MORRIS, 2006*)

Chez l'Homme adulte, l'essentiel des apprentissages se fait dans le contexte d'une intégration des nouvelles informations au sein de schémas déjà existants (Dudai et Morris, 2013). La théorie des schémas s'appuie sur celle de l'index hippocampique et sur le modèle standard de la consolidation systémique. Elle met l'accent sur trois éléments spécifiques :

- La région hippocampique est impliquée dans l'encodage et le rappel rapides et automatiques d'évènements contextualisés, et la plasticité synaptique est un mécanisme essentiel à ces processus ;
- Un tel système nécessite deux mécanismes de consolidation distincts, mais s'imbriquant dans le temps ;
- La création de souvenirs contextualisés durables implique l'intégration de nouvelles informations au sein de représentations existantes, ou schémas (Morris, 2006).

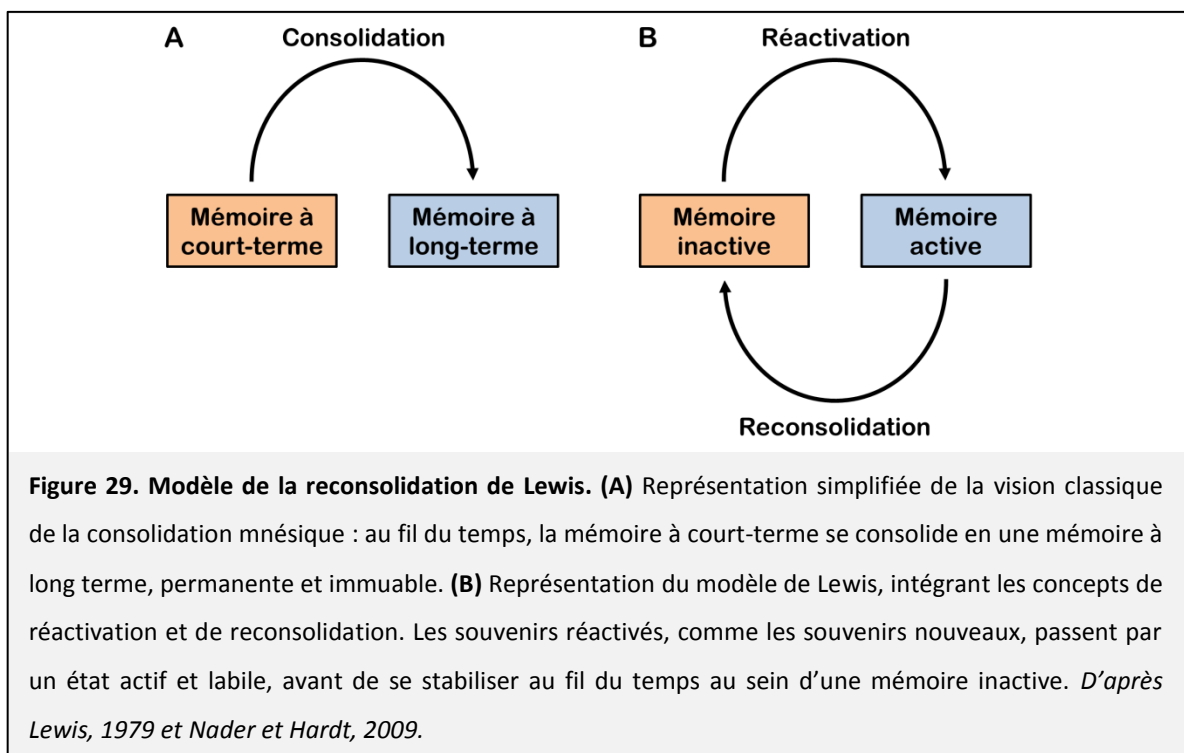
La théorie des schémas se distingue de la théorie standard de la consolidation systémique par la possibilité d'une acquisition et d'une consolidation rapide de nouvelles informations au sein du cortex, mais uniquement quand un schéma déjà existant permet à ces nouvelles informations de s'y intégrer. L'index hippocampique associé à un schéma donné guiderait alors le mécanisme par lequel les nouvelles informations sont encodées et consolidées. La mise en place d'un schéma serait ainsi un processus lent, tout aussi lent que la consolidation systémique selon la théorie standard, mais une fois en place, un schéma pourrait intégrer de nouvelles informations à la représentation distribuée dans le cortex beaucoup plus rapidement (Morris, 2006). Dans cette publication, Morris décrit une nouvelle tâche nécessitant que le Rat retienne des associations odeur/emplacement. Publiés en 2007, les résultats de cette étude montrent que les rats peuvent développer un schéma spatial qui représente les emplacements de différentes odeurs les unes par rapport aux autres au sein d'un environnement familier. Cette acquisition a nécessité 18 sessions. A la suite de cet apprentissage, les animaux devaient apprendre deux nouvelles associations odeur/emplacement. Cette fois, une seule session était nécessaire pour que les animaux développent une préférence de place distincte pour chacune des deux nouvelles odeurs. Une fois acquis, les schémas semblent donc permettre un apprentissage accéléré de nouvelles informations (Tse et al. 2007). Selon ces auteurs, la mise en place de schémas

pourrait suivre un déroulement temporel compatible avec la théorie standard, et solliciter à la fois l'Hip et le cortex. Mais contrairement à ce que proposent les autres théories, ils suggèrent qu'une fois le schéma acquis, de nouvelles informations pourraient être très rapidement ajoutées à celui-ci et immédiatement stockées au niveau cortical, de manière indépendante de l'Hip.

En 2011, Tse et al. ont utilisé un protocole d'acquisition similaire, puis ont comparé l'expression des gènes précoces *zif268* et *arc* lors d'une session au cours de laquelle les rats devaient soit apprendre deux nouvelles associations odeur/emplacement (parmi six, dont quatre apprises précédemment, condition 1), soit rappeler les six associations précédemment apprises (condition 2), soit apprendre six nouvelles associations (condition 3). Dans la région CA1 de l'Hip, l'expression du gène précoce *arc* est fortement augmentée dans les conditions 1 et 3, signe d'une activité en lien avec la nouveauté (ces deux conditions impliquent l'apprentissage de nouvelles associations). L'activité neuronale dans le cortex prélimbique (PL), le cortex cingulaire antérieur (ACC) et le cortex rétrosplénial (RSC) est fortement augmentée dans le groupe devant apprendre deux nouvelles associations, ce qui n'est pas le cas dans les deux autres groupes. Ce profil d'activité cortical signifierait ainsi l'incorporation de nouvelles informations au sein d'un schéma préexistant. Comme l'augmentation la plus massive a lieu dans le PL, ils ont ensuite évalué l'effet de l'inactivation de cette structure sur le rappel d'associations odeur/emplacement apprises longtemps auparavant ou la veille, et sur l'acquisition de deux nouvelles paires odeur/emplacement. Ils ont pour cela reproduit cette expérience avec des animaux chez lesquels ont été implantées des canules d'instillation ciblant le PL. L'inactivation à l'aide de CNQX durant le test de rétention empêche le rappel à 24 h ainsi que l'acquisition de nouvelles associations. Les auteurs en concluent que l'acquisition et le rappel d'informations incluses dans un schéma sont deux mécanismes dépendants d'un encodage au niveau cortical, et que celui-ci est essentiel pour la rétention à long terme de ces informations. D'après ces résultats, les modules néocorticaux seraient capables d'encoder et de consolider de l'information à une vitesse comparable aux neurones hippocampiques, ce qui s'oppose au modèle standard qui distingue un système d'apprentissage rapide – hippocampique – et un système d'apprentissage lent – cortical – (Frankland et Bontempi, 2005).

4.3.8. CONSOLIDATION VS. RECONSOLIDATION (LEWIS, 1979)

Les modèles théoriques de la consolidation évoqués jusqu'ici considèrent que pour chaque trace mnésique, la consolidation commence et s'achève une seule fois. La validité de ce postulat a plusieurs fois été remise en question depuis l'apparition du modèle standard au début des années 70. Le premier à avoir évoqué une possible importance de la reconsolidation dans la mémorisation est Lewis qui, dès 1979, proposa que l'activation d'une trace mnésique lors de son rappel entraîne une nouvelle consolidation (Lewis, 1979 ; Fig. 29). Le rappel pourrait ainsi impliquer la reconstruction, partielle ou totale, de la trace mnésique, ce qui inclut la possible incorporation de nouvelles informations obtenues au cours du rappel (rev. Dudai, 2004 ; Nader et Hardt, 2009).

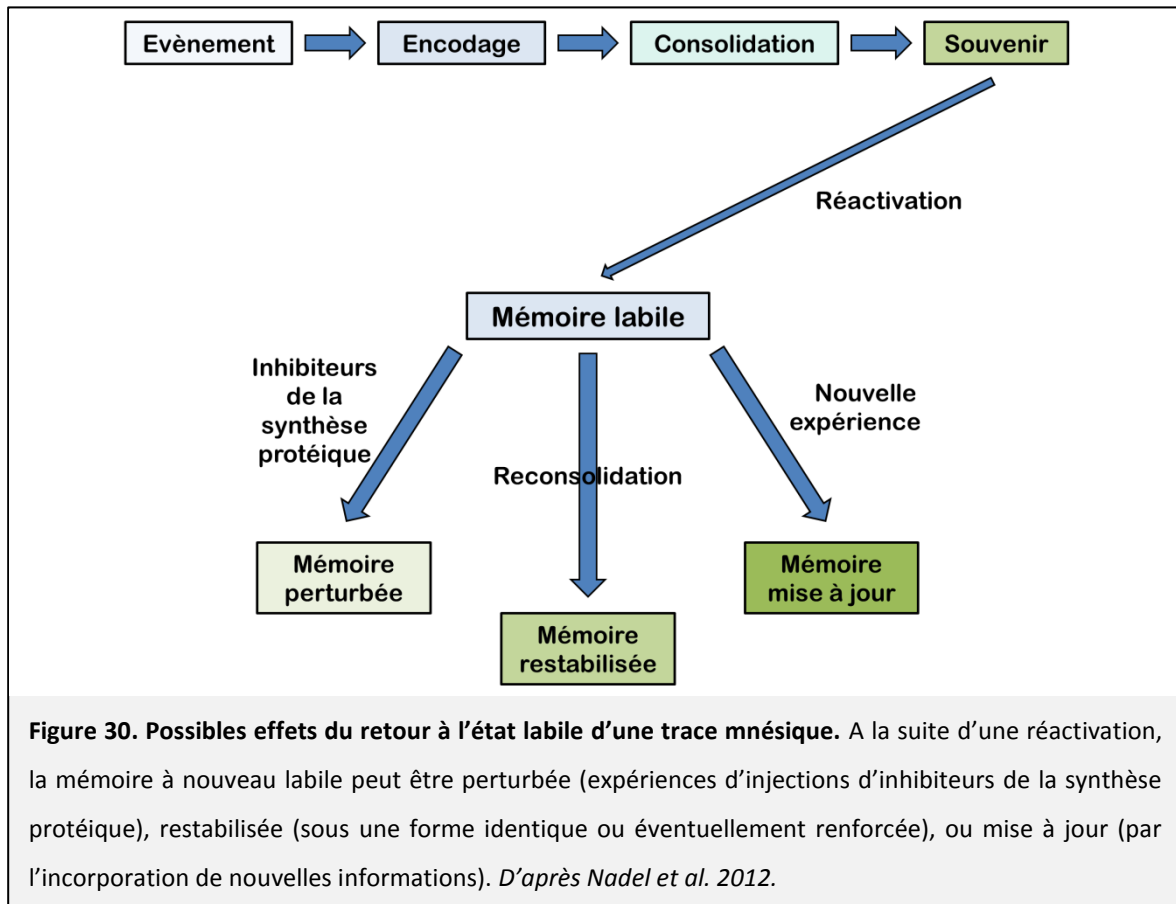


Les propositions de Lewis sont tombées dans l'oubli durant une vingtaine d'années, puis ont fait leur réapparition à la fin des années 90. Cette latence s'explique peut-être par l'engouement suscité par la découverte de la LTP, paradigme dominant dans les années 80/90 (Sara, 2000). En 1997, Przybylski et Sara ont réalisé une série d'expériences pour tester spécifiquement l'hypothèse selon laquelle la mémoire spatiale de référence subit une étape de reconsolidation dépendante des récepteurs NMDA après sa réactivation. Ils ont entraîné des rats à retrouver les récompenses alimentaires disposées à l'extrémité de trois

bras (toujours les mêmes) d'un labyrinthe à 8 branches. Une fois que les animaux ne faisaient plus d'erreurs, une unique séance de cette tâche a fait office de procédure de réactivation. L'injection intrapéritonéale de l'antagoniste des récepteurs NMDA MK-801 une heure avant cette procédure de réactivation a alors empêché le rappel, testé 24h plus tard (Przybylawski et Sara, 1997). Les performances de rats recevant la même molécule dans un contexte différent au cours de la session de réactivation n'étaient pas impactées. Des résultats comparables ont été obtenus à l'aide d'instillations intra-cérébro-ventriculaires de l'antagoniste des récepteurs NMDA DL-APV (Torras-Garcia et al. 2005). Des expériences similaires ont montré un rôle majeur des récepteurs β -adrénergiques dans la reconsolidation successive à une réactivation (Roullet et Sara, 1998 ; Przybylawski et al. 1999 ; Sara et al. 1999), suggérant que la voie de signalisation de l'AMPC est impliquée dans ce mécanisme. D'autre part, l'instillation d'anisomycine (un inhibiteur de la synthèse protéique, processus nécessaire à la consolidation) dans les noyaux latéraux et basaux de l'amygdale durant une session de réactivation empêche le rappel ultérieur d'une peur conditionnée au contexte (Nader et al. 2000).

Les mécanismes de consolidation et de reconsolidation sont tous deux sujets à des périodes d'instabilité (après l'acquisition ou le rappel, respectivement) ; périodes durant lesquelles il est possible d'interférer sur leur déroulement, et en-dehors desquelles les traitements ne sont plus efficaces (Fig. 30 ; e.g. Roullet et Sara, 1998 ; Nadel et Hardt, 2009 ; Nadel et al. 2012). En 2004, Lee et al. ont instillé des oligodesoxynucléotides (ODN) antisens dirigés contre le BDNF ou Zif268 dans l'Hip dorsal de rats 90 min avant l'acquisition ou la réactivation d'une peur conditionnée au contexte. L'instillation d'ODN antisens dirigés contre le BDNF n'a pas eu d'effet sur la mémoire à court-terme (processus indépendant de la synthèse protéique), mais la mémoire à long terme, testée à 24h, était altérée. L'absence d'effet sur la mémoire à court-terme indique que l'encodage n'est pas altéré par l'instillation d'ODN antisens dirigés contre le BDNF, et que c'est bien la phase de consolidation qui y est sensible. L'instillation dans l'Hip d'ODN antisens dirigés contre Zif268, 90 minutes avant un test de réactivation de la peur conditionnée au contexte, a quant à elle empêché le rappel à 24h dans un test de rétention post-réactivation. De plus, l'instillation d'ODN antisens dirigés contre Zif268 n'a pas eu effet sur l'étape de consolidation, et celle d'ODN antisens dirigés contre le BDNF pas davantage sur la reconsolidation. Ces auteurs ont ainsi mis en évidence

une dissociation entre consolidation et reconsolidation en ce qui concerne les protéines impliquées : la consolidation nécessite le BDNF, et non la protéine Zif268 ; l'inverse étant vrai pour la reconsolidation (Lee et al. 2004). Plusieurs publications ont ainsi appuyé le fait que consolidation et reconsolidation pourraient être des processus au moins partiellement distincts (e.g. Roulet et Sara, 1998 ; Tronel et Sara, 2002 ; Duvarci et Nader, 2004 ; Balderas et al. 2013 ; rev. Alberini, 2005, 2008 ; Sara, 2010).



Des traces mnésiques considérées comme consolidées peuvent donc redevenir labiles à la suite de leur rappel, ce qui implique une reconsolidation, qui comme la consolidation, est un mécanisme dépendant des récepteurs NMDA, de l'AMPC et de la synthèse protéique. Néanmoins ces processus pourraient différer en ce qui concerne les mécanismes cellulaires et moléculaires qui les sous-tendent. L'étude de la reconsolidation appuie le caractère dynamique des représentations mnésiques, notamment épisodiques, qui loin d'être figées une fois la consolidation « achevée », peuvent être modifiées, renforcées ou altérées au gré des expériences personnelles successives (Fig. 30).

4.3.9. LA THEORIE DE LA TRANSFORMATION (*MOSCOVITCH ET AL. 2005*)

L'enjeu principal des théories de la consolidation mnésique est de comprendre comment nos souvenirs finissent par être représentés de manière « permanente » dans notre cerveau. La vision traditionnelle (théorie standard) stipule que l'Hip est nécessaire pour maintenir ces représentations en mémoire le temps de leur consolidation (sous une forme identique) dans les structures néocorticales. Moscovitch et al. proposèrent, en 2005, une alternative basée sur le fait qu'avec le temps, les souvenirs pourraient se transformer, changer de nature, passant d'une représentation épisodique et détaillée, dépendante du contexte, à une représentation plus schématique et générique, qui contient toujours l'essentiel du souvenir, mais est dépourvue d'informations contextuelles. Selon cette hypothèse, le processus de transformation fait référence au fait que les éléments essentiels du souvenir prennent le pas, au fil du temps, sur les aspects contextuels, mais cela n'implique pas forcément un oubli du souvenir épisodique initial. La théorie de la transformation se distingue ainsi de la théorie standard en trois points :

- Tout souvenir est initialement épisodique (liée au contexte d'acquisition), et reste dépendant de l'Hip tant que les détails contextuels associés sont accessibles ;
- Avec le temps, la représentation hippocampique permet le développement d'une version schématique et néocorticale du souvenir, contenant l'essentiel du souvenir initial, mais peu de détails contextuels ;
- Il existe une interaction dynamique entre ces deux types de mémoire, de telle manière que l'une ou l'autre peut dominer lors du rappel, notamment en fonction des conditions dans lesquelles celui-ci a lieu (Winocur et al. 2010a).

Les facteurs qui pourraient être impliqués dans la régulation de cette transformation sont notamment le passage du temps, l'intensité de l'apprentissage, la saillance du contexte, et les aspects émotionnels (Moscovitch et al. 2005 ; Winocur et al. 2007, 2010a). En 2007, Winocur et al. ont réalisé des lésions de l'Hip chez le Rat, puis mis en œuvre deux tests : la transmission sociale de préférence alimentaire, et le conditionnement de peur au contexte. Dans le premier cas, un rat sujet renifle l'haleine d'un rat démonstrateur qui a consommé un échantillon de nourriture à l'odeur caractéristique. Quand le rat sujet doit ensuite choisir entre deux échantillons de nourriture, dont celui que le rat démonstrateur a consommé, il va avoir tendance à préférer ce dernier. Les rats étaient testés 1 ou 8 jours après cet

apprentissage, dans le même contexte ou dans un contexte différent. Pour le test de conditionnement de peur au contexte, les rats recevaient un choc unique dans les pattes dans une enceinte ouverte sur l'environnement extérieur, qui constitue alors le contexte de conditionnement. Ils étaient ensuite testés 1 ou 28 jours plus tard, dans un contexte identique ou différent. Ces délais de 8 et 28 jours ont été choisis par les auteurs car ils correspondent au temps nécessaire pour que la mémoire soit consolidée, i.e., indépendante de l'Hip, dans la tâche de transmission sociale de préférence alimentaire et dans celle de conditionnement de peur au contexte, respectivement (Winocur, 1990 ; Kim et Fanselow, 1992). Dans les deux tests, les rats Sham expriment des performances supérieures dans le même contexte que dans un contexte différent lors du rappel à 1j. Les performances des animaux Sham dans le même contexte évoluent peu entre 1j et 8-28j, tandis que les performances dans le contexte différent augmentent avec le délai (1j vs 8-28j). Chez les animaux Sham, le changement de contexte a ainsi des effets différents en fonction du délai : la mémoire est dépendante du contexte à un délai court (1j), ce qui n'est pas le cas à un délai long (8-28j). Les animaux lésés ne distinguent pas les deux contextes (performances similaires), quel que soit le délai et la tâche. Lors du test de rétention d'une peur conditionnée dans le contexte d'origine, les rats lésés ont des performances significativement inférieures aux rats Sham aux deux délais, confirmant que l'Hip est nécessaire à l'acquisition dans ce paradigme. Dans le test de transmission sociale de préférence alimentaire, les performances des rats lésés se dégradent avec l'augmentation du délai. Les souvenirs initiaux sont ainsi liés au contexte dans lequel ils ont été formés, et avec le passage du temps, la sensibilité contextuelle diminue. La réponse comportementale peut alors être évoquée par d'autres environnements partageant des éléments (génériques) communs avec la situation d'origine (processus de généralisation). Le gradient temporel observé après des lésions de l'Hip ne serait donc pas le résultat d'une consolidation à l'identique des souvenirs dans le néocortex, mais reflèterait la transformation d'une trace mnésique hippocampo-corticale intégrant les détails contextuels en une trace mnésique extra-hippocampique et dégagée du contexte d'acquisition. La théorie de la transformation propose ainsi qu'une mémoire initialement dépendante du contexte et de l'Hip (épisode) évolue en une mémoire indépendante du contexte et de l'Hip (sémantique) avec le passage du temps, et possiblement en fonction d'autres critères qui restent à explorer (profondeur de l'apprentissage, saillance du contexte et aspects émotionnels sont évoqués ; Moscovitch

et al. 2005 ; Winocur et al. 2007, 2010a). Il apparait que même les représentations spatiales, notamment familières, pourraient être stockées au niveau cortical sous une forme schématique, moins précise et moins flexible, mais néanmoins suffisante à la navigation. Les performances inférieures des Rats dont l'Hip a été lésé semblent bien indiquer que les représentations extra-hippocampiques de l'environnement ne sont pas les mêmes que celles sous-tendues par l'Hip (Winocur et al. 2010b ; voir aussi Wang et al. 2009 chez la Souris).

Chez l'Homme, Conway affirme aussi que dans la majeure partie des cas, les détails perceptuels qui caractérisent les souvenirs épisodiques et permettent un rappel précis d'une expérience passée sont perdus en quelques jours au profit d'une version schématique du souvenir (Conway, 2009). Des études d'imagerie fonctionnelle chez des patients atteints de lésions appuient cette hypothèse, montrant que toutes les mémoires sont initialement dépendantes de l'Hip, mais qu'avec le passage du temps, seuls les souvenirs épisodiques le restent, les souvenirs sémantiques étant stockés dans des structures extra-hippocampiques (Rosenbaum et al. 2001 ; Bayley et al. 2005 ; rev. Moscovitch et al. 2005,2006 ; Winocur et Moscovitch, 2011). D'un point de vue clinique, les patients atteints de démence sémantique souffrent de troubles de la mémoire sémantique, mais leur mémoire épisodique est relativement épargnée (Moss et al. 2003 ; Maguire et al. 2010). Or, dans les premiers stades de cette maladie, ce sont surtout des régions néocorticales (temporales latérales et antérieures) qui sont touchées, sans atteinte du lobe temporal médian.

La théorie de la transformation peut également offrir un nouvel éclairage du phénomène de reconsolidation évoqué précédemment. Selon la théorie de la transformation, les mémoires hippocampiques et extra-hippocampiques sont fondamentalement différentes. La réactivation, réalisée expérimentalement en remettant l'animal dans le contexte d'apprentissage, devrait entraîner la résurgence de la mémoire hippocampique dépendante du contexte, au détriment de la mémoire schématique extra-hippocampique. La version « dépendante du contexte » de ce souvenir serait alors à nouveau sensible à la lésion de l'Hip. Si cette réactivation a lieu dans un environnement différent, cet effet ne devrait pas avoir lieu. C'est effectivement ce que Winocur et al. ont constaté à l'aide du paradigme de conditionnement de peur au contexte (Winocur et al. 2007, 2009), en faveur de la théorie de la transformation et en accord avec l'existence de processus de reconsolidation.

4.3.10. LA THEORIE DU TAGGING ET DE LA CAPTURE SYNAPTIQUES (FREY ET MORRIS, 1997)

La théorie du tagging (ou marquage) et de la capture synaptiques (TCS, ou *synaptic tagging and capture theory*), initialement proposée par Frey et Morris en 1997, se focalise principalement sur les mécanismes cellulaires donnant lieu à la consolidation (Frey et Morris, 1997, 1998). Ce n'est pas une théorie de la consolidation *systémique* à proprement parler, mais ces propositions ont des implications directes sur la façon d'appréhender celle-ci. La TCS propose que l'encodage d'une trace mnésique crée le potentiel nécessaire à sa rétention à long terme, mais ne suffit pas, seul, à assurer la persistance de l'information. La formation et la consolidation d'une trace mnésique sont des processus dynamiques qui seraient influencés par l'état du système à un instant donné. Ainsi, selon cette théorie, la survenue et le déroulement de la consolidation synaptique sont fonction de l'état actuel du réseau neuronal concerné ; la façon dont va être encodée en mémoire la représentation d'un épisode précis est tributaire des événements cellulaires précédents, voire d'événements cellulaires intervenant juste après celui-ci (Redondo et Morris, 2011). Cette théorie met ainsi en évidence l'importance du déroulement temporel des événements cellulaires : un événement mineur, s'il suit ou précède immédiatement un événement majeur, peut être consolidé.

D'un point de vue cellulaire, la théorie TCS propose que la LTP précoce entraîne un marquage (ou tagging) local des synapses au moment de son induction. Le tagging est un état spécifique de la synapse, probablement dépendant de plusieurs molécules, dont la protéine kinase CaMKII (Martin et Kosik, 2002). Ce marquage n'est pas suffisant, en soi, pour induire une consolidation (LTP tardive) : l'interaction entre ce *tag* et des protéines/produits liés à la plasticité (PRPs, pour *plasticity-related proteins/products*), synthétisées dans le soma ou les dendrites, est essentiel à la stabilisation dans le temps de la potentialisation (passage de la LTP précoce à la LTP tardive). Cette hypothèse est basée sur trois éléments centraux :

- Un stimulus faible, entraînant une plasticité à court terme, induit le tagging permettant aux synapses concernées de capturer les PRPs (libérés à la suite d'un événement majeur, indépendant mais proche dans le temps), ce qui induit des processus de plasticité à long terme sélectivement sur les synapses activées ;
- Les tags et les PRPs ont une durée de vie limitée (environ 2h ; Ballarini et al. 2009) ;

- Pour que les PRPs puissent être capturés par les tags, tous deux doivent être présents au même endroit (synapse) et au même moment (Viola et al. 2014).

Les PRPs seraient donc à l'origine de changements synaptiques durables uniquement lorsqu'ils sont capturés par des synapses taggées (Fig. 31). Les PRPs sont ainsi, par définition, des protéines dont la production résulte de cascades intracellulaires déclenchées par une stimulation forte, et qui jouent un rôle important dans le maintien de la LTP tardive. Les PRPs pourraient inclure GluR1, Homer1a, PKM ζ et ARC (Redondo et Morris, 2011).

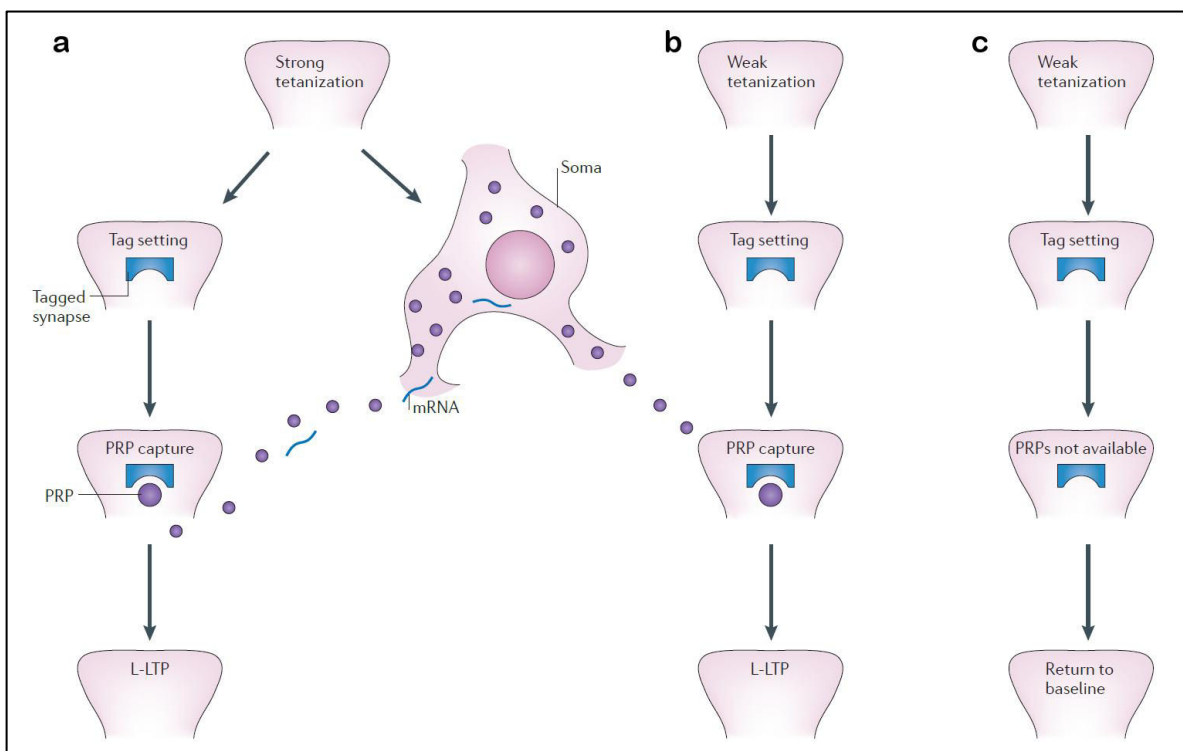


Figure 31. La théorie du tagging et de la capture synaptiques. (a) La stimulation forte et répétée (*strong tetanization*) d'une voie synaptique entraîne deux événements distincts : d'une part le tagging de la synapse (gauche), d'autre part la synthèse de molécules diffusibles appelées PRPs (*plasticity-related proteins/products*). Les PRPs peuvent alors être capturées par les synapses taggées, étape nécessaire à la LTP tardive (L-LTP). **(b)** Une synapse peu stimulée (*weak tetanization*) ayant accès aux PRPs peut également atteindre le stade de L-LTP. **(c)** En l'absence de PRPs, l'état réceptif (*tagging*) des synapses va s'estomper rapidement (quelques minutes/heures) et la potentialisation synaptique sera limitée. Adaptée de Redondo et Morris, 2011.

Sur la base de ce modèle, la théorie du tagging comportemental a été proposée par Moncada et al. en 2007. Ces auteurs ont montré, au niveau comportemental, l'effet d'un stimulus fort (l'exploration d'un environnement nouveau) sur la rétention à long terme d'un

stimulus faible (un entraînement réduit dans une tâche d'évitement passif). La trace mnésique faible générée par un apprentissage réduit, et normalement amenée à disparaître, peut ainsi être consolidée si un événement marquant se produit dans une fenêtre temporelle proche (Moncada et Viola 2007). Une autre équipe a obtenu des résultats similaires en utilisant un test de reconnaissance spatiale ou un paradigme d'aversion gustative conditionnée en tant que stimulus faible, la stimulation forte étant là-aussi assurée par l'exposition à un environnement nouveau (Ballarini et al. 2009). Ces auteurs ont montré que la fenêtre temporelle permettant une interaction entre les deux événements est limitée : l'environnement nouveau présenté 1h avant et jusqu'à 2h après le test de reconnaissance spatiale améliore la rétention, mais ce n'est pas le cas si le stimulus fort est présenté 2h avant ou 4h après le stimulus faible. Il est remarquable que l'exploration d'un environnement nouveau, procédure très aisée à mettre en œuvre, semble particulièrement marquante pour les animaux, et parfaitement adaptée à l'étude du tagging comportemental (Moncada et Viola, 2007 ; Ballarini et al. 2009 ; Moncada et al. 2011). A l'aide d'instillations de différentes substances pharmacologiques dans le but d'altérer le fonctionnement d'un système de neurotransmission ou une étape précise d'une voie de signalisation intracellulaire, Moncada et al. ont mis en évidence l'implication des récepteurs dopaminergiques D1/D5 et des récepteurs β -adrénergiques dans l'induction de la synthèse des PRPs, ainsi que celle des récepteurs NMDA, de l' α -CAMKII et de la PKA (deux protéines kinases) dans le processus de tagging (Moncada et al. 2011). Leurs résultats confirment que la présence de PRPs ou de tags ne suffit pas à la stabilisation de la trace mnésique, qui nécessite la co-occurrence de ces deux éléments.

Récemment, Lesburguères et al. (2011) ont abordé la théorie du tagging et de la capture synaptiques dans le contexte de la consolidation au niveau des systèmes. Pour mettre en évidence les mécanismes intervenant à la suite d'un apprentissage impliquant un dialogue hippocampo-cortical, et permettant sa persistance et sa consolidation à (très) long terme, Lesburguères et al. ont utilisé le paradigme de la transmission sociale d'une préférence alimentaire. Dans cette tâche, les rats apprennent, au cours d'une unique session de 30 min, à préférer l'odeur d'un aliment préalablement consommé par un congénère à l'odeur d'un aliment inconnu. Les animaux sont ensuite testés 1j (mémoire récente) ou 30j (mémoire ancienne) après l'apprentissage. L'acquisition et la rétention de cette tâche sont

particulièrement dépendantes de l'Hip (Alvarez et al. 2001), et au niveau cortical, du cortex orbitofrontal (OFC), impliqué dans le traitement et l'association des informations olfactives (Schoenbaum et Roesch, 2005). Les auteurs montrent que des changements morphologiques des synapses (pré- et post-synaptiques) interviennent de manière dépendante du délai dans l'OFC : le niveau de la protéine synaptophysine est significativement plus élevé après un rappel à 30j qu'à 1j dans l'OFC, de même que la densité des épines dendritiques (fig. S4 de Lesburguères et al. 2011 ; voir aussi Restivo et al. 2009 pour la mise en évidence de l'augmentation de la densité des épines dendritiques dans l'ACC 36 jours après un conditionnement de peur au contexte, et le rôle temporaire de l'Hip dans ce processus). Pour déterminer si le remodelage progressif des synapses au sein de l'OFC est dépendant de l'Hip, Lesburguères et al. ont inactivé le dHip (à l'aide de CNQX) à la suite de l'apprentissage, de manière chronique, au cours d'une période précoce (jours 0 à 12) ou tardive (jours 15 à 27). Le rappel d'une mémoire ancienne (30j) est altéré quand le dHip est inactivé durant la phase précoce de la consolidation systémique, mais pas durant sa phase tardive. De plus, l'inactivation de l'Hip durant les 12 premiers jours succédant à l'acquisition empêche les modifications dendritiques de se produire dans l'OFC à 30j. Ils ont ensuite procédé de la même manière avec l'OFC (inactivation durant la phase précoce ou tardive). Dans ce cas, les performances de rappel sont significativement inférieures au groupe contrôle pour les deux périodes d'inactivation. L'activité corticale est donc nécessaire à la fois juste après l'apprentissage, probablement pour la maturation et la stabilisation de la trace mnésique au travers d'interactions hippocampo-corticales, mais également à plus long terme, pour assurer la stabilité et le maintien de la trace en mémoire. Enfin, sur la base de la théorie du tagging et de la capture synaptiques, Lesburguères et al. ont fait l'hypothèse que les réseaux neuronaux hippocampiques et corticaux devaient tous deux être marqués de manière simultanée au moment de l'encodage. L'hip étant essentiel à l'acquisition de la tâche, ils se sont focalisés sur l'OFC. L'inactivation de cette structure juste avant l'acquisition n'affecte pas le rappel à 7j de la transmission sociale de préférence alimentaire (Lesburguères et al. 2011 ; voir aussi Smith et al. 2010), mais empêche le rappel à 30j, et abolit l'augmentation de la densité des épines dendritiques observée chez les animaux contrôles. Bloquer le tagging initial des neurones corticaux en inactivant l'OFC durant l'acquisition interfère donc avec la persistance à très long terme, probablement en empêchant l'Hip de recruter les réseaux neuronaux corticaux durant l'acquisition de la

tâche. Les processus de tagging et de capture synaptiques pourraient ainsi jouer un rôle majeur dans la consolidation systémique.

4.3.11. SOMMEIL ET CONSOLIDATION MNESIQUE

Déjà évoqué par Marr en 1971, le sommeil ne fait pourtant partie intégrante d'aucun des modèles théoriques de la consolidation présentés précédemment. Son rôle positif sur la mémorisation, notamment au travers de la réactivation des traces mnésiques précédemment formées, est néanmoins fréquemment souligné (Dudai, 2004 ; Frankland et Bontempi, 2005 ; Morris, 2006 ; Winocur et Moscovitch, 2011 ; Nadel et Hardt, 2011 ; Preston et Eichenbaum, 2013). En effet, depuis la première mise en évidence expérimentale des effets bénéfiques du sommeil sur le rappel chez l'Homme (Jenkins et Dallenbach, 1924), de très nombreuses études ont montré son rôle positif sur la mémorisation et la persistance d'une mémoire déclarative ou procédurale (e.g. rev. Smith, 2001 ; Robertson et al. 2004 ; Marshall et Born, 2007). Ces effets sont principalement visibles, au niveau comportemental, par l'augmentation de la résistance à l'interférence d'une autre tâche similaire (stabilisation) et par une amélioration des performances de rappel.

Le sommeil est divisé en deux grandes phases se succédant en moyenne trois à cinq fois au cours de la nuit : le sommeil à ondes lentes (*slow-wave sleep*, SWS) et le sommeil paradoxal (*rapid eye movement sleep*, REM). Au cours d'une nuit normale de 8h, la phase SWS est prédominante durant la première partie de la nuit, la phase REM durant la seconde partie de celle-ci. Les premières études ont montré que la phase SWS est surtout bénéfique à la consolidation des souvenirs déclaratifs, et la phase REM à la consolidation des mémoires non-déclaratives (émotionnelle et procédurale) (Plihal et Born, 1997 ; 1999). Aujourd'hui, il apparaît que ces deux phases du sommeil jouent un rôle complémentaire dans les processus de consolidation ayant lieu durant le sommeil (rev. Diekelmann et Born, 2010).

La consolidation systémique implique une réactivation des traces mnésiques récemment encodées. Ce processus intervient *off-line*, essentiellement durant le sommeil, ce qui éviterait que l'encodage (processus constamment à l'œuvre lorsque nous sommes éveillés) et la réactivation/consolidation des souvenirs n'interfèrent, empêchant que le cerveau « n'hallucine » durant la consolidation (rev. Diekelmann et Born, 2010). Une avancée substantielle dans la compréhension de ce mécanisme de réactivation *off-line* a eu lieu

lorsqu'il a été démontré, chez le Rat, que le profil d'activation de certains neurones hippocampiques pendant l'exploration d'un environnement nouveau est reproduit au cours de la période de sommeil suivante (Wilson et McNaughton, 1994 ; Ji et Wilson, 2007). Ces réactivations neuronales interviennent principalement durant la phase SWS (plus rarement durant la phase REM ; Louie et Wilson, 2001), dans une minorité de neurones et dans l'ordre dans lequel les expériences ont été vécues au cours de la période d'éveil précédente (Wilson et McNaughton, 1994 ; Ji et Wilson, 2007). Comparé à l'activité enregistrée durant les phases d'encodage (éveil), les réactivations ayant lieu durant la phase SWS semblent plus précises, accompagnées de moins de bruit de fond, et le rythme de décharge des neurones est plus élevé que pendant l'encodage, comme si elles étaient rejouées en accéléré (Nadasdy et al. 1999). Chez le Rat, ces réactivations ont été observées dans l'Hip, le néocortex, le thalamus et le striatum (Ribeiro et al. 2004 ; Ji et Wilson, 2007 ; Lansink et al. 2008). Des signes de ces réactivations ont aussi été observés chez l'Homme dans des études utilisant des approches d'imagerie fonctionnelle (Maquet et al. 2000 ; Peigneux et al. 2004). Sur la base du modèle standard de la consolidation, Saletin et Walker proposèrent en 2012 un modèle intégrant les mécanismes de réactivation *off-line* dans la dynamique des communications réciproques entre l'Hip et le néocortex (Fig. 32).

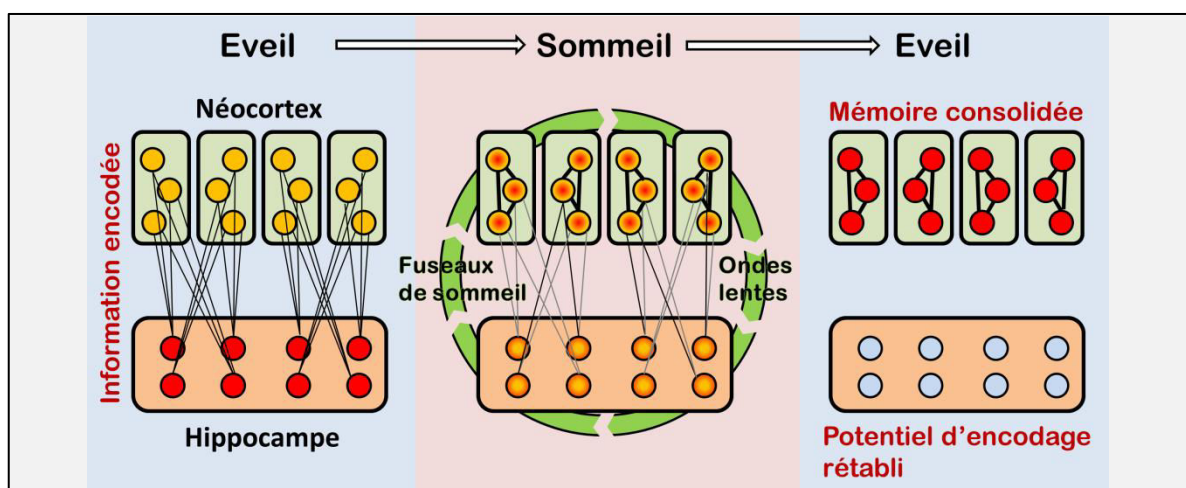


Figure 32. Modèle de la consolidation de traces mnésiques hippocampo-corticales grâce au sommeil.

(Gauche) Durant l'encodage, l'hip intègre rapidement les informations dans des réseaux neuronaux distribués comprenant les modules corticaux impliqués dans le traitement des différentes composantes de la trace mnésique. (Centre) Des réactivations successives de ces réseaux neuronaux hippocampo-corticaux, intervenant durant le sommeil, amènent au renforcement progressif des connexions cortico-corticales. (Droite) Avec le temps, ce mécanisme permet aux souvenirs de devenir indépendants de l'Hip et d'être graduellement intégrés aux traces mnésiques corticales préexistantes, rétablissant également le potentiel d'encodage de l'Hip. *D'après Saletin et Walker, 2012.*

D'après les études récentes, la réactivation de traces mnésiques précédemment formées permettrait leur intégration à long terme au sein de réseaux neuronaux préexistants, modifiant les représentations en mémoire (Born et Wilhelm, 2012). Un modèle séquentiel des mécanismes de consolidation à l'œuvre durant le sommeil pourrait comporter les étapes suivantes (rev. Diekelmann et Born, 2010 ; Saletin et Walker, 2012 ; Nadel et al. 2012) :

- 1) [SWS] Un processus de sélection détermine, parmi les traces formées le jour même, celles qui méritent d'être consolidées. Ce processus définit ainsi l'équilibre entre conservation et suppression des informations. Cette sélection pourrait s'opérer sur des critères tels que la saillance des indices durant l'encodage et/ou le caractère nouveau, émotionnel ou récompensant d'une information (Saletin et Walker, 2012) ;
- 2) [SWS] Une mise à l'échelle synaptique (*downscaling*), visant à réduire la charge synaptique sans perte des traces mnésiques, normalise le système hippocampique, ne laissant au-dessus du seuil que les traces sélectionnées (Van Der Werf et al. 2009). Ce phénomène servirait principalement à éviter la saturation des synapses, inévitable sans *downscaling* (Tonini et Cirelli, 2003, 2006) ;
- 3) [SWS] Les traces hippocampiques, et uniquement celles-ci, sont alors réactivées, « rejouées » (*replay*) en interaction avec les modules corticaux impliqués dans leur encodage. Ce *replay* permet l'intégration des traces mnésiques journalières au sein de circuits corticaux préexistants. L'Hip jouerait ainsi un rôle (temporaire) de mise en relation des régions corticales impliquées dans les différentes composantes d'un souvenir, mécanisme rendu possible par des réactivations précises et répétées (Fig. 32 ; Saletin et Walker, 2012). Durant cette phase, la plasticité synaptique corticale est facilitée, possiblement via un mécanisme levant l'inhibition au niveau des neurones corticaux, permettant la formation de nouvelles associations et le renforcement des traces « choisies » ;
- 4) [REM] Enfin, la phase de REM est à l'origine de la stabilisation au niveau cortical des modifications effectuées durant la phase SWS au cours d'une période de consolidation synaptique libre d'interférences. Ceci serait rendu possible par la « déconnexion » entre l'Hip et les aires néocorticales (Robertson, 2009). A terme, le renforcement des connexions cortico-corticales permet à la trace de devenir indépendante de l'Hip, et de restaurer les capacités d'encodage de l'Hip.

Les phases de sommeil SWS et REM joueraient ainsi des rôles complémentaires dans l'optimisation de la consolidation systémique (modèle séquentiel proposé par Diekelmann et Born, 2010). Ces mécanismes dépendants du sommeil sont bénéfiques à deux niveaux. D'une part, les souvenirs épisodiques de la journée précédente sont consolidés, et donc moins soumis aux interférences générées par de nouveaux apprentissages (l'augmentation de la résistance à l'interférence à la suite d'une période de sommeil a été démontrée ; e.g., Ellenbogen et al. 2006). D'autre part, les connexions cortico-corticales formées au cours de la nuit désengagent en partie l'Hip, ce qui se traduit par des capacités d'encodage restaurées (Walker, 2009) : une baisse de la capacité d'encodage de l'Hip est constatée lors de la privation de sommeil (Yoo et al. 2007 ; Van Der Werf et al. 2009), et le sommeil restaure les capacités d'apprentissage d'une tâche hippocampo-dépendante (Mander et al. 2011).

Tous les modèles théoriques de la consolidation systémique, toutes les propositions présentées ci-dessus mettent en évidence le caractère essentiel d'un dialogue hippocampo-cortical intense qui, au niveau cortical, implique notamment fortement le mPFC. Les échanges réciproques entre l'Hip et le mPFC ne pouvant avoir lieu de manière directe (pas de projection directe du mPFC sur l'Hip), les noyaux ReRh du thalamus sont donc idéalement situés pour jouer le rôle de relai et de coordinateur entre ces deux structures dans les processus permettant la consolidation au niveau des systèmes. Cela a été l'objet de ma 1^{ère} étude (publication 1).

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. ANIMAUX

Toutes les études présentées dans cette thèse ont été effectuées sur des rats mâles de souche Long-Evans (provenant du centre d'élevage R. Janvier, France ; Fig. 33), âgés de 3 mois et pesant environ 250g à leur arrivée au laboratoire. Cette souche de rats est souvent utilisée dans des tâches de mémoire spatiale (notamment la piscine de Morris) en raison de ses bonnes capacités cognitives et visuelles (D'Hooge et De Deyn 2001 ; Paul et al. 2009). Placés dès leur arrivée au laboratoire dans des cages transparentes individuelles en Makrolon (de dimensions 42 x 26 x 15 cm), les rats sont manipulés une semaine plus tard



Figure 33. Rat Long Evans en passe de monter sur une plateforme (visible) dans la piscine de Morris.

(1-2 min/jour durant 5 jours) et préalablement à toute expérience, de façon à les habituer à l'expérimentateur et à la manipulation. Les pièces de stabulation sont distinctes des salles de test, et les paramètres d'éclairage (cycle lumière/obscurité 12h:12h, période éclairée 7h-19h), de température ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), de taux d'humidité ($50\% \pm 10\%$), et d'ambiance sonore (assurée par une radio durant la phase diurne) sont automatiquement régulés. Les rats disposent d'eau et de nourriture *ad libitum* (hors expériences) et sont toujours testés durant la phase diurne.

2. INTERVENTIONS CHIRURGICALES

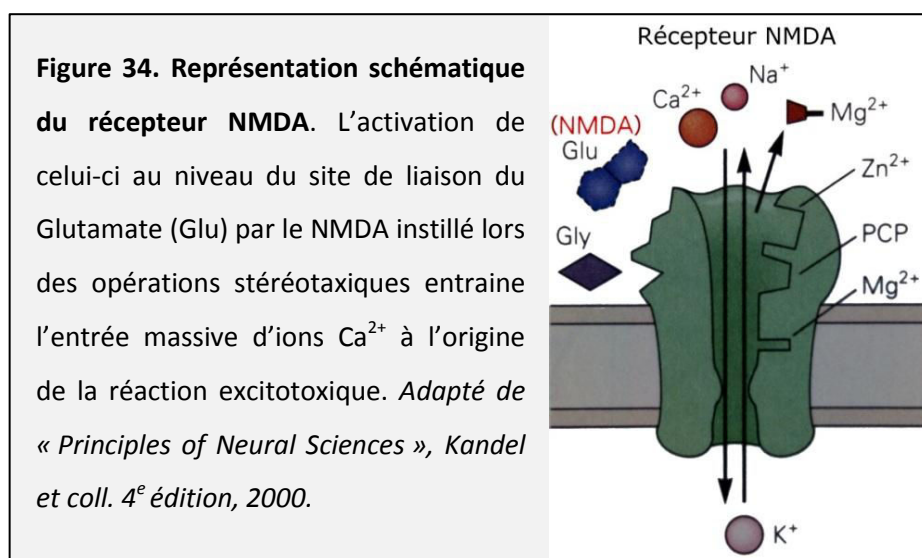
Tous les rats utilisés dans les expériences relatées dans cette thèse ont fait l'objet d'une intervention chirurgicale (excepté les rats utilisés pour l'expérience 1 (*c-fos*) de la publication 1). Deux types d'opérations ont été effectués : des lésions excitotoxiques des noyaux reuniens (Re) et rhomboïde (Rh) du thalamus, visant à détruire les neurones dans la zone cible, ou des implantations à demeure de guide-canules permettant l'instillation ultérieure de substances pharmacologiques dans le but d'inactiver temporairement une structure cérébrale donnée. Dans ce second cas, l'implantation de guide-canule(s) a été unilatérale (structure impaire et médiane, comme les noyaux ReRh du thalamus) ou bilatérale

(structures paires et latérales, dans le cas présent l'hippocampe dorsal (dHip) ou le cortex préfrontal médian (mPFC)). Ces opérations chirurgicales ont toujours eu lieu avant le début des expériences comportementales (les animaux ayant néanmoins été manipulés au préalable pour limiter le stress inhérent à l'anesthésie). Les coordonnées stéréotaxiques utilisées au cours de ces opérations ont été calculées à partir de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (2007) et vérifiées au cours d'expériences préliminaires.

2.1. LESIONS EXCITOTOXIQUES

2.1.1. PRINCIPE

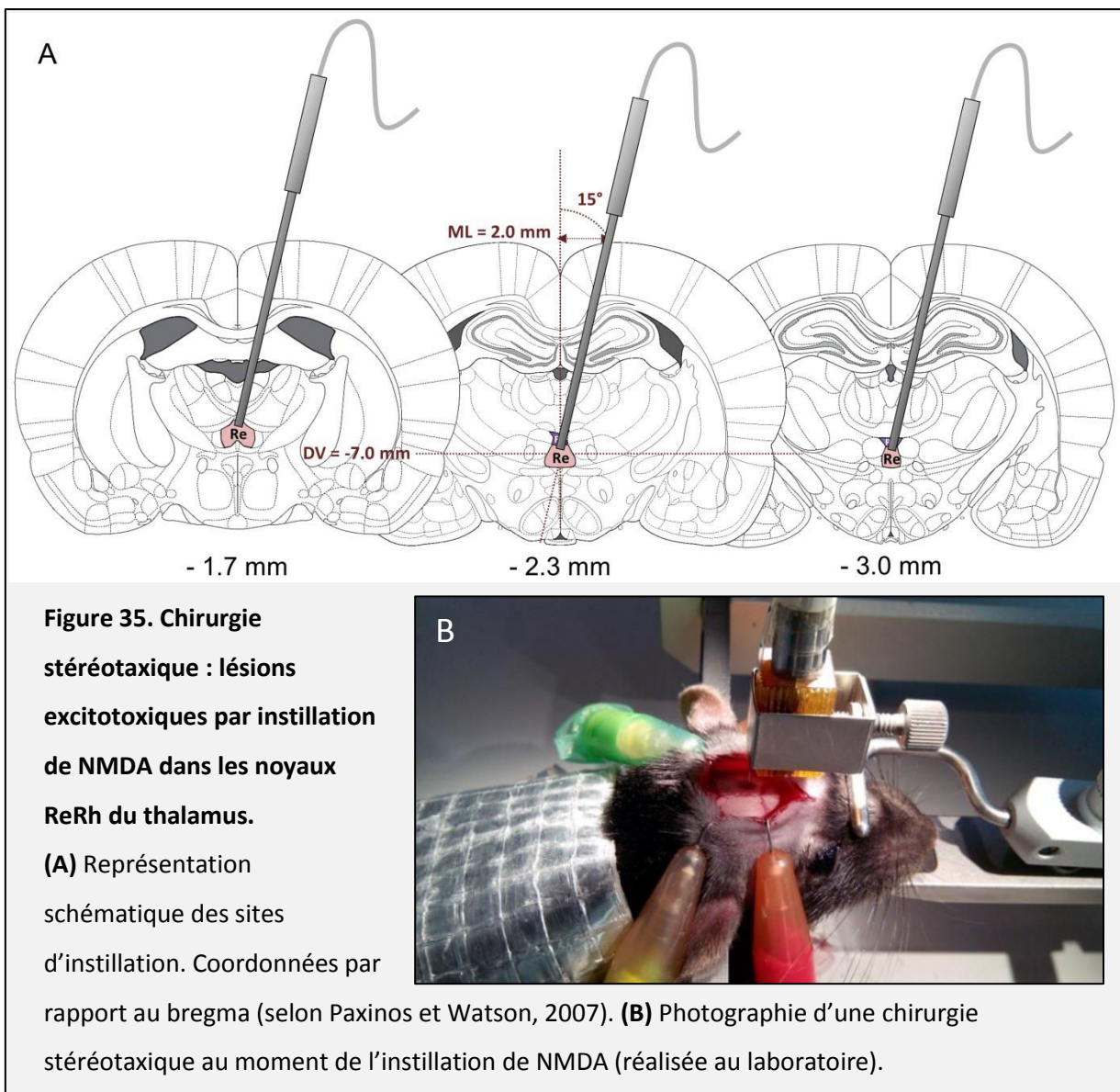
Ces lésions sont réalisées à l'aide de NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) injecté dans le parenchyme au niveau des noyaux ReRh par chirurgie stéréotaxique. Le NMDA est un agoniste spécifique du récepteur ionotropique portant le même nom. Instillé dans le tissu cérébral, le NMDA va mimer l'action du glutamate qui se lie habituellement, en conditions physiologiques, sur le récepteur NMDA, l'un des principaux récepteurs neuronaux excitateurs. Contrairement au glutamate, le NMDA ne va se fixer que sur le récepteur NMDA et n'aura aucun effet sur les récepteurs AMPA et kainate. A forte concentration, le NMDA va provoquer une entrée massive d'ions calcium dans les neurones, ce qui induit l'activation d'enzymes telles des phospholipases, des endonucléases et des protéases. Ces enzymes vont dégrader les structures cellulaires (membranes, cytosquelettes...) amenant à la destruction des neurones dans la zone d'instillation, d'où le terme de lésions excitotoxiques.



2.1.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les rats sont anesthésiés à l'aide de pentobarbital sodique (50 mg/kg, Ceva santé animale) injecté par voie intrapéritonéale. Quelques minutes plus tard, la profondeur de l'anesthésie est observée par l'immobilité générale de l'animal (hormis une respiration régulière), et le cas échéant vérifiée par un pincement de la queue et un éventuel mouvement des vibrisses. Puis le crâne du rat est rasé et celui-ci est placé dans un cadre stéréotaxique. Une injection sous-cutanée de xylocaïne (Xylovet, 0.1 mL/rat) est alors effectuée au niveau du scalp pour induire une anesthésie locale au niveau du futur champ opératoire. Les rats reçoivent également une injection intramusculaire d'antibiotique à large spectre (Extencilline 2.4 MUI, 0.3 mL/rat) et leurs yeux sont couverts d'un gel ophtalmique (Lacrigel) pour prévenir toute déshydratation de la cornée. Le scalp est incisé et les tissus écartés pour laisser apparaître la boîte crânienne, et des écarteurs disposés pour libérer l'accès au champ opératoire. Puis une craniotomie est effectuée à l'aide d'une fraise dentaire : une fenêtre de 2 mm² est percée dans la boîte crânienne pour permettre l'accès au parenchyme. Une canule d'instillation (d'un diamètre de 0.28 mm) est alors délicatement descendue au niveau des noyaux ReRh du thalamus avec un angle de 15° de manière à éviter le sinus veineux sagittal et l'hémorragie qui résulterait de sa perforation. Les lésions sont réalisées *via* l'instillation de NMDA 0.12 M (Sigma, Saint-Louis, USA) dissout dans une solution de tampon phosphate salin (PBS 0.1 M). Une micro-pompe motorisée reliée à la canule d'instillation par un cathéter est utilisée pour instiller un volume de 0.1 µL de NMDA par site à une vitesse de 0.05 µL / min. Une fois l'instillation effectuée, la canule est laissée en place 5 minutes supplémentaires pour permettre au NMDA de diffuser dans le tissu cérébral entourant le site d'instillation. Cette précaution limite fortement la remontée du produit le long de la canule lors de son retrait. La canule est ensuite retirée délicatement. Chaque animal reçoit 3 instillations de NMDA selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes (Paxinos et Watson, 2007) : AP (antéro-postérieur) = -1.5 mm, -2.1 mm et -2.7 mm par rapport au bregma ; ML (médio-latéral) = ±1.8 mm, ±1.8 mm et ±1.9 mm par rapport à la suture sagittale ; DV (dorso-ventral) = -7.0 mm, -7.1 mm et -7.2 mm par rapport à la surface du crâne (Fig. 35). Ces instillations sont réalisées en passant soit par l'hémisphère gauche, soit par l'hémisphère droit, d'un seul et même côté pour un animal donné, et de manière semi-aléatoire (pour obtenir au final le même nombre d'animaux opérés côté gauche et côté droit). Les rats contrôles (SHAM) sont opérés en suivant exactement la même procédure, si ce n'est qu'ils

reçoivent des instillations de PBS en lieu et place du NMDA. Une fois les instillations terminées, le champ opératoire est nettoyé, puis le scalp refermé par des points de suture « en cadre » assurant une bonne cicatrisation et difficiles à défaire ou arracher pour l'animal. Les rats sont alors placés sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil, puis ramenés dans leur pièce de stabulation. Une période de deux semaines de récupération et d'installation de la lésion est respectée avant le début de toute expérience comportementale. Durant cet intervalle, les animaux sont régulièrement manipulés et observés de manière à s'assurer de leur bon rétablissement et à pallier à toute anomalie, le cas échéant (point de suture arraché, signes de douleur, d'infection, d'inflammation anormale, etc.).



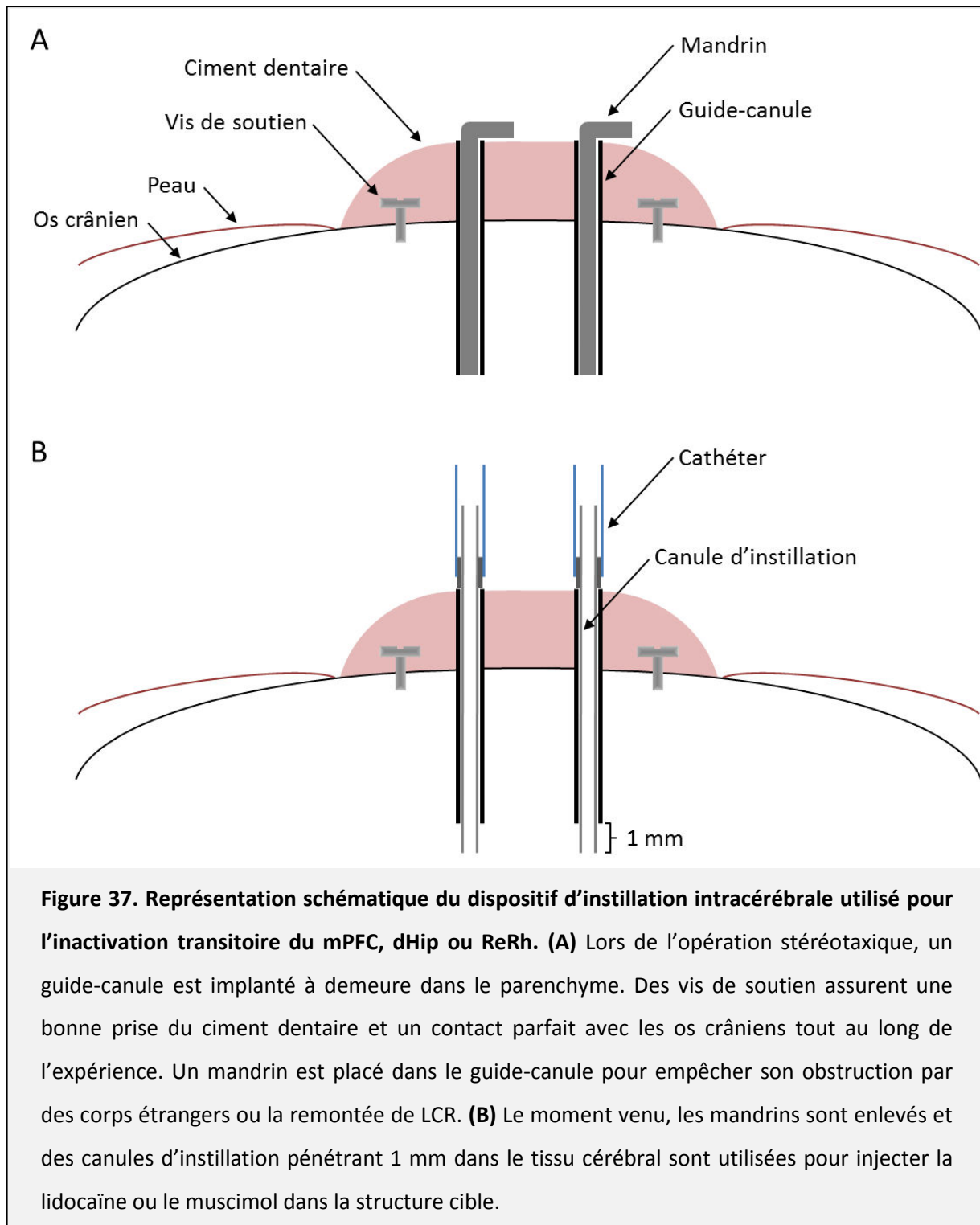
2.2. INACTIVATIONS FONCTIONNELLES REVERSIBLES

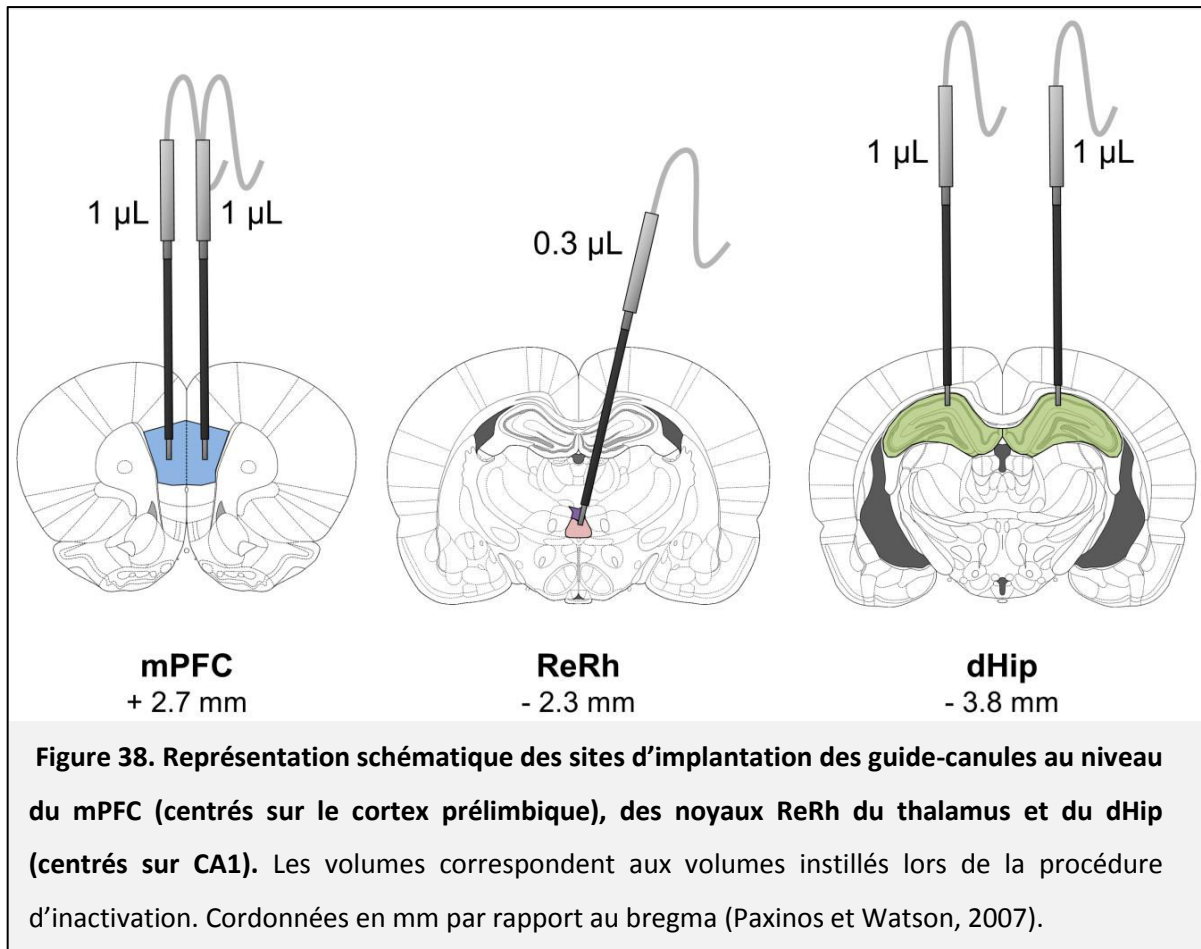
2.2.1. IMPLANTATION DES GUIDE-CANULES

Lors de l'implantation de guide-canules, l'anesthésie est réalisée avec un mélange de xylazine (13 mg/kg, Rompun 2%, Centravet, Nancy, France) et de kétamine (98 mg/kg, Imalgène 500, Centravet, Nancy, France) par injection intrapéritonéale. La procédure chirurgicale débute exactement comme dans le cas des lésions excitotoxiques, jusqu'à la craniotomie. Puis trois perforations de la boîte crânienne sont effectuées à l'aide d'une fraise dentaire afin d'y placer trois vis d'horloger, une au niveau de l'os frontal et deux dans l'os pariétal. Un ou deux trous d'un diamètre de 0.5 mm sont ensuite percés dans la boîte crânienne au-dessus de la structure d'intérêt (dHip, mPFC ou ReRh) de manière à descendre et placer à demeure une ou deux canules d'instillation (diamètre 0.4 mm) permettant une instillation bilatérale (mPFC, dHip) ou unilatérale (ReRh) ultérieure (Fig. 38). Les coordonnées stéréotaxiques utilisées pour chaque structure sont renseignées dans le tableau ci-dessous (Fig. 36).

	mPFC	dHip	ReRh	Figure 36. Coordonnées stéréotaxiques utilisées pour l'implantation à demeure de guide-canules d'instillation intracrânienne en fonction de la structure ciblée.
AP	+ 2.7 mm	+ 3.8 mm	+ 2.3 mm	
ML	± 0.7 mm	± 2.4 mm	± 1.7 mm	
DV	- 3.2 mm	- 2.2 mm	- 6.2 mm	

L'implantation unilatérale en vue d'une instillation au niveau des noyaux ReRh est réalisée avec un angle de 15° par rapport à la verticale. Une fois les canules installées dans leur position définitive, un ciment dentaire est utilisé pour créer un « chapeau » solide les maintenant en place *ad vitam æternam*. Les vis assurent un bon maintien du chapeau en offrant une prise supplémentaire au ciment dentaire, rigidifiant la structure et améliorant sa tenue dans le temps. Enfin, un mandrin est inséré dans chaque guide-canule pour éviter la remontée de LCR et l'obstruction de celle-ci par du tissu cérébral ou des éléments extérieurs (Fig. 37). Puis comme dans le cas de lésions excitotoxiques, les rats sont placés sous une lampe chauffante jusqu'à leur réveil avant d'être ramenés dans leur pièce de stabulation. Une période de dix jours de récupération est respectée avant le début de toute expérience comportementale, période au cours de laquelle les animaux sont régulièrement manipulés et observés de manière à s'assurer de leur bon rétablissement.





2.2.2. COMPOSES PHARMACOLOGIQUES

L'inactivation fonctionnelle réversible d'une structure cérébrale à l'aide d'un composé pharmacologique est couramment mise en œuvre dans la recherche en neurosciences. Deux grandes familles de composés sont principalement utilisées. La première est celle des anesthésiques locaux, tels que la lidocaïne et la tétrodotoxine, capables d'inhiber de façon réversible la genèse et la propagation des potentiels d'action le long des axones en bloquant les canaux sodiques voltage-dépendants (Tehovnik et Sommer, 1997). Nous avons utilisé la lidocaïne (LIDO) dans l'expérience d'inactivation de la Publication 1. L'un des inconvénients de ce composé est que de par son action sur les canaux sodiques présents sur les axones, son instillation peut être à l'origine de l'inactivation de fibres blanches en passage dans la structure cible ou à proximité immédiate de celle-ci. C'est la raison pour laquelle nous avons ensuite utilisé du muscimol (MSCI), un agent pharmacologique appartenant à la seconde famille de composés les plus couramment utilisés, celle des agonistes GABA. En se liant aux récepteurs GABA_A, le MSCI accroît la perméabilité de ce canal aux ions chlorure, provoquant un afflux de ces ions au sein du neurone et une augmentation de la différence de potentiel

électrique de membrane (intérieur négatif, extérieur positif), ce qui se traduit *in fine* par l'inhibition de la transmission neuronale. La concentration de LIDO utilisée a été de 20 µg/0.3 µL dans les noyaux ReRh. Cette dose a précédemment été validée au laboratoire, et utilisée dans plusieurs études (Pereira de Vasconcelos et al. 2006, Lopez et al. 2012). En ce qui concerne le MSCl, les doses utilisées ont varié en fonction de l'expérience : 250 ng/0.3 µL dans les noyaux ReRh et 250 ng/µL dans le mPFC et le dHip (publication 1), 30 ou 80 ng/0.3 µL dans les noyaux ReRh et 30 ou 80 ng/µL dans le mPFC et le dHip (soit 0.26nM ou 0.70 nM, publication 2) et enfin 30, 50, 80 ou 250 ng/µL dans le mPFC et le dHip (publication 3). Dans tous les cas, les solutions de LIDO ou de MSCl sont préparées dans du PBS filtré et à température ambiante le jour même de leur utilisation.

2.2.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

HABITUATION

L'inactivation réversible par instillation intracérébrale est une technique délicate à mettre en œuvre : les rats ne sont soumis à aucune sédation ou anesthésie et doivent néanmoins rester immobiles durant plusieurs minutes. Cela nécessite une habitude progressive de l'animal à la contention (immobilisation du corps, et tout particulièrement de la tête de l'animal), et de l'expérimentateur aux manipulations relatives à la mise en place des canules d'instillation et à la procédure d'instillation. Cette technique requiert ainsi le maintien de l'animal pendant toute la durée de l'opération consistant à retirer les mandrins, placer les canules d'instillation, instiller de la LIDO / du MSCl / du PBS à l'aide d'une pompe, permettre au produit de diffuser, retirer les canules d'instillation et enfin remettre les mandrins en place. L'intégralité de la procédure prend environ 3 min pour un expérimentateur entraîné, un temps d'immobilisation très long pour un rat. Les animaux doivent donc être progressivement habitués à l'ensemble de la procédure, à commencer par la contention. Posé sur une serviette, l'arrière du corps du rat est maintenu dans la paume de la main de l'expérimentateur, et l'index et le majeur sont placés sur les omoplates de part et d'autre de la tête de l'animal, de manière à limiter au minimum les mouvements de cette dernière. La serviette peut également être repliée sur le museau du rat et maintenue par les deux doigts sus-cités de manière à couvrir la gueule et les yeux de l'animal (Fig. 39). Jour après jour, le temps d'immobilisation imposé à l'animal est augmenté de 20-30 secondes le premier jour à 2 min 30 secondes après 6 jours d'habitude. Dès le second jour, une manipulation

supplémentaire est ajoutée : les mandrins sont retirés des guide-canules et nettoyés dans une solution d'éthanol à 70% pendant une trentaine de secondes, puis séchés et remis en place. Les troisième, quatrième et cinquième jours se déroulent de la même manière, si ce n'est que le temps de contention est progressivement allongé (1 minute, 1 minute 30 secondes et 2 minutes respectivement). Le sixième et dernier jour, les animaux sont également habitués à la mise en place des canules d'instillation. Pour ce faire, des canules factices courtes (1 mm de moins que les canules utilisées lors des instillations) sont mises en place pour simuler la procédure complète d'inactivation. Leur longueur est réduite pour ne pas dépasser des guide-canules et éviter toute pénétration dans le parenchyme. La veille de l'instillation de MSCl ou de LIDO, une instillation de PBS filtré est réalisée sur tous les animaux, quel que soit leur groupe expérimental (qu'ils reçoivent du MSCl, de la LIDO ou du PBS le lendemain avant le test de rétention), et ce selon des paramètres de volume et de débit d'instillation similaires à l'instillation du lendemain (voir paragraphe suivant).

PROCEDURE D'INSTILLATION

10 ou 30 min avant le test de rétention, en fonction de la substance utilisée pour provoquer l'inactivation (LIDO ou MSCl, respectivement), le rat est sorti de sa cage, posé sur une serviette et maintenu comme décrit précédemment. Ces délais ont été choisis en fonction de la cinétique de la substance à instiller : ils correspondent au moment où leur effet est maximal (Van Duuren et al. 2007, Edeline et al. 2002). Les mandrins sont retirés et les canules d'instillation mises en place dans les guide-canules préalablement installés à demeure sur la tête de l'animal. Une pompe de micro-injection est utilisée pour effectuer les instillations intracrâniennes de MSCl / LIDO / PBS à une vitesse de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ en ce qui concerne le mPFC et le dHip, et de 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans les noyaux ReRh, grâce à des seringues Hamilton de 10 μL reliées aux canules d'instillation par un cathéter en polyéthylène. L'ensemble seringue-cathéter-canule d'instillation est d'abord rempli d'eau ultra pure, puis la substance à instiller est aspirée par la canule d'instillation, en prenant soin de créer une bulle d'air la plus petite possible à l'interface entre l'eau et la substance. L'emplacement initial de cette bulle d'air est alors indiqué sur le cathéter à l'aide d'un trait de marqueur fin, de manière à pouvoir suivre l'avancée de l'instillation en observant le déplacement de la bulle d'air. Une fois l'instillation terminée, une période de 30 secondes supplémentaires est nécessaire à la diffusion de la substance dans le parenchyme et évite une remontée de cette

dernière par le guide-canule. Puis les canules d'instillation sont retirées et les mandrins remis en place dans les guide-canules.

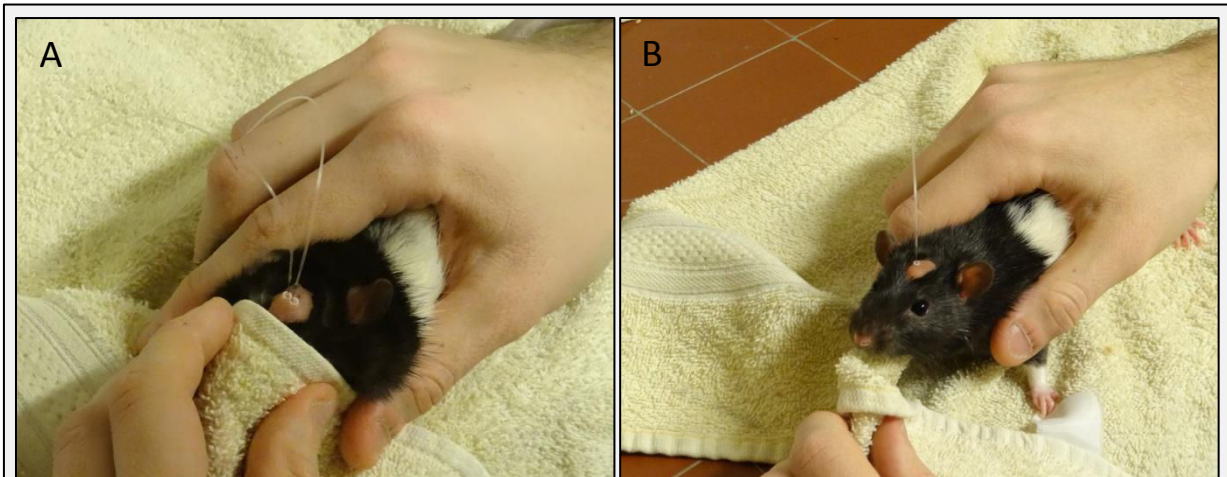


Figure 39. Procédure de contention permettant l'instillation intracrânienne chez le Rat.

L'animal est maintenu dans la serviette à l'aide de la main droite, la main gauche restant libre pour le retrait des mandrins, la mise en place des canules d'instillation, la manipulation de la pompe d'instillation etc. Une fois l'instillation en cours, la main gauche peut permettre de renforcer la contention, de la tête notamment, si nécessaire **(A)**, ou la contention peut être légèrement relâchée et le museau dégagé si l'animal est calme **(B)**. Notez qu'à gauche, l'instillation cible le mPFC (deux canules d'instillation, une pour chaque hémisphère) ; à droite, les noyaux ReRh (une seule canule d'instillation). Photographies réalisées au laboratoire.

3. EVALUATIONS COMPORTEMENTALES

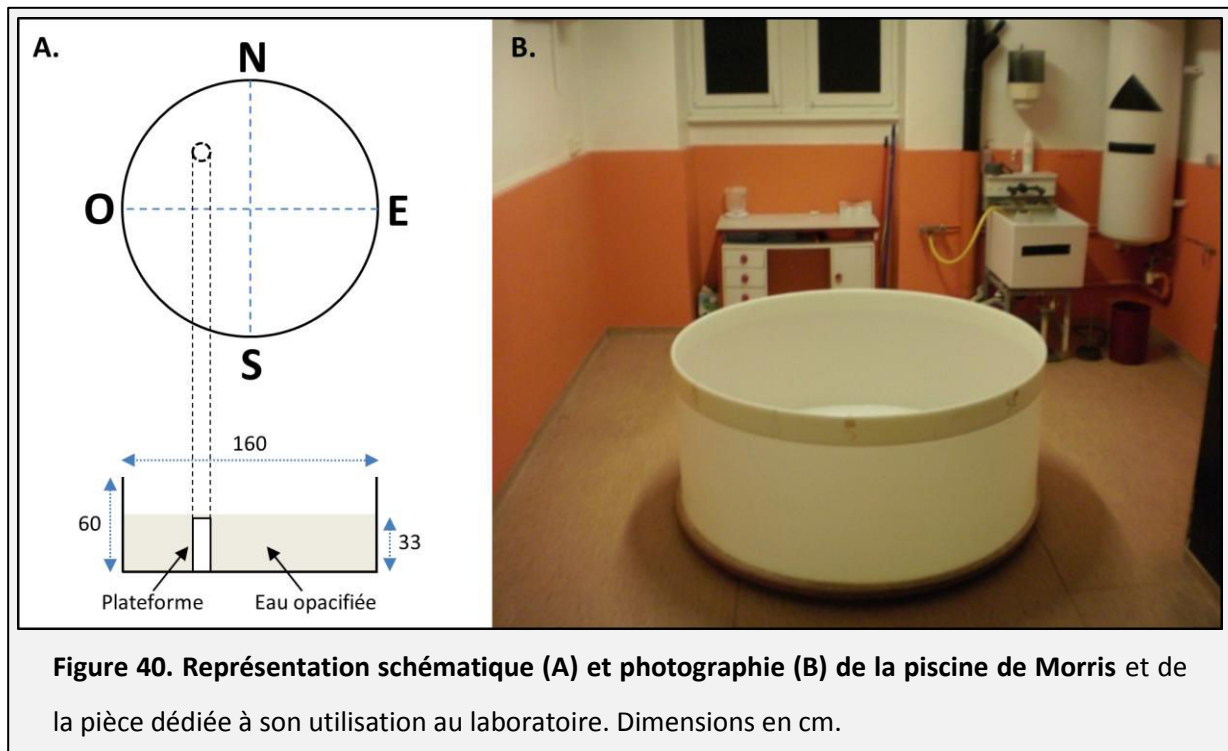
3.1. GENERALITES

Lors de tests comportementaux, des précautions s'imposent pour minimiser l'impact de la variation naturelle du niveau d'éveil et de vigilance au cours de la journée sur les performances. Ainsi, ces tests sont toujours effectués au sein d'une tranche horaire la plus réduite possible, généralement entre 9h et 13h. De plus, l'ordre de passage des animaux est différent d'un jour à l'autre de manière à ce que chaque animal soit parfois passé au début, au milieu et à la fin de la séance d'acquisition quotidienne (dans la piscine de Morris par exemple) dans le but de lisser d'éventuelles variations de performances inhérentes aux fluctuations nyctémérales.

3.2. LA PISCINE DE MORRIS

3.2.1. DISPOSITIF

La piscine de Morris est une enceinte circulaire en PVC blanc de 160 cm de diamètre et de 60 cm de haut virtuellement découpée en quatre quadrants égaux (Fig. 40). La piscine est remplie d'eau opacifiée à l'aide de lait en poudre (600 g environ) sur une hauteur de 33 cm, soit près de 660 litres d'eau. Une plateforme circulaire (11 cm de diamètre, 31 cm de hauteur) en PVC transparent et percée de trous est disposée au centre de l'un des quatre quadrants et immergée 2 cm sous la surface de l'eau. La couleur de l'eau, blanche et opaque, ainsi que la structure de la plateforme, transparente et percée, permettent de la rendre invisible aux yeux de l'animal nageant en surface. La température de l'eau est de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, ce qui confère à ce milieu un caractère aversif suffisant pour que l'animal soit motivé à réaliser la tâche consistant à retrouver et monter sur la plateforme, mais sans le mettre en danger (hypothermie). Une caméra placée à la verticale au-dessus de la piscine est reliée à un ordinateur exploitant le logiciel Smart (SD instruments, États-Unis). Cette installation permet de suivre en temps réel le trajet du rat dans la piscine depuis l'écran de l'ordinateur, mais également d'enregistrer ce trajet, le temps de nage, la latence d'arrivée à la plateforme, la distance parcourue, la vitesse de déplacement et de nombreux autres paramètres pour une analyse ultérieure. La salle dans laquelle se trouve ce test a été spécialement conçue à cet égard : de nombreux indices distaux stables sont disposés autour de la piscine (peintures fortement contrastées sur les murs, les équipements électriques, le bureau, l'évier etc.) de manière à faciliter la mise en place d'une mémoire spatiale allocentrique permettant à l'animal de se repérer et de localiser la plateforme (Fig. 40, voir aussi Lopez et al. 2012).

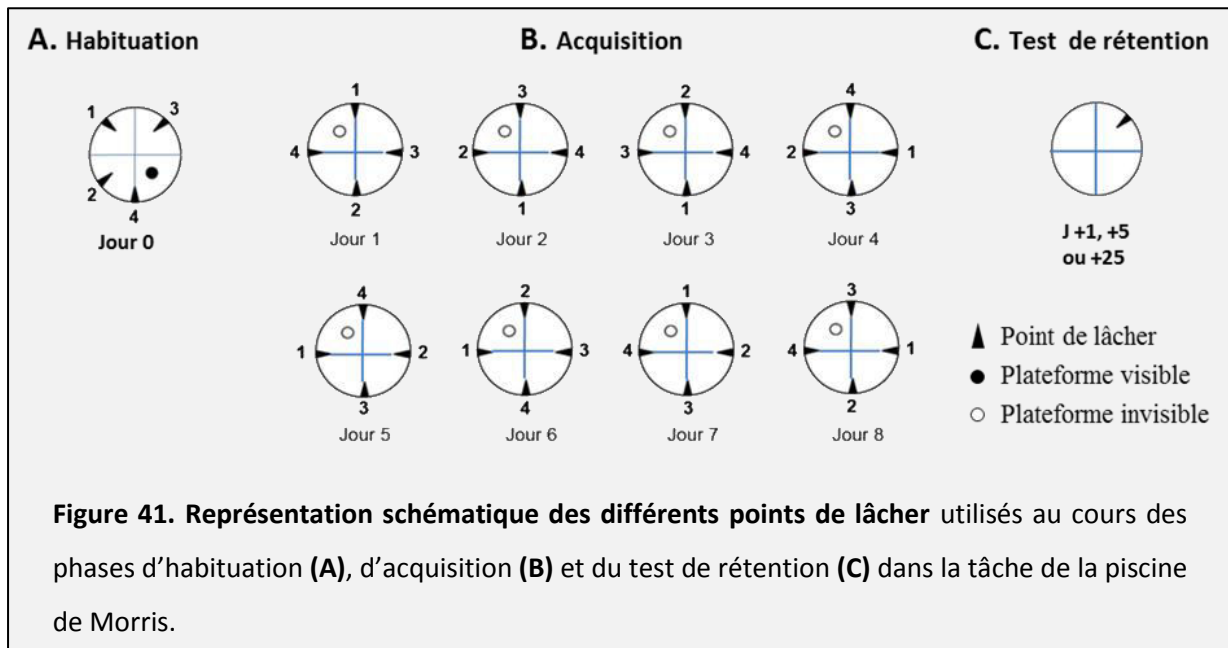


3.2.2. TACHE COMPORTEMENTALE

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

3.2.3. PHASE D'ACQUISITION

Le protocole utilisé a été identique pour toutes les expériences. Il se divise en deux parties : une phase d'habituation avec une plateforme visible et une phase d'acquisition de l'emplacement d'une plateforme cachée. Le premier jour constitue l'unique séance d'habituation à l'aide d'une plateforme visible à emplacement fixe. 4 essais consécutifs permettent à l'animal d'appréhender le dispositif et la tâche consistant à trouver l'unique échappatoire et à y grimper. Au cours de cette phase, la piscine est entourée d'un épais rideau empêchant l'accès aux indices distaux externes. La phase d'acquisition débute le deuxième jour et s'étale sur 8 jours à raison de 4 essais par jour. Il a été validé au laboratoire que dans nos conditions expérimentales, une durée de 8 jours d'acquisition permet une bonne rétention en mémoire ancienne (25 jours) chez des animaux opérés (Sham, lésés ou équipés de guide-canules). Chez des animaux non-opérés, 6 jours d'acquisition suffisent à obtenir de bonnes performances de rappel à 25 jours (Lopez et al. 2012). Pour l'acquisition, le rideau est enlevé et la plateforme est cachée sous la surface de l'eau à un emplacement fixe et différent de celui utilisé durant la phase d'habituation. Le rat est introduit dans la piscine face à la paroi à un point de départ différent pour chaque essai quotidien (4 points de départ distincts, voir Fig. 41). Il dispose alors de 60 secondes pour trouver la plateforme. S'il n'arrive pas à effectuer cette tâche dans le temps imparti, il est délicatement guidé vers la plateforme par l'expérimentateur, de manière à ce qu'il l'atteigne en nageant. Il y est alors laissé 10 secondes, puis récupéré dans l'attente de l'essai suivant ou pour rejoindre sa cage de stabulation. La latence, la distance d'accès à la plateforme, la vitesse de nage ainsi que le temps passé à proximité des parois du dispositif (thigmotaxie) sont systématiquement enregistrés à l'aide du logiciel Smart. Une diminution progressive de la thigmotaxie, de la latence et du temps d'accès à la plateforme au fil des jours et des essais indique une bonne acquisition de la tâche.



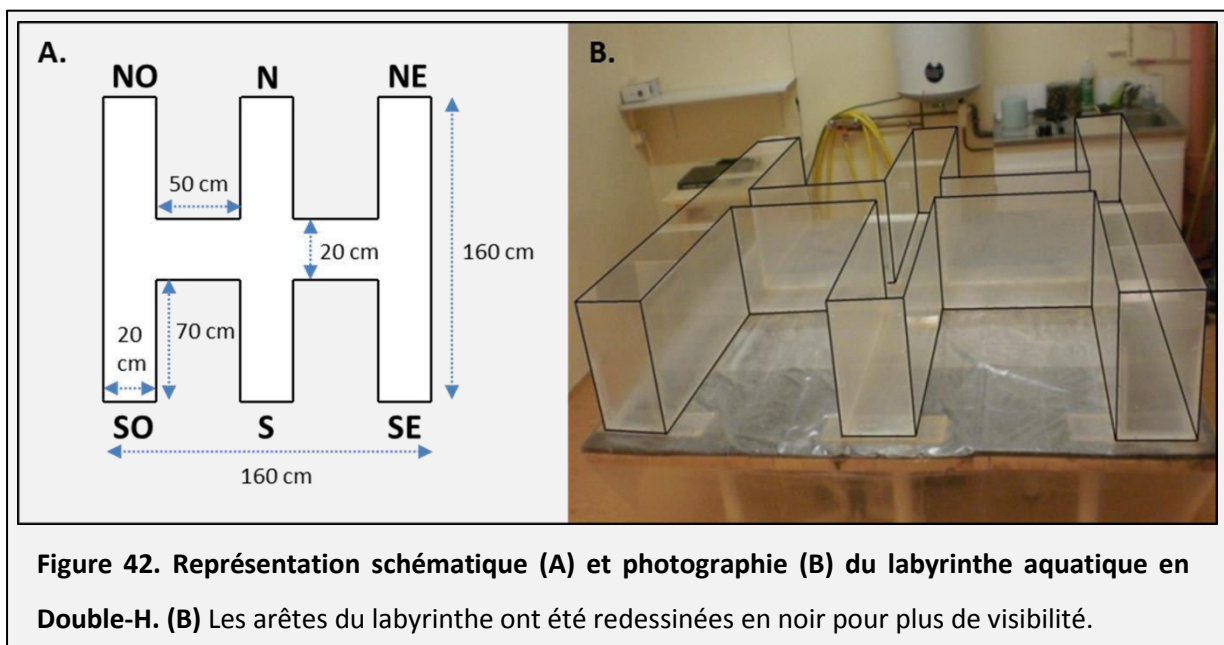
3.2.4. TEST DE RETENTION

La plateforme est retirée de la piscine, le reste du dispositif et de la pièce étant en tout point identique à la phase d'acquisition. Le test de rétention consiste en un unique essai de 60 secondes. Le rat est introduit dans le dispositif à un point de lâcher spécifique qui n'a jamais été utilisé auparavant (Fig. 41C). Le temps passé dans chaque quadrant est alors enregistré et exprimé sous la forme d'un pourcentage : un temps passé dans le quadrant cible significativement supérieur au hasard (25%) est synonyme d'une « préférence de place » pour ce quadrant, indiquant le rappel de l'emplacement de la plateforme. A l'inverse, des animaux incapables de rappeler l'emplacement de la plateforme se déplacent de manière erratique dans la piscine de Morris au cours du test de rétention, passant environ 25% du temps total de nage dans chacun des quadrants, sans exprimer de préférence de place. Le second paramètre enregistré est le nombre de croisements de la zone cible, à savoir un disque virtuel d'un diamètre de 31 cm (10 cm autour d'une plateforme de 11 cm, soit 750 cm² et 3,75% de la surface totale de la piscine de Morris) centré sur la plateforme et appelé annulus. Le nombre de passage de l'animal dans cette zone au cours du test de rétention est utilisé comme indice de la précision de la recherche de la plateforme au sein du quadrant cible.

3.3. LE DOUBLE-H

3.3.1. DISPOSITIF

Le labyrinthe aquatique du Double-H (DH) comporte une allée principale reliant trois allées parallèles entre elles et perpendiculaires à l'allée principale, ce qui lui donne, vu du dessus, la forme de deux H contigus (Fig. 42A). Toutes les allées ont la même longueur (160 cm), la même hauteur (35 cm) et la même largeur (20 cm) ; ce labyrinthe s'inscrit ainsi dans un carré d'une surface totale de 160 x 160 cm. Inventé au laboratoire par Jean-Christophe Cassel, il a été fabriqué en plexiglas transparent. Lors de son utilisation, le DH est rempli sur une hauteur de 17 cm avec environ 170 litres d'eau à 21°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) opacifiée par l'ajout de 250 g de lait en poudre. Une plateforme circulaire de 11 cm de diamètre et de 15 cm de hauteur représente la seule issue et l'emplacement à atteindre pour les animaux. Par convention, les branches centrales sont appelées Sud (S) et Nord (N). Les quatre branches latérales sont désignées par leur emplacement vis-à-vis des deux branches centrales : Nord-Ouest (NO), Nord-Est (NE), Sud-Est (SE) et Sud-Ouest (SO). Le dispositif est installé dans une pièce dédiée comportant des indices distaux fixes (évier, chauffe-eau, formes géométriques aux murs etc., Fig. 42B).



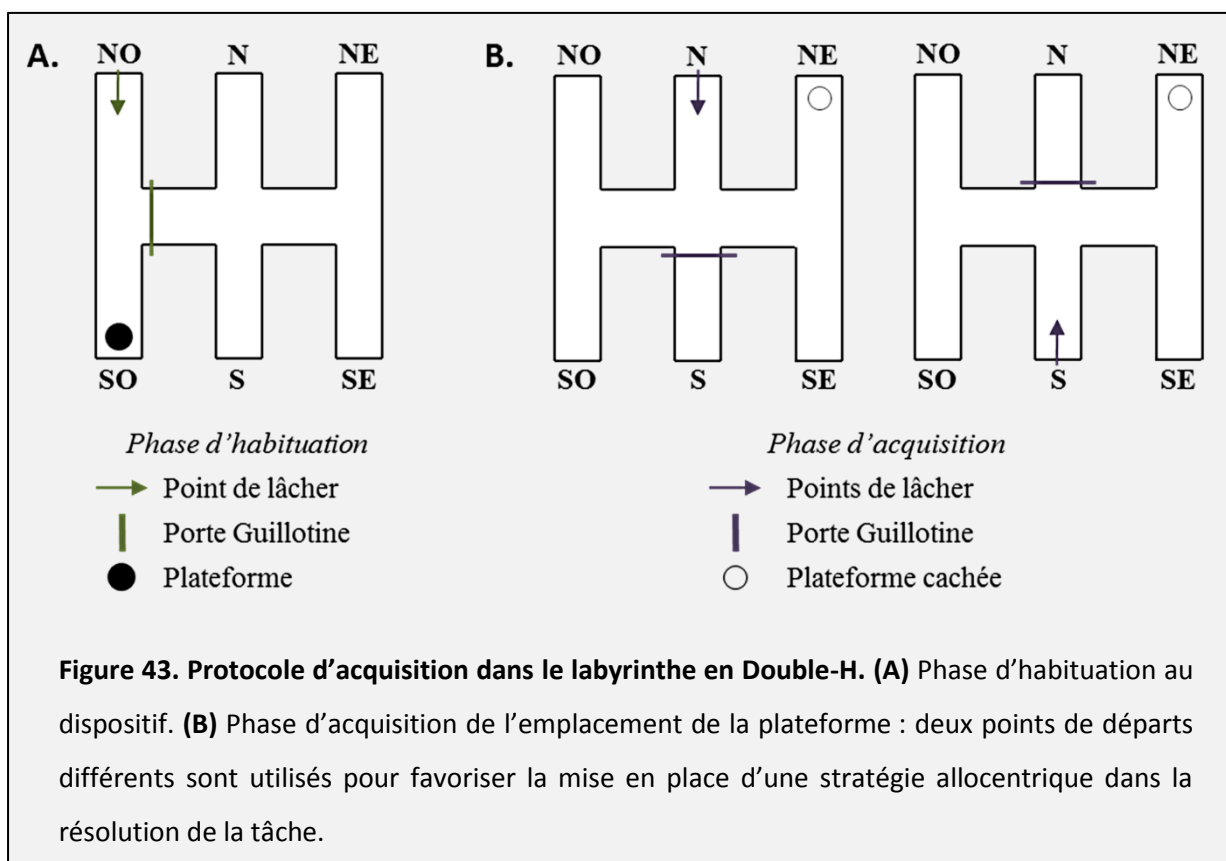
3.3.2. TACHE COMPORTEMENTALE

Tout comme la piscine de Morris, le DH est un labyrinthe aquatique plaçant l'animal dans une situation aversive (eau « fraîche ») dont il va chercher à se soustraire. L'intérêt de ce test par rapport à la piscine consiste dans le fait qu'il va permettre, en fonction du protocole d'acquisition utilisé, d'évaluer les capacités de rongeurs en termes de mémoire spatiale et/ou de mémoire procédurale (Pol-Bodetto et al. 2011, Cassel et al. 2012). En effet, la forme spécifique du DH implique la présence d'embranchements qui vont forcer l'animal à faire un choix de trajectoire aux trois intersections, contrairement à la piscine qui, en tant qu'espace circulaire ouvert, est beaucoup moins restrictive en ce qui concerne les options de déplacement. Ce test est également approprié pour évaluer la capacité d'un animal à faire preuve de flexibilité comportementale, i.e. la capacité à adapter son comportement en fonction des changements de l'environnement (publication 2). Tout comme dans la piscine de Morris, la tâche consiste à apprendre la localisation d'une plateforme immergée sous la surface de l'eau. Mais ce dispositif offre l'avantage de permettre de favoriser la mise en place par l'animal d'une stratégie allocentrique (basée sur l'utilisation des indices visuels externes au dispositif pour se repérer) ou égocentrique (basée sur les informations proprioceptives internes) en fonction du protocole mis en œuvre : si le point d'introduction dans le dispositif change d'un essai à l'autre, mais que l'emplacement de la plateforme est fixe, la stratégie allocentrique est la plus efficace. Si au contraire, l'animal est toujours introduit dans le DH au même endroit (par exemple la branche S), et que la plateforme se situe toujours au même emplacement (par exemple à l'extrémité de la branche NE), la répétition de la tâche favorise rapidement l'utilisation d'une séquence motrice optimale (en l'occurrence, sortir de la branche S, tourner à droite, avancer, tourner à gauche, atteindre la plateforme à l'extrémité de la branche NE), et par là même, la mise en place d'une stratégie égocentrique (Fig. 44).

3.3.3. PHASE D'ACQUISITION

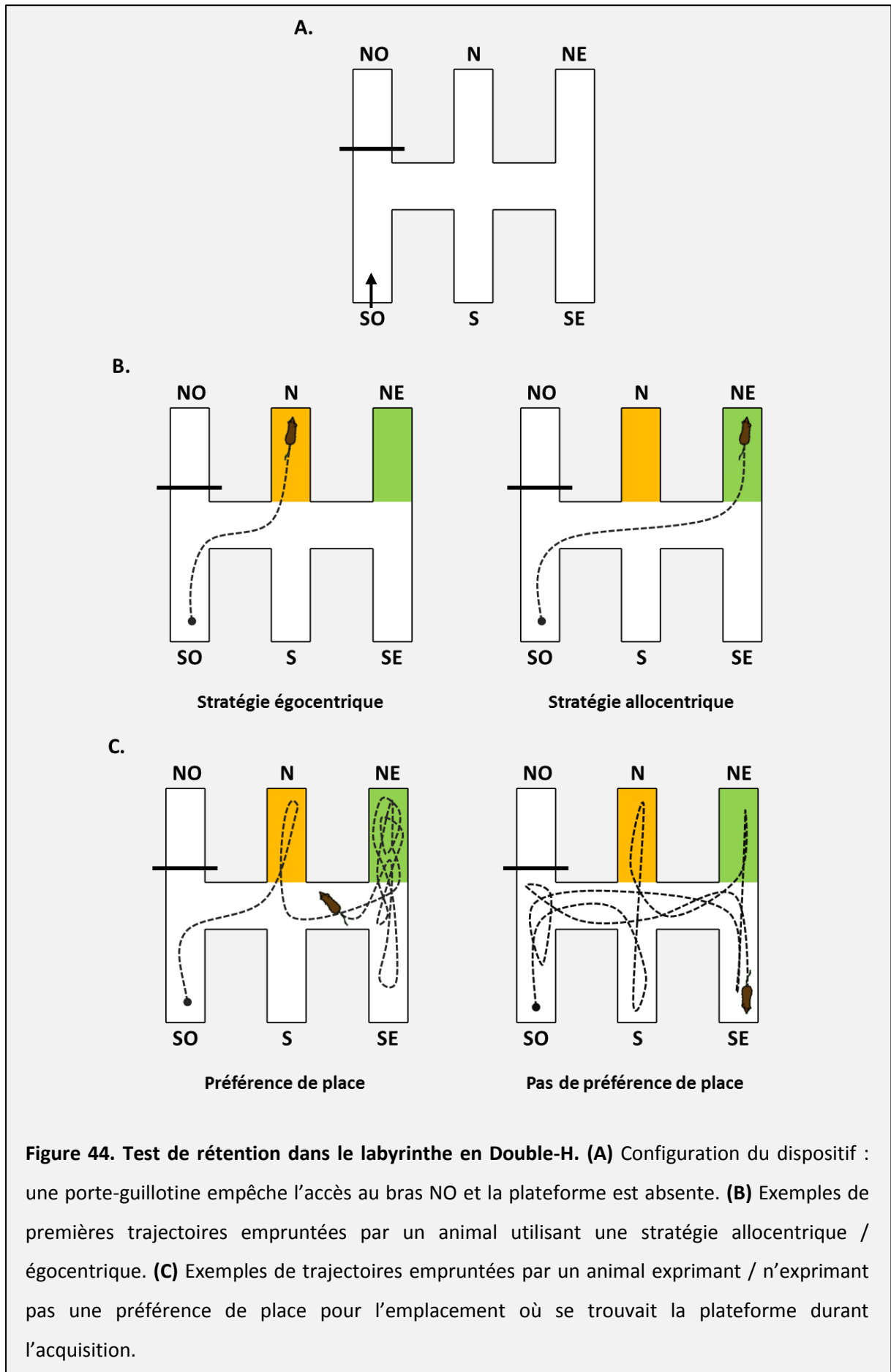
Dans la publication 2, le protocole mis en œuvre dans le DH avait pour objectif de favoriser la mise en place d'une stratégie allocentrique. Tout comme dans la piscine de Morris, le premier jour vise à permettre à l'animal de se familiariser avec le dispositif au cours d'une session de 4 essais consécutifs. Au cours de cette phase d'habituation, la plateforme est visible car l'eau n'est pas opacifiée, et seules les branches NO et SO sont accessibles, une

porte-guillotine bloquant l'accès au reste du DH. L'animal est alors introduit à l'extrémité de la branche NO et doit rejoindre la plateforme située à l'extrémité de la branche opposée (SO). La phase d'acquisition débute le deuxième jour et s'étale sur 4 jours à raison de 4 essais par jour. L'eau est alors opacifiée à l'aide de lait en poudre pour dissimuler la plateforme placée à l'extrémité de la branche NE. Pour favoriser la mise en place d'une stratégie allocentrique, deux points de départ différents sont utilisés : l'extrémité de la branche S ou celle de la branche N. L'accès à la branche faisant face à la branche de départ de l'animal est condamné à l'aide d'une porte-guillotine (Fig. 43). L'ordre des points de départ est pseudo-randomisé d'une session à l'autre (4 sessions : NSSN, SNSN, SNNS, NSNS). Comme dans le test de la piscine de Morris, chaque essai avait une durée maximale de 60 secondes, et le rat est laissé sur la plateforme 10 secondes avant d'être délicatement récupéré pour débiter le prochain essai ou rejoindre sa cage.



3.3.4. TEST DE RETENTION

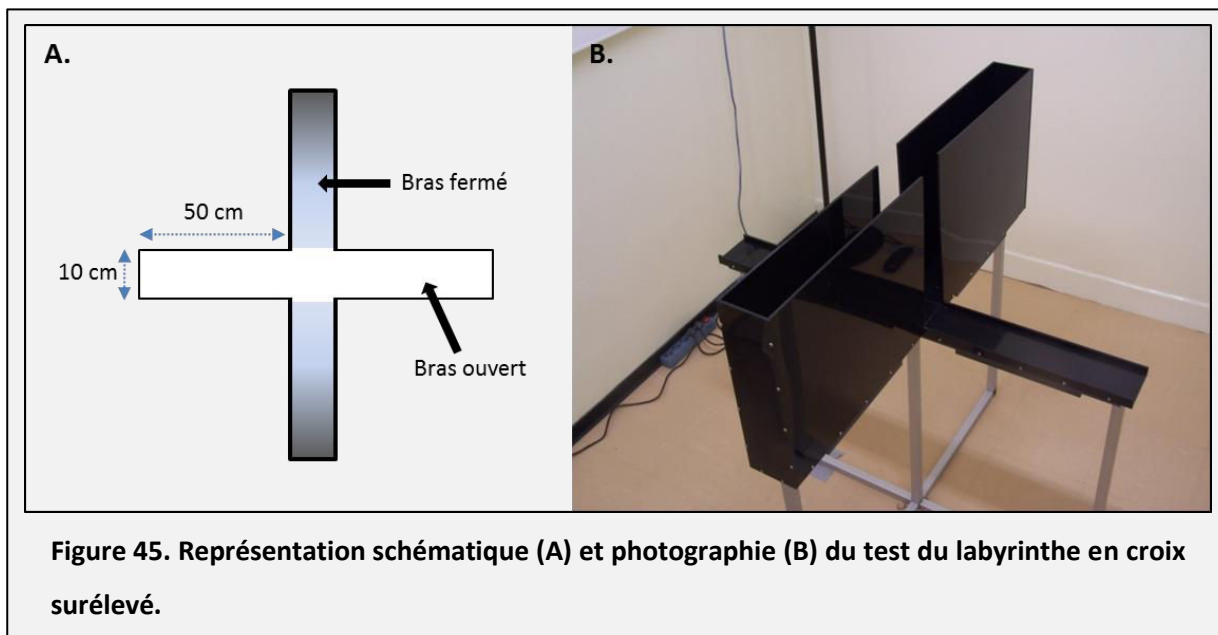
Le test de rappel de l'emplacement de la plateforme a été réalisé 24 h après la fin de l'acquisition. La plateforme est retirée et les rats sont introduits dans le dispositif à l'extrémité du bras SO pour un unique essai de 60 sec. Le point de départ subit donc une translation dans l'espace, passant du bras S durant l'acquisition au bras SO durant le test de rappel, et comme au cours de la phase d'acquisition, le bras faisant face au bras de départ est fermé par une porte-guillotine. Le point d'introduction de l'animal différant entre l'acquisition et le test de rétention, c'est l'accès au bras NO qui est condamné durant la session de test (Fig. 44). Cette procédure a pour but de mettre en évidence la stratégie utilisée en première intention par l'animal : un rat se rendant directement dans le bras N lors du test de rétention aura reproduit la séquence motrice le guidant vers la plateforme lors de l'acquisition depuis le bras S (avancer – tourner à droite – avancer – tourner à gauche – avancer jusqu'à la plateforme). La stratégie utilisée est dite égocentrique. Si au contraire, le rat se rend immédiatement dans le bras NE (qui contenait la plateforme durant l'acquisition), il utilise une stratégie allocentrique lui permettant de naviguer dans l'environnement en fonction des indices externes et n'est pas « leurré » par la modification du point de départ qui caractérise le test de rétention. Les variables mesurées dans ce test sont la première et la seconde branche dans lesquelles entre l'animal ; les latences d'accès à l'emplacement où se trouvait la plateforme durant l'acquisition (extrémité du bras NE) et à l'extrémité du bras N ; le temps passé et le nombre d'entrées dans chacun des bras et dans l'espace central.



3.4. LE LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE

3.4.1. DISPOSITIF

Ce labyrinthe en plexiglas noir est construit en forme de croix avec 2 bras ouverts et 2 bras fermés, le tout surélevé 73 cm au-dessus du sol. L'espace central de 10 x 10 cm relie les quatre bras d'une longueur de 50 cm et d'une largeur de 10 cm. Les bras fermés (Nord (N) et Sud (S)) sont entourés d'une paroi opaque et rigide de 40 cm de haut, les bras ouverts (Est (E) et Ouest (O)) d'un petit rebord de 1,5 cm de hauteur (Fig. 45). Le test est situé dans une pièce close sans fenêtre ni lumière extérieure ; l'éclairage est réglable de manière précise grâce à quatre lampes halogènes installées aux quatre coins de la pièce. Lors de la mise en œuvre du test, l'intensité lumineuse est précisément ajustée à l'aide d'un luxmètre pour que celle-ci soit de 10 lux au niveau des bras ouverts, 5 lux au sein des bras fermés et 7,5 lux sur la plateforme centrale du labyrinthe. Une caméra placée à la verticale au-dessus du dispositif et reliée à un ordinateur autorise la visualisation en temps réel des comportements des animaux sans interférer avec le déroulement du test. Le logiciel associé permet à l'expérimentateur de comptabiliser le nombre d'entrées dans chaque partie du labyrinthe et calcule le temps passé par l'animal dans chaque bras.



3.4.2. TACHE COMPORTEMENTALE

Le test du labyrinthe en croix surélevé exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement. Les bras fermés représentent la sécurité et limitent la prise de risque ; les bras ouverts sont un espace à haute valeur exploratoire, mais plus anxiogène. Ce labyrinthe est ainsi couramment utilisé pour évaluer le niveau d'anxiété d'un animal ou l'effet anxiolytique / anxiogène d'une substance ou d'un traitement (e.g. Cosquer et al. 2005 ; Walf et Frye, 2007). Ce test permet également d'évaluer superficiellement l'activité locomotrice en réponse à une situation nouvelle en se basant sur le nombre total d'entrées dans les différents bras.

3.4.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

L'animal est placé dans la pièce d'expérimentation 5 min avant le début du test. Puis celui-ci débute en plaçant le rat sur la plateforme centrale du labyrinthe, sa tête orientée vers le bras Nord. L'animal peut alors explorer librement le dispositif pendant 5 min. L'expérimentateur rejoint alors le poste informatique dissimulé à l'autre bout de la pièce. Le nombre d'entrées dans chaque bras (N, E, S, O) et sur la plateforme centrale, le temps passé dans chaque zone et le nombre de défécations (indice d'anxiété) sont comptabilisés. Après le passage d'un animal dans le labyrinthe, celui-ci est soigneusement nettoyé à l'alcool absolu de manière à réduire et uniformiser les informations olfactives laissées par les rats précédents.

3.5. LE CHAMP OUVERT

3.5.1. DISPOSITIF

Le champ ouvert est un espace carré de 65 x 65 cm délimité par quatre parois verticales en bois de 43,5 cm de hauteur. Cette surface est divisée en 25 carreaux de taille égale dont les limites sont tracées en noir sur fond bleu (Fig. 46). Lors de la mise en œuvre du test, l'intensité lumineuse est ajustée pour atteindre 50 lux au centre du dispositif.

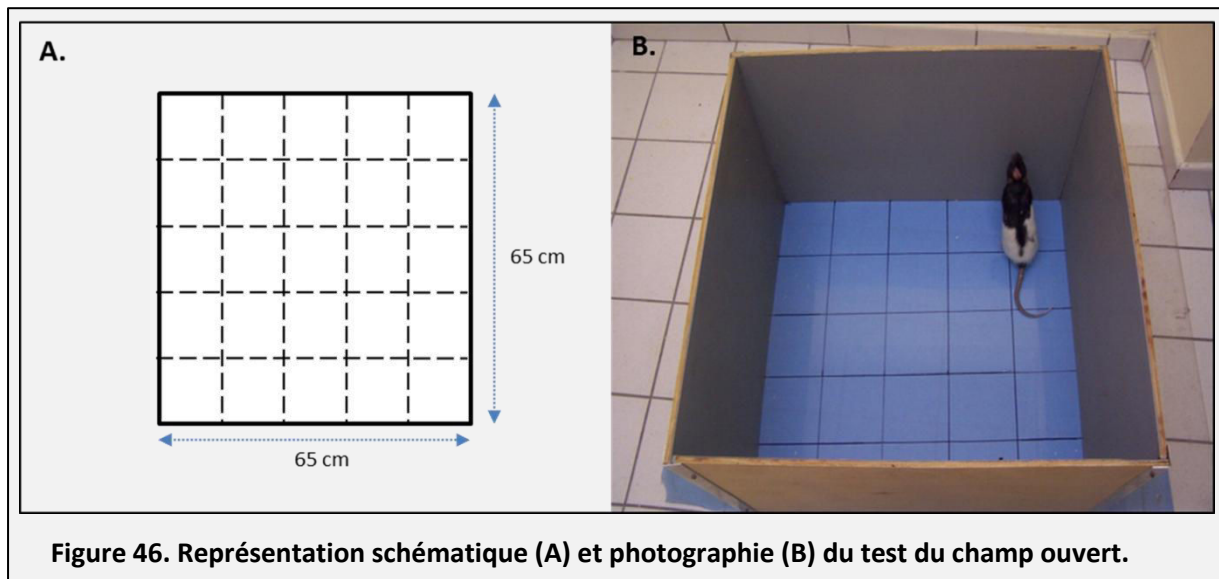


Figure 46. Représentation schématique (A) et photographie (B) du test du champ ouvert.

3.5.2. TACHE COMPORTEMENTALE

Le test du champ ouvert permet de mesurer les déplacements de l'animal et les comportements associés à l'exploration d'un nouvel environnement. Ces comportements sont induits par le simple fait de placer l'animal dans un environnement ouvert et nouveau (Walsh et Cummins, 1976). Ce test est couramment utilisé pour évaluer le niveau d'activité locomotrice d'une souche de rongeur ou l'effet d'une substance. Le nombre de carreaux traversés, de redressements et d'arrêts comportementaux indique le niveau général d'activité locomotrice de l'animal et permet de mesurer sa capacité d'adaptation à une situation nouvelle (Walsh et Cummins, 1976 ; Milot et Plamondon, 2008).

3.5.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

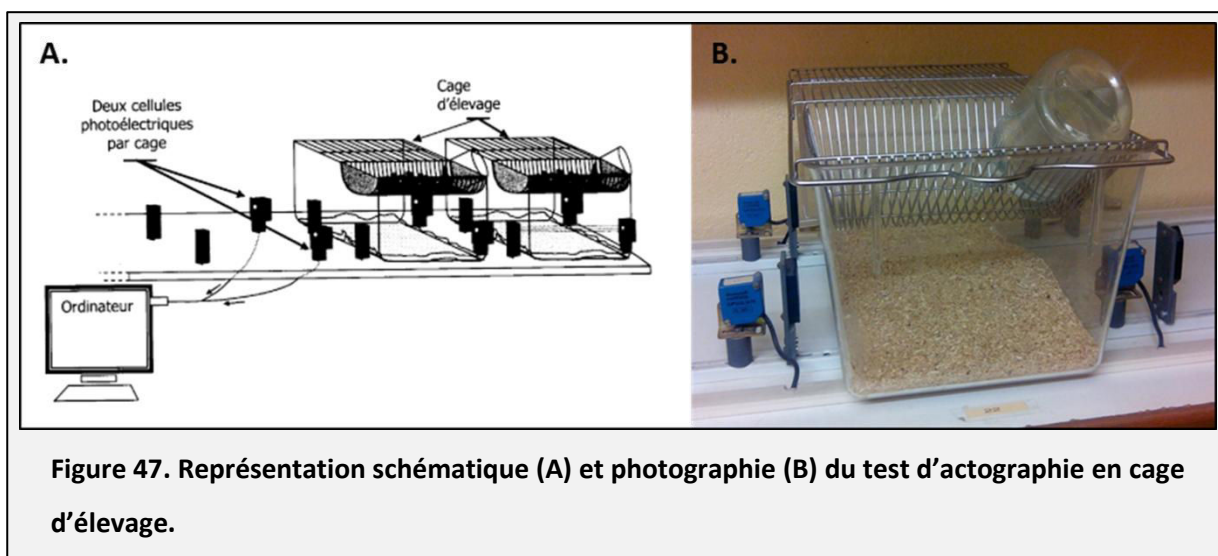
Le test d'une durée de 10 min débute par l'introduction de l'animal dans le champ ouvert. Celui-ci est placé dans le coin supérieur gauche du dispositif, la tête orientée face aux murs. L'animal est alors libre d'explorer le test. Un expérimentateur est installé à une distance d'un mètre cinquante du champ ouvert, et assis sur une chaise, prend note du trajet, des redressements, des défécations et des arrêts comportementaux de l'animal. Le test d'une durée de 10 min est divisé en périodes de 2 min. En comptabilisant ensuite le nombre de carrés traversés, cette méthode permet une estimation de l'activité locomotrice dans un environnement nouveau. Le nombre de redressements est un indice supplémentaire de la tendance à l'exploration. Le nombre de défécations est associé à l'aspect anxiogène d'une situation nouvelle. Après le passage d'un animal dans le champ ouvert, celui-ci est

soigneusement nettoyé à l'alcool absolu de manière à réduire et uniformiser les informations olfactives laissées par les rats précédents.

3.6. L'ACTOGRAPHIE EN CAGE D'ELEVAGE

3.6.1. DISPOSITIF

Ce test permet l'enregistrement sur une longue durée de l'activité locomotrice spontanée de l'animal dans sa cage d'élevage. Contrairement au test du champ ouvert, l'animal est ici dans un environnement familier. Ce test est ainsi particulièrement adapté à l'étude des effets durables d'un traitement pharmacologique, ou dans notre cas, d'une lésion intracérébrale. Il complète également les résultats obtenus dans le test du champ ouvert au sujet de l'activité locomotrice lors de l'exploration d'un nouvel environnement. L'enregistrement de l'activité de l'animal dans sa cage d'élevage est possible grâce à des cellules photoélectriques situées de part et d'autre de la cage et qui émettent un faisceau infrarouge. En l'absence de l'animal, ce signal est renvoyé vers la cellule émettrice par un réflecteur situé de l'autre côté de la cage, et réceptionné par un capteur *ad hoc*. Si l'animal bouge et traverse sa cage, la rupture du faisceau permet de déduire l'activité locomotrice de l'animal. Deux cellules photoélectriques et deux réflecteurs équipent chaque cage pour ce test. Ces éléments sont placés de telle manière que les faisceaux sont situés à 4,5 cm du sol et 4 cm de chaque extrémité de la cage, et la distance entre les deux faisceaux infrarouges parallèles est de 28 cm (Fig. 47).



3.6.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les cellules photoélectriques sont reliées à un ordinateur chargé de compiler les résultats selon la règle suivante : pour qu'une unité d'activité locomotrice soit comptée, l'animal doit interrompre les deux faisceaux successivement. L'animal ainsi que sa cage d'élevage sont donc placés dans la pièce contenant le dispositif d'actographie pour une durée de 24 h. L'activité comportementale est enregistrée à une fréquence d'échantillonnage de 10 min, puis analysée heure par heure.

4. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES

Les techniques histologiques et immunohistochimiques mises en œuvre sur le tissu cérébral de nos animaux visaient à i) vérifier l'emplacement des canules et des sites d'instillation lors de protocoles d'inactivation intracérébrale grâce à la coloration au violet de crésyl, ii) estimer avec précision la localisation et l'étendue de l'inactivation à l'aide de Bleu Evans et de muscimol fluorescent, iii) estimer avec précision la localisation et l'étendue d'une lésion des noyaux ReRh à l'aide du marquage immunohistochimique de la protéine NeuN, et iv) évaluer l'activité neuronale induite lors du rappel d'une mémoire spatiale récente ou ancienne par l'immunomarquage de la protéine c-Fos.

4.1. MISE A MORT DES ANIMAUX ET PRELEVEMENT DES CERVEAUX

A la fin des tests comportementaux, les rats sont euthanasiés à l'aide d'une injection létale de pentobarbital sodique (200 mg/kg, i.p). Puis une perfusion intracardiaque de 60 mL de paraformaldéhyde (4%) dissout dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) à 4°C permet de fixer les tissus cérébraux. Les cerveaux sont ensuite extraits de la boîte crânienne et placés dans ce même fixateur à 4°C pendant 2h, puis transférés dans une solution cryoprotectrice (saccharose à 20% et à 4°C) pour 48h. Une fois ce délai écoulé, les cerveaux sont congelés dans de l'isopentane à -40°C puis conservés au congélateur à -80°C.

4.2. CRYOSTAT : COUPES CORONALES

Des coupes coronales d'une épaisseur de 40 µm ont systématiquement été réalisées grâce à un cryostat (Frigocut 2800), mais la procédure de récupération des coupes diffère en fonction des besoins de l'expérience en cours et de leur traitement ultérieur. Lors des expériences d'inactivation, les coupes sont récupérées sur des lames gélatinées, puis

séchées à température ambiante. Une moitié des coupes est alors observée sous un microscope à fluorescence, de manière à observer le bleu Evans (Publication 1) ou le MSCI fluorescent (Publication 2) instillé avant l'euthanasie. L'autre moitié est colorée au violet de crésyl pour observer les sites d'implantation des canules. Dans la publication 3, le protocole devait permettre l'observation de la diffusion du MSCI fluorescent instillé 30 min avant l'euthanasie, mais également l'expression des gènes précoces, relative à l'activité neuronale au cours du test de rétention en piscine de Morris. Pour ce faire, des coupes coronales « flottantes » ont été coupées au sein de blocs de tissu s'étendant de -2.28 mm à -4.20 mm par rapport au Bregma pour le dHip et de +4.00 à +2.52 pour le mPFC (Paxinos et Watson, 2007). Une coupe sur six est ensuite dédiée à l'immunohistochimie de la protéine c-Fos, la suivante au marquage au violet de crésyl et une troisième à l'observation directe du MSCI fluorescent.

4.3. COLORATION AU VIOLET DE CRESYL

La coloration au violet de Crésyl est couramment utilisée en laboratoire pour marquer les composés acides des cellules, et en particulier les noyaux. Elle permet de mettre en évidence les limites neuroanatomiques des régions cérébrales, facilitant la localisation des zones d'intérêt sur les coupes. Elle offre l'avantage d'être rapide et économique à l'usage. Après rinçage à l'eau distillée, les coupes sont placées dans une solution de violet de crésyl (Sigma, Saint-Louis, USA), d'eau distillée, d'acétate de sodium et d'acide acétique chauffée à 50°C, puis rincées à l'eau distillée avant d'être décolorées dans une solution d'alcool-acide, déshydratées dans des bains d'alcool successifs de concentration croissante, et enfin plongées dans un bain de solvant (LMR). Les lames sont ensuite montées sous des lamelles dans le milieu d'inclusion *ad hoc* (Eukitt) et observées au microscope optique.

4.4. EVALUATION DE LA DIFFUSION DE LA LIDOCAÏNE ET DU MUSCIMOL

4.4.1. DE LA NECESSITE D'EVALUER LA DIFFUSION DES COMPOSES INSTILLES

Lors de la mise en œuvre de protocoles visant à inactiver une région cérébrale par instillation intracrânienne, l'impossibilité d'évaluer en temps réel la localisation mais surtout l'étendue de la diffusion des composés pharmacologiques instillés constitue l'une des limites majeures de cette technique. Il est effectivement essentiel de s'assurer que les agents utilisés pour inactiver une région donnée ne voient pas leurs effets s'étendre bien au-

delà de celle-ci, auquel cas l'interprétation des données peut s'avérer hasardeuse. Etant dans l'impossibilité d'observer *in situ* la diffusion des solutions de LIDO, MSCI et PBS dans le parenchyme lors des instillations précédant le test de rétention, nous avons utilisé une méthode indirecte reproduisant ultérieurement cette instillation à l'aide d'un composé coloré et visualisable sur les coupes coronales. Dans la publication 1, nous avons mis en œuvre une instillation intracérébrale d'une solution de Bleu Evans (Merck, Darmstadt, Allemagne) contenant soit de la LIDO soit du PBS. Le choix du Bleu Evans a été dicté par ses capacités colorantes élevées, sa fluorescence naturelle (excité à une longueur d'onde de 355 nm, il émet une lumière rouge) ainsi que sa nature lipophile qui, malgré un poids moléculaire important, permet à ce colorant une bonne diffusion dans le parenchyme. La diffusion du MSCI a également été évaluée par l'injection de MSCI fluorescent, c'est-à-dire une solution contenant du MSCI couplé à un fluorochrome (Bodipy, Invitrogen, USA, réf. M23400). De par la présence du fluorochrome, le poids moléculaire du MSCI fluorescent est de 607.46 g/mol, celui du muscimol étant de seulement 114,10 g/mol. De plus l'encombrement stérique inhérent au fluorochrome modifie probablement les propriétés de diffusion de ce composé en comparaison du muscimol standard. Cette méthode est néanmoins la plus adaptée que nous ayons pu mettre en œuvre et offre la possibilité de visualiser facilement la diffusion à l'aide d'un microscope à fluorescence.

4.4.2. PROTOCOLE

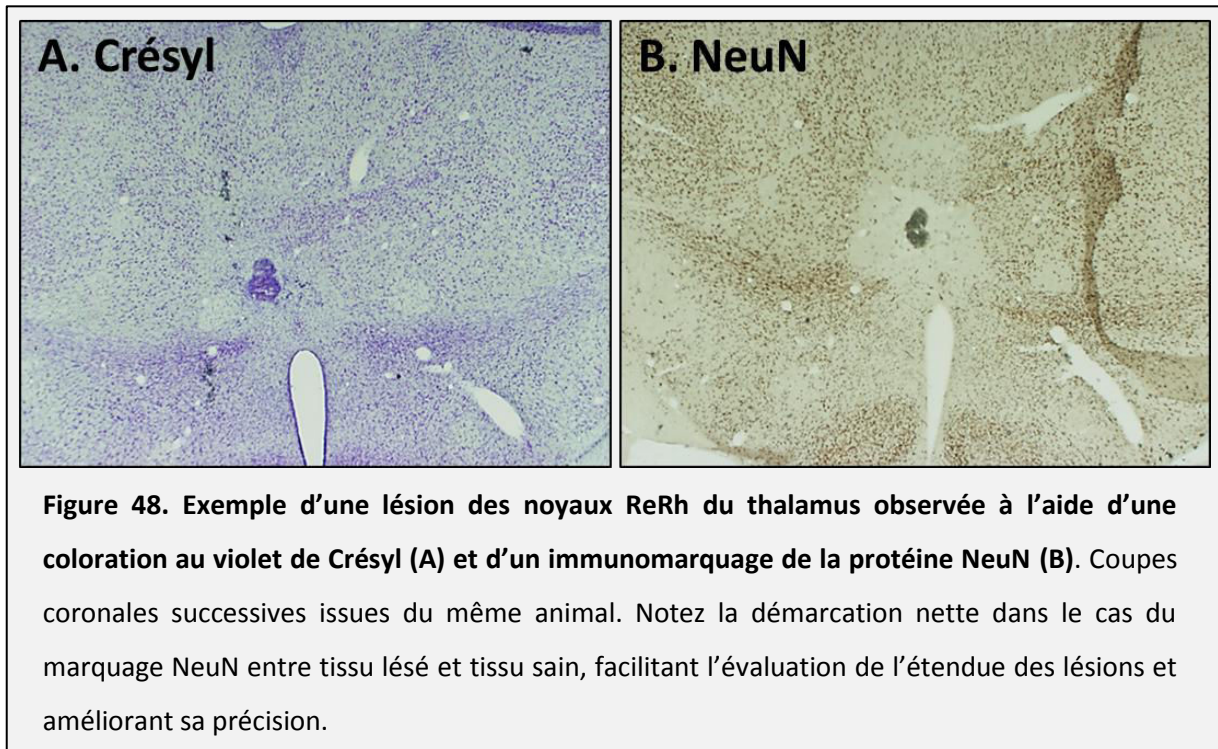
Le protocole d'instillation des solutions contenant des substances fluorescentes (Bleu Evans et MSCI fluorescent) est strictement le même que celui utilisé lors de l'instillation de LIDO ou MSCI au cours des évaluations comportementales. Les rats sont ensuite euthanasiés 10 min (LIDO) ou 30 min (MSCI) après l'instillation de la substance. La procédure est en tout point similaire à celle décrite dans la section 4.1 relative à la mise à mort des animaux et au prélèvement de leurs cerveaux.

4.5. EVALUATION DE L'ÉTENDUE DES LÉSIONS DES NOYAUX ReRH DU THALAMUS : IMMUNOHISTOCHEMIE DE LA PROTEINE NeuN

4.5.1. PRINCIPE

Le marquage de la protéine NeuN a été utilisé dans toutes nos expériences nécessitant d'évaluer l'étendue de lésions des noyaux ReRh à la suite de l'instillation de NMDA. Le

NMDA en forte concentration est excitotoxique, provoquant la mort des neurones, et par voie de fait une absence du marquage neuronal de la protéine NeuN dans la zone lésée. La coloration au violet de Crésyl décrite précédemment ne permet pas une évaluation précise de l'étendue d'une lésion cérébrale : les limites de la lésion sont mal définies et peu contrastées. Le marquage de la protéine NeuN, biomarqueur permettant de mettre en évidence les neurones, donne des résultats plus précis et adaptés à nos besoins (Fig. 48).



4.5.2. PROTOCOLE IMMUNOHISTOCHEMIQUE

Pour chaque rat, un tiers des coupes coronales au niveau antéro-postérieur correspondant aux noyaux ReRh du thalamus est prélevé pour l'immunohistochimie NeuN et placé dans les puits d'une plaque de microtitration avec 250 μ L de PBS (un puits par animal). Toutes les étapes suivantes sont réalisées sous agitation lente, à température ambiante et à volume constant (250 μ L/puits). Les coupes flottantes sont d'abord rincées trois fois au PBS pendant 10 minutes. Puis les sites antigéniques aspécifiques sont saturés durant 1 h à l'aide de sérum d'âne (Abcys, S2170-100) dilué à 5% dans du PBS contenant 0,5% de Triton X-100 (PBST). Le Triton X-100 est un détergent de synthèse qui perméabilise les membranes et permet donc une meilleure pénétration des réactifs ultérieurs. Les coupes sont ensuite incubées une nuit avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine NeuN (Millipore, France, réf. MAB377), dilué au 1/2000^{ème} dans du PBST. Le lendemain, les coupes sont rincées trois fois à l'aide de

PBS, puis incubées 1 h avec l'anticorps secondaire (Vector Laboratories International, Burlingame, CA, USA) dilué au 1/500^{ème} dans du PBST. Les coupes sont ensuite à nouveau rincées trois fois dans du PBS, avant d'être incubées à l'obscurité et durant 45 min avec le complexe avidine-biotine-peroxydase (Kit ABC Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA) dilué au 1/500^{ème}. Après deux rinçages au PBS et un rinçage dans du tampon TRIS (0,6%, pH 7.6), le marquage est révélé à l'aide de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, ou DAB (Kit DAB, SK 4100, Vector Laboratories). La réaction est ensuite neutralisée 8 minutes plus tard par le rinçage des coupes dans du PBS. Après trois rinçages de 10 min, les coupes sont prêtes à être montées sur des lames gélatinées avant d'être mises à sécher à l'étuve (37°C) pour 24 h. Le lendemain, la dernière étape du protocole consiste à protéger les coupes en les incluant dans un milieu de montage entre lame et lamelle. Les lames sont rincées dans de l'eau ultra pure, puis déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante (70%, 95%, 100%), et enfin placées dans le solvant Clearify (ClearifyUS, Houston, USA) avant d'être incluses entre lame et lamelle dans un milieu d'inclusion (Diamount).

4.5.3. ESTIMATION DE L'ÉTENDUE DES LÉSIONS

Afin d'estimer l'étendue des lésions, celles-ci sont reproduites sur des planches neuroanatomiques en utilisant les plans adéquats d'un atlas stéréotaxique (Paxinos et Watson, 2007). Puis à l'aide d'une tablette graphique reliée à un ordinateur, l'étendue de la lésion est estimée dans son ensemble, puis pour chaque noyau thalamique, de manière à évaluer le pourcentage de lésion relatif aux noyaux Re, Rh, mais également à tous les noyaux adjacents. Cette méthode permet de rendre compte de la réussite de la lésion : un haut pourcentage (>50% au minimum) de lésion des noyaux ReRh est impératif, tout comme une faible altération des noyaux thalamiques adjacents. Il est ainsi possible de chiffrer l'étendue et la précision de nos lésions et de ne prendre en considération que les animaux dont la lésion est à la fois suffisamment étendue et spécifique, et ce sur la base de critères objectifs.

4.6. EVALUATION DE L'ACTIVITE NEURONALE : IMMUNOHISTOCHIMIE DE LA PROTEINE C-FOS

4.6.1. PRINCIPE

La stimulation d'une cellule induit la transcription de gènes d'expression précoce de façon rapide et transitoire ; ces gènes sont impliqués dans les mécanismes de plasticité à long terme par lesquels une information brève inhérente à la neurotransmission est intégrée au

niveau cellulaire. Ces protéines sont à leur tour impliquées dans la plasticité synaptique (Bussolino et al. 2001 ; Guzowski et al. 2001 ; Teather et al. 2005). La quantification de l'expression de protéines synthétisées à partir des ARNm de gènes précoces tels que *c-fos*, *zif268* ou *arc*, est couramment utilisée pour évaluer l'activité neuronale au sein d'une ou plusieurs structures cérébrales (rev. Barry et Commins, 2011). Une activité neuronale telle que la liaison d'un neurotransmetteur sur son récepteur ou un potentiel d'action déclenche une cascade d'évènements intracellulaires. Celle-ci implique des seconds messagers, comme l'ion calcium, et l'activation de protéines kinases telles que PKA, CaMK, MAPK et PKC, ce qui mène à la phosphorylation de CREB (*cAMP Response-Binding Protein*), puis à la transcription des gènes précoces, et enfin à la traduction des protéines correspondantes (Fig. 49).

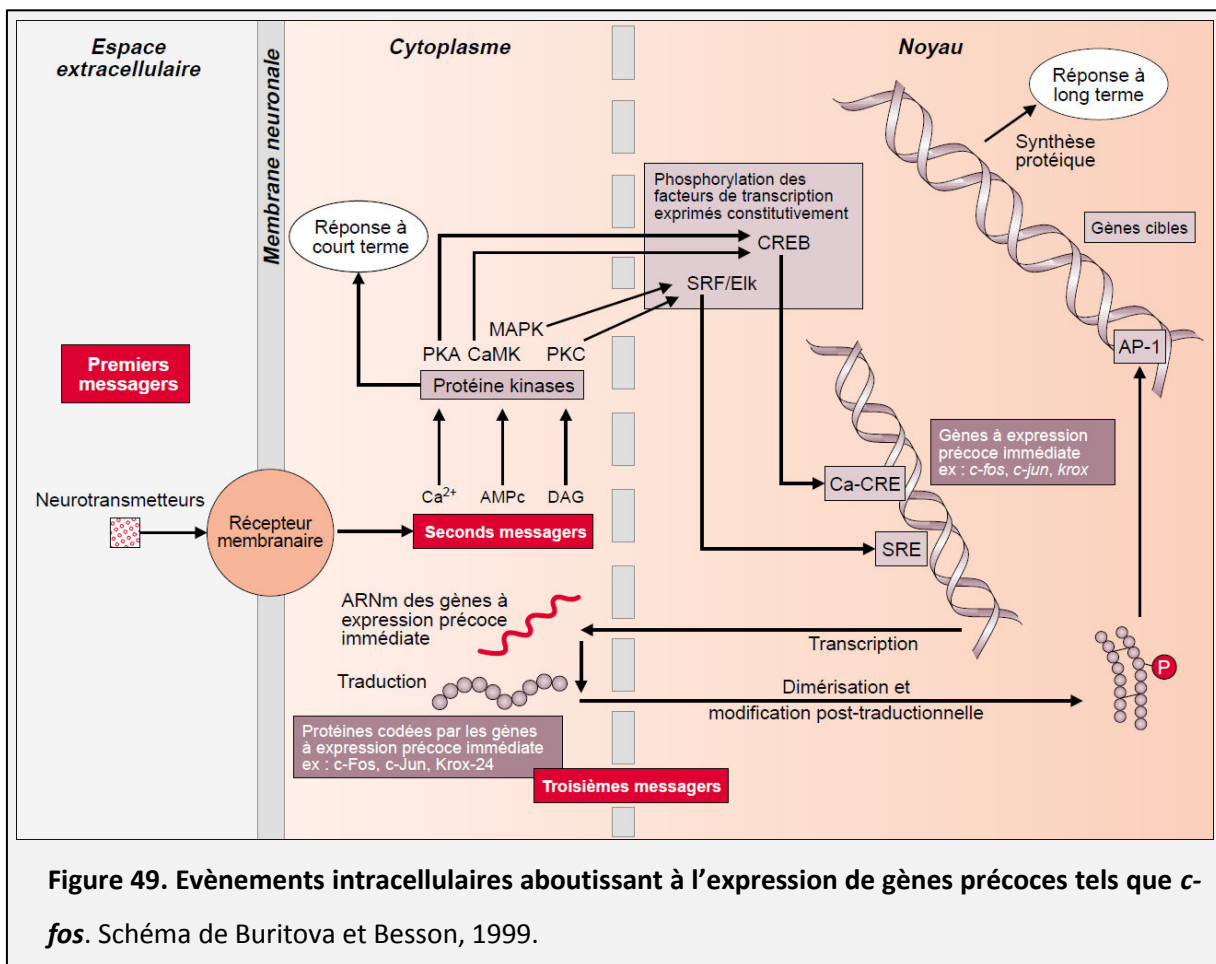


Figure 49. Evènements intracellulaires aboutissant à l'expression de gènes précoces tels que *c-fos*. Schéma de Buritova et Besson, 1999.

L'avantage de *c-fos* par rapport à d'autres gènes précoces réside dans le fait que le niveau basal d'expression de cette protéine est très faible ; c'est ainsi un indicateur fiable de l'activation des structures cérébrales étudiées. La protéine *c-Fos* n'est pas détectable de façon instantanée du fait du décalage entre la sollicitation neuronale et leur synthèse : 90 minutes sont nécessaires à la mise en œuvre des cascades intracellulaires aboutissant à

l'expression de l'ARN messenger et *in fine* à l'expression des protéines. Ce délai est un avantage majeur de cette technique : en prélevant le cerveau des animaux 90 min après la tâche mnésique testée, elle permet de visualiser post-mortem l'activité cérébrale ayant eu lieu au cours de celle-ci. De plus cette approche permet d'étudier plusieurs régions cérébrales en même temps (voire l'intégralité du cerveau). Néanmoins, l'expression de gènes précoces tels que *c-fos* n'est pas spécifique d'une tâche mnésique : la manipulation, le stress, l'exposition aux stimuli, les processus de navigation ; toute sollicitation de l'animal est potentiellement à même de modifier l'activité neuronale. Il est alors important de constituer des groupes témoins adaptés lorsque l'on cherche à isoler les mécanismes à l'œuvre au cours d'un processus cognitif précis, tel le rappel d'une mémoire spatiale. Ces groupes contrôles sont constitués de rats exposés aux mêmes sollicitations que les animaux dont on teste les capacités mnésiques ; il peut être nécessaire de composer plusieurs groupes témoins. Dans notre cas (publication 1), chez des animaux non-opérés, nous avons ainsi défini 4 groupes : des animaux testés à 5 jours (mémoire récente) et des animaux testés à 25 jours (mémoire ancienne) dans un protocole de mémoire de référence dans la piscine de Morris (plateforme cachée) ; des animaux nageant vers une plateforme visible dans une piscine entourée de rideaux (pour empêcher l'accès aux indices visuels distaux) durant toute l'acquisition et lors du test de rétention ; et enfin un groupe d'animaux Home Cage (HC), stabulés dans leur cage d'élevage pour toute la durée de l'expérience et manipulés régulièrement. Lors de notre expérience mettant en évidence l'activité neuronale à la suite de lésions ReRh, nous avons également inclus des animaux HC (publication 4).

4.6.2. PROTOCOLE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

Le protocole d'immunomarquage permettant de révéler la présence de la protéine c-Fos est globalement similaire à celui relatif à la protéine NeuN (section 4.5.2). Ne seront abordés ici que les modifications inhérentes à la mise en évidence de protéines différentes. Dans le cas de la protéine c-Fos, l'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal de lapin (c-Fos (4), SC-52, Santa Cruz, USA), dilué au 1/4000^{ème} dans du PBS contenant 0,5% de Triton X-100 (PBST). L'anticorps secondaire est un anticorps biotinylé de chèvre, anti-lapin, IgG (H+L), BA-1000, Jackson ImmunoResearch, West Grove PA, dilué au 1/500^{ème} dans du PBST. Le temps de révélation dans la DAB est de 12 minutes dans nos conditions expérimentales.

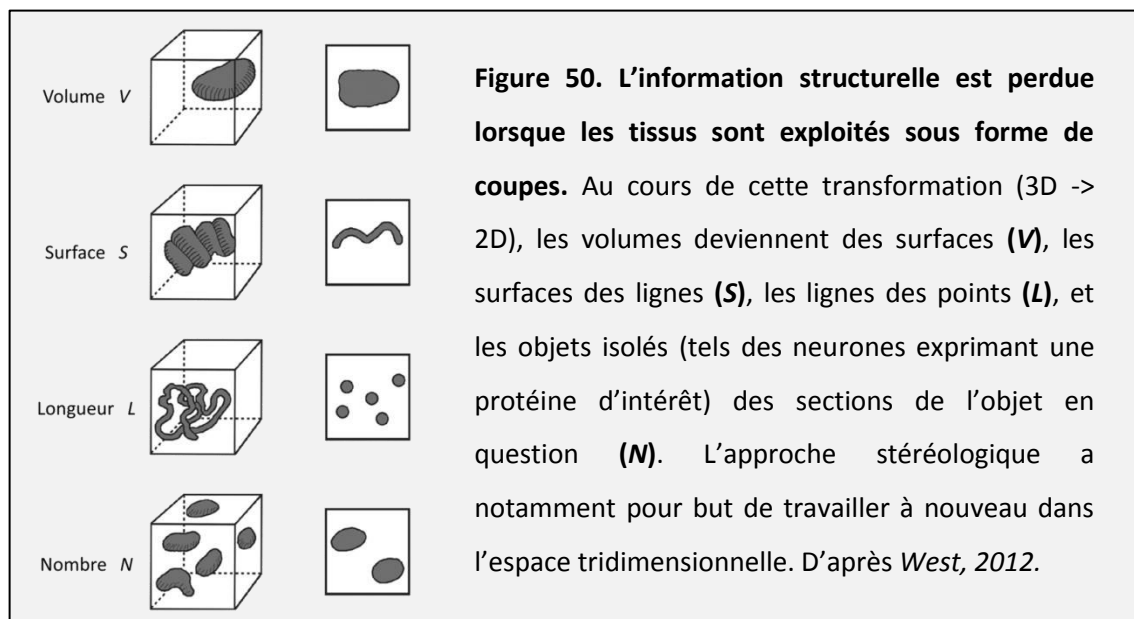
5. EVALUATION DE L'ACTIVITE C-FOS : L'APPROCHE STEREOLOGIQUE

5.1. PRINCIPE

La stéréologie est un outil basé sur un ensemble de méthodes mathématiques et statistiques permettant d'extraire des informations quantitatives (volumes, surfaces, longueurs, nombres) au sujet d'éléments présents dans un volume délimité (exemple : une structure cérébrale) (West, 2012, 2013a). Cette méthode est basée sur une approche non-biaisée : aucun postulat initial n'est formulé sur la taille, la forme, l'orientation ou la distribution spatiale des objets à compter ; la stéréologie s'appuie sur des échantillons systématiques et randomisés, de manière à ce que chaque objet au sein du volume d'intérêt ait la même probabilité d'être compté. Dans notre cas, elle autorise une estimation du nombre de neurones exprimant une protéine d'intérêt, sans pour autant nécessiter une analyse systématique de chaque section. Il serait par exemple envisageable de chercher à compter chacun des milliers de neurones exprimant c-Fos dans le mPFC à la suite d'un test de rétention dans la piscine de Morris, mais cela nécessiterait de prendre en compte toutes les coupes de cerveau sur lesquelles cette structure est présente ; ce qui s'avèrerait extrêmement long et fastidieux, voire impossible. A cette problématique, l'approche stéréologique propose une estimation quantitative à partir d'un échantillon qui exclut totalement le fait de choisir le matériel d'intérêt. Elle apporte ainsi une réponse comparable à celle des enquêtes d'opinion publique : estimer avec une grande précision le nombre total d'occurrences d'un élément ou d'un événement sur la base d'un échantillon représentatif d'une population beaucoup plus large.

L'un des problèmes majeurs rencontré lorsqu'il s'agit d'estimer le nombre de neurones exprimant un marqueur réside dans le fait qu'à l'issue du processus immunohistochimique, le matériel biologique se trouve sous la forme de coupes : le tissu cérébral, initialement opaque et en 3 dimensions, est plus simple à traiter et à observer sous une forme « plate », en 2 dimensions. Au cours de cette transformation (3D -> 2D), les volumes deviennent des surfaces, les surfaces des lignes, les lignes des points, et les objets isolés (tels des neurones exprimant une protéine d'intérêt) une succession de sections de l'objet en question (Fig. 50 ; West, 2012). Dès lors, l'analyse d'images ne permet plus l'accès qu'à des paramètres en 2 dimensions, alors que la prise en compte de ces paramètres dans les 3 dimensions de l'espace apporterait un complément d'informations appréciable ; c'est ce que propose

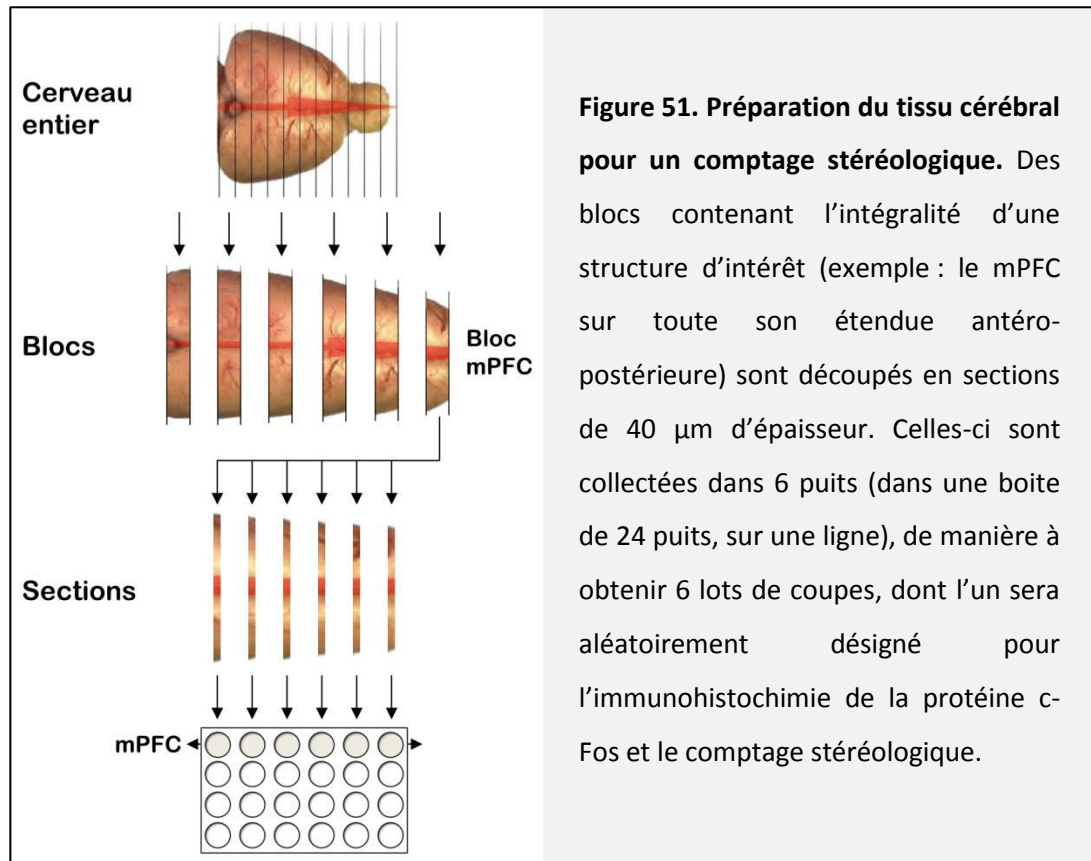
l'approche stéréologique. Dans notre cas, il va s'agir d'une estimation quantitative du nombre de neurones exprimant c-Fos dans la structure en entier, grâce à la prise en considération du volume de celle-ci. Ainsi, le comptage stéréologique est réalisé d'une part à partir d'un échantillon de coupes issues de l'ensemble de la région anatomique qui a été entièrement sectionnée, et d'autre part, dans l'épaisseur de chaque coupe, et non uniquement sur sa surface. L'approche stéréologique prend donc en compte les 3 dimensions de l'espace : le plan X (horizontal), le plan Y (vertical), mais également le plan Z (profondeur).



5.2. ECHANTILLONNAGE ET OUTILS DE MESURE (DISSECTEUR OPTIQUE) NON BIAISES ET PRECISION DE L'ESTIMATION STEREOLOGIQUE

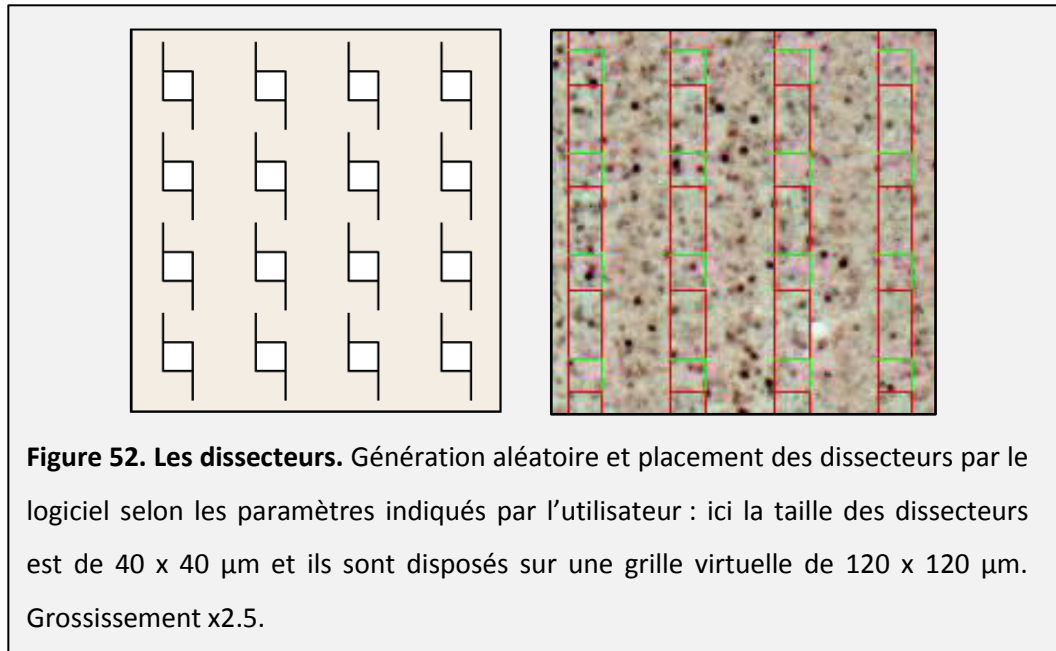
Le principe de l'approche stéréologique est donc de réaliser le comptage sur un échantillon représentatif du nombre total d'éléments présents dans l'ensemble du volume considéré. Pour estimer le nombre total de neurones exprimant c-Fos dans la couche CA1 de l'hippocampe dorsal (par exemple) sur la base d'un échantillon représentatif, la mise en place d'un échantillonnage non-biaisé est primordial. Cet échantillonnage a lieu à deux niveaux : le premier concerne les coupes (sections) prises en considération, le second la proportion du volume de chaque coupe au sein de laquelle le comptage sera effectué (dissecteur optique).

L'échantillonnage des coupes permet de prendre en considération l'intégralité de la structure d'intérêt sans pour autant évaluer le nombre de neurones immunomarqués sur toutes les sections de celle-ci : un échantillonnage de coupes de 1/6 (une coupe considérée toutes les six sections effectuées au cryostat) a été utilisé (Fig. 51). Il est important de débiter cet échantillonnage à un endroit aléatoire de la première série de sections (sélection aléatoire d'un puits parmi 6 contenant un jeu complet de coupes ; Fig. 51).

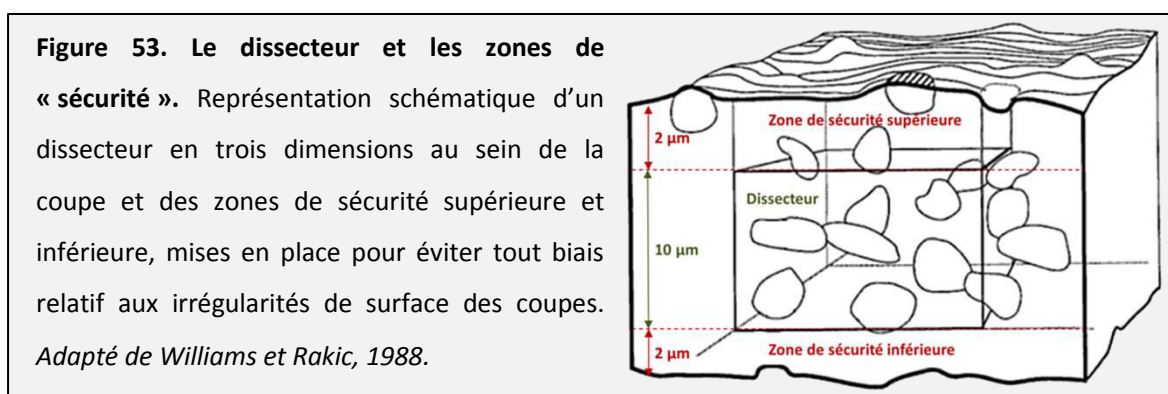


L'outil de mesure : le dissecteur optique et la méthode du fractionateur

Le deuxième niveau d'échantillonnage concerne le placement des **dissecteurs optiques**. Les dissecteurs optiques sont des cubes virtuels qui permettent, à l'aide d'un ensemble de sections optiques dans le plan Z, le comptage en 3D. Ces dissecteurs sont répartis de manière aléatoire et homogène par le logiciel au sein de la région d'intérêt (Fig. 52). Le comptage est effectué uniquement au sein de ces dissecteurs, qui définissent les limites des zones à considérer pour le comptage, à la fois dans les plans X et Y, mais aussi dans l'épaisseur du tissu, au sein du dissecteur (plan Z).



Le comptage à l'aide du dissecteur optique nécessite de connaître l'épaisseur réel du tissu. Au départ, les coupes utilisées sont réalisées au cryostat à une épaisseur de 40 µm, mais après le traitement immunohistochimique, leur épaisseur a fortement diminuée ; c'est le « *shrinkage* », ou rétrécissement (West, 2013b). Nous avons mesuré l'épaisseur réelle de nos coupes, qui était de 14 µm en moyenne une fois traitées et montées. De plus, les limites supérieure et inférieure des coupes sont irrégulières, ce qui nécessite la mise en place de zones de « sécurité » ou « guard zone » (Fig. 53). Dans les études présentées dans cette thèse, nous avons utilisé une épaisseur moyenne de 14 µm, et le comptage a été réalisé sur une hauteur de 10 µm (centraux) après élimination de 2 µm en haut et en bas (Fig. 53).



Lors du paramétrage d'une expérience basée sur l'approche stéréologique, il est important de tester le nombre de coupes à considérer (ici 1/6, premier échantillonnage), la taille des dissecteurs ainsi que la distance entre deux dissecteurs successifs (second échantillonnage). Le choix de ces paramètres va directement dicter la précision de l'estimation finale. Ces

paramètres dépendent de la taille de la région d'intérêt et de celle des objets à compter ainsi que de la densité numérique de ceux-ci. Il est donc primordial de tester au préalable différentes configurations de manière à sélectionner la meilleure combinaison de paramètres, c'est-à-dire celle qui permet d'obtenir une estimation fiable et précise. Il n'existe pas de méthode permettant de définir *à priori* ces paramètres, notamment car le nombre d'éléments positivement marqués et leur répartition au sein du tissu sont initialement inconnus. Une étape de mise au point empirique est donc un prérequis à l'utilisation de la méthode stéréologique. Les paramètres indiqués ici sont ceux obtenus après des essais préliminaires. Ces ajustements sont possibles car la précision de l'estimation peut être calculée grâce au coefficient d'erreur.

Le **coefficient d'erreur** (CE) est un indicateur chiffré de la précision de l'estimation rapportée par le logiciel ; il est basé sur l'analyse mathématique des variations d'expression constatées d'une coupe à l'autre et d'un dissecteur à l'autre pour un animal donné et/ou au sein d'un groupe expérimental (West, 2013a). Pour reprendre l'analogie précédente, il peut être comparé à la marge d'erreur calculée lors d'enquêtes d'opinion publique. Le nombre de coupes prises en compte, la taille et l'espacement entre les dissecteurs impactent ainsi directement la précision de l'estimation. Un $CE \leq 0.10$ est couramment considéré comme critère de fiabilité de la précision de l'estimation obtenue (West, 2012).

Le calcul du nombre de neurones c-Fos positifs : le logiciel de comptage prend en considération les paramètres d'échantillonnage pour calculer le nombre de cellules immunopositives présentes au sein de l'ensemble de la région d'intérêt. La méthode utilisée a été celle du **fractionateur optique**, qui utilise la méthode du dissecteur optique combinée à un échantillonnage systématique et randomisé (dans notre cas, 1 coupe/6), et qui permet d'obtenir une estimation quantitative du nombre total de neurones exprimant la protéine d'intérêt dans la structure considérée (Mura et al. 2004). Le calcul est réalisé par le logiciel selon la formule suivante :

$$N = Q * \frac{1}{hsf} * \frac{1}{asf} * \frac{1}{ssf}$$

Où N est l'estimation quantitative du nombre total de neurones, Q le nombre de comptages de neurones positifs effectués, *asf* la surface d'un dissecteur, *hsf* l'épaisseur de fraction d'échantillonnage, *ssf* l'échantillonnage des coupes.

5.3. LA STATION D'IMAGERIE

Les coupes sont observées à l'aide d'une station d'imagerie dédiée comprenant un microscope optique (Leica DM5500B), une caméra numérique (Optronics Microfire) et une platine motorisée pouvant être contrôlée dans les 3 axes (x, y, z) à l'aide d'un joystick (Fig. 54). L'ensemble est relié à un ordinateur via une carte contrôleur OASIS permettant de piloter le microscope directement depuis un logiciel compatible. Cette station utilise le programme Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France, Fig. 55), spécialement développé pour la quantification de marqueurs biologiques sur des coupes de cerveau et disposant d'un module spécifique dédié à l'approche stéréologique.



Figure 54. Station d'imagerie Explora Nova au LNCA. Un microscope optique Leica est relié à un ordinateur via une carte contrôleur pour permettre la manipulation de la platine depuis le programme Mercator (ou à l'aide du joystick à 3 axes), et une caméra numérique permet l'acquisition des images.

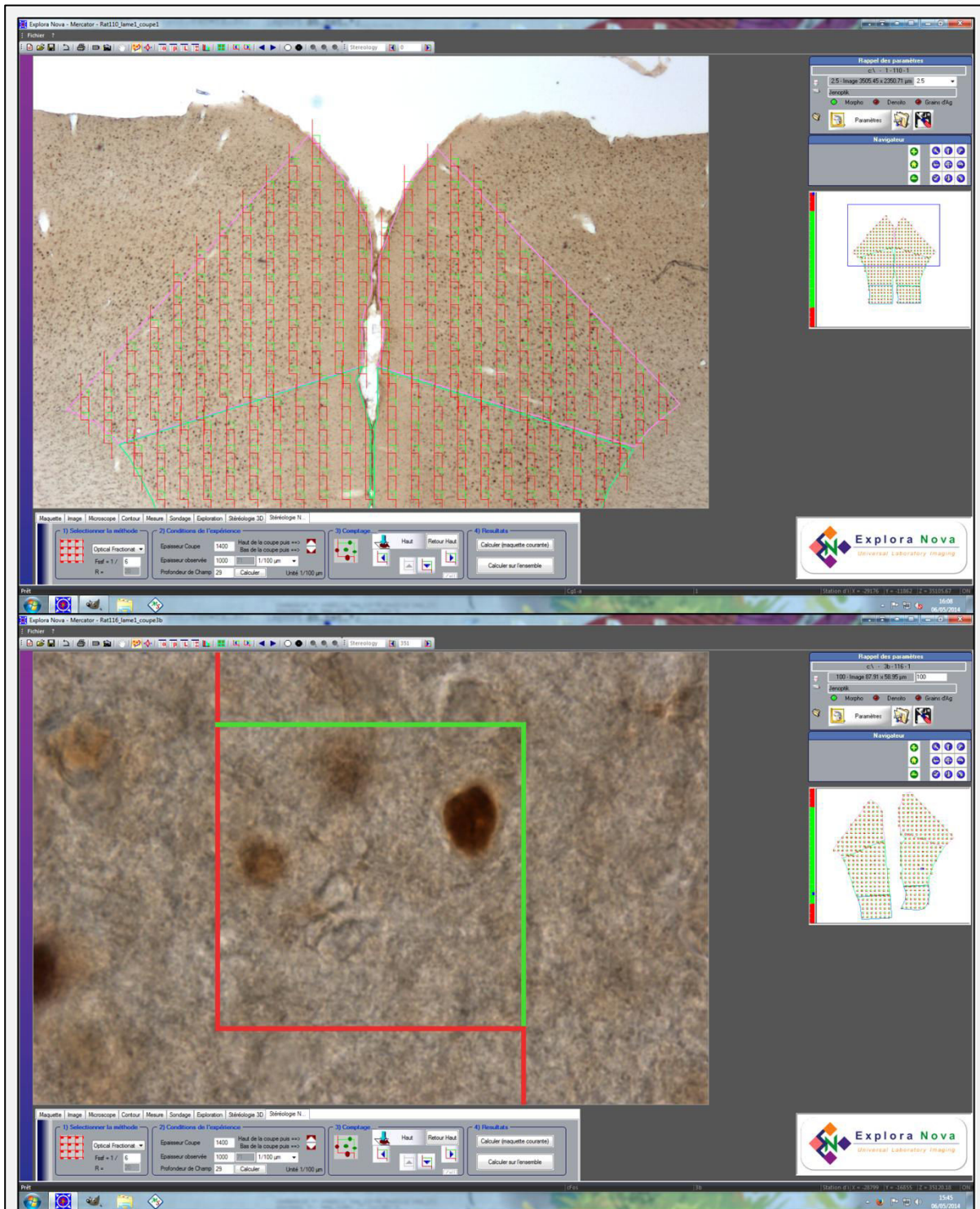


Figure 55. L'interface du logiciel Mercator - onglet stéréologie. (Haut) Illustration de la délimitation des structures d'intérêt (ici l'ACC (rose) et le PL (vert), bilatéralement). Les dissecteurs sont ensuite distribués aléatoirement par le logiciel au sein des régions. **(Bas)** Comptage au x100 : à ce grossissement, chaque dissecteur occupe la majeure partie de la zone visible sur l'écran, et l'identification des cellules immunomarquées est aisée.

5.4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL (LOGICIEL MERCATOR)

Une coupe de 40 μm d'épaisseur est utilisée à intervalles réguliers de 240 μm (6 x 40 μm , 1 coupe sur 6). Les coupes sélectionnées sont alors traitées pour mettre en évidence la protéine d'intérêt puis montées entre lame et lamelle. A l'aide du logiciel Mercator, les régions d'intérêts sont délimitées au grossissement de 2.5x (Fig. 56A). Dans le cadre de cette thèse, les dissecteurs avaient une taille de 40 x 40 μm , et sont répartis de manière homogène sur une grille virtuelle de 120 x 120 μm au sein de la région préalablement délimitée (Fig. 56B, voir également la publication 4).

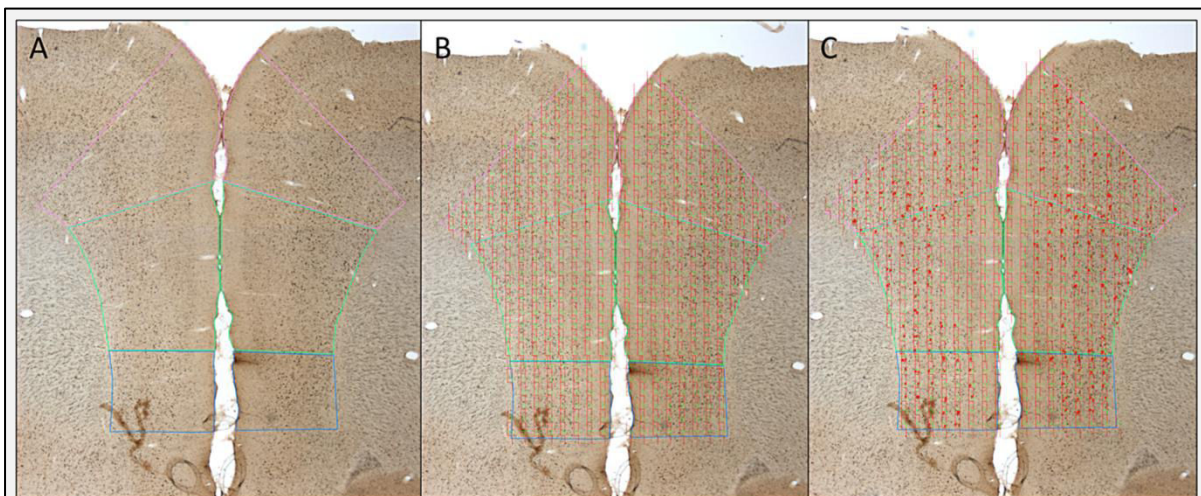
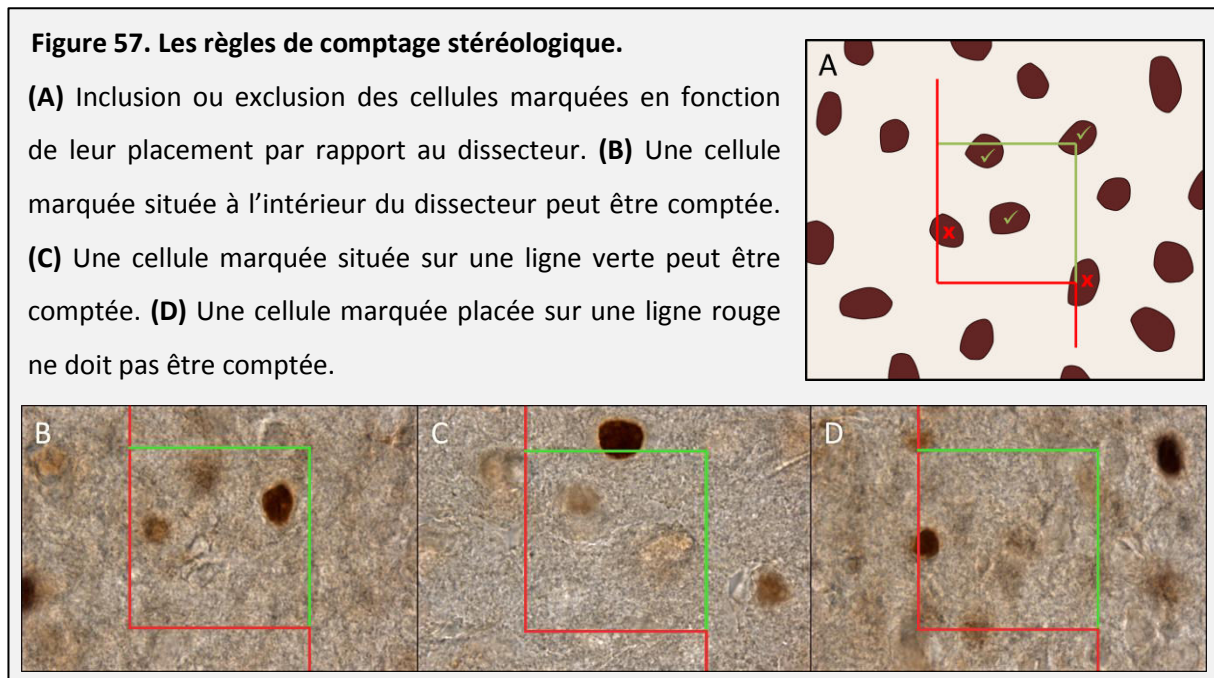


Figure 56. Trois étapes du comptage stéréologique à l'aide du logiciel Mercator. (A) Délimitation des régions d'intérêt par l'expérimentateur. Ici les trois sous-régions du mPFC : l'ACC (rose), le PL (vert) et l'IL (bleu). **(B)** Génération et placement des dissecteurs par le logiciel selon les paramètres définis. **(C)** Après le comptage manuel à l'aide de l'objectif x100 (voir Fig. 58), chaque élément compté est indiqué par un point rouge. Grossissement x2.5.

Une fois les dissecteurs automatiquement distribués de manière uniforme par le logiciel Mercator, le comptage est effectué à l'aide de l'objectif x100 à immersion dans l'huile (Fig. 57, 58). Les dissecteurs se présentent sous la forme de carrés délimités sur deux côtés (bas et gauche) par des lignes rouges, et sur deux côtés (haut et droite) par des lignes vertes. La couleur de la ligne indique le comportement à adopter lorsqu'une cellule marquée empiète sur celle-ci : le chevauchement d'une ligne verte est un facteur d'inclusion (comptage autorisé), une ligne rouge un facteur d'exclusion (comptage interdit) (Fig. 57). Dans le cas où une cellule marquée chevauche à la fois une ligne verte et une ligne rouge, l'exclusion prime.



Comme décrit précédemment, lors du comptage, les coupes ont une épaisseur réelle moyenne de 14 μm , dont les 10 μm centraux sont considérés, et les 2 μm supérieurs et inférieures définissent les zones de sécurité (Fig. 53). Le logiciel permet de renseigner ces paramètres, et une fois le haut de la coupe défini manuellement, celui-ci va automatiquement placer une grande croix rouge sur le dissecteur si la coordonnée Z actuelle ne correspond pas à la zone centrale - autrement dit, si l'on se trouve au-dessus ou au-dessous du dissecteur dans le plan Z (Fig. 58). L'utilisateur peut alors se focaliser sur la détection des cellules marquées, le logiciel lui indiquant si le plan Z actuel est dans la zone de comptage ou non. Le plan focal dans lequel le noyau de la cellule est le plus net est considéré comme celui auquel elle appartient (Fig. 58). Toute cellule immunopositive située au sein d'un dissecteur et/ou en contact avec une ligne verte délimitant celui-ci est donc marquée manuellement par l'expérimentateur comme positive. Les mêmes paramètres (intensité lumineuse, contraste, durée d'exposition...) sont utilisés pour toutes les coupes et tous les animaux. Après avoir reproduit cette procédure sur l'ensemble des coupes relatives à un animal donné, l'estimation finale du nombre de cellules exprimant la protéine d'intérêt est réalisée par le logiciel en fonction des paramètres d'échantillonnage. Pour éviter tout biais relatif aux différences entre expérimentateurs (possible car la sélection des cellules marquées est à la charge de l'expérimentateur), j'ai effectué tous les comptages, et ce sans avoir connaissance du groupe expérimental auquel l'animal en cours d'analyse appartenait.

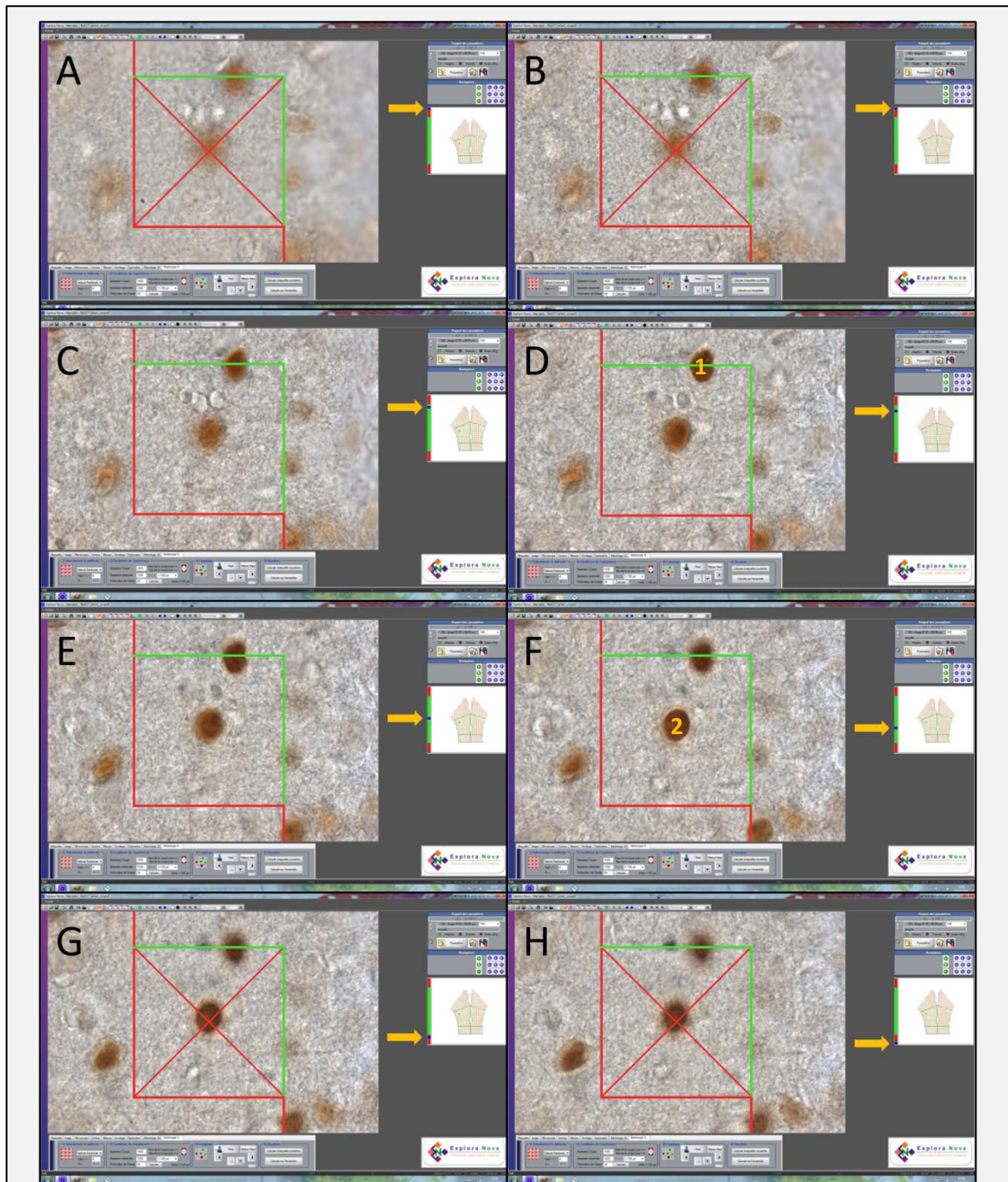


Figure 58. Captures d'écran du logiciel Mercator illustrant la navigation et le comptage dans le plan Z (épaisseur de la coupe). Le point bleu sur la barre verticale rouge et verte (située au centre à droite de l'écran) indique le plan focal actuel (le niveau auquel on se situe dans l'épaisseur de la coupe). J'ai ici ajouté une flèche jaune en face du point bleu pour le mettre en évidence. **(A-B)** Lorsque le plan focal se situe au-dessus de la coupe (zone de sécurité supérieure), l'image est floue et le logiciel indique qu'il ne faut pas compter (grande croix rouge au centre du dissecteur). **(C-F)** Au sein du dissecteur (le point bleu est dans la zone verte sur la barre verticale), le comptage est possible. Ici, deux cellules immunopositives ont été comptées. Elles sont prises en compte et numérotées lorsqu'elles apparaissent dans le plan focal. **(G-H)** Lorsque le plan focal se situe au-dessous de la coupe (zone de sécurité inférieure), le logiciel l'indique également en ajoutant une grande croix rouge au centre du dissecteur.

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

PUBLICATION 1

PUBLICATION 1

IMPLICATION DES NOYAUX VENTRAUX DE LA LIGNE MEDIATE DU THALAMUS (NOYAUX REUNIENS ET RHOMBOÏDE) DANS LA PERSISTANCE D'UNE MEMOIRE SPATIALE CHEZ LE RAT

Cette première publication avait pour objectif d'étudier le rôle des noyaux ReRh du thalamus dans la persistance d'une mémoire spatiale chez le Rat. Nous avons utilisé trois approches : l'imagerie cérébrale de l'expression de la protéine c-Fos, des lésions excitotoxiques par instillation de NMDA dans les noyaux ReRh, et l'inactivation fonctionnelle réversible de ces noyaux par instillation intracérébrale de Lidocaïne. Les animaux étaient entraînés selon un protocole de mémoire de référence en piscine de Morris et testés soit 5 jours (mémoire récente), soit 25 jours (mémoire ancienne) après la fin de l'acquisition. Dans un premier temps, nous avons évalué l'implication des noyaux ReRh dans le rappel d'un souvenir spatial récent ou ancien dans la piscine de Morris chez des rats non-opérés, en effectuant une immunohistochimie de la protéine c-Fos 1h30 après la fin du test de rappel. Cette approche nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité des noyaux ReRh spécifiquement lors du rappel d'une mémoire spatiale ancienne (25 jours), et pas d'une mémoire récente (5 jours). La lésion excitotoxique des noyaux ReRh effectuée avant l'acquisition n'altère pas cette dernière, ni ne modifie le rappel d'une mémoire récente, mais empêche le rappel d'une mémoire ancienne. L'impact de cette lésion sur des aspects non-mnésiques (anxiété et activité locomotrice) a également été évalué ; les variables concernées ne sont pas affectées par celle-ci. L'inactivation fonctionnelle des noyaux ReRh, effectuée juste avant les tests de rétention à 5 et 25 jours, n'a pas eu d'impact significatif sur les performances des animaux. Cependant, l'augmentation de l'expression de la protéine c-Fos dans ces noyaux lors du test à 25 jours indique qu'ils pourraient participer au rappel d'une mémoire spatiale ancienne. Ces résultats montrent d'une part que si ces noyaux ne sont pas cruciaux lors de la phase de rappel d'une mémoire récente ou ancienne, ils semblent contribuer au rappel d'une mémoire ancienne ; et d'autre part qu'ils seraient impliqués dans la consolidation systémique, mécanisme nécessaire à la persistance des souvenirs à long terme et dont il a été démontré qu'il nécessite un dialogue hippocampo-cortical dans lequel les noyaux ReRh pourraient jouer un rôle prépondérant.

Behavioral/Systems/Cognitive

The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats

Michaël Loureiro, Thibault Cholvin, Joëlle Lopez, Nicolas Merienne, Asma Latreche, Brigitte Cosquer, Karine Geiger, Christian Kelche, Jean-Christophe Cassel,* and Anne Pereira de Vasconcelos*

Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Strasbourg, Institut Fédératif de Recherche 37 de Neurosciences, GDR 2905 du CNRS, Faculté de Psychologie, F-67000 Strasbourg, France

The formation of enduring declarative-like memories engages a dialog between the hippocampus and the prefrontal cortex (PFC). Electrophysiological and neuroanatomical evidence for reciprocal connections with both of these structures makes the reuniens and rhomboid nuclei (ReRh) of the thalamus a major functional link between the PFC and hippocampus. Using immediate early gene imaging (*c-Fos*), fiber-sparing excitotoxic lesion, and reversible inactivation in rats, we provide evidence demonstrating a contribution of the ReRh to the persistence of a spatial memory. Intact rats trained in a Morris water maze showed increased *c-Fos* expression (vs home cage and visible platform groups: >500%) in the ReRh when tested in a probe trial at a 25 d delay, against no change at a 5 d delay; behavioral performance was comparable at both delays. In rats subjected to excitotoxic fiber-sparing NMDA lesions circumscribed to the ReRh, we found normal acquisition of the water-maze task (vs sham-operated controls) and normal probe trial performance at the 5 d delay, but there was no evidence for memory retrieval at the 25 d delay. In rats having learned the water-maze task, lidocaine-induced inactivation of the ReRh right before the probe trial did not alter memory retrieval tested at the 5 d or 25 d delay. Together, these data suggest an implication of the ReRh in the long-term consolidation of a spatial memory at the system level. These nuclei could then be a key structure contributing to the transformation of a new hippocampal-dependent spatial memory into a remote one also depending on cortical networks.

Introduction

The debate about memory systems in the brain, the number and type of neural ensembles which they engage, and the cellular/subcellular processes underlying memory persistence is still open (Frankland and Bontempi, 2005; Squire, 2009; Sutherland et al., 2010; Nadel and Hardt, 2011). One consensual idea is that the hippocampus is essential for the consolidation of declarative memories in humans and declarative-like ones in animals (Winocur et al., 2010). Another one is that the hippocampus is required for the retrieval of richly contextualized memories, especially when formed recently (Frankland and Bontempi, 2005; Sutherland et al., 2010). It is therefore not surprising that dys-

function of the hippocampal formation is associated with both anterograde and retrograde amnesia. Diencephalic lesions, as seen in Korsakoff syndrome (KS) or in thalamic stroke, are another cause of enduring memory dysfunctions, of which some features resemble those of temporal lobe amnesia (Aggleton and Brown, 1999; Kopelman, 2002; Aggleton et al., 2011; Carlesimo et al., 2011). Our understanding of the neuroanatomical bases of diencephalic amnesia is complicated by the fact that KS or stroke usually affects a relatively large number of thalamic and sometimes even extrathalamic nuclei (Van der Werf et al., 2000, 2003a,b; Carlesimo et al., 2011). Approaches in animals, which enable better circumscribed damage, suggest that intralaminar (ILN) and/or anterior thalamic nuclei lesions could be among the critical alterations accounting for diencephalic amnesia (Aggleton and Brown, 1999; Gold and Squire, 2006; Lopez et al., 2009). Thalamic nuclei that received much less attention are the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei. This apparent neglect is surprising given the connections between the ReRh and brain structures such as the hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC), which are both crucial to memory processing over time (Frankland and Bontempi, 2005; Sutherland et al., 2010; Winocur et al., 2010). Indeed, the ReRh is the major source of excitatory thalamic projections to the hippocampus (Wouterlood et al., 1990; Dolleman-Van der Weel et al., 1997; Bertram and Zhang, 1999; Cavdar et al., 2008), and has dense bilateral connections with the PFC (Vertes, 2002; Vertes et al., 2006; Hoover and

Received Jan. 28, 2012; revised May 18, 2012; accepted May 24, 2012.

Author contributions: J.-C.C. and A.P.d.V. designed research; M.L., T.C., J.L., N.M., A.L., B.C., K.G., J.-C.C., and A.P.d.V. performed research; C.K. contributed unpublished reagents/analytic tools; M.L., J.-C.C., and A.P.d.V. analyzed data; M.L., J.-C.C., and A.P.d.V. wrote the paper.

This work was supported by the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. We are grateful to O. Bildstein, D. Egesi, and G. Edomwonyi for their assistance in animal care.

*J.-C.C. and A.P.d.V. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Dr. Jean-Christophe Cassel, Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. E-mail: jcassel@unistra.fr.

J. Lopez's present address: Psychology Department, Stewart Biology Building, 1205 Drive Penfield Avenue, Montreal, QC H3A 1B1, Canada.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0410-12.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/329947-13\$15.00/0

Vertes, 2012). Supported by electrophysiological findings (Di Prisco and Vertes, 2006), this connectivity makes the ReRh a major link between the mPFC and the hippocampus (McKenna and Vertes, 2004; Vertes, 2006), whereby it may participate in the contribution of these two structures to recent and remote memory functions. Recent data even showed that a subpopulation of Re neurons had collateral projections to both the mPFC and hippocampus (Hoover and Vertes, 2012). In the following experiments, which used immediate early gene expression, fiber-sparing excitotoxic lesion, and reversible functional inactivation approaches in rats, we aimed at investigating the contribution of the ReRh to recent and remote memory retrieval in a Morris water-maze task. We provide evidence demonstrating a contribution of the ReRh to spatial memory persistence.

Materials and Methods

Animals

The study adhered to the regulations specified by the European Committee Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (references for personal authorization licenses are n°67–7 for A.P.d.V. and n°67–215 for J.-C.C.; the other authors are under the formers' responsibility). All experiments were performed in male Long–Evans rats aged 3 months at their arrival in the laboratory (250–300 g). Animals were housed individually in quiet facilities, under a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 A.M.) with food and water *ad libitum*, controlled temperature, and a hygrometry of about 55%. Before any experiment (surgery or maze training), rats were individually handled for 2 min each day over 5 consecutive days.

c-Fos immunohistochemistry

Brain preparation and section processing. Ninety minutes after behavioral test completion, rats were killed by an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, i.p.) and then perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were removed, postfixed for 2 h (4% PFA, 4°C), and transferred to a 20% sucrose solution for 48 h at +4°C before being snap frozen (isopentane, –40°C) and stored at –80°C. Floating coronal sections (50 μ m) were cut using a cryostat (Reichert–Jung Frigocut 2800 Reichert) in serial sections within a block of tissue extending from –1.4 to –3.0 mm from bregma (Paxinos and Watson, 1998). Starting at a random position among the first four sections collected, every fourth section was selected for immunohistochemistry. All selected sections were processed at the same time with all group conditions equally represented [i.e., home cage (HC), curtain 5 d, curtain 25 d, and hidden platform 5 and 25 d] in each of the 24-well boxes used for staining. These precautions avoided any technical bias. Neuron counting used immunostained sections included in a more narrow caudorostral window (i.e., –1.6 to –2.5 mm from bregma), in which both Re and Rh nuclei showed the largest extent in the dorsoventral (DV) and mediolateral (ML) planes (Paxinos and Watson, 1998). In most rats our quantifications could be performed on five sections. In four of them, however, one, or at most, two sections had to be discarded because of damage during processing that was sufficient to compromise the legibility of information, reducing quantifications to four or three sections, at the least. Thus, data considered for analysis were average values/rat over three, four, or five sections.

Immunohistochemistry protocol. The protocol is that used by Lopez et al. (2012). Briefly, sections were rinsed three times during 10 min in a PBS merthiolate buffer before being soaked for 1 h in 5% normal donkey serum in PBS merthiolate containing 0.5% Triton X-100. The sections were subsequently transferred into the primary anti-Fos rabbit polyclonal antibody (1:4000; Santa Cruz Technology) solution for 18 h at room temperature. Then, the sections were soaked in a buffer solution containing biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:500, Biotin-SP-conjugated affiniPure; Jackson ImmunoResearch). Staining was revealed with the avidin-biotin peroxidase method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) coupled to diaminobenzidine.

Imaging and quantification. The quantitative analyses of c-Fos-positive nuclei were performed in the ventral midline nuclei (Re, Rh) (–1.6 to –2.5 mm from bregma; see Fig. 2) (Paxinos and Watson, 1998) by an

experimenter blind to the experimental conditions. In addition, at the same bregma levels, c-Fos-positive neurons in two additional control regions not known to be directly involved in spatial memory functions were also evaluated at the same bregma levels as Re and Rh nuclei: the primary somatosensory cortex, barrel field (S1BF), and the ventromedial hypothalamus (VMH). Stained sections were observed under a Leica DM5500B light microscope ($\times 20$ objective lens) and digitalized online using a video camera (Optronics Microfire) with an image analyzer (Explora Nova). The same intensity of light in the microscope as well as the same parameters in the exposure time of the digital camera were used for all sections. Using the Mercator software (Explora Nova), the regions of interest were delimited and c-Fos-positive neuron counting was performed by selecting a threshold value that keeps all labeled immunopositive elements but no background. On each selected section, counting was performed in a rectangular frame (465 \times 437 μ m and 437 \times 304 μ m, for the Re and Rh, respectively) of which the center was positioned on the center of the area of interest. Depending on the anteriority of the section and according to Paxinos and Watson (1998), this frame covered 29–64% of the structure area, representing over all selected sections a mean of 39 and 49% of the Re and Rh surface, respectively. This procedure allowed us to standardize our counting zones between animals, groups, and section levels, and to take into consideration the variation of the size of each nucleus along the anteroposterior (AP) axis. The same principle was applied to counting in the S1BF and VMH, except that the rectangles were 1164 \times 636 μ m and 310 \times 174 μ m, respectively.

Statistical analyses. Imaging data were analyzed using a two-way ANOVA, considering Group (HC, Curtain 5 d, Curtain 25 d, 5 d, and 25 d) and Region (Re, Rh, S1BF, and VMH) as factors. *Post hoc* comparisons used the Newman–Keuls multiple range test. The functional connectivity between the individual brain regions was characterized by regression analyses (Spearman correlations). All analyses considered a value of $p < 0.05$ significant.

Stereotactic surgery

For permanent fiber-sparing excitotoxic lesions of the ReRh, subjects were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and secured in a stereotactic frame (incisor bar: –3 mm). Neurotoxic lesions targeting the ventral midline thalamus (ReRh) were made using slow microinfusions (over 5 min) of 0.12 M NMDA (0.1 μ l/site; Sigma), dissolved in saline phosphate buffer, via an infusion needle (0.28 mm in diameter) connected to a motorized infusion pump. After leaving the needle *in situ* for an additional 5 min to ensure diffusion of NMDA into the target structure, it was slowly retracted. Infusion sites were as follows (in mm): AP = –1.6 and –2.3 (from bregma), DV = –7.0 (from skull), ML = ± 2.0 (from midline of the sagittal sinus) at an ML angle of 15° and AP = –3.0, DV = –7.0, and ML = ± 1.4 at an ML angle of 10° (Paxinos and Watson, 1998). The sham-operated controls (Sham) were infused with saline phosphate buffer instead of NMDA at the same coordinates.

For cannula implantation, subjects were anesthetized with a ketamine (6.38 mg/kg)–xylazine (0.85 mg/kg) mixture (intraperitoneally). A stainless steel guide cannula (0.4 mm in diameter) was implanted unilaterally in the ReRh (AP: –2.3, ML: ± 1.7 , DV: –6.2 from skull, with a mediolateral angle of 15°; coordinates according to Paxinos and Watson, 1998). Each guide cannula was secured to the skull by acrylic dental cement and stainless steel screws. At the end of surgery, a sterile stainless steel mandrel (0.28 mm in diameter) was inserted into the guide cannula.

All rats that underwent surgery were allowed to recover under a warm lamp for 20–30 min before being placed back into their HC. They were given a 1 (cannula implanted) or 2 week (permanent lesion) rest period before the start of behavioral testing.

Spatial testing in the Morris water maze

General behavioral apparatus and procedures. The specifications of the water maze and the testing procedures have been described previously (Lopez et al., 2012). In brief, the first pretraining day consisted of one four-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, painted black, 1 cm above the water surface) located in the southeast quadrant of the pool, starting randomly from each of the four cardinal points at the edge

of the pool. The rats were then given four successive acquisition trials per day (intertrial interval, 10–15 s) of a maximum duration of 60 s, starting randomly from each of the four cardinal points from the edge of the pool, to learn the location of a platform (diameter 11 cm) hidden 1 cm below the water surface in the northwest quadrant. The distance traveled before reaching the platform as well as the thigmotactic behavior were recorded and subsequently computed by a video-tracking system (Smart; Pan-Lab). At the end of the acquisition, rats were randomly allocated to a recent or a remote memory group to be tested in a probe trial 5 d or 25 d later, respectively. For this probe trial, no platform was placed in the pool. The rats were released from the northeast start point and allowed a 60 s swim time to explore the pool. The time spent in the four virtual quadrants (Target quadrant = northwest quadrant; Opposite quadrant (Opp.) = southeast; Adjacent to the target quadrant = northeast (Adj. L.) and southwest (Adj. R.) quadrants), as well as the number of crossings in the target area (i.e., size of the platform surface enlarged by a 10 cm wide annulus) were recorded: the second parameter was used as an index of memory precision (Lopez et al., 2012). Likewise, swim speed and thigmotaxis were also recorded during the probe trial. In addition, a recent report suggests that rats with Re lesions, despite spending less time than controls in the target quadrant, were able to swim to the correct quadrant as rapidly as the controls (Dolleman-van der Weel et al., 2009). This result was interpreted as a PFC-associated deficit and not as reflecting genuine memory impairment. Therefore, in our rats subjected to lesions, we completed our analysis of the probe trial data by considering the distance and the latency to the first entrance in the target area, as well as the time spent in the so-called “Whishaw error” path (i.e., during the first swim to the target area, the percentage time spent in an 18 cm wide path linking the release point of the rat with the former location of the platform) (Whishaw, 1985).

Specific experimental protocols

The c-Fos imaging experiment used 31 intact rats. Fifteen of them were given 6 consecutive days of acquisition with the hidden platform at a fixed location and were tested in a probe trial either at a 5 d postacquisition delay ($n_{5d} = 8$) or at a 25 d postacquisition delay ($n_{25d} = 7$). In an additional group, control rats ($n = 11$, including six rats tested at the 5 d delay and five rats tested at the 25 d delay) were trained with a plain shower curtain drawn all around the pool to prevent any access to distal cues. After the pretraining day with a visible platform, these rats were given four successive trials per day over 6 consecutive days, in which they had to swim to a visible platform. The location of this platform was changed after each trial. This condition prevented, or at least minimized, incidental encoding of spatial information and was used as the control condition for hidden platform groups (Lopez et al., 2012). Finally, in an additional control group, rats kept in their HC ($n_{HC} = 5$) were handled regularly, including the day preceding euthanasia. Three of them were killed at the same time as the rats from the recent memory group (5 d), and 2 HC rats at the same time as the rats from the remote memory group (25 d).

The permanent lesion experiment used 54 rats (22 sham-operated and 32 ReRh lesioned). Rats were trained with the hidden platform over 8 consecutive days and tested in a probe trial assessing either recent memory (5 d postacquisition delay) or remote memory (25 d delay). After elimination of the rats in which the lesion was inappropriate (see Results), the final numbers of rats included in the lesion study were as follows: 5 d delay, $n_{Re/Rh} = 13$, $n_{Sham} = 11$; 25 d delay, $n_{Re/Rh} = 12$, $n_{Sham} = 11$.

Functional reversible inactivation of the ReRh. As previously described (Lopez et al., 2012), 58 implanted rats were habituated to be handled and maintained for drug infusions over 5 consecutive days before water-maze testing. For infusions, needles were slowly inserted into the guide cannula with the tip of the needle protruding 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula. Lidocaine hydrochloride (LIDO, 20 μ g in 0.3 μ l PBS; Sigma) was infused over 60 s; the needle was then left in place for an additional 30 s before its retraction. The choice of LIDO over other possible drugs targeting cell bodies (e.g., muscimol or 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) but not the fibers en passage was based on our quite extensive experience with this drug infused in various brain areas such as the dorsal

and ventral hippocampus and mPFC (Pereira de Vasconcelos et al., 2006; Klur et al., 2009; Lopez et al., 2012; Loureiro et al., 2012). In these experiments, using the 2-deoxyglucose method to map cerebral glucose metabolism (and behavioral evaluations in parallel), we showed that the LIDO diffusion area was mostly confined around the infusion site without any major changes in surrounding or in some distant brain structures (Pereira de Vasconcelos et al., 2006; Lopez et al., 2012). In addition, the use of a drug that does not target a specific neurotransmission system appeared more appropriate to us, because an imbalance between inhibition/excitation in some thalamic nuclei might have side effects other than only inhibition including triggering seizures (Steriade, 2006).

Thus, in the present study, after drug-free training over 8 consecutive days, rats received an intra-ReRh infusion of either LIDO ($n_{LIDO} = 30$) or PBS as a control (same volume, $n_{PBS} = 28$). Rats were returned to their HC until the start of the probe trial, 15 min later. The total number of rats, after elimination of rats in which histological examinations showed evidence of cannula misplacement (seven rats were discarded) was as follows: 5 d delay, $n_{LIDO} = 12$, $n_{PBS} = 13$; 25 d delay, $n_{LIDO} = 12$, $n_{PBS} = 14$.

Additional behavioral tests

One week after water-maze testing, rats with permanent excitotoxic lesions of the ReRh were subjected to additional behavioral tests to assess potential side effects of the lesions that could bias performance in the Morris water-maze task. Thus, these tests aimed at ruling out any non-mnemonic effects of the thalamic lesions on water maze performance. All rats were first subjected to an evaluation of locomotor activity over 24 h in their HC. Then, half of the rats were tested in a plus-maze test and the other half in an open field.

Baseline locomotor activity. As previously described (Lecourtier et al., 2010), locomotor activity was recorded over 24 h. Thus, rats ($n_{Sham} = 22$, $n_{ReRh} = 25$) were brought with their HC to an unfamiliar experimental room. Each cage (eight cages per shelf; 2 \times 4 shelves in the room) was traversed by two infrared light beams perpendicularly to its width, each 4.5 cm above floor level and 28 cm apart along the length of the cage. The number of longitudinal cage crossings (successive beam interruptions) was monitored continuously by a computer, saved in 10 min intervals, and subsequently analyzed in 1 h bins. A cage crossing was scored each time a rat interrupted the two light beams consecutively (and thus went from one extremity of the cage to the other).

Anxiety testing in an elevated plus maze. As previously described (Lecourtier et al., 2010; Loureiro et al., 2012), the elevated plus maze was made of black Plexiglas and consisted of four arms (50 cm long \times 10 cm wide) fixed to a central platform (10 \times 10 cm): two with 40 cm high walls (closed arms) and two with 1.5 cm high borders (open arms). Light adjustments were made to have the same intensity on both open arms (i.e., 10 lux). For testing, rats ($n_{Sham} = 11$, $n_{ReRh} = 12$) were placed individually in the center of the maze, their head facing a closed arm (the same for all rats). The movements of the rats were followed by a computer-based video camera fixed on the ceiling 180 cm above the floor level. The measures were taken over 5 min. An entry in a given arm was counted when the rat had all four paws in the arm. The total number of entries as well as the total time spent in open versus closed arms were recorded and analyzed.

Open-field test. Rats ($n_{Sham} = 11$, $n_{ReRh} = 13$) were tested over a 10 min free exploration period in an open field. The device consisted of a wooden square arena with 43.5 cm high walls and a 65 \times 65 cm floor divided into 25 equal squares (Loureiro et al., 2012). The number of squares crossed and the number of rearings were recorded by an experimenter blind to the treatment conditions.

Histology and NeuN immunohistochemistry for verification of permanent lesion placement/extent, placement of infusion devices, and intraparenchymal LIDO diffusion

Euthanasia and brain processing. All rats were killed and perfused as for c-Fos immunohistochemistry. Their brains were snap frozen in isopentane at -40°C , and kept at -80°C until sectioning (30 μ m thick for lesion and reversible inactivation experiments) using a cryostat (Reichert-Jung Frigocut 2800 Reichert).

Cresyl violet staining. Sections from the region including the ventral midline thalamus were stained with cresyl violet for verification of per-

manent lesion placement and extent or for identification of guide cannula placements and thus infusion site locations.

NeuN immunostaining. To complete the histological characterization of the ReRh lesions, a labeling of the NeuN protein was performed on every other section, and the remaining ones were stained with cresyl violet. The protocol was similar to the one used for *c-Fos* immunohistochemistry using a mouse NeuN antibody (1:2000, ref MAB377; Millipore) as primary antibody, and a biotinylated anti-mouse horse antibody (1:500; Vector Laboratories) as secondary antibody.

Evans blue infusion. As previously described (Loureiro et al., 2012), the area of diffusion of LIDO was estimated in all rats implanted with a cannula. To this end, an indirect method used the intraparenchymal infusion of an Evans blue-containing LIDO solution 15 min before euthanasia. Briefly, Evans blue powder (Merck) was incorporated into a solution of 20 $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$ of LIDO to obtain a final dye dilution of 0.5%. Rats received the mixture of LIDO + Evans blue in the ReRh using the same volume and rate of diffusion as for the behavioral experiments (i.e., 0.3 μl over 60 s plus needle in place 30 s before slow removal). Evans blue produces a red color when excited at 355 nm under a fluorescence microscope, allowing the detection of the dye and its spread around the infusion site (see Fig. 7c) (Loureiro et al., 2012).

Statistical analyses for behavioral tests

For the *c-Fos* experiment, water-maze training performances were evaluated using a two-way ANOVA with Delay (5 d, 25 d) as the between-subject factor and Day (1, 2, ..., 6) as the repeated measure. Probe trial performances were analyzed using a one-way ANOVA considering the Delay (5 d, 25 d) as the factor. We also performed Spearman correlation computations between *c-Fos* expression in the different brain areas and the time spent in the target quadrant during the probe trial.

For the experiments using permanent lesion or reversible functional inactivation of the ReRh, water-maze training performances were evaluated using a three-way ANOVA with Group (Lesion vs Sham or PBS vs LIDO to be administered, depending on the experiment), Delay (5 d, 25 d) as the between-subject factors, and Day (1, 2, ..., 8) as the repeated measure. Probe trial performances were analyzed using a two-way ANOVA with Group and Delay as factors. For the Lesion experiment, we also analyzed the data of the pretraining day in the Morris water maze with a visible platform. To this end, we used a three-way ANOVA with Group (Lesion, Sham) and Delay (5 d, 25 d) as the between-subject factors and Trial (1, 2, 3, 4) as the repeated measure. Open-field and plus-maze data were analyzed using a one-way ANOVA considering Group (Lesion, Sham) as the factor. HC locomotor activity over 24 h was analyzed using a two-way ANOVA with Group (Lesion, Sham) as the between-subject factor and Hour (1, 2, ..., 24) as the repeated measure.

Finally, for all water-maze experiments, probe trial performance analyses were completed by one-sample Student's *t* test to compare the average time spent in the target quadrant in each group to chance level (i.e., 15 s in the target quadrant). For all behavioral experiments, when required, *post hoc* comparisons were done using the Newman–Keuls multiple range test. All analyses considered a value of $p < 0.05$ significant.

Results

Ventral midline thalamus (ReRh) activation coincides with the retrieval of a remote spatial memory, but not with that of a recent one

To evidence a possible role of the ventral midline thalamus in spatial memory, we first assessed expression of the activity-regulated gene *c-Fos* 90 min after the completion of a probe trial in a water-maze task. Indeed, the expression of this immediate early gene is correlated with the level of neuronal activity and can be used to track changes in the organization of memories at different times after learning (Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; Teixeira et al., 2006). Therefore, we first used *c-Fos* immunohistochemistry to evaluate whether the Re and Rh were activated during retrieval of a recent versus remote spatial memory. Rats were trained to find a hidden platform at a fixed location in the pool and memory was assessed in probe trials either 5 d (re-

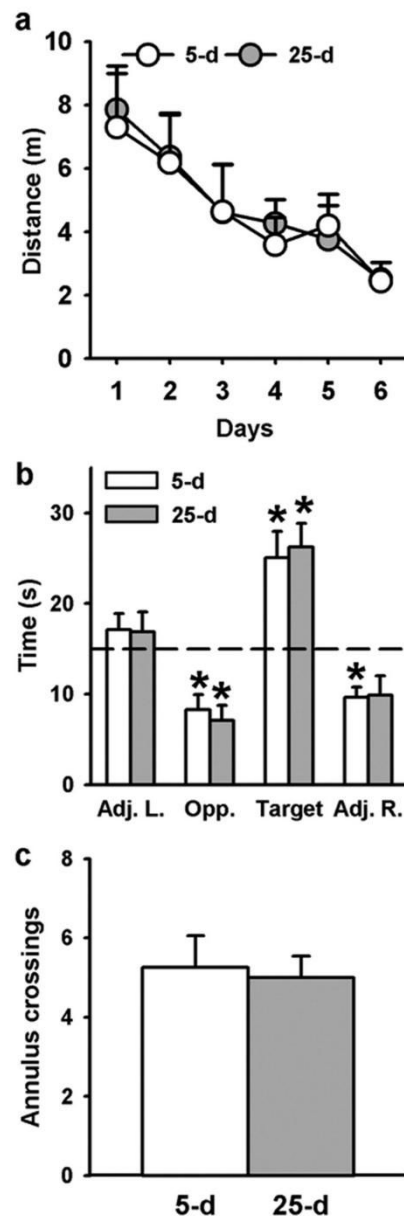


Figure 1. Spatial memory performance during acquisition and retrieval in the water-maze task with a hidden platform. **a**, Average distance (+SEM) to reach the platform during water-maze training in rats subsequently tested for recent (5 d, $n_{5d} = 8$) or remote (25 d, $n_{25d} = 7$) memory retrieval. All rats were subjected to four daily trials over 6 consecutive days. There were no significant differences between the two delay groups. **b**, **c**, Mean performance (+SEM) during probe trials performed 5 d (recent memory) or 25 d (remote memory) after the end of training. Probe trial performance is expressed as the time (in seconds) spent in the four virtual quadrants of the pool (**b**) and the number (+SEM) of crossings over the target area (**c**). The dashed line in **b** represents chance level. Statistics: *Significantly different from chance (i.e., 15 s), $p < 0.05$. All rats remembered the platform location and concentrated their searches in the target quadrant where the platform was located during task acquisition. 5 d, 5 d postacquisition delay; 25 d, 25 d postacquisition delay; Adj. L., quadrant at the left of the target quadrant; Opp., quadrant opposite the target quadrant; Adj. R., quadrant at the right of the target quadrant; Target, quadrant where the platform was located during training.

cent memory) or 25 d (remote memory) later. Over the 6 consecutive days of training in the water maze, the distance to reach the platform decreased progressively over days ($F_{(5,65)} = 16.33$, $p < 0.0001$; Fig. 1a), as well as the time spent swimming near the wall

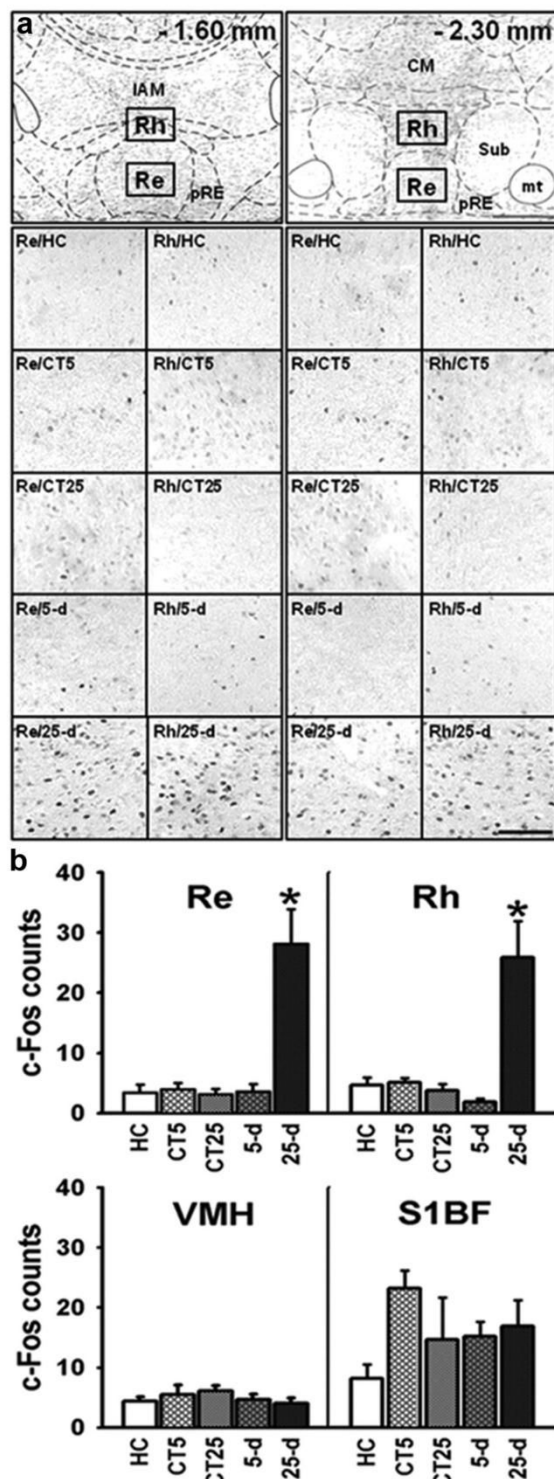


Figure 2. *a*, Coronal sections through the ventral midline thalamus and schematic delimitation of several nuclei therein according to Paxinos and Watson (1998) at two AP levels (top). Typical examples of *c-Fos* expression patterns in the Re and Rh are shown in the photographs (bottom); their location corresponding to the rectangles shown in the top) for the two control conditions (5 d, $n_{HC} = 3$, $n_{CT} = 6$; 25 d, $n_{HC} = 2$, $n_{CT} = 5$) and at the two postacquisition delays for rats trained with the hidden platform in the water maze (5 d, $n_{5d} = 8$; 25 d, $n_{25d} = 7$). CM, central medial thalamic nucleus; CT, curtain; HC, home cage; IAM, interanteromedial thalamic nucleus; mt, mammillothalamic tract; Re, reuniens nucleus; Rh, rhomboid nucleus; Sub, submedius nucleus; pRe, perireuniens; 5 d, 5-day postacquisition delay; 25 d, 25 d postacquisition delay. *b*, Quantification of *c-Fos*-positive nuclei in the two ventral midline thalamic nuclei (Re

(thigmotaxis) ($F_{(5,65)} = 17.06$, $p < 0.0001$, data not shown), reflecting significant learning of the platform's location. There was no significant difference in the distance swum to the platform between recent and remote delay groups and no significant Day \times Delay interaction ($F_{(1,13)} = 0.07$; $F_{(5,65)} = 0.21$, respectively; ns for both). This training schedule produced a stable and long-lasting spatial memory: rats showed a strong bias for the area of the pool where the platform was previously located during training in both recent and remote memory tests. We quantified this spatial bias by measuring the time spent in each of the four quadrants (Fig. 1*b*). The ANOVA showed no significant Group effects whatever the quadrant (Adj. L., $F_{(1,13)} = 0.01$; Opp., $F_{(1,13)} = 0.63$; Target quadrant, $F_{(1,13)} = 0.08$; Adj. R., $F_{(1,13)} = 0.01$). The time spent in the target quadrant was significantly above chance level at both delays ($p < 0.05$ vs chance level), indicating that rats spent more time in the target quadrant, as compared to the three other quadrants, and thus showing a good recall of the platform's location. The time spent in the southeast quadrant (Opp.) in both delay groups as well as the time spent in the quadrant right to the target quadrant (Adj. R.) in the 5 d delay group were significantly below chance level. Analysis of the number of annulus crossings, an index of memory precision, also showed no significant difference between the two delay groups ($F_{(1,13)} = 0.06$; ns) (Fig. 1*c*). Swim speed and thigmotaxis during the probe trial were not significantly different between groups tested at each delay ($F_{(1,13)} = 0.78$ for swim speed; $F_{(1,13)} = 0.12$ for thigmotaxis; ns for both) (data not shown). Thus, these behavioral data pointed to an absence of difference between the 5 and 25 d delay during both acquisition and retention of platform location.

Although performance was similar in the recent and remote memory tests, we found that *c-Fos* expression in the Re and Rh thalamic nuclei was significantly higher after the remote probe trial than after the recent one (Fig. 2). The Group \times Region ANOVA showed significant Group ($F_{(1,104)} = 19.74$, $p < 0.0001$) and Region ($F_{(1,104)} = 16.22$, $p < 0.0001$) effects, and a significant interaction between the two factors ($F_{(1,104)} = 5.10$, $p < 0.0001$). The Group effect was due to a much higher number of *c-Fos*-positive neurons in the 25 d group, as compared to the four other groups (HC, Curtain 5 d, Curtain 25 d, and 5 d). The Region effect can be explained by a much higher overall number of *c-Fos*-positive neurons in the S1BF than in any of the three other regions ($p < 0.0005$ for all) and a lower number of *c-Fos*-positive neurons in the VMH as compared to Rh ($p < 0.05$) and Re ($p = 0.058$) as revealed by the Newman–Keuls multiple range test. The significant interaction between Group and Region was due to a higher number of *c-Fos*-positive neurons in the Re, Rh, and S1BF at the 25 d delay, but also in S1BF of the Curtain 5 d group, as compared to all other groups, whatever the region (Newman–Keuls test: $p < 0.05$ for all comparisons). Most interestingly, the only significant interdelay difference was observed in the Re and Rh; the number of *c-Fos*-positive neurons was much higher at the 25 d than at the 5 d delay (Newman–Keuls test: $p < 0.0005$; Fig. 2*b*). Regression analyses among *c-Fos* expression values in the different structures showed no significant

←

and Rh) and in two control structures, the VMH, and the primary somatosensory cortex (S1BF), under different control conditions (HC, CT5, and CT25) and after recent (5 d) or remote (25 d) memory retrieval in the rats trained with a hidden platform. Data are shown as the mean \pm SEM. Statistics: * $p < 0.001$ versus all other groups. A marked increase in *c-Fos* expression was noticed only in the Re and Rh and after retrieval of a remote spatial memory in the rats trained with the hidden platform as compared to all other groups (HC, CT at both delays, and recent memory). No such increase occurred in the two control structures, i.e., the VMH and S1BF.

correlation, except between Re and Rh ($r = 0.95$, $p < 0.05$). We found no significant correlation between *c-Fos* expression in Re and Rh and behavioral performance during the probe test, whatever the delay ($p > 0.1$ in all cases; ns). Altogether, these results indicate an implication of the ventral midline thalamus in the processing of remote but not recent spatial memory.

ReRh lesion disrupted expression of a remote spatial memory placement and extent of the lesion

Serial sections throughout the thalamus were stained with NeuN to visualize the lesion placement and extent. Lesions were drawn using the relevant plates of the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1998) and replicated on electronic copies of the atlas so that automated pixel counts of the thalamic nuclei in the target regions could be used to estimate lesion extent. Acceptable lesions were defined as having $>50\%$ damage to the Re area and $>25\%$ damage to the perireuniens (pRe) and Rh, but no more than 10% damage to the adjacent thalamic region. According to Groenewegen and Witter (2004), the main mass of the Re is bordered by the so-called pRe. As for the Re, the pRe has connections with limbic structures, particularly the mPFC (Hoover and Vertes, 2012). Figure 3*a* shows the largest and smallest ReRh lesions observed in the rats that were included in the behavioral analyses. Seven ReRh rats (three from the 5 d group, four from the 25 d group) had insufficient damage to the Re area ($<50\%$) and were discarded from the analyses. Final sample sizes were as follows: 5 d group, $n_{\text{ReRh}} = 13$, $n_{\text{Sham}} = 11$; 25 d group, $n_{\text{ReRh}} = 12$, $n_{\text{Sham}} = 11$. No significant differences in the extent of the ReRh lesion were found between the 5 and 25 d delay groups ($F_{(1,23)} = 2.28$ for Re; $F_{(1,23)} = 2.41$ for Rh; ns for both). In the selected 13 ReRh rats of the 5 d delay group, there was a median of 69.68% damage to the Re (range, 52.23–89.38%), 37.7% to the left pRe (range, 31.46–45.29%), 42.2% to the right pRe (range, 29.85–57.56%), and 34.53% damage to the Rh region (range, 25.12–43.94%). In the selected 12 ReRh rats of the 25 d delay group, there was a median of 68.55% damage to the Re (range, 60.19–92.5%), 39.32% to the left pRe (range, 28.28–54.66%), 38.81% to the right pRe (range, 29.80–57.63%), and 35.03% damage to the Rh (range, 27.86–47.67%). Damage to thalamic structures other than ReRh, including midline nuclei, was generally minimal to modest. The median damage was always $<5.0\%$ in both groups for each of the following regions: submedius nucleus, centromedial nucleus, interanteromedial thalamic nucleus, and mediodorsal nucleus (with a maximum value of 9.36 and 9.98% for the submedius nucleus in the 5 d and 25 d delay groups, respectively). So, our lesions were highly specific to the ReRh region, with minimal damage to other adjacent thalamic nuclei and produced through the AP extent, about two-thirds

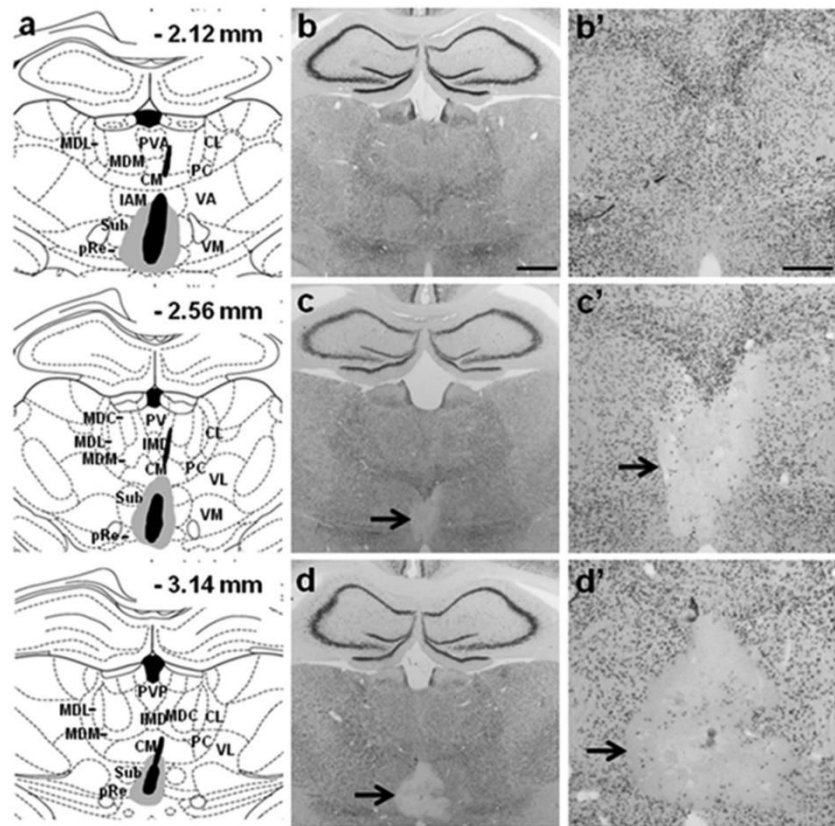


Figure 3. Evaluation of the placement and extent of ReRh lesions. *a*, Schematic representation of the smallest (black, including the visible part of the cannula track) and largest (gray) lesion of the ventral midline thalamic nuclei (Re and Rh) in the rats tested for probe trial performance 5 d (recent memory) or 25 d (remote memory) after the end of acquisition (Fig. 4, behavioral data). The numbers indicate the distance in millimeters from bregma according to Paxinos and Watson (1998). CL, centrolateral thalamic nucleus; CM, central medial thalamic nucleus; IAM, interanteromedial thalamic nucleus; IMD, intermediodorsal thalamic nucleus; MDC, central mediodorsal thalamic nucleus; MDL, lateral mediodorsal thalamic nucleus; MDM, medial mediodorsal thalamic nucleus; PC, paracentral thalamic nucleus; pRe, perireuniens thalamic nucleus; PV, paraventricular thalamic nucleus; PVA, anterior paraventricular thalamic nucleus; PVP, posterior paraventricular thalamic nucleus; Sub, submedius thalamic nucleus; VA, ventral anterior thalamic nucleus; VL, ventrolateral thalamic nucleus; VM, ventromedial thalamic nucleus. *b–d*, Photomicrographs showing typical examples of NeuN immunostained brain sections, from a rat of the Sham group (*b*), from a rat showing a small ReRh lesion (*c*), and from a rat with a large ReRh lesion (*d*). Scale bar, 1 mm. Photomicrographs (*b'–d'*) represent a larger magnification of the region including the Re and Rh as shown in *b–d*, respectively. Scale bar, 500 μm . Black arrows point to the lesion site. One can notice the well delimited lesion circumscribed to the ReRh area with no evident damage to surrounding thalamic nuclei.

and one-third damage of Re and Rh nucleus, respectively. Moreover, incidental unilateral damage—one cannula lowered at an angle—to overlying areas of the ILN and mediodorsal thalamic nuclei, hippocampus, and cortex was also very limited. Therefore, the significant spatial memory impairment in the lesioned rats could be attributed to damage restricted to the ReRh (Fig. 3*a–d*).

ReRh lesion disrupted remote spatial memory performance

To further investigate the role of the ventral midline thalamus in spatial memory processing, we next tested whether a pre-acquisition excitotoxic lesion of the ReRh disrupted the formation and/or expression of a spatial memory. In this experiment, lesioned rats were trained over 8 consecutive days to locate a hidden platform, and then tested in a probe trial either 5 d or 25 d later. Because a ReRh lesion might impact some non-mnemonic aspects of the water-maze task, we first analyzed the performance during the habituation phase (pretraining day), which consisted of four consecutive trials with a visible platform. The distance to

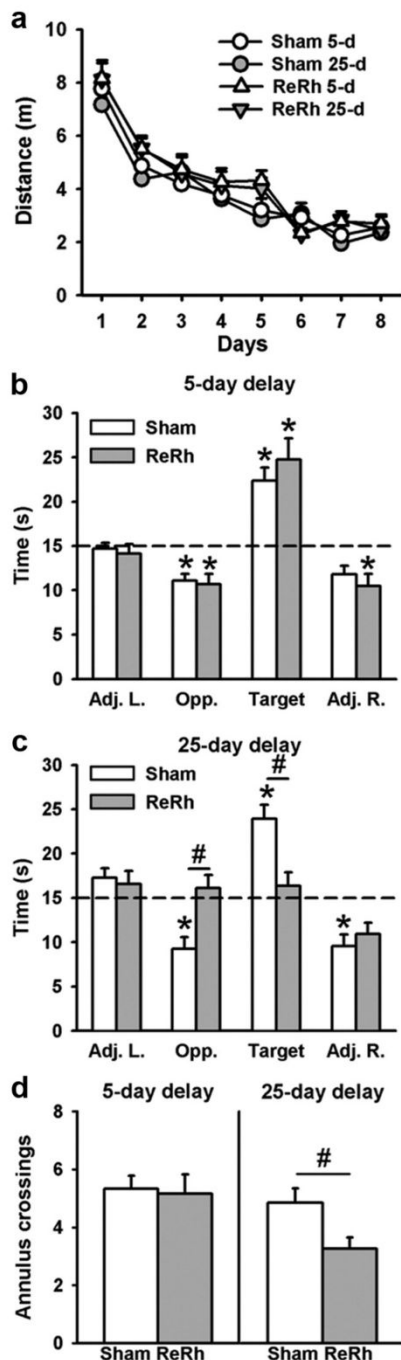


Figure 4. Effects of a pre-acquisition ReRh lesion in spatial memory performance during acquisition and retrieval in the hidden version of the water-maze task. **a**, Average distance (+SEM) to reach the platform during water-maze acquisition in the rats subsequently tested for recent (5 d) or remote (25 d) memory in ReRh and Sham groups. All rats were subjected to four daily training trials over 8 consecutive days. There were no significant differences between the four groups. **b–d**, Mean performance (+SEM) during recent and remote memory probe trials, expressed as the time (in seconds) spent in the four virtual quadrants of the pool (**b, c**) and the number (+SEM) of crossings over the target area (**d**) at the 5 day (left) and 25 day (right) postacquisition delays. The dashed line represents chance level (i.e., 15 s). Statistics: # $p < 0.05$, versus Sham; *significantly different from chance, $p < 0.05$. Sham rats remembered the platform location and concentrated their searches in the target quadrant where the platform was located over training. In contrast, ReRh lesion rats, but only at the 25 day delay, were impaired in spatial exploration. The number of rats was as follows: 5 day delay, $n_{\text{ReRh}} = 13$, $n_{\text{SHAM}} = 11$; 25 d delay, $n_{\text{ReRh}} = 12$, $n_{\text{SHAM}} = 11$. 5 d, 5 d postacquisition delay; 25 d, 25 d postacquisition delay; Adj. L., quadrant at the left of the target quadrant; Opp., quadrant opposite to the

reach the visible platform decreased progressively showing a significant effect of Trial ($F_{(7,301)} = 62.50$, $p < 0.0001$). No effects of the Group (Lesion, Sham) or of the Delay (5 d, 25 d) were observed (Group: $F_{(1,43)} = 1.64$; Delay: $F_{(1,43)} = 0.27$; ns for both) (data not shown). Thus, this cued test, assumed to reflect the occurrence of any gross sensorimotor and/or motivation deficiencies, showed no effect of the ReRh lesion, as previously shown (Dollemann-van der Weel et al., 2009). During training, the distance to reach the platform progressively declined over days ($F_{(7,301)} = 62.50$, $p < 0.0001$) showing progressive learning of the hidden platform location (Fig. 4a). The statistical analysis of the distance traveled by each rat during the acquisition phase also revealed no effect of the Group (Lesion, Sham), the Delay (5 d, 25 d), or the Group \times Delay interaction (Group: $F_{(1,43)} = 1.64$; Delay: $F_{(1,43)} = 0.27$, interaction: $F_{(1,43)} = 0.45$; ns for all). All rats showed a decrease in thigmotactic behavior over days ($F_{(7,301)} = 37.54$, $p < 0.0001$), with no effect of Group or Delay ($F_{(1,43)} = 1.87$ and $F_{(1,43)} = 0.066$, respectively; ns). Thus, a ReRh lesion had no impact on the acquisition of the platform location in the water maze. According to the probe trial performance, for the time spent in the target quadrant (Fig. 4b), there was no significant effect of the Group ($F_{(1,43)} = 1.91$; ns), of the Delay ($F_{(1,43)} = 3.34$; ns), but we found a significant interaction between Delay and Group ($F_{(1,43)} = 7.04$; $p < 0.05$). The interaction effect was due to a significant difference between the two groups (Sham vs Lesion) at the 25 d delay ($p < 0.05$) as revealed by the Newman–Keuls multiple range test. Indeed, at the 25 d delay, rats with a ReRh lesion did not remember the platform location ($p > 0.1$ vs chance level) whereas Sham rats did ($p < 0.001$ vs chance level) (Figs. 4b, 5d). On the opposite, for recent memory, both groups (Sham, Lesion) showed a strong bias for the area of the pool where the platform was previously located during training as shown by the time spent in the Target quadrant ($p < 0.001$ vs chance level for both groups) (Figs. 4b, 5). The statistical analyses for the three other quadrants showed: for the Adj. L. quadrant, a significant effect of the Delay ($F_{(1,43)} = 3.34$, $p < 0.05$), no effect of the Group ($F_{(1,43)} = 0.3$; ns), and no interaction between Delay and Group ($F_{(1,43)} = 0.00$; ns); for the Adj. R. quadrant, no significant effect of the Group, Delay, or interaction between the two factors ($F_{(1,43)} = 0.00$, $F_{(1,43)} = 0.49$, and $F_{(1,43)} = 1.14$, respectively; ns); and for the Opposite quadrant, no significant effect of the Delay ($F_{(1,43)} = 2.14$; ns), but a significant Group effect ($F_{(1,43)} = 6.84$, $p < 0.05$) and a significant Group \times Delay interaction ($F_{(1,43)} = 8.85$, $p < 0.05$). The Group and interaction effects in the Opposite quadrant (southeast quadrant) were due to the fact that in the ReRh group at the 25 d delay, performance was not different from chance (ns). Analysis of the number of annulus crossings confirmed the performance deficits in the ReRh group at the 25 d delay (Fig. 4c). Indeed, the number of crossings showed a significant effect of Delay ($F_{(1,43)} = 6.74$, $p < 0.05$) but no significant effect of the Group nor of the interaction between Group and Delay ($F_{(1,43)} = 3.18$; $F_{(1,43)} = 5.89$; ns for both, respectively). The analysis of the percentage of time spent by the rats inside the corridor corresponding to the Whishaw error before the first target area entrance (Fig. 5a) showed a significant effect of the Group ($F_{(1,43)} = 4.23$, $p < 0.05$), no significant effect of the Delay ($F_{(1,43)} = 1.32$; ns), and a significant interaction between Group and Delay ($F_{(1,43)} = 4.60$, $p < 0.05$). These differences were due to a significantly longer time spent by the 25 d delay group in the corridor of the

target quadrant; Adj. R., quadrant at the right of the target quadrant; Target, quadrant where the platform was located during training.

Whishaw error ($p < 0.05$). The statistical analyses of the distance traveled for the first target area entrance (Fig. 5*b*) showed a significant effect of the Group ($F_{(1,43)} = 4.64$, $p < 0.05$), of the Delay ($F_{(1,43)} = 5.29$, $p < 0.05$), and a significant interaction between the two factors ($F_{(1,43)} = 4.76$, $p < 0.05$). The Newman–Keuls *post hoc* comparisons revealed that these differences were due to a significantly larger distance traveled in the 25 d delay group for the first target zone entrance ($p < 0.05$). Concerning the latency to the first target area entrance (Fig. 5*c*), there were no significant Group, Delay, or a significant interaction between the two factors ($F_{(1,43)} = 0.63$, ns; $F_{(1,43)} = 0.72$, ns; $F_{(1,43)} = 1.66$, ns, respectively). Finally, swim speed and thigmotaxis during the probe trial were not significantly different between groups ($F_{(1,43)} = 0.69$ for swim speed; $F_{(1,43)} = 0.23$ for thigmotaxis; ns for both) and delays ($F_{(1,43)} = 0.55$ for swim speed; $F_{(1,43)} = 0.01$ for thigmotaxis; ns for both), and the Group \times Delay interaction was not significant ($F_{(1,43)} = 0.43$ for swim speed; $F_{(1,43)} = 0.19$ for thigmotaxis; ns for both; data not shown) (Fig. 5*d*, illustration of swim paths showing no evident thigmotactic behavior in ReRh lesioned 25 d delay group). These data suggest no influence on water-maze performance of non-mnemonic factors such as gross sensorimotor, motivation, or anxiety alterations. Thus, all of these behavioral data might point to a specific effect of the ReRh lesions on remote memory, with no effect of such lesions on task acquisition or retrieval of recent memory.

Effects of a ReRh lesion on spatial memory formation were not related to any alteration in anxiety level or locomotor activity

To confirm that the ReRh lesion had no impact on some non-mnemonic effect that could explain the deficits observed at the 25 d delay in the lesioned group, we used more specific and thus more direct behavioral tests targeting anxiety and locomotor activity levels. Thus, in an elevated plus maze, ReRh-lesioned rats did not show any alteration in anxiety-related behavior, as compared to Sham rats. Indeed, no difference between these two groups could be evidenced in the number of entries in open arms and closed arms ($F_{(1,22)} = 1.80$; $F_{(1,22)} = 0.64$, respectively; ns), as well as in the time spent in open arms and closed arms ($F_{(1,22)} = 3.40$; $F_{(1,22)} = 0.55$, respectively; ns) (Fig. 6*a*). Likewise, in the plus maze, locomotor activity, estimated by the total number of arm entries, showed no significant difference between Sham and Lesion rats ($F_{(1,22)} = 0.078$, ns; data not shown). Moreover, in an open-field arena, the number of square crossings and rearings showed no significant effect of the Group (Lesion, Sham) (square crossings: $F_{(1,22)} = 0.55$; rearings: $F_{(1,22)} = 0.54$; ns for both) (Fig. 6*b*). Finally, locomotor activity assessed in HC over 24 h, also showed no significant effects of the Group ($F_{(1,45)} = 0.007$; ns), a significant effect of Hour ($F_{(23,1035)} = 12.86$, $p < 0.001$),

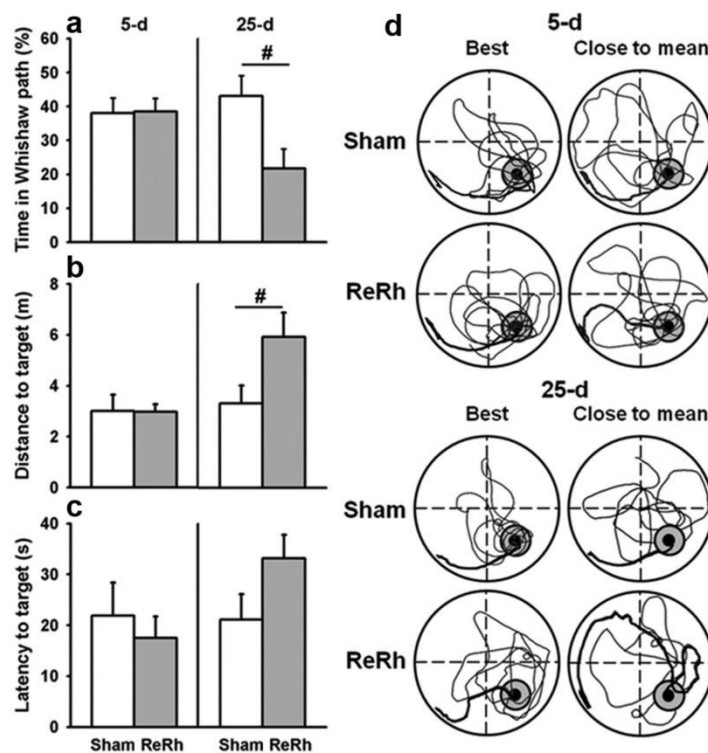


Figure 5. Effects of a pre-acquisition ReRh lesion on spatial memory in the hidden version of the water-maze task. *a–c*, Analyses of the path initially taken by the rats during the probe trial at the 5 d (left) and 25 d (right) postacquisition delays. *a*, Time in the Whishaw error path corresponds to the percentage time (+SEM) spent by the rat inside a corridor (width: 18 cm, from the start point to the former location of the platform) before its first entry in the target area. *b*, Average distance (+SEM) for the first entry in the target area. *c*, Latency to the first target area crossing. [#] $p < 0.05$. *d*, Examples of detailed swim paths during each probe trial from a rat showing the best performance, i.e., highest percentage of time spent in the target quadrant (left) and from a rat showing performance close to the mean (right) for each group at each delay (5 d, recent memory; 25 d, remote memory). Paths initially taken by rats are in bold. Note that, except for the 25 d delay ReRh lesion “close to mean” group, all swim paths showed that rats were spending significantly more time in the target quadrant versus the three other ones and thus, remembered the platform location.

but no significant interaction between the two factors ($F_{(23,1035)} = 0.35$; ns). Hour effect was due to an increased activity during the nocturnal period in both groups (Fig. 6*c*). These latter data showing no effects of the ReRh lesion on locomotor activity are in accordance with Prasad et al. (2012).

Reversible inactivation of the ReRh had no impact on retrieval of a recent or remote spatial memory in rats having acquired the task with an intact thalamus

During the probe trial performed at the 25 d delay, we found memory deficits in the rats subjected to ReRh lesions. These deficits could be the consequence of alterations of long-term consolidation and/or of retrieval of remote memory. Therefore, we next asked whether functional reversible inactivation during the probe trial would impair performance in rats having learned the location of a hidden platform without any prior treatment. To this end, we infused LIDO or PBS (control) 15 min before the probe trial, which occurred either 5 d or 25 d after the end of acquisition. For indications on cannula placement and drug diffusion, see Figure 7. Our behavioral data showed that during acquisition, the four groups improved over days (Fig. 8*a*; $F_{(7,329)} = 55.98$, $p < 0.0001$) and no significant between-Group and Delay differences in the distance to reach the platform were observed (Group: $F_{(1,47)} = 1.89$; Delay: $F_{(1,47)} = 0.00$; ns for both); there was no Delay \times Group \times Day interaction ($F_{(7,329)} = 0.65$; ns). Thigmot-

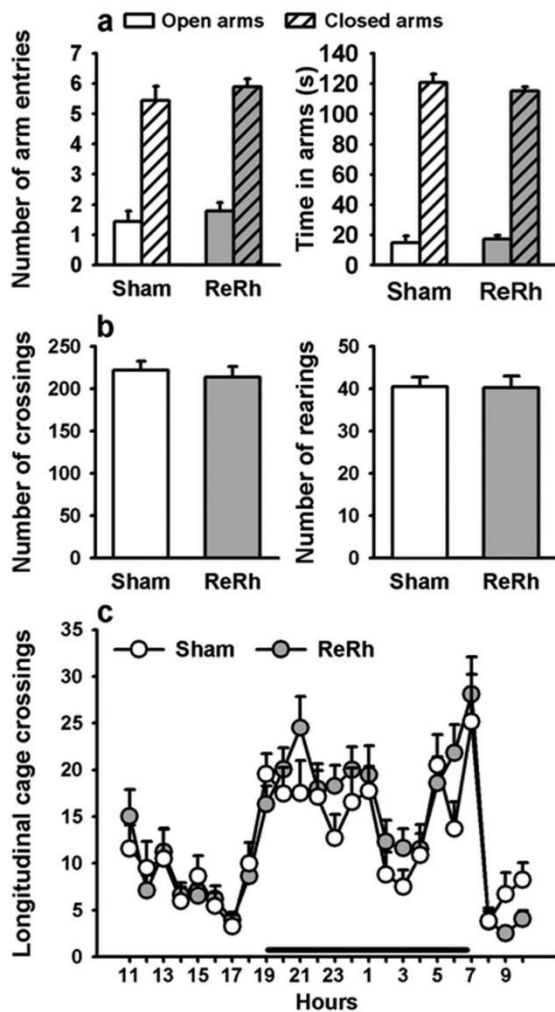


Figure 6. Effects of a ReRh lesion on anxiety and locomotor activity. *a*, In the plus maze, the total number of open- and closed-arm entries (left), as well as the total time spent in open- and closed-arms (right) did not differ among the two groups. Thus, the thalamic lesion did not affect anxiety-related behavior ($n_{\text{SHAM}} = 11, n_{\text{Re/Rh}} = 12$). *b*, In the open-field test, the ReRh lesion did not affect locomotor activity (number of square crossings, left) or number of rearings (right) ($n_{\text{SHAM}} = 11, n_{\text{Re/Rh}} = 13$). *c*, HC locomotor activity over a 24 h period also failed to detect lesion effects on the total number of longitudinal cage crossings during both the light and dark periods. The black horizontal line above the x-axis indicates the duration of the dark period ($n_{\text{SHAM}} = 22, n_{\text{Re/Rh}} = 25$).

actic behavior decreased in all rats over days ($F_{(7,329)} = 33.28, p < 0.0001$), with no effect of the Group or Delay ($F_{(1,47)} = 0.50, F_{(1,47)} = 0.55$, respectively; ns) (data not shown). According to the probe trial performance, for the time spent in the target quadrant (Fig. 8*b*), there was no significant effect of Group ($F_{(1,47)} = 0.43$; ns). We found a significant effect of Delay ($F_{(1,47)} = 6.63, p < 0.05$) but no interaction between Delay and Group ($F_{(1,47)} = 0.53$; ns). The Delay effect was due to a significant decrease in performance at the 25 d delay in both LIDO and PBS rats as compared to the 5 d delay ($p < 0.05$). At both delays and for both groups, however, performances were significantly above chance level ($p < 0.05$ for all), and the significant bias for the area of the pool where the platform was previously located during training attested for memory of the platform location in all treatment groups. The statistical analyses of the three other quadrants showed the following: for the Adj. L. quadrant, a significant effect of the Delay ($F_{(1,47)} = 4.75, p < 0.05$) but no effect

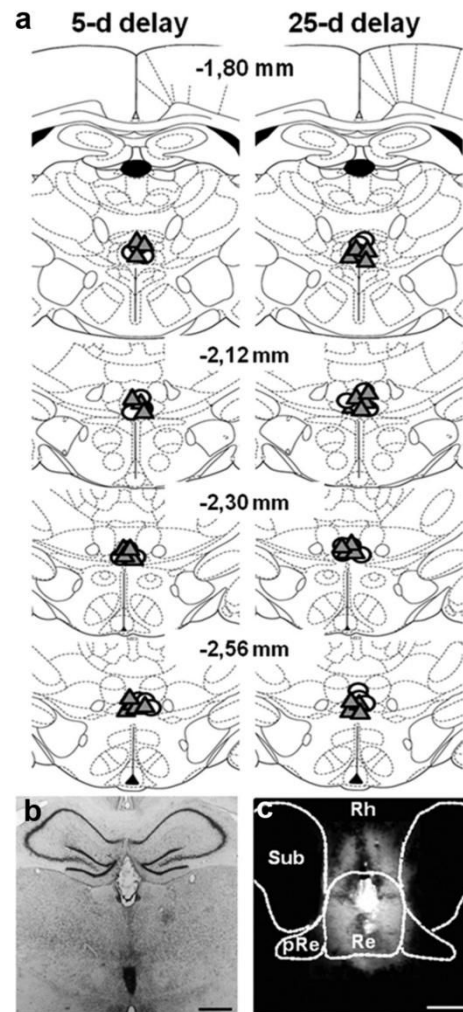


Figure 7. *a*, Schematic representation of the infusion sites on coronal sections through the midline thalamus in rats subjected to PBS or LIDO infusions before the probe trial. Behavioral performances are shown in Figure 8. Coordinates are given in millimeters from bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each infusion site is represented by open circles (PBS) or gray triangles (LIDO), the center of which corresponds to the location of the tip of the infusion needle. *b*, Photomicrograph showing a representative location of the infusion site on a brain section stained with cresyl violet. Scale bar, 1 mm. *c*, Distribution of Evans blue 10 min after the infusion of a LIDO solution containing 0.5% of the dye into the ReRh. Scale bar, 500 μm . The diffusion area appears in red under a fluorescence microscope (excitation 355 nm). Dashed lines delineate the limits of the reuniens nucleus (Re), submedius nucleus (Sub), and perireuniens (pRe). Rh, rhomboid nucleus.

of the Group ($F_{(1,47)} = 0.19$; ns) and no Group \times Delay interaction ($F_{(1,47)} = 1.14$; ns); for the Adj. R. quadrant, no significant effect of the Treatment, Delay, or the interaction between the two factors ($F_{(1,47)} = 0.52, F_{(1,47)} = 1.20, F_{(1,47)} = 1.20$, respectively; ns); for the Opposite quadrant, no significant effect of the Delay ($F_{(1,47)} = 3.27$; ns), Group ($F_{(1,47)} = 0.75, p < 0.1$; ns), or the Group \times Delay interaction ($F_{(1,47)} = 0.56, p < 0.1$; ns). The significant preference for the target quadrant was confirmed by the analysis of the number of annulus crossings, which showed a significant effect of the Delay ($F_{(1,47)} = 11.32, p < 0.05$) but no significant Group effect ($F_{(1,47)} = 2.01$; ns) and no interaction between Delay and Group ($F_{(1,47)} = 0.53$; ns) (Fig. 8*c*). As for the time spent in the target quadrant, the delay effect was due to a decrease in performance for both LIDO and PBS rats at the 25 d delay, as compared to the performance found at

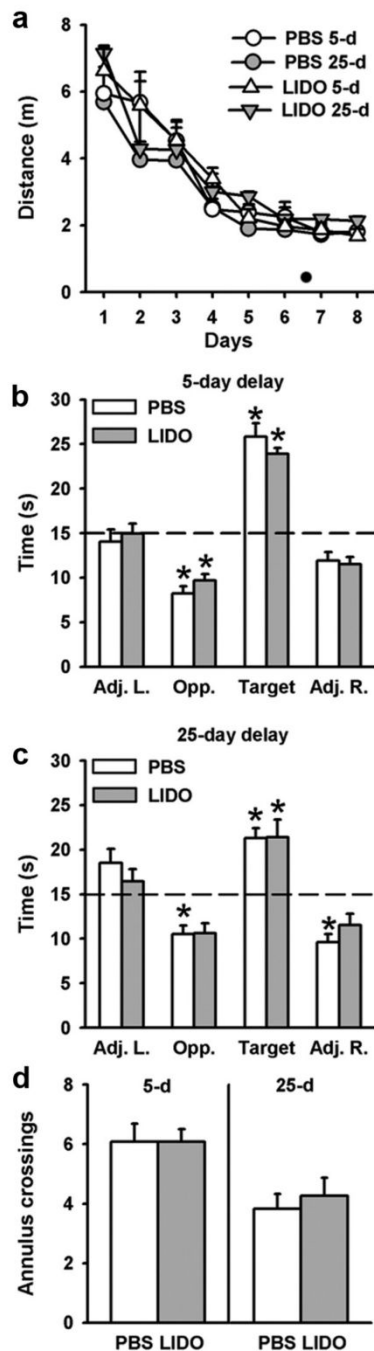


Figure 8. Effects of ReRh-reversible LIDO inactivation on spatial memory in the hidden version of the water-maze task. *a*, Drug-free acquisition expressed as average distance to reach the platform (+ SEM) in the rats that were subsequently tested for recent (5 d) or remote (25 d) memory after bilateral LIDO or vehicle (PBS) infusions into the ReRh. All rats were subjected to four daily trials over 8 consecutive days. There were no significant differences among the four groups. *b–d*, Mean performance (+ SEM) during recent and remote memory probe trials in PBS and LIDO groups, expressed as the time (in seconds) spent in the four quadrants of the pool (*b*, *c*) and the number of crossings in the target area (*d*), at the 5 (left) and 25 day (right) postacquisition delays. The dashed line represents chance level (i.e., 15 s). Statistics: *Significantly different from chance, $p < 0.05$. All rats (LIDO and PBS) remembered the platform location and concentrated their searches in the target quadrant where the platform was located during acquisition. At the 25 d delay, searches for the platform were less precise than at the 5 day delay, but there was no difference between PBS and LIDO rats. The number of rats was as follows: 5 day delay ($n_{\text{PBS}} = 13$, $n_{\text{LIDO}} = 12$) and 25 d delay ($n_{\text{PBS}} = 14$, $n_{\text{LIDO}} = 12$). LIDO, lidocaine; PBS, phosphate buffer saline; 5 d, 5-d postacquisition delay; 25 d, 25 d postacquisition delay; Adj. L.,

the 5 d delay. However, *post hoc* comparisons revealed that those differences were not significant. Swim speed and thigmotaxis were not significantly affected by ReRh inactivation ($F_{(1,47)} = 0.01$ for swim speed; $F_{(1,47)} = 0.81$ for thigmotaxis; ns for both), by Delay ($F_{(1,47)} = 1.29$ for swim speed; $F_{(1,47)} = 0.27$ for thigmotaxis; ns for both), or by the interaction between these two factors, Group \times Delay ($F_{(1,47)} = 0.01$ for swim speed; $F_{(1,47)} = 0.11$ for thigmotaxis; ns for both) (data not shown). Thus, these behavioral data showed an absence of effect of ReRh functional inactivation during the probe trial, whatever the postacquisition delay. This points to a nonessential role of those nuclei for spatial memory retrieval per se, although, based on our imaging data, ReRh nuclei appeared to be activated during the retrieval of a remote memory.

Discussion

The present study shows, for the first time and in a water maze, a specific implication of the ReRh thalamic nuclei in memory persistence. *c-Fos* expression was increased in the ReRh during remote but not recent memory retrieval. Excitotoxic ReRh lesions, which prevented neither task acquisition nor recent memory recall, impaired remote memory performance in the probe trial. Behaviors such as locomotor activity or those related to anxiety were not altered by the lesion. Finally, after drug-free acquisition, reversible ReRh inactivation had no impact on retrieval performance, whatever the delay. The discordance between the effects of pre-acquisition thalamic lesion and of reversible inactivation at the 25 d postacquisition delay points to a contribution of the ventral midline thalamus in the establishment of a remote spatial memory. In addition, the increase in *c-Fos* expression in ReRh at the 25 d delay, contrasting with the absence of inactivation effects during retrieval, reinforces the idea of a possible role of these thalamic nuclei in remote memory consolidation, most probably via a functional participation in a neuronal network that includes at least the hippocampus and the mPFC (Lopez et al., 2012).

The ventral midline thalamus and memory

Evidence of a thalamic contribution to memory functions exists in patients with diencephalic damage (Van der Werf et al., 2003a,b). Although some neuropsychological symptoms of diencephalic amnesia are akin to those of temporal lobe damage, and others resemble deficits characteristic of PFC dysfunctions (Van der Werf et al., 2000, 2003a; Aggleton, 2008), the contribution of the thalamic subregions to memory awaits further clarification. Thalamic nuclei best known to participate in memory are the anterior thalamus and the medial thalamus, including ILN and mediodorsal nuclei. Interestingly, the former is highly connected with the hippocampus, while the latter has major connections with the PFC (Van der Werf et al., 2003a,b). Considering the key position of the ReRh nuclei at the interface between the hippocampus and the mPFC (Hoover and Vertes, 2012), the relatively small number of studies that paid attention to their functional implications remains surprising. Dolleman-van der Weel et al. (2009) showed in rats that Re lesions did not prevent water-maze acquisition, but impaired performance in a delayed (24 h) probe trial. This impairment was attributed to a too rapid shift of strategy after an initial search oriented toward the correct quadrant, possibly as a consequence of maladaptations to envi-

←
quadrant at the left of the target quadrant; Opp., quadrant opposite to the target quadrant; Adj. R., quadrant at the right of the target quadrant; Target, quadrant where the platform was located during training.

ronmental constraints or of mPFC dysfunction. Our results showing no effect of the ReRh lesion on recent memory retention appear contradictory. However, the results of Dolleman-van der Weel et al. (2009) show that the rats with ReRh lesions performed above chance level, and thus remembered the platform location. Another study assessed reference and working memory performance in a water maze after ReRh inactivation, but conclusions were unclear as controls did not remember the platform location (Davoodi et al., 2009). Hembrook et al. (2012) reported that lesions or functional inactivation of the ReRh altered performance in spatial working memory tasks requiring an interaction between the hippocampus and the mPFC, while memory performance in tasks requiring only one of these structures was normal (Hembrook and Mair, 2011). Likewise, high-frequency stimulation of the Re in mice impaired normal acquisition of trace eyeblink conditioning and object recognition, which both involve the hippocampus and mPFC (Eleore et al., 2011). Thus, our present data showing a specific effect of the ReRh lesion on remote spatial memory (Figs. 4, 5), which, at the system level, depends on coordinated interactions between the hippocampus and mPFC (Frankland and Bontempi, 2005; Winocur et al., 2010), are in line with a potential role of these thalamic nuclei in the formation of remote memories.

The ventral midline thalamus: a key relay for hippocampocortical interactions?

The memory impairment found in the present study might be explained by a disconnection of the hippocampus from the mPFC. There are no direct projections from the mPFC to the hippocampus (Vertes, 2004). On the contrary, there is a direct unilateral pathway connecting the hippocampus to the mPFC via CA1 and the subiculum and terminating in the prelimbic cortex (Thierry et al., 2000). Anatomical and electrophysiological data support the idea of a major role of the ReRh in the information flow between the hippocampus and the mPFC (Vertes, 2006; Vertes et al., 2007; Hoover and Vertes, 2012). Indeed, the Re densely projects to the mPFC, ventral CA1, and subiculum. The Rh also innervates these areas and additionally has connections with other cortices (e.g., sensorimotor), the ventral striatum, and the amygdala (Su and Bentivoglio, 1990; Dolleman-Van Der Weel and Witter, 1996; Vertes et al., 2006). Recently, Hoover and Vertes (2012) showed that a significant proportion of Re neurons project to both structures via axon collaterals, placing the Re at a critical position to influence the hippocampus and mPFC. Interestingly, stimulations of ReRh excite neurons in CA1 but also hippocampal projections to the mPFC (Dolleman-Van der Weel et al., 1997; Bertram and Zhang, 1999; di Prisco and Vertes, 2006), demonstrating that ReRh nuclei may functionally influence hippocampal projections to mPFC (Vertes, 2006; Vertes et al., 2007). The present study extends the findings reported by Hembrook et al. (Hembrook and Mair, 2011; Hembrook et al., 2012) about the specific role of the ReRh in behavioral tasks depending upon hippocampo-mPFC interactions to the consolidation of a spatial memory at the system level. Indeed, we, as other authors, previously showed that remote spatial memory retrieval in a water maze required the hippocampus and the mPFC, while recent memory retrieval was possible with only the hippocampus (Clark et al., 2005; Broadbent et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Wiltgen et al., 2010; Lopez et al., 2012). According to the main system consolidation theories (i.e., standard and multiple trace), a memory trace is initially encoded within hippocampal-neocortical networks and, over

time, is progressively consolidated in cortical networks. This process requires repeated and coordinated reactivation of hippocampocortical networks to increase the strength and stability of corticocortical connections (Frankland and Bontempi, 2005; Winocur et al., 2010). The mPFC appears to play a prominent role in these processes (Frankland and Bontempi, 2005). Thus, considering (1) our *c-Fos* data indicating an ReRh activation for the retrieval of a remote memory, (2) normal recent and remote memory performance despite the inactivation of the ReRh, and (3) ReRh lesion-induced alteration of only remote memory performance, the hypothesis of a specific role of the ReRh nuclei in the consolidation of a spatial memory at the system level appears highly plausible. Given the neuroanatomical evidence, these nuclei are in a key position to influence the hippocampocortical interactions leading to the reorganization of a memory trace from its initial stage of hippocampo dependency to its final stage involving (also) neocortical modules. The high *c-Fos* expression in the ReRh after retrieval of a remote memory suggests that those thalamic nuclei may participate in the reactivation of hippocampo-neocortical interactions required for remote memory retrieval. The absence of inactivation effects on this retrieval, however, indicates that this participation is not crucial, or it could alternatively be the result of less complete activity suppression in the ReRh than after the lesions.

Toward a role of the “nonspecific” thalamus in memory consolidation at the system level

The results of the present study may be compared to those obtained after lesions of the ILN/lateral thalamic (LT) nuclei (Lopez et al., 2009). Indeed, in a similar water-maze task, the pre-acquisition lesion of the ILN/LT had no impact on either acquisition or retrieval of a spatial memory tested at a 5 d delay, but prevented retrieval at 25 d. This suggests a key role of the ILN/LT and the ventral midline thalamus (the present study) within an extrahippocampal network critically involved in the time-dependent reorganization of a spatial memory. These two sets of thalamic nuclei, which belong to the nonspecific thalamus, (1) send relatively diffuse projections to superficial cortical areas, (2) are involved in cortical synchronous activity via thalamocortical and corticothalamic relay cells, and thus, (3) are able to activate one or more cortical neural assemblies (Miller, 1996; Jones, 2001; Llinás and Steriade, 2006). In the context of memory formation, cortical neuronal assemblies have been proposed as the substrate for the consolidated memories resulting from hippocampocortical as well as corticocortical reactivation/replay sequences, temporally linked and mostly occurring during sleep (Hebb, 1949; Sirota et al., 2003; Battaglia et al., 2011). Our data clearly and for the first time demonstrate that the “nonspecific thalamus,” which plays a key role in cortical arousal, awareness, and motivation, particularly via its strong projections to the mPFC and anterior cingulate cortex (Van der Werf et al., 2002; Llinás and Steriade, 2006), actively participates in processes underlying the long-term consolidation of a memory. This most probably occurs via its involvement in the hippocampocortical and corticocortical dialog necessary to the progressive reorganization of a memory trace at the system level.

References

- Aggleton JP (2008) EPS Mid-Career Award 2006. Understanding anterograde amnesia: disconnections and hidden lesions. *Q J Exp Psychol* 61:1441–1471.
- Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the

- hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22:425–444; discussion 444–489.
- Aggleton JP, Dumont JR, Warburton EC (2011) Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: a review. *Learn Mem* 18:384–400.
- Battaglia FP, Benchenane K, Sirota A, Pennartz CMA, Wiener SI (2011) The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn Neurosci* 15:310–318.
- Bertram EH, Zhang DX (1999) Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92:15–26.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13:187–191.
- Carlesimo GA, Costa A, Serra L, Bozzali M, Fadda L, Caltagirone C (2011) Prospective memory in thalamic amnesia. *Neuropsychologia* 49:2199–2208.
- Cavdar S, Onat FY, Cakmak YO, Yananli HR, Gülçebi M, Aker R (2008) The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reuniens nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat. *J Anat* 212:249–256.
- Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005) Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15:260–272.
- Davoodi FG, Motamedi F, Naghdi N, Akbari E (2009) Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on spatial learning and memory in rats using Morris water maze task. *Behav Brain Res* 198:130–135.
- Di Prisco GV, Vertes RP (2006) Excitatory actions of the ventral midline thalamus (Rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60:45–55.
- Dolleman-Van Der Weel MJ, Witter MP (1996) Projections from the nucleus reuniens thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. *J Comp Neurol* 364:637–650.
- Dolleman-Van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP (1997) Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J Neurosci* 17:5640–5650.
- Dolleman-van der Weel MJ, Morris RG, Witter MP (2009) Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Struct Funct* 213:329–342.
- Eleore L, López-Ramos JC, Guerra-Narbone R, Delgado-García JM (2011) Role of reuniens nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. *PLoS One* 6:e23538.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130.
- Frankland PW, Bontempi B, Tolton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304:881–883.
- Gold JJ, Squire LR (2006) The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learn Mem* 13:699–710.
- Groenewegen HJ, Witter MP (2004) Thalamus. In: *The rat nervous system*, Ed 3 (Paxinos G, ed), pp 407–453. San Diego: Academic.
- Hebb D (1949) *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. Wiley, New York.
- Hembrook JR, Mair RG (2011) Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21:815–826.
- Hembrook JR, Onos KD, Mair RG (2012) Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the Rat. *Hippocampus* 22:853–860.
- Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct* 217:191–209.
- Jones EG (2001) The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci* 24:595–601.
- Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani R, Certa U, Cassel JC (2009) Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in Rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* 19:800–816.
- Kopelman MD (2002) Disorders of memory. *Brain* 125:2152–2190.
- Lecourtier L, Pereira de Vasconcelos AP, Cosquer B, Cassel JC (2010) Combined lesions of GABAergic and cholinergic septal neurons increase locomotor activity and potentiate the locomotor response to amphetamine. *Behav Brain Res* 213:175–182.
- Llinás RL, Steriade M (2006) Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol* 95:3297–3308.
- Lopez J, Wolff M, Lecourtier L, Cosquer B, Bontempi B, Dalrymple-Alford J, Cassel JC (2009) The intralaminar thalamic nuclei contribute to remote spatial memory. *J Neurosci* 29:3302–3306.
- Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos AP (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22:827–841.
- Loureiro M, Lecourtier L, Engeln M, Lopez J, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A (2012) The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct Funct* 217:93–106.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96–99.
- McKenna JT, Vertes RP (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol* 480:115–142.
- Miller R (1996) Neural assemblies and laminar interactions in the cerebral cortex. *Biol Cybern* 75:253–261.
- Nadel L, Hardt O (2011) Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology Rev* 36:251–273.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Ed 4. San Diego: Academic.
- Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, Cosquer B, Lopez J, Certa U, Cassel JC (2006) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: A comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the Rat. *Neuroscience* 141:1649–1663.
- Prasad JA, Macgregor EM, Chudasama Y (2012) Lesions of the thalamic reuniens cause impulsive but not compulsive responses. *Brain Struct Funct*. Advance online publication. Retrieved January 24, 2012. doi: 10.1007/s00429-012-0378-5.
- Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsáki G (2003) Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2065–2069.
- Squire LR (2009) The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron* 61:6–9.
- Steriade M (2006) Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* 137:1087–1106.
- Su HS, Bentivoglio M (1990) Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 297:582–593.
- Sutherland RJ, Sparks FT, Lehmann H (2010) Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model: a modest proposal for the situation of systems consolidation. *Neuropsychologia* 48:2357–2369.
- Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* 26:7555–7564.
- Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampal-prefrontal pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411–419.
- Van der Werf YD, Witter MP, Uylings HB, Jolles J (2000) Neuropsychology of infarctions in the thalamus: a review. *Neuropsychologia* 38:613–627.
- Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res Rev* 39:107–140.
- Van der Werf YD, Jolles J, Witter MP, Uylings HB (2003a) Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex* 39:1047–1062.
- Van der Werf YD, Scheltens P, Lindeboom J, Witter MP, Uylings HB, Jolles J (2003b) Deficits of memory, executive functioning and attention following infarction in the thalamus; a study of 22 cases with localised lesions. *Neuropsychologia* 41:1330–1344.

- Vertes RP (2002) Analysis of the projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J Comp Neurol* 442:163–187.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20.
- Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ (2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the Rat. *J Comp Neurol* 499:768–796.
- Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C (2007) Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull* 71:601–609.
- Whishaw IQ (1985) Cholinergic receptor blockade in the Rat impairs locale but not taxon strategies for place navigation in a swimming pool. *Behav Neurosci* 99:979–1005.
- Wiltgen BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, Li W, Silva AJ (2010) The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr Biol* 20:1336–1344.
- Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B (2010) Memory formation and long-term retention in humans and animals: convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2339–2356.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP (1990) Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296:179–203.

PUBLICATION 2

PUBLICATION 2

LES NOYAUX VENTRAUX DE LA LIGNE MEDIANE DU THALAMUS CONTRIBUENT AU CHANGEMENT DE STRATEGIE DANS UNE TACHE MNESIQUE NECESSITANT A LA FOIS LE CORTEX PREFRONTAL ET L'HIPPOCAMPE

Cette seconde publication avait pour objectif d'étudier le rôle des noyaux ReRh du thalamus dans une tâche nécessitant une flexibilité comportementale lors du test de rappel d'une mémoire spatiale récente (24h). Un nouveau test spatial élaboré et validé au laboratoire, le labyrinthe en Double-H (DH), permet d'étudier la mémoire allocentrique, la mémoire égocentrique et/ou la capacité de passer de l'une à l'autre en cours de tâche (changement de stratégie). Dans différents groupes d'animaux, les rats sont implantés avec des guide-canules dans les noyaux ReRh, l'hippocampe dorsal (dHip) ou le cortex préfrontal médian (mPFC), de manière à pouvoir inactiver la structure cible juste avant le test de rétention, pour évaluer l'implication de chacune de ces structures dans le rappel à 24h après 2 ou 4 jours d'acquisition. L'inactivation est réalisée à l'aide de Muscimol (deux doses ont été utilisées : 0.26 et 0.70 nmol). D'après la littérature, le dHip joue un rôle majeur dans la navigation spatiale, et le mPFC est impliqué dans le changement de stratégie ; ces deux structures seraient donc nécessaires dans la tâche mise en place dans le DH. En effet, l'inactivation du dHip ou du mPFC altère les performances de rappel dans ce test ; il en va de même de celle des noyaux ReRh du thalamus. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus à la suite de l'inactivation de chacune de ces régions cérébrales juste avant un test de rétention à 24h dans la piscine de Morris (selon un protocole de mémoire de référence). Dans ce cas, seule l'inactivation du dHip empêche le rappel ; l'inactivation du mPFC n'altère pas les performances. L'inactivation des noyaux ReRh affecte les performances de rappel dans la piscine de Morris (qui sont inférieures aux animaux Sham), mais sans l'empêcher (les performances restent significativement au-dessus du hasard). Ces résultats confirment que le rappel d'une information spatiale dans une situation nécessitant de faire preuve de flexibilité comportementale implique à la fois l'Hip et le mPFC, et suggèrent la participation des noyaux ReRh dans ce processus mnésique qui engage de manière conjointe ces deux structures.

8772 • The Journal of Neuroscience, May 15, 2013 • 33(20):8772–8783

Behavioral/Cognitive

The Ventral Midline Thalamus Contributes to Strategy Shifting in a Memory Task Requiring Both Prefrontal Cortical and Hippocampal Functions

Thibault Cholvin,* Michaël Loureiro,* Raphaëlle Cassel,* Brigitte Cosquer, Karine Geiger, David De Sa Nogueira, Hélène Raingard, Laura Robelin, Christian Kelche, Anne Pereira de Vasconcelos, and Jean-Christophe Cassel

Laboratory of Cognitive and Adaptive Neurosciences, UMR 7364, University of Strasbourg–National Center of Scientific Research (CNRS), Federal Research Institute 37 of Neurosciences, CNRS Research Group 2905, Faculty of Psychology, F-67000 Strasbourg, France

Electrophysiological and neuroanatomical evidence for reciprocal connections with the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus make the reuniens and rhomboid (ReRh) thalamic nuclei a putatively major functional link for regulations of cortico-hippocampal interactions. In a first experiment using a new water escape device for rodents, the double-H maze, we demonstrated in rats that a bilateral muscimol (MSCI) inactivation (0.70 vs 0.26 and 0 nmol) of the mPFC or dorsal hippocampus (dHip) induces major deficits in a strategy shifting/spatial memory retrieval task. By way of comparison, only dHip inactivation impaired recall in a classical spatial memory task in the Morris water maze. In the second experiment, we showed that ReRh inactivation using 0.70 nmol of MSCI, which reduced performance without obliterating memory retrieval in the water maze, produces an as large strategy shifting/memory retrieval deficit as mPFC or dHip inactivation in the double-H maze. Thus, behavioral adaptations to task contingency modifications requiring a shift toward the use of a memory for place might operate in a distributed circuit encompassing the mPFC (as the potential set-shifting structure), the hippocampus (as the spatial memory substrate), and the ventral midline thalamus, and therein the ReRh (as the coordinator of this processing). The results of the current experiments provide a significant extension of our understanding of the involvement of ventral midline thalamic nuclei in cognitive processes: they point to a role of the ReRh in strategy shifting in a memory task requiring cortical and hippocampal functions and further elucidate the functional system underlying behavioral flexibility.

Introduction

Diencephalic lesions induce cognitive symptoms reminiscent of those of hippocampal amnesia or prefrontal dysfunctions (Van der Werf et al., 2003; Aggleton et al., 2011; Carlesimo et al., 2011). Experiments in animals suggest that damage to intralaminar and/or anterior thalamic nuclei take part in such effects (Aggleton and Brown, 1999; Gold and Squire, 2006) and that intralaminar or ventral midline thalamic nuclei contribute to spatial memory persistence (Lopez et al., 2009; Loureiro et al., 2012). Anatomical and electrophysiological evidence points to a role of the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei in the information flow between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (Vertes, 2006; Vertes et al., 2007; Hoover and Vertes,

2012). Although the Re projects to the mPFC, ventral CA1, and subiculum, the Rh has additional connections with other cortices, ventral striatum, and amygdala (Su and Bentivoglio, 1990; Dolleman-Van der Weel and Witter, 1996; Vertes et al., 2006; Xu and Südhof, 2013). Recently, Hoover and Vertes (2012) described Re neurons projecting to both structures via axon collaterals, placing the Re at a hub position between the mPFC and the hippocampus. Hembrook and colleagues (Hembrook and Mair, 2011; Hembrook et al., 2012) demonstrated a specific involvement of ReRh in cognitive tasks requiring interactions between the two aforementioned structures but not in those requiring only one of them. Xu and Südhof (2013) found a role of the Re in fear memory generalization. We recently found that reversible inactivation of the ReRh had no influence on recent memory retrieval in the water maze, a typical hippocampus-dependent task (Loureiro et al., 2012). The mPFC has a crucial role in executive functions, behavioral flexibility, and strategy shifting (Ragozzino et al., 2003; Floresco et al., 2008). We therefore hypothesized that, in a task requiring both memory for location and strategy selection/shifting, and thus cortico-hippocampal contributions, rats subjected to inactivation of the ReRh might be impaired but retain the capacity to perform on a typical spatial navigation task. Using a novel testing device, the double-H maze (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012), we designed a training protocol in which rats used two learned escape response sequences (right–left or left–left turns) according to where they

Received Feb. 20, 2013; revised April 4, 2013; accepted April 6, 2013.

Author contributions: A.P.d.V. and J.-C.C. designed research; T.C., M.L., R.C., B.C., K.G., D.D.S.N., H.R., L.R., and J.-C.C. performed research; C.K. contributed unpublished reagents/analytic tools; T.C., M.L., A.P.d.V., and J.-C.C. analyzed data; A.P.d.V. and J.-C.C. wrote the paper.

This work was supported by the University of Strasbourg, National Center of Scientific Research, Neurex, and National Institute of Health and Medical Research. We are grateful to O. Bildstein, D. Egesi, and G. Edomwonyi for their assistance in animal care.

*T.C., M.L., and R.C. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Dr. Jean-Christophe Cassel, Laboratory of Cognitive and Adaptive Neurosciences, UMR 7364, University of Strasbourg–National Center of Scientific Research, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. E-mail: jcassel@unistra.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013

Copyright © 2013 the authors 0270-6474/13/338772-12\$15.00/0

were released in the maze. Subsequently, in a misleading probe trial, we tested their ability to shift from a previously useful but now inefficient response to a strategy based on memory for place. A first experiment evaluated, in the double-H maze, the sensitivity of our task protocol to MSCI inactivation of the mPFC or dorsal hippocampus (dHip). A second experiment assessed the effects of ReRh inactivation. Before the double-H maze task, all rats were trained drug-free in a classical Morris water-maze task and given a probe trial after inactivation of the dHip or mPFC (first experiment) or ReRh (second experiment). We show that, whereas only dHip inactivation disrupted memory recall in the water maze, inactivation of the mPFC, dHip, or ReRh disrupted performance in the double-H maze in relatively comparable ways.

Materials and Methods

Subjects

The study adhered to the regulations specified by the European Committee Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the French Department of Agriculture (references for personal authorization licenses are 67-7 to A.P.d.V., 67-217 to C.K., 67-358 to K.G., and 67-215 to J.-C.C.; the other authors are under the formers' responsibility). The two experiments used a total of 103 male Long-Evans rats aged 3 months at their arrival at the laboratory (250–300 g). Animals were housed individually in quiet facilities under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 A.M.) with access to food and water *ad libitum*, controlled temperature, and a hygrometry of ~55%. Before any experiment (surgery or maze training), rats were individually handled for 2 min each day over 5 consecutive days in their housing room. All rats were maintained in this room for the duration of the experiment. For the behavioral evaluations, the rats were brought to the testing room ~1 min before the start of the first training trial on each day. An identical interval was used for all probe trials (see below).

Surgical procedure

Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (98 mg/kg)–xylazine (13 mg/kg) administered intraperitoneally. A stainless steel guide cannula (0.4 mm in diameter) was implanted bilaterally in the mPFC or hippocampus and unilaterally in the ReRh. Coordinates were as follows: +2.7 mm anteroposterior (AP), ±0.7 mm mediolateral (ML), and –3.2 mm dorsoventral (DV) for the mPFC; –3.8 mm AP, ±2.4 mm ML, and –2.2 mm DV for the dHip; and –2.3 mm AP, ±1.7 mm ML, and –6.2 mm DV from skull, with a mediolateral angle of 15°, for the ReRh. All coordinates are in accordance with Paxinos and Watson (1998). Each guide cannula was secured to the skull by acrylic dental cement and stainless steel screws. At the end of surgery, a sterile stainless steel mandrel (0.28 mm in diameter) was inserted into each guide cannula. After the operation, all rats were allowed to recover under a warm lamp for 20–30 min before being placed back into their home cage. They were given a 1 week rest period before the start of behavioral evaluations.

The water-maze task

The specifications of the water maze and the testing procedures have been described previously (Lopez et al., 2012). In brief, the first pretraining day consisted in one four-trial session using a visible platform (11 cm diameter, painted black, protruding 1 cm above the water surface) located in the southeast quadrant of the pool, starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool. A blue curtain surrounded the pool to prevent the use of distal cues. After this first day, the curtain was removed. The rats were then given four successive acquisition trials per day (10–15 s intertrial interval) of a maximum duration of 60 s, starting randomly from each of the four cardinal points from the edge of the pool, to learn the location of a platform (11 cm diameter) hidden 1 cm below the water surface in the northwest quadrant. Training extended over 8 consecutive days. The distance traveled and latency before reaching the platform, the swim speed, and the thigmotactic behavior were recorded and subsequently computed by a video-tracking system (SMART; PanLab). At the end of the acquisition, rats were ran-

domly allocated to the group to be subjected to inactivation by MSCI or to be used as control after a PBS infusion in the mPFC, dHip, or ReRh. For the probe trial, no platform was placed in the pool. Thirty minutes after the infusion (see below for the drug infusion protocol), rats were released from the northeast start point and allowed a 60 s swim time in the pool. We recorded the time spent in each target quadrant and the number of crossings over the target area, which was used as an index of memory precision (Lopez et al., 2012). The annulus is defined as a surface covering the size of the top of the platform enlarged by a 10-cm-wide annulus. The swim speed and thigmotaxis were also recorded during the probe trial.

The double-H maze task

Testing apparatus. The apparatus has been conceived, constructed, and validated *intra muros*. It was located in a 3.64 × 6.52 m large room as illustrated in Figure 1*a*. In a top view, the general layout of the apparatus approximately corresponds to the shape of two contiguous Hs (Fig. 1*a*). The double-H maze is made of three parallel run arms, 160 cm long × 20 cm wide, connected to each other at the level of their center by a 160 cm long × 20 cm wide central corridor (Fig. 1*a*); a photograph of the device can be found in the study by Pol-Bodetto et al. (2011). Each of these arms is delimited by transparent side walls, 35 cm high. By convention, the two opposing arms in the middle are designed as north (N) and south (S), respectively. The extremities of both other pairs of side arms correspond to our four potential target locations. They are termed northwest (NW), northeast (NE), southwest (SW), and southeast (SE) hereafter (Fig. 1*a*). All elements of the apparatus are made of transparent Plexiglas. The double-H device was placed on a table, 80 cm from the floor, in a large room with several well-contrasted cues on the walls (black disk, black triangles, orange-painted heating ducts). Additional details concerning this test and its possible applications can be found in the studies by Pol-Bodetto et al. (2011), Schumacher et al. (2011), Cassel et al. (2012), Lecourtier et al. (2012), and Kirch et al. (2013).

Training protocol. The double-H was filled with an approximate volume of 170 L of water (21°C) to a height of 15 cm. The water was made opaque by addition of powdered milk (~1.5 g/L). A platform, 11 cm diameter × 14 cm high, was immersed 1 cm beneath the water surface at the extremity of the NE arm (for details, see Fig. 1*b*). For each rat, the task consisted of learning to swim from the start point—which was changed randomly between S and N—to the escape platform, which was always located at the extremity of the NE arm. A first day of pretraining habituated the rats to the testing device and the water. For only this pretraining session, the water was left without milk, the platform protruded 1 cm above the water surface, and the rats were given four consecutive trials, for which the platform was located at the end of the SW arm and the rats were released from the NW. A transparent guillotine door blocked the access to the central corridor, so that rats could only swim straight to the opposite arm. Over the 4 following training days, the rats were also given four daily trials, but now the water was opaque and the platform was immersed at the extremity of the NE arm. These trials were separated from each other by a 10 s interval. The rats were released in the maze either from the N or the S arm in a randomized order (e.g., S, N, S, N on day 1; S, N, N, S on day 2; N, S, N, S on day 3, and N, S, N, S on day 4). When released from the S, the rats had to turn once right and then left to reach the platform directly. When released from the N, the correct sequence consisted of two consecutive left turns. When the rats were released from the N, the S arm was closed by a transparent guillotine door to prevent any entry and vice versa. Each trial, whatever the protocol, lasted for a maximum of 60 s. When the rat did not reach the platform within this delay, it was gently guided to the platform by the experimenter. Once a rat had climbed on the platform, it was left there for 10 s before the next trial was started. The variables recorded were the distance and latency to reach the target arm as well as the swim velocity.

Probe trial. Two probe trials were given: (1) one 24 h after the first 2 d of training and (2) another one 24 h after 2 additional days of training (Fig. 1*c*). For both probe trials, the platform was removed from the water maze. The probe trial duration was 60 s. All rats were released from the SW arm, with the entry of NW arm closed by a guillotine door. This procedure (1) prevented a repeat of the behavior displayed during maze

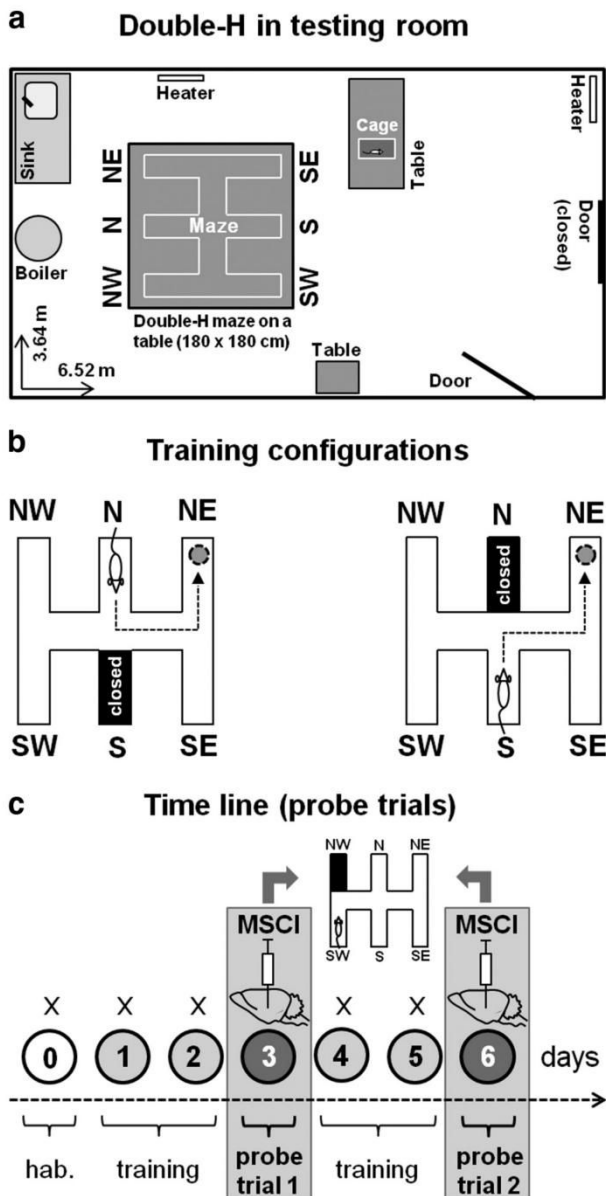


Figure 1. The double-H test, training, and reversible inactivation protocols. *a*, Top-view drawing of the overall organization of the room in which the double-H device was installed (Maze). For a photograph of the device, see the study by Pol-Bodetto et al. (2011). *b*, Illustration of the configurations used during maze training. The rats were given four daily trials for which they were released twice from the S and twice from the N (in a randomized order, e.g., N, S, S, N on day 1, S, N, S, N on day 2, etc.). The platform was always located in the NE arm. The arm opposite to the one in which the rats were placed at the start of each of the four daily trials was always closed by a transparent guillotine door (it corresponds to the black-colored arm). The most direct swim paths to the escape platform consisted of successive left–left or right–left turns. This training procedure did not prevent spatial learning because rats do shift from a response memory-based to a spatial-memory-based strategy during negative feedback in a misleading probe trial (Cassel et al., 2012). *c*, Time line of the training days and probe trials in the double-H test. After a habituation day (0), rats were trained for 2 consecutive days (1, 2), given a first 24 h delayed probe trial (3), trained for two additional days (4, 5), and given a second 24 h delayed probe trial (6). Thirty minutes before each probe trial, approximately half of the rats were infused with 0.26 or 0.70 nmol in 1 μ l of MSCI in the mPFC or dHip in the first experiment or with 0.26 or 0.70 nmol in 0.3 μ l of MSCI in the ReRh in the second experiment, with the others being infused with an equivalent volume of PBS as a control. For both probe trials, rats were released from the SW arm, the NW one was closed by a guillotine door, and the platform had been removed from the device. Each probe trial lasted for 60 s. Before being trained and tested in the double-H maze, all rats had been subjected to a classical spatial learning task in the water maze and given mPFC, dHip, or ReRh inactivation before a standard probe trial at a 24 h post-acquisition delay.

habituation (i.e., swim directly from SW to NW), (2) made one of the learned successive turn sequences impossible (i.e., the left–left sequence), (3) did not disable the right–left sequence, and (4) allowed rats to shift from a strategy based on the right–left turn sequence to a spatial approach of the task (search in target arm) and to do so either directly or during negative feedback (corresponding to entering the N arm after successive right and left turns). It is noteworthy that, because rats were released from the SW arm, which corresponds to a shift of their start place in the device relative to the testing environment by only 60 cm to the left, the visuospatial context at the start of the probe trial was relatively comparable with that of all training trials started from the S arm. Therefore, the potential of the probe trial to mislead was extremely high. Indeed, in our previous experiments, we found that, after such a weak shift of the start point, $\sim 90\%$ of the rats first behaved as if they had been released from the usual training arm (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012). For their first swim track, rats thus had the possibility to adopt the right–left turn sequence (leading them to the N arm) or immediately use a cognitive map, leading them to the arm of the former platform location, namely the NE one. In cases of a right–left turn as their first approach to the task, given the 60 s duration of the probe trial, they could subsequently correct for a spatial-memory-based search, which is usually manifested by an increased time spent in the arm in which they were used to find the platform during training (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012). Whether the shift to a spatial strategy was immediate or not, evidence for searching the platform at the correct place can be interpreted as the consequence of a strategy shift. The variables recorded and analyzed were the time spent in the former target arm (i.e., NE, termed the place arm hereafter) and the time spent in the arm to which successive right–left turns were leading (i.e., N, termed response arm hereafter).

Functional reversible inactivation by MSCI infusions

In contrast to lidocaine or tetrodotoxin, MSCI reportedly induces a deep inactivation of neurons in its diffusion radius without changing the excitability of the fibers en passant therein (Edeline et al., 2002; van Duuren et al., 2007). As described previously (Lopez et al., 2012; Loureiro et al., 2012), all rats were first habituated to be handled and maintained as for drug infusions. Such handling lasted for 5 consecutive days. For the infusions, rats were gently restrained by hand, the mandrels were removed, and infusion needles (0.28 mm diameter) were slowly inserted into the guide cannula with the tip of the needle protruding 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula. The needle was connected to a 10 μ l Hamilton syringe by polyethylene tubing. Using a micropump (CMA-100; CMA/Microdialysis), MSCI (Sigma; dissolved in PBS) was infused over 60 s to induce inactivation. In mPFC and dHip, rats received on each site 0.26 or 0.70 nmol of MSCI in 1 μ l of PBS (thus, 1 μ l of a 0.03 and 0.08 μ g/ μ l solution, respectively) before the probe trial in the water maze and before each probe trial in the double-H maze. In the ReRh group, they received 0.26 or 0.70 nmol of MSCI in 0.3 μ l of PBS (thus, 0.3 μ l of a 0.10 and 0.27 μ g/ μ l solution, respectively) before the probe trial in the water maze and before each probe trial in the double-H maze. A smaller PBS volume was used in ReRh rats to limit MSCI diffusion, these nuclei being small. All controls (0 nmol) received an infusion of an identical volume of PBS (i.e., 1 μ l in the mPFC and dHip and 0.3 μ l in the ReRh). After the infusion, the needle was left in place for an additional 30 s before being slowly retracted. All infusions were performed in the room in which the rats were maintained for the duration of the experiment. Right after the infusion, the rats were returned to their home cage until the start of the probe trial, which occurred 30 min after infusion in both the Morris water maze and the double-H maze.

Histological verifications

Ten minutes after an infusion of fluorescent MSCI (Invitrogen), using amounts identical to those used for the experiments, the rats were killed by injection of an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, i.p.) and transcardially perfused with a 4% phosphate-buffered (0.1 M) paraformaldehyde solution (4°C). Brains were removed, postfixed for 2 h in the same fixative at 4°C, and transferred to a 20% phosphate-buffered (0.1 M) sucrose solution for 48 h at +4°C before being snap frozen (isopentane,

–40°C) and stored at –80°C. Coronal sections (50 μm) were cut using a cryostat (Frigocut 2800; Reichert Jung) in serial sections, which, in the respective regions of interest defined according to Paxinos and Watson (1998), were collected on gelatin-coated slides and either processed for cresyl violet staining to be viewed under a light microscope or directly observed under a fluorescence microscope to visualize fluorescent MSC1. Fluorescent MSC1 produces a red color when excited at 544 nm under a fluorescence microscope, enabling the detection of the intraparenchymal presence, location, and diffusion radius of the drug. This fluorescent MSC1 was shown previously to have similar electrophysiological and behavioral effects as the classical form of MSC1 (Allen et al., 2008). It is noteworthy that the molecular weight of fluorescent MSC1 is slightly more than five times larger than the weight of the usual nonfluorescent molecule (i.e., ~ 607 vs 114). This difference may lead to a possible underestimation of the diffusion radius of the non-fluorescent MSC1 used to perform the inactivation. Despite this drawback, the fluorescent MSC1 has the advantage to enable several verifications, including the following: (1) our infusion devices were still working at the end of our experiments; (2) the presence of the drug could be evidenced in the appropriate target region; and (3) the spreading radius of fluorescence was larger with the largest amount infused than with the smallest one, thereby documenting *in situ* a “dose” effect. It is also noteworthy that Allen et al. (2008) found that the fluorescent and nonfluorescent MSC1 infused into the dorsomedial region of PFC produced relatively comparable effects in a delayed instrumental response task. A final note concerns the possibility that significant amounts of MSC1 could have spread to regions adjacent to the regions we wanted to reversibly inactivate, as shown by Edeline et al. (2002). Although such spreading (and thus unspecific effects) cannot be excluded in our current experiments, it is emphasized that even the largest amount of MSC1 infused (i.e., 0.08 μg) corresponded to a relatively small dose regarding the doses commonly used in the literature (to give two examples of large doses, 1 μg by Blum et al., 2006; 8 μg by Churchwell and Kesner, 2011). The spreading of MSC1 is also a reason why, conversely to the majority of experiments published so far with drug-induced functional inactivation, we have decided to use a dose–effect approach, as done recently by Hembrook et al. (2012), and to infuse relatively small volumes. For this concern, it may be useful to remind that, in the experiment by Hembrook et al. (2012), an infusion of 2.5 nmol of MSC1 (and thus approximately three times our highest amount infused) have been performed in the thalamus at a distance 1.5 mm dorsal to the ReRh as a control: the authors found this control infusion to have no effect on the behavioral output that was disrupted when the same amount of MSC1 was infused into the ReRh. Finally, and perhaps even more convincing, in a recent study, Stratford and Wirtshafter (2013) infused up to 100 ng MSC1 into contiguous dorsal thalamic nuclei (i.e., the paraventricular and the mediodorsal nuclei), with the infusion sites being $\sim 500 \mu\text{m}$ from each other; they found opposite and thus site-specific effects on feeding behavior.

Statistical analyses

Unless otherwise specified and depending on the experiment, data analyses used a two- or three-way ANOVA, with repeated measures when appropriate. In experiment 1, for training phases in both mazes, we considered the factors structure (mPFC, dHip), inactivation (0, 0.26, and 0.70 nmol), and day and, in the double-H maze, also the factor probe trial (PT1, PT2). In experiment 2, we considered the factors inactivation (0, 0.26, and 0.70 nmol) and day (water maze) or probe trial (double-H maze). When appropriate, all these analyses were complemented by multiple comparisons using the Newman–Keuls test. The time spent in the target quadrant (water maze) or in the place arm (double-H) during the probe trials was also compared with chance using a one-sample *t* test. Chance levels were 15 s in the water maze [(surface of one quadrant/surface of the pool) \times 60 s] and 8.2 s in the double-H [(surface of one arm/accessible surface of the maze) \times 60 s]. Values of $p < 0.05$ were considered significant. A χ^2 analysis was used to compare categorical variables in the double-H maze.

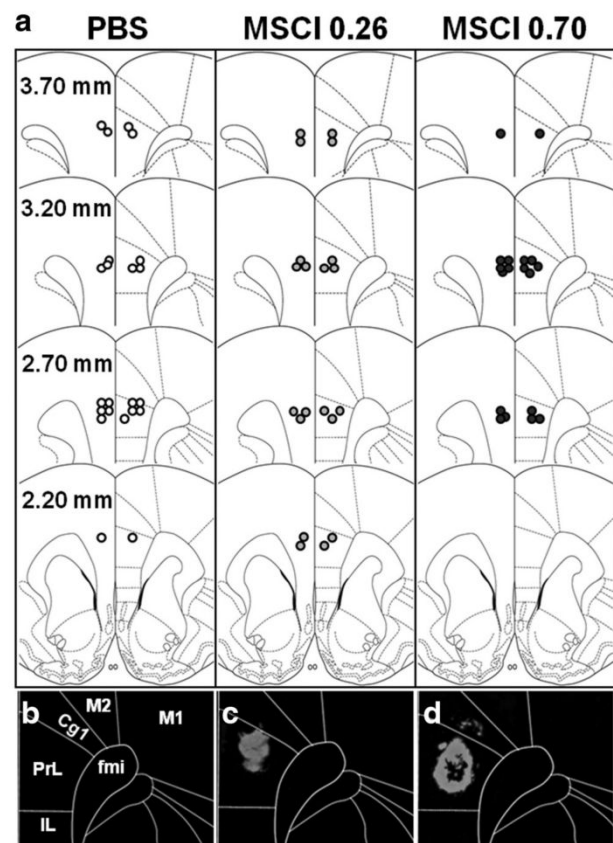


Figure 2. Infusion sites on coronal sections through the mPFC. **a**, Location of the infusion sites in rats subjected to PBS (white circles) or MSC1 (gray and black circles, respectively) infusions before the probe trials. Coordinates are given in millimeters from bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each infusion site corresponds to the location of the tip of the infusion needle as identified under a microscope. **c** and **d** are photomicrographs showing a representative location/diffusion radius of fluorescent MSC1 in the mPFC (bottom; 544 nm excitation); **b** is the control (PBS). White lines in **b–d** delineate the limits of the cingulate cortex, region 1 (Cg1), the prelimbic cortex (PrL), the infralimbic cortex (IL), regions 1 and 2 of the motor cortex (M1, M2), and the forceps minor of the corpus callosum (fmi). Notice the absence of fluorescence after PBS infusion (**b**) and the larger diffusion radius after 0.70 nmol (**d**) compared with 0.26 nmol (**c**) fluorescent MSC1 infusions; it is likely that the diffusion area of the fluorescent MSC1 underestimates the inactivation area obtained with the MSC1 used for the behavioral tests.

Results

Experiment 1

Location of the infusion sites and diffusion radius of the drug in the mPFC and dHip

Figures 2a and 3a show the location of the injector tips in the mPFC and dHip, respectively, for each group. For mPFC, all injection sites were located in the prelimbic cortex, i.e., between the coordinates 2.2 and 3.7 mm anterior to bregma. Figure 2, c and d, shows typical examples of intraparenchymal diffusion of fluorescent MSC1 in the mPFC compared with a PBS infusion (Fig. 2b). Thus, after intra-mPFC infusions, the fluorescent solution remained confined to the mPFC with maximum fluorescence in the prelimbic cortex and a larger diffusion radius with the largest amount of MSC1 (i.e., 0.70 nmol). For dHip, all injection sites were localized between the coordinates –3.3 and –4.2 mm posterior to bregma. The extent of the fluorescent MSC1 in the dHip is illustrated in Figure 3, c and d, compared with PBS (Fig. 3b). The spread of the solution was confined to the dHip with occasional spread into the overlying cortex. After re-

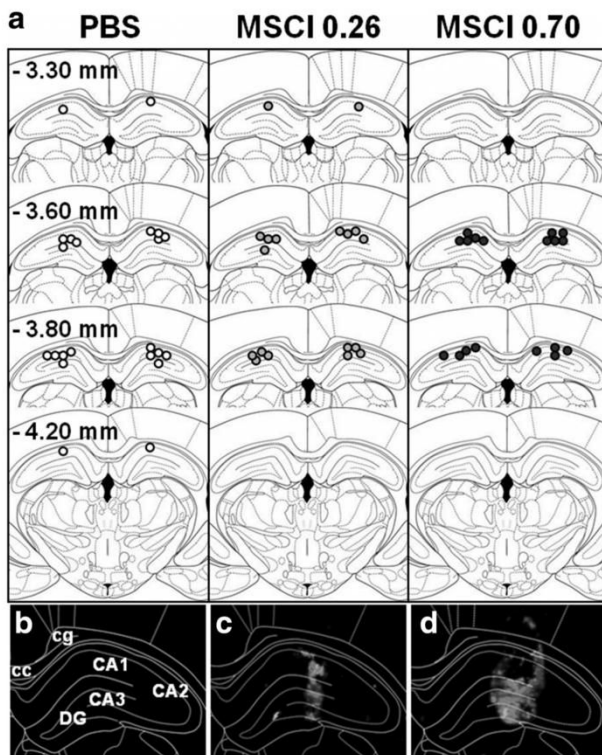


Figure 3. Infusion sites on coronal sections through the dHipp. **a**, Location of the infusion sites in rats subjected to PBS (white circles) or MSC1 (gray and black circles, corresponding to 0.26 and 0.70 nmol of MSC1, respectively) infusions before the probe trials. Coordinates are given in millimeters from bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each infusion site corresponds to the location of the tip of the infusion needle. **c** and **d** are photomicrographs showing a representative location/diffusion of fluorescent MSC1 in the dHipp (bottom; 544 nm excitation); **b** is the control (PBS). White lines in **b–d** delineate the limits of the corpus callosum (cc), the cingulum (cg), regions CA1, CA2, and CA3 of the Ammon's horn, and the gyrus dentatus (DG). Notice the absence of fluorescence after PBS infusion (**b**) and the larger diffusion radius after 0.70 nmol (**d**) compared with 0.26 nmol (**c**) MSC1 infusions; it is likely that the diffusion area of the fluorescent MSC1 underestimates the inactivation area obtained with the MSC1 used for the behavioral tests.

removal of seven rats showing misplacement of at least one of the two injection sites, group sizes were as follows: $n_{\text{mPFC-PBS}} = 11$, $n_{\text{mPFC-0.26 nmol MSC1}} = 10$, $n_{\text{mPFC-0.70 nmol MSC1}} = 9$, $n_{\text{dHipp-PBS}} = 11$, $n_{\text{dHipp-0.26 nmol MSC1}} = 9$, and $n_{\text{dHipp-0.70 nmol MSC1}} = 9$.

MSC1 inactivation of the dHipp, not of the mPFC, impaired retrieval of the platform location in a Morris water maze after drug-free learning

In this experiment, all rats had been equipped with infusion devices before any behavioral training. Starting 1 week after surgery, they were given four daily trials over 8 consecutive days to learn the location of an escape platform hidden in a water maze. After a 1 d post-acquisition rest, they were tested in a probe trial. During training, the distance to reach the platform declined over days ($F_{(7,371)} = 392.2, p < 0.0001$), showing progressive learning of the platform location (Fig. 4*a,b*). The statistical analysis of the distance traveled by each rat during the acquisition phase revealed no overall effect of structure ($F_{(1,53)} = 0.9$, n.s.) or inactivation ($F_{(2,53)} = 0.2$, n.s.), and there was no significant structure \times inactivation interaction ($F_{(2,53)} = 1.3$, n.s.). None of the other interactions was significant. The analyses of the latencies, swimming speeds, and thigmotaxis behavior yielded a similar pattern

of effects (data not shown). Thus, learning was comparable among the six groups.

ANOVA of the time spent in the target quadrant during the probe trial (Fig. 4*c,d*, left) showed a significant effect of inactivation ($F_{(2,53)} = 3.4, p < 0.05$), structure ($F_{(1,53)} = 11.0, p < 0.01$), and a significant interaction between the two factors ($F_{(2,53)} = 9.9, p < 0.001$). *Post hoc* comparisons showed that only rats given 0.70 nmol of MSC1 in the dHipp were impaired compared with each of the five other groups ($p < 0.001$ in all cases). Comparison of performance in each group with chance level further supported the presence of a deficit in only dHipp rats given the largest amount of MSC1. Indeed, performance significantly exceeded chance in all groups ($p < 0.001$ in all cases), except in the dHipp–0.70 nmol MSC1 group ($p = 0.9$). Analysis of the number of annulus crossings confirmed a performance deficit restricted to dHipp–0.70 nmol MSC1 rats (Fig. 4*c,d*, right), because *post hoc* comparisons showed that only these rats were impaired compared with their PBS-infused controls ($p < 0.001$), as well as with each of the other four groups. During the probe trial, thigmotaxis and swim speed were not significantly affected by the inactivation (data not shown; for illustrations of typical swim paths in the different groups, see Fig. 4*e,f*).

Thus, after drug-free learning of the platform location in the Morris water maze, which is considered a typical hippocampus-dependent task, the capability to retrieve a spatial memory was altered by the inactivation of the dHipp but only with the higher of the two amounts of MSC1. When infused in the mPFC, the same amount of MSC1 did not impair retrieval.

MSC1 inactivation of the dHipp or the mPFC both disrupted performance in the double-H maze probe trial after drug-free learning

One week after the probe trial in the water maze, we started drug-free training in the double-H maze. This training was organized over two 2-d periods, with each ending up with a probe trial after a 1 d rest (Fig. 1*c*). Before each probe trial, rats were subjected to MSC1 (0.26 or 0.70 nmol) or PBS infusions into the mPFC or dHipp. During training, the distances swum before reaching the platform shortened over days ($F_{(3,159)} = 59.3, p < 0.0001$), indicating learning (Fig. 5*a,b*). There was no significant difference among the six groups, as attested by the absence of significant structure ($F_{(1,53)} = 0.2$, n.s.), inactivation ($F_{(3,53)} = 0.3$, n.s.), or structure \times inactivation interaction ($F_{(2,53)} = 0.8$, n.s.) effects. Analyses of the latencies and swim velocities showed comparable significance levels in all groups (data not shown).

The very first two-movement swim sequence in the first probe trial consisted in a succession of right and left turns (leading rats to the N arm) in 76% of rats, 14% swam directly to the former location of the platform (i.e., NE arm), and the last 10% of animals reached another arm, with no significant difference among groups (χ^2 statistic, n.s.). For the second probe trial, 78% of rats chose the N arm, 15% directly swam to the former platform location (i.e., to the NE arm), and the other rats swam to the SE or S arms. This behavioral pattern did not differ significantly among mPFC–PBS, mPFC–MSC1, dHipp–PBS, and dHipp–MSC1 groups, regardless of the probe trial and amount of MSC1 infused (χ^2 statistic, n.s.). However, in terms of relative amount of time the various groups spent in the NE and N arms, clear-cut differences emerged during probe trials, especially during the second one (Fig. 5*c–g*). The $2 \times 2 \times 2$ ANOVA of the time spent in the place arm (NE) showed significant structure ($F_{(1,53)} = 11.2, p < 0.01$), inactivation ($F_{(2,53)} = 17.4, p < 0.001$), and probe trial ($F_{(1,53)} = 9.0, p < 0.01$) effects. None of the interactions was significant.

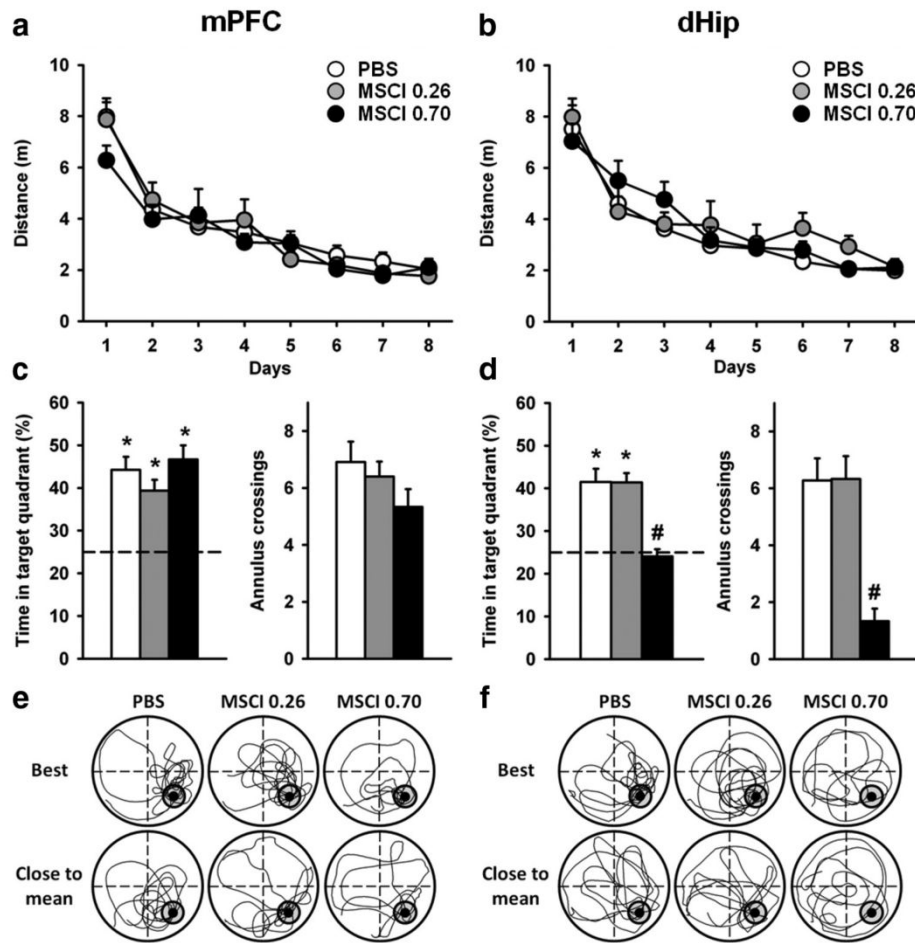


Figure 4. Acquisition curves and effects of dHip or mPFC MSCI inactivation on spatial memory retrieval in the hidden version of the water-maze task. *a, b*, Drug-free acquisition expressed as average \pm SEM distance to reach the platform in the rats that were subsequently tested for a probe trial after bilateral MSCI or PBS infusions into the mPFC or dHip (*c–f*). All rats were subjected to four daily trials over 8 consecutive days. There was no significant difference among the six groups, in terms of overall performance or learning curves. Mean \pm SEM performance during the probe trial was expressed as percentage time in the target quadrant (*c, d*, left) and number of crossings in the annulus as an index of precision (*c, d*, right). The dashed line in *c* and *d* represents chance level (i.e., 25%). * $p < 0.05$, significant difference compared with chance (i.e., 25%); # $p < 0.05$, significant difference compared with control (PBS). All but dHip–0.70 nmol MSCI rats remembered the platform location and concentrated with comparable precision their searches in the target quadrant where the platform had been located during acquisition. Representative swim paths are shown after mPFC (*e*) or dHip (*f*) inactivation. The examples are from a rat that showed the best performance, i.e., highest percentage of time spent in the target quadrant (top) and from a rat showing performance closest to the group mean (bottom) in each group. PBS, Infusions of PBS; MSCI 0.26, MSCI 0.70, infusions of 0.26 and 0.70 nmol of MSCI, respectively.

Multiple comparisons showed that the inactivation with 0.70 nmol of MSCI induced a marked deficit, regardless of region, compared with control rats (Fig. 5*c,d*). After PBS infusions, this group was able to search for the platform in the appropriate target, especially during the second probe trial. Indeed, in mPFC–PBS and dHip–PBS rats, performance was significantly above chance during the second probe trial ($p < 0.05$), as was already the case in the first probe trial for mPFC–PBS rats. In mPFC rats given 0.26 or 0.70 nmol of MSCI, performance did not differ from chance on both probe trials. In dHip rats, for both amounts of MSCI, performance was significantly below chance level on the first probe trial ($p < 0.05$) and did not differ from chance on the second one. The analysis of the time spent in the response arm (N arm; Fig. 5*e,f*) showed no significant effect of the single factors or of any of their interactions, except for the probe trial, during which the overall time was significantly lower on the second compared with the first probe trial ($p < 0.05$) for most groups. Swim tracks from a representative rat of each group are shown in Figure 5*g*.

In summary, rats in the control groups searched for the platform more accurately after 4 d of training than after only 2 d. The

inactivation of the mPFC or dHip disrupted searching in the appropriate arm, with the dHip inactivation effect appearing more pronounced than the mPFC one because the dHip effect was observed for both amounts of MSCI.

Experiment 2

Location of the infusion sites and diffusion radius of the drug in the ReRh

Almost all infusion sites were found to be localized in the ReRh and most of them between anteroposterior coordinates -1.8 and 2.6 mm from bregma (Fig. 6*a*). Figure 6, *c* and *d*, shows a typical example of MSCI diffusion after intra-ReRh infusion of fluorescent MSCI (compare with PBS in Fig. 6*b*). After removal of six rats, because of misplaced cannula, group sizes were as follows: $n_{\text{ReRh-PBS}} = 11$, $n_{\text{ReRh-0.26 nmol MSCI}} = 10$, and $n_{\text{ReRh-0.70 nmol MSCI}} = 10$.

MSCI inactivation of the ReRh impaired performance but did not prevent retrieval of the platform location in the Morris water-maze task after drug-free learning

As in experiment 1, starting 1 week after surgery, the rats were first trained over 8 consecutive days to locate a hidden platform in

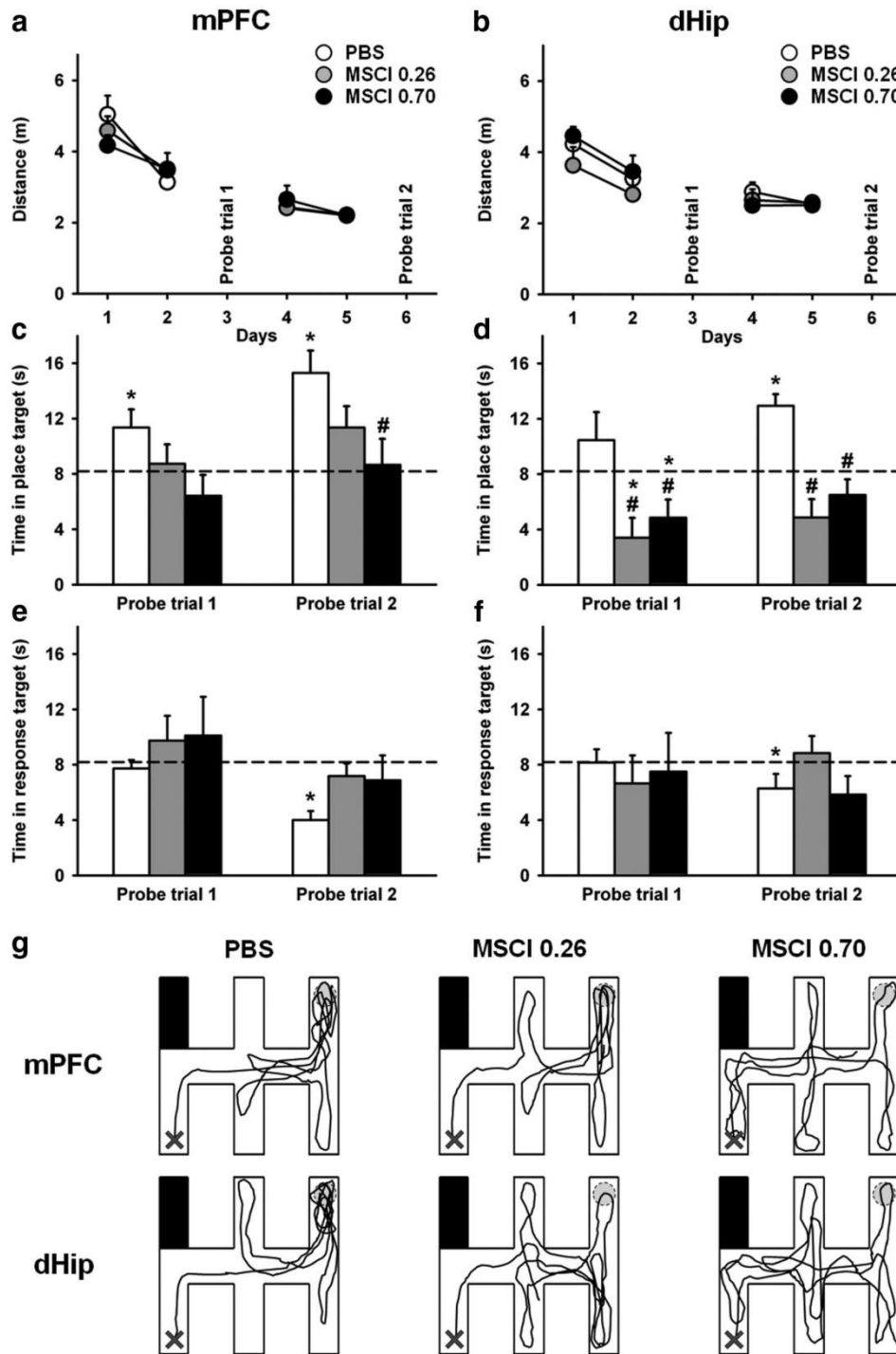


Figure 5. Acquisition curves and effects of dHip or mPFC MSCI inactivation on performance in the double-H maze task. Drug-free acquisition expressed as average \pm SEM distance swum (**a, b**) to reach the platform. All rats were subjected to four daily trials on days 1, 2, 4, and 5. On days 3 and 6, they were given a probe trial after bilateral infusion of either 0.26 or 0.70 nmol of MSCI or PBS as control. There was no significant difference among the six groups in terms of overall performance or learning curves. Probe trial performance is expressed as the time spent in the place target arm (i.e., NE arm) in **c** and **d** and the time spent in the response arm (N arm) in **e** and **f** in rats subjected to infusions into the mPFC or dHip. Representative swim paths are shown in **g** for each group; all rats were released from SW arm and taken out of the maze at the end of the 60 s probe trial. Abbreviations are as in Figure 4. * $p < 0.05$, significant difference compared with PBS; # $p < 0.05$, significant difference compared with chance (indicated by the hatched line in **c–f**).

the water maze. They were subsequently tested in a probe trial after a 24 h post-acquisition rest. During training, the distance to reach the platform declined over days ($F_{(7,196)} = 50.0, p < 0.0001$), showing progressive learning of the location of the hid-

den platform (Fig. 7a). There was no effect of inactivation (PBS vs MSCI, 0.26 and 0.70 nmol; $F_{(2,28)} = 0.3, n.s.$) and no significant inactivation \times day interaction ($F_{(14,196)} = 1.4, n.s.$). The analyses of the latencies, swimming speed, and thigmotaxis only showed

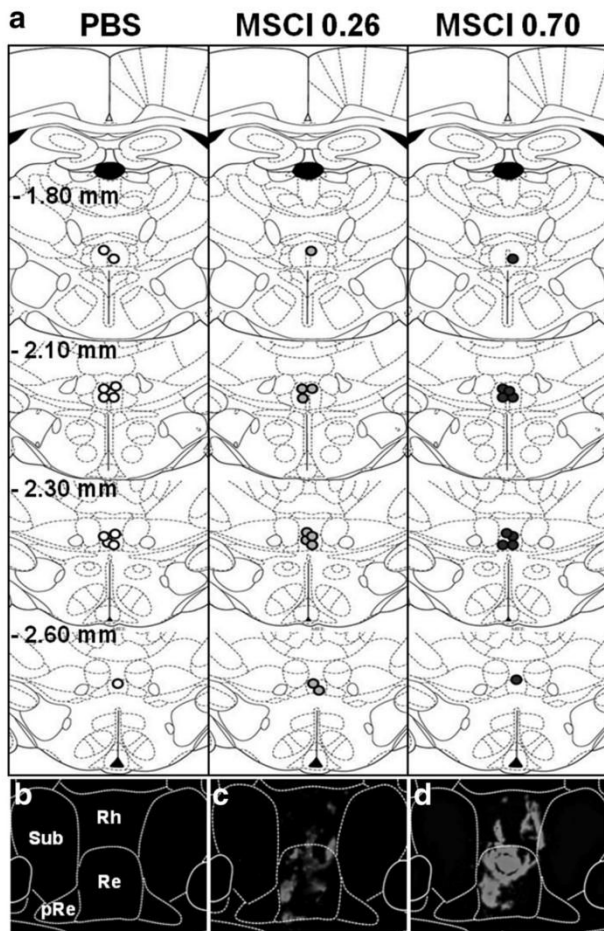


Figure 6. Infusions sites on coronal sections through the midline thalamus. *a*, Site locations were examined in rats subjected to PBS or MSCI infusion before the probe trial. Coordinates are given in millimeters from bregma according to Paxinos and Watson (1998). Each infusion site is represented by white (PBS), gray (0.26 nmol of MSCI), or dark circles (0.70 nmol of MSCI) circles, the center of which corresponds to the location of the tip of the infusion needle. *c* and *d* are photomicrographs showing the distribution of the fluorescent MSCI solution within the ReRh. The diffusion area appears in red under a fluorescence microscope (excitation 544 nm excitation); *b* is the control (PBS). White lines delineate the limits of Rh, Re, the perireuniens (pRe), and the submedial nucleus (Sub). Notice the absence of fluorescence after PBS infusion (*b*) and the larger diffusion radius after 0.70 nmol (*d*) compared with 0.26 nmol (*c*) MSCI infusions; it is likely that the diffusion area of the fluorescent MSCI underestimates the inactivation area obtained with the MSCI used for the behavioral tests.

significant day effects (data not shown). Thus, there was equivalent learning in both groups.

ANOVA of the time spent in the target quadrant during the probe trial (Fig. 7*b*) showed a significant effect of inactivation ($F_{(2,28)} = 5.5, p < 0.01$). This effect was attributable to performance that was significantly altered in rats administered 0.26 and 0.70 nmol of MSCI compared with their PBS counterparts ($p < 0.05$ for each comparison). However, these differences did not result in an inability to remember the platform location. Indeed, comparison of performance in each group with chance level showed performance to be significantly above chance in all three groups (PBS, $p < 0.001$; 0.26 nmol of MSCI, $p < 0.001$; 0.70 nmol of MSCI, $p < 0.05$). Although less for both amounts of MSCI compared with PBS ($p < 0.05$; Fig. 7*b*), it is noteworthy that the number of annulus crossings was much larger than found in dHip–0.70 nmol MSCI rats (Fig. 7*c*

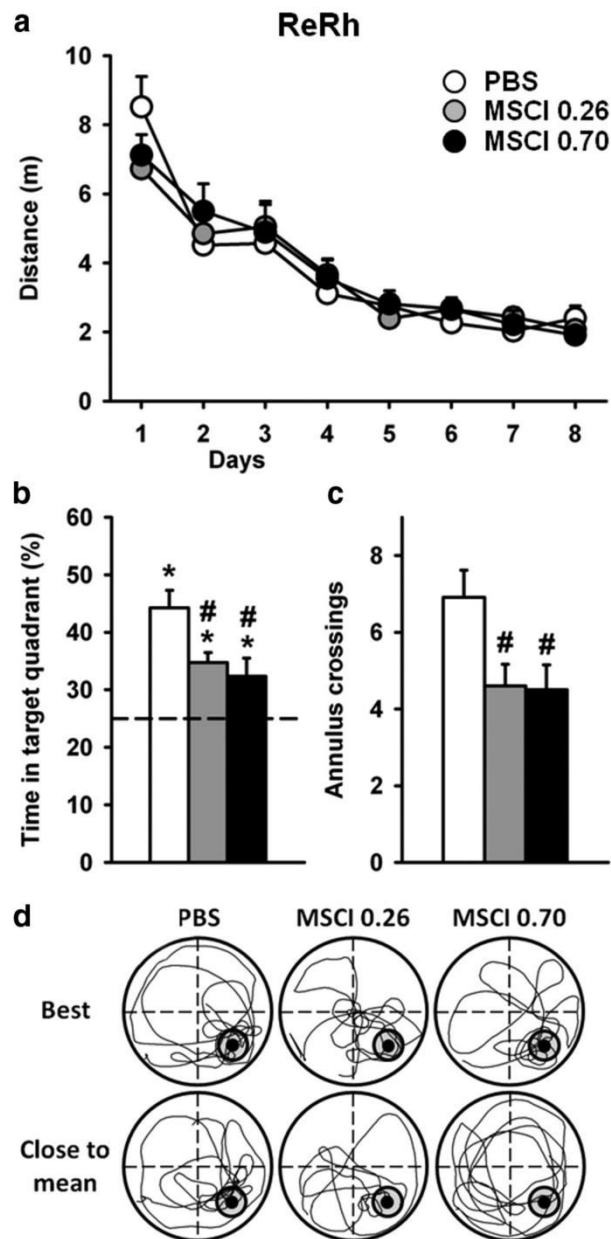


Figure 7. Acquisition curves and effects of ReRh MSCI inactivation on spatial memory retrieval in the hidden version of the water-maze task. *a*, Drug-free acquisition was expressed as average \pm SEM distance to reach the platform in the rats that were subsequently tested for a probe trial after MSCI or PBS infusion. All rats were subjected to four daily trials over 8 consecutive days. There were no significant differences between the three groups. Mean \pm SEM performance during the probe trial were expressed as percentage time in the target quadrant (*b*) and the number (\pm SEM) of crossings in the annulus (*c*). The dashed line in *b* represents chance level (i.e., 25%). Abbreviations are as in Figure 4. * $p < 0.05$, significant difference compared with chance (25%); # $p < 0.05$, significant difference compared with control. *d*, Examples of detailed swim paths during the probe trial. Patterns are shown for a rat displaying the best performance, i.e., highest percentage of time spent in the target quadrant (top) and for a rat showing performance closest to the mean (bottom).

compared with Fig. 4*d*). Typical swim paths are shown in Figure 7*d*. Thus, after drug-free inactivation of the platform location in the Morris water maze, inactivation of the ReRh reduced performance without obliterating the capability to retrieve the platform location.

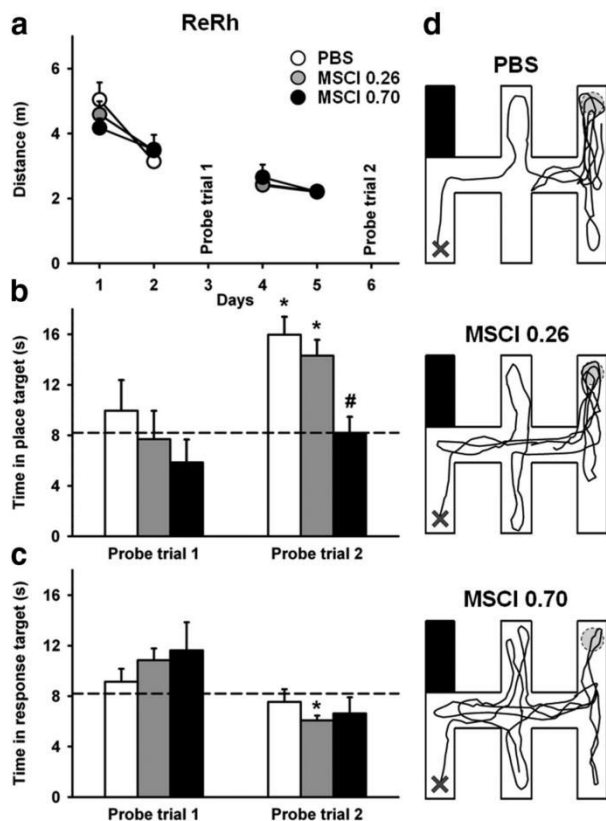


Figure 8. Acquisition curves and effects of ReRh MSCI inactivation on performance in the double-H maze task. Drug-free acquisition was expressed as average \pm SEM distance (**a**) to reach the platform. As in experiment 1, all rats were subjected to four daily trials on days 1, 2, 4, and 5. There were no significant differences between the three groups. On days 3 and 6, they were given a probe trial after bilateral MSCI or PBS infusion. Probe trial performance was shown as the time spent in the place arm (NE arm) (**b**) and the time spent in the response arm (N arm) (**c**). Representative swim paths are shown in **d**. The rats were released from the SW arm and taken out of the maze at the end of the 60 s probe trial. Abbreviations are as in Figure 7. * $p < 0.05$, significant difference compared with PBS; * $p < 0.05$, significant difference compared with chance (indicated by hatched line in **b** and **c**).

MSCI inactivation of the ReRh disrupted performance in the probe trial of the double-H maze after drug-free learning

During training, the distances swum before reaching the platform decreased over days ($F_{(3,84)} = 86.1, p < 0.0001$), indicating learning (Fig. 8a). There was no overall significant difference among the two groups, as attested by the absence of a significant inactivation effect ($F_{(2,28)} = 1.3, n.s.$). The inactivation \times day interaction was significant ($F_{(6,84)} = 3.9, p < 0.01$) and can be explained by a more pronounced performance improvement in rats from the PBS group between days 1 and 2 compared with both other groups. However, final performance levels (day 5) did not differ among groups. Analysis of latencies yielded similar conclusions, except that the inactivation \times day interaction was not significant ($F_{(6,84)} = 1.2, n.s.$).

The very first two-movement swim sequence exhibited in the first probe trial consisted of a succession of right and left turns, leading rats to the N arm in 87% of rats, whereas none of them swam directly to the former location of the platform, and the other ones reached another arm, with no significant difference among groups (χ^2 statistic, *n.s.*). For the second probe trial, 83% of rats exhibited such a behavior (i.e., to go to the N arm), 10% swam directly to the former platform location (i.e., to the NE

Table 1. Summary and comparison of mPFC, dHip, and ReRh inactivation effects in the water-maze and double-H-maze tasks (second probe trial)

Target region	Water maze task		Double-H task (2nd probe trial)	
	0.26 nmol	0.70 nmol	0.26 nmol	0.70 nmol
mPFC	ns	ns	ns	↓ ↓ ↓ ↓
dHip	ns	↓ ↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓ ↓
ReRh	↓	↓ ↓ ↓ ↓	ns	↓ ↓ ↓ ↓

ns, No significant effect; ↓, performance significantly impaired, memory still there; ↓ ↓ ↓ ↓, performance significantly impaired, no evidence of memory.

arm), and the other rats swam to the SE or S arms. This behavioral pattern did not differ significantly among ReRh–PBS and ReRh–MSCI groups, regardless of probe trial or amount of MSCI (χ^2 statistic). However, in terms of relative amount of time the various groups spent in the NE and N arms, clear-cut differences emerged during the probe trials, especially during the second one (Figs. 8b–d). The 2×2 ANOVA of the time spent in the place arm (NE) showed significant inactivation ($F_{(2,28)} = 4.5, p < 0.05$) and probe trial ($F_{(1,28)} = 14.9, p < 0.001$) effects (Fig. 8b). The interaction between both factors was not significant ($F_{(2,28)} = 1.1, n.s.$). Multiple comparisons showed that 0.70 nmol MSCI inactivation produced a marked deficit compared with PBS during essentially the second probe trial ($p < 0.01$). In ReRh–PBS rats, performance of the second probe trial was significantly above chance ($p < 0.001$), as was also the case in rats administered 0.26 nmol of MSCI ($p < 0.001$) but not 0.70 nmol of MSCI ($p = 1.0, n.s.$). The analysis of the time spent in the response arm (N; Fig. 8c) showed no significant inactivation ($F_{(2,28)} = 0.3, n.s.$) or inactivation \times probe trial interaction ($F_{(2,28)} = 0.7, n.s.$) effects (Fig. 7c). Performance in ReRh–0.26 nmol MSCI rats was significantly below chance level. Swim tracks from a representative rat of each group are shown in Figure 8d.

Thus, after 4 learning days, rats from the group with the highest amount of MSCI infused into the ReRh failed to search for the platform as accurately as did the rats of the two other groups during the second probe trial, in line with the performance recorded after the largest MSCI amount in the mPFC or dHip groups (Fig. 5c,d).

Discussion

In the Morris water maze, reversible inactivation of the dHip abolished retrieval of a recently acquired spatial memory, an effect not mimicked by mPFC or ReRh inactivation (Table 1). However, in the double-H maze, the performance disruption produced by 0.70 nmol of MSCI in the ReRh was mimicked by 0.70 nmol of MSCI in mPFC or dHip. Such task/brain structure-dependent dissociations suggest that, although the dHip and not the mPFC or ReRh is crucial for recent spatial memory retrieval, all three structures participate in behavioral adaptations invoking a place strategy in the double-H maze. Indeed, the weak effect of MSCI in the mPFC or ReRh on Morris water-maze performance suggests that the spatial memory system remains operational despite inactivation. ReRh inactivation most probably disrupted the shift-triggering process normally substituting an appropriate place strategy for an inappropriate response one. This cognitive operation might require coordination between the mPFC (as the potential set-shifting structure) and the dHip (as the spatial memory substrate). Given the reciprocal connectivity of the ReRh with both structures, we propose a role for the ReRh in the regulation of strategy shifting underlying behavioral flexibility in adaptation to modifications of environmental demands.

Hippocampal, not mPFC or ReRh, inactivation disrupts spatial memory retrieval in the water maze

Regarding mPFC and dHip inactivation effects on recent memory, our data are in line with the literature (Broadbent et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Klur et al., 2009; Lopez et al., 2012). The only exception we know of is the report by Blum et al. (2006) on mPFC inactivation-induced recall deficits. These authors used another task (conditioned fear) and 12 times our highest dose of MSCI, questioning the specificity of the effect. Dolleman-Van der Weel et al. (2009) found that ReRh lesions did not obliterate the ability to learn a water-maze task (confirmed by Loureiro et al., 2012) and to recall the platform location in a probe trial. However, probe trial performance was below that of controls, as found after inactivation in the current study. Based on this weaker performance, the authors proposed a non-mnemonic interpretation suggesting that rats with ReRh lesions showed deficits in strategy shifting. In a previous study (Loureiro et al., 2012), we found normal recent memory retrieval performance, but the inactivation was performed with lidocaine, not with MSCI, and memory was tested 5 d (not 1 d) after acquisition. The fact that ReRh rats showed reduced memory performance in the water maze indicates that MSCI-induced inactivation of the ReRh weakens but does not disrupt hippocampal-dependent cognitive processes contributing to recent spatial memory retrieval.

Inactivation of the mPFC, hippocampus, or ReRh induces deficits in the double-H maze

The double-H maze is a novel device that we recently validated using response and place learning tasks, amnesic drugs (Pol-Bodetto et al., 2011), and manipulations of training and testing protocols (Cassel et al., 2012). In one of these protocols, rats were trained to swim from a constant start (S) to a constant target arm (NE). When subsequently tested in a misleading probe trial (as in the present experiments), most rats first engaged a behavior driven by response memory but then shifted to a behavior driven by place memory, indicating a flexibility in their cognitive processing of the situation (Cassel et al., 2012). In the current study, the rats had to use one of two efficient response sequences depending on the arm from which the trials were started. However, for the probe trials, there was no constraint hindering the shift to place memory-driven behavior. Furthermore, all rats were given two probe trials: one after 2 training days and the other after 2 additional days. Interestingly, in all three control groups, the negative feedback-driven shift to place memory-driven behavior eventually occurred in the second probe trial; however, control rats, regardless of infusion site, spent more time in the former target (place) arm than in the others and performed above chance level. This same search pattern was not observed after dHip, mPFC, or ReRh inactivation, suggesting a disruption of either spatial memory processing or strategy shifting. The fact that dHip rats subjected to MSCI infusions were also impaired in the water maze suggests that these rats most probably had difficulty in retrieving spatial memory in both tasks. The fact that mPFC and ReRh rats subjected to MSCI infusions showed recall in the water-maze task but performance was weaker in ReRh rats indicates that neither mPFC nor ReRh contributes crucially to recent spatial memory retrieval. In several experiments, it has been shown that alterations of the mPFC affect the capability of shifting to the correct strategy when task contingencies or environmental conditions are modified (Ragozzino et al., 1999; Dias and Aggleton, 2000; Block et al., 2007; Jo et al., 2007; Oualian and Gisquet-Verrier, 2010). It is very possible that, after mPFC inactivation, rats simply were unable to properly manage this shift to

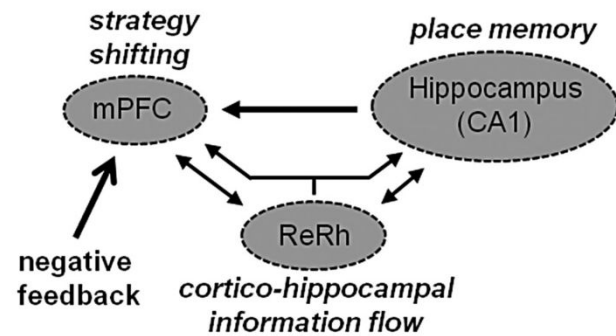


Figure 9. Hypothetical model of functional processes engaged in the probe trial of the double-H maze test. The hippocampus, the mPFC, and the ReRh of the ventral midline thalamus belong to a system characterized by a connectivity encompassing direct projections from the hippocampus to the mPFC, reciprocal connections of the ReRh with the mPFC and with the hippocampus, and, in the Re, neurons having axon projecting collaterals in each of the cortical and hippocampal terminal fields; there are no described direct mPFC–hippocampal return projections (Hoover and Vertes, 2012). Our double-H maze data are compatible with a functional model in which negative feedback may trigger an mPFC-dependent shift toward a hippocampus-dependent strategy engaging a place memory. The crucial functional relay in this cooperation could be the ReRh nuclei, which might serve as a hub relaying the information flow arising from the mPFC to the hippocampus. This hypothetical functional schema is compatible with the currently reported findings and provides a conceptual frame to further the investigations on the functional implications of the nuclei of the ventral midline thalamus.

a place memory-based behavior despite their intact memory for the training location of the platform. Why then the same effects after ReRh inactivation? An adapted behavior presupposes not only the mPFC-dependent shift to be operational but also the memory for place to be conjointly engaged, a process for which the hippocampus is important. In other words, most adapted behaviors require interactions between mPFC (for shifting) and dHip (for place memory retrieval). In all tasks requiring such interactions and in which the effects of ventral midline thalamus lesion or inactivation have been explored, deficits were found. Hembrook et al. (2012) showed impaired delayed non-matching-to-position performance in operant chambers after ReRh inactivation, a task sensitive to either mPFC or hippocampal lesions. They also reported that permanent ReRh lesions altered win-shift performance in a radial maze, a task requiring coordinated activation of mPFC and hippocampus (Hembrook and Mair, 2011). Finally, we found that permanent ReRh lesions obliterated spatial memory persistence (Loureiro et al., 2012), for which cortico-hippocampal interactions are also crucial (Frankland and Bontempi, 2005). These findings together with the current ones are in agreement with neuroanatomical and electrophysiological investigations. First, ReRh neurons have, among other sites, dense overlapping terminal fields in region CA1 of the hippocampus and in the mPFC (Vertes et al., 2006). A recent study even found a subpopulation of Re neurons with axon collaterals in each terminal field (Hoover and Vertes, 2012). Because there are direct projections from the hippocampus to the mPFC but no direct return projection from the mPFC to the hippocampus (Thierry et al., 2000), the ReRh appears as a crucial relay in cortico-hippocampo-cortical information exchange (Fig. 9). Second, Di Prisco and Vertes (2006) reported that stimulation of the ReRh produced strong, monosynaptic activation of the PFC (Eleore et al., 2011). Dolleman-Van der Weel et al. (1997) showed previously that stimulation of the Re induced strong activity changes in the CA1 region of the hippocampus. Furthermore, Zhang et al. (2012) reported that systemic blockade of NMDA receptors by ketamine produced a coherent increase of activity in

both the Re and hippocampus, and blockade of the Re by MSC1 infusion reduced the ketamine-induced changes in the hippocampus. Despite these arguments and because not all cortico-hippocampal pathways have been disrupted by the ReRh inactivation in the current experiments (e.g., those passing through the rhinal cortex and others are still operational), an alternative interpretation of our data could be that the ventral midline thalamus is in fact crucial to mPFC functions and that the deficits found after mPFC or ReRh inactivation were in fact very similar in nature. Given the data recently reported by Xu and Südhof (2013) on the role of the Re nucleus in contextual fear memory generalization, the question of whether the deficits found in the double-H maze after ReRh inactivation could be explained by spatial memory generalization might be worth an investigation.

Conclusions

Altogether, our current data indicate that, in the double-H maze, a behavioral adaptation to a task contingency modification requiring a shift toward the use of a memory for location might operate in a distributed circuit encompassing the mPFC as the possible shift-triggering (or inappropriate strategy inhibiting) structure, the hippocampus as the substrate from which the place memory is retrieved, as well as the ventral midline thalamus, and therein the ReRh, either as a potential relay of this processing or as a crucial actor of mPFC functions (Fig. 9). Therefore, the ReRh could be an important subcortical contributor to behavioral flexibility. Beside their fundamental interest, these findings add to our understanding of the cognitive alterations characterizing diencephalic amnesia associated with stroke or Korsakoff's syndrome. They could also be of some interest regarding an interpretation of cognitive symptoms seen in schizophrenia, because the reunions nucleus was recently proposed as a possible link of a loop contributing to the psychotic break in schizophrenic patients (Lisman et al., 2010; Zhang et al., 2012). Finally, these results might also shed additional light on our understanding of neurological or psychiatric diseases characterized by symptoms of cognitive flexibility failures.

References

- Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 22:425–444; discussion 444–489. [Medline](#)
- Aggleton JP, Dumont JR, Warburton EC (2011) Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: a review. *Learn Mem* 18:384–400. [CrossRef Medline](#)
- Allen TA, Narayanan NS, Kholodar-Smith DB, Zhao Y, Laubach M, Brown TH (2008) Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. *J Neurosci Methods* 171:30–38. [CrossRef Medline](#)
- Block AE, Dhanji H, Thompson-Tardif SF, Floresco SB (2007) Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting. *Cereb Cortex* 17:1625–1636. [CrossRef Medline](#)
- Blum S, Hebert AE, Dash PK (2006) A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport* 17:341–344. [CrossRef Medline](#)
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem* 13:187–191. [CrossRef Medline](#)
- Carlesimo GA, Costa A, Serra L, Bozzali M, Fadda L, Caltagirone C (2011) Prospective memory in thalamic amnesia. *Neuropsychologia* 49:2199–2208. [CrossRef Medline](#)
- Cassel R, Kelche C, Lecourtier L, Cassel JC (2012) The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats. *Behav Brain Res* 230:333–342. [CrossRef Medline](#)
- Churchwell JC, Kesner RP (2011) Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: interactions and independent parallel processing. *Behav Brain Res* 225:389–395. [CrossRef Medline](#)
- Di Prisco GV, Vertes RP (2006) Excitatory actions of the ventral midline (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60:45–55. [CrossRef Medline](#)
- Dias R, Aggleton JP (2000) Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioral flexibility. *Eur J Neurosci* 12:4457–4466. [CrossRef Medline](#)
- Dolleman-Van der Weel MJ, Witter MP (1996) Projections from the nucleus reuniens thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. *J Comp Neurol* 364:637–650. [CrossRef Medline](#)
- Dolleman-Van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP (1997) Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J Neurosci* 17:5640–5650. [Medline](#)
- Dolleman-van der Weel MJ, Morris RG, Witter MP (2009) Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Struct Funct* 213:329–342. [CrossRef Medline](#)
- Edeline JM, Hars B, Hennevin E, Cotillon N (2002) Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol Learn Mem* 78:100–124. [CrossRef Medline](#)
- Eleore L, López-Ramos JC, Guerra-Narbona R, Delgado-García JM (2011) Role of reuniens nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. *Plos One* 6:e23538. [CrossRef Medline](#)
- Floresco SB, Block AE, Tse MT (2008) Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behav Brain Res* 90:85–96. [CrossRef Medline](#)
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130. [CrossRef Medline](#)
- Gold JJ, Squire LR (2006) The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learn Mem* 13:699–710. [CrossRef Medline](#)
- Hembrook JR, Mair RG (2011) Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21:815–826. [CrossRef Medline](#)
- Hembrook JR, Onos KD, Mair RG (2012) Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus* 22:853–860. [CrossRef Medline](#)
- Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct* 217:191–209. [CrossRef Medline](#)
- Jo YS, Park EH, Kim IH, Park SK, Kim H, Kim HT, Choi JS (2007) The medial prefrontal cortex is involved in spatial memory retrieval under partial-cue conditions. *J Neurosci* 27:13567–13578. [CrossRef Medline](#)
- Kirch RD, Meyer PT, Geisler S, Braun F, Gehrig S, Langen KJ, von Hörsten S, Nikkhah G, Cassel JC, Döbrössy MD (2013) Early deficits in declarative and procedural memory dependent behavioral function in a transgenic rat model of Huntington's disease. *Behav Brain Res* 239:15–26. [CrossRef Medline](#)
- Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani R, Certa U, Cassel JC (2009) Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: an approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* 19:800–816. [CrossRef Medline](#)
- Lecourtier L, Antal MC, Cosquer B, Schumacher A, Samama B, Angst MJ, Ferrandon A, Koning E, Cassel JC, Nehlig A (2012) Intact neurobehavioral development and dramatic impairments of procedural-like memory following neonatal ventral hippocampal lesion in rats. *Neuroscience* 207:110–123. [CrossRef Medline](#)
- Lisman JE, Pi HJ, Zhang Y, Otmakhova NA (2010) A thalamo-hippocampal-ventral tegmental area loop may produce the positive feedback that underlies the psychotic break in schizophrenia. *Biol Psychiat* 68:17–24. [CrossRef Medline](#)
- Lopez J, Wolff M, Lecourtier L, Cosquer B, Bontempi B, Dalrymple-Alford J,

- Cassel JC (2009) The intralaminar thalamic nuclei contribute to remote spatial memory. *J Neurosci* 29:3302–3306. [CrossRef Medline](#)
- Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel JC, de Vasconcelos AP (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22:827–841. [CrossRef Medline](#)
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A (2012) The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J Neurosci* 32:9947–9959. [CrossRef Medline](#)
- Oualian C, Gisquet-Verrier P (2010) The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioral flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task. *Learn Mem* 17:654–668. [CrossRef Medline](#)
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Ed 4. San Diego: Academic.
- Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, Geiger K, Cassel JC (2011) The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav Brain Res* 218:138–151. [CrossRef Medline](#)
- Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP (1999) Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *J Neurosci* 19:4585–4594. [Medline](#)
- Ragozzino ME, Kim J, Hassert D, Minniti N, Kiang C (2003) The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behav Neurosci* 117:1054–1065. [CrossRef Medline](#)
- Schumacher A, de Vasconcelos AP, Lecourtier L, Moser A, Cassel JC (2011) Electrical high frequency stimulation in the dorsal striatum: effects on response learning and GABA levels in rats. *Behav Brain Res* 222:368–374. [Medline](#)
- Stratford TR, Wirtshafter D (2013) Injections of muscimol into the paraventricular thalamic nucleus, but not mediodorsal thalamic nuclei, induce feeding in rats. *Brain Res* 1490:128–133. [CrossRef Medline](#)
- Su HS, Bentivoglio M (1990) Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 297:582–593. [CrossRef Medline](#)
- Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J Neurosci* 26:7555–7564. [CrossRef Medline](#)
- Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampoprefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 1:411–419. [CrossRef Medline](#)
- Van der Werf YD, Jolles J, Witter MP, Uylings HB (2003) Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex* 39:1047–1062. [CrossRef Medline](#)
- van Duuren E, van der Plasse G, van der Blom R, Joosten RN, Mulder AB, Pennartz CM, Feenstra MG (2007) Pharmacological manipulation of neuronal ensemble activity by reverse microdialysis in freely moving rats: a comparative study of the effects of tetrodotoxin, lidocaine, and muscimol. *J Pharmacol Exp Ther* 323:61–69. [CrossRef Medline](#)
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20. [CrossRef Medline](#)
- Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ (2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the Rat. *J Comp Neurol* 499:768–796. [CrossRef Medline](#)
- Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C (2007) Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull* 71:601–609. [CrossRef Medline](#)
- Xu W, Südhof TC (2013) A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339:1290–1295. [CrossRef Medline](#)
- Zhang Y, Yoshida T, Katz DB, Lisman JE (2012) NMDAR antagonist action in thalamus imposes delta oscillations on the hippocampus. *J Neurophysiol* 107:3181–3189. [CrossRef Medline](#)

PUBLICATION 3

PUBLICATION 3

L'HIPPOCAMPE DORSAL ET LE CORTEX PREFRONTAL MEDIAN CONTRIBUENT TOUS DEUX AU RAPPEL D'UNE MEMOIRE RECENTE CHEZ LE RAT

Cette troisième publication avait pour objectif d'étudier le rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire récente chez le Rat. Le rôle du mPFC dans la formation et le rappel d'une mémoire ancienne est aujourd'hui largement accepté ; sa participation dans les processus qui sous-tendent le rappel d'une mémoire récente est par contre toujours discutée. Les résultats précédents (publication 2) nous ont amenés à approfondir cette question, ainsi que celle de l'effet de la dose de muscimol utilisée qui, à des concentrations trop élevées, peut inactiver des régions cérébrales situées au-delà de la structure ciblée. Cet effet expliquerait notamment les controverses présentes dans la littérature. Nous avons évalué l'impact de l'inactivation du mPFC ou de l'hippocampe dorsal sur le rappel à 24h de l'emplacement d'une plateforme dans la piscine de Morris. Le muscimol (30, 50, 80 et 250 ng) dilué dans 1 μ L de PBS, a été instillé bilatéralement 30 min avant le test de rappel. Les animaux contrôles recevaient uniquement du PBS. La dose la plus faible (30 ng) n'a pas d'impact sur le rappel quelle que soit la structure cible. Dans l'hippocampe dorsal, la dose de 50 ng de muscimol altère les performances de rappel, et aux doses supérieures (80 et 250 ng), les rats ne présentent aucun souvenir de l'emplacement de la plateforme. Instillée dans le mPFC, seule la dose la plus élevée de 250 ng de muscimol empêche le rappel. Cependant, même cette dernière dose peut être considérée comme relativement faible, eut égard aux concentrations utilisées dans la littérature, couramment 2 à 4 fois supérieures, et à la zone de diffusion du muscimol observée dans nos expériences, restreinte à la région cible (l'étendue de la diffusion du muscimol a été évaluée grâce à l'immunohistochimie de la protéine c-Fos et à l'aide de muscimol fluorescent). Les résultats de cette étude suggèrent donc un rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire spatiale récente, en accord avec une partie de la littérature qui met en avant l'implication de cette structure dans l'adaptation au contexte environnemental, la sélection de stratégie et la navigation orientée vers un but, implication qui ne serait pas en lien avec l'âge de la mémoire.

DORSAL HIPPOCAMPUS AND MEDIAL PREFRONTAL CORTEX EACH CONTRIBUTE TO THE RETRIEVAL OF A RECENT SPATIAL MEMORY IN RATS

Authors: Thibault Cholvin, Michaël Loureiro, Raphaëlle Cassel, Brigitte Cosquer, Karine Herbeaux, Anne Pereira de Vasconcelos and Jean-Christophe Cassel

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives

UMR 7364, CNRS – Université de Strasbourg

Neuropôle de Strasbourg, GDR 2905 du CNRS

Faculté de Psychologie

12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France

Corresponding author: Anne Pereira de Vasconcelos, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364 University of Strasbourg – CNRS, Faculty of Psychology, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. Phone: +33 368 851 952. E-mail address: pereira@unistra.fr.

Conflict of interest: None of the authors has any established or potential conflict of interest to declare in relation with the current work.

Acknowledgements: The authors wholeheartedly acknowledge the precious contribution of O. Bildstein, G. Edomwonyi and O. Egesi to animal care. They also thank the University of Strasbourg, the CNRS and the INSERM for their financial support, and the French government for a PhD fellowship to TC, ML and RC.

Abstract

Systems-level consolidation models propose that recent memories are initially hippocampus-dependent. When remote, they have become partially or completely dependent upon the medial prefrontal cortex (mPFC). A possible implication of the mPFC in recent memory, however, is still debated. Different amounts of muscimol (MSCI: 0, 30, 50, 80 and 250 ng in 1 μ L PBS) were used to assess the impact of inactivation of the dorsal hippocampus (dHip) or the mPFC on a 24-h delayed retrieval of a platform location that rats had learned drug-free in a water-maze. The smallest amount of MSCI (30 ng) had no effect on recall, whatever the region. A MSCI amount of 50 ng infused into the dHip disrupted spatial memory retrieval, as did all larger amounts. Infusions of MSCI into the mPFC did not alter performance in the 0-80 ng range. At 250 ng, it induced an as dramatic memory impairment as after efficient dHip inactivation. Stereological quantifications showed that 80ng MSCI in the dorsal hippocampus and 250 ng MSCI in the mPFC induced a more than 80% reduction of c-Fos expression, suggesting that, beyond the amounts infused, it is the magnitude of the neuronal activity decrease which is determinant as to the functional outcome of the inactivation. Because, based on the literature, 250 ng MSCI can be considered a small amount, our results point to a contribution of the mPFC to the recall of a recently-acquired spatial memory and thereby add to our knowledge about the functions of this major actor of cognition.

Keywords: Hippocampus; Medial prefrontal cortex; Morris water maze; Muscimol; Retrieval; Spatial memory.

Introduction

Memory encoding, consolidation and retrieval engage interactions between dispersed neuronal assemblies. The hippocampus (Hip) is crucial to encode and store declarative-like memories. Several studies supporting a role for Hip-medial prefrontal cortex (mPFC) interplay in systems-level consolidation show a selective role of the mPFC in retrieval of remote, but not recent memories (rev Frankland and Bontempi 2005; Winocur et al. 2010; Nadel and Hardt 2011). The first of them (Bontempi et al. 1999) labeled glucose metabolism in mice recalling a 3-arm configuration in a radial maze and found more activity in the mPFC at remote (25 days) than recent (5 days) time-point. The implication of the mPFC in remote memory retrieval was confirmed for spatial and fear memory, taste aversion, social transmission of food preference and trace eye-blink conditioning (e.g. Maviel et al. 2004; Frankland et al. 2004; Takehara-Nishiuchi et al. 2006; Teixeira et al. 2006; Lesburguères et al., 2011; Lopez et al. 2012).

Other studies support a role for the mPFC in recent memory, as shown with trace fear conditioning (Blum et al. 2006; Corcoran and Quirk 2007), inhibitory avoidance (Gonzalez et al. 2013) and after spatial paired-associate learning (Lee and Solivan, 2008). Molecular or pharmacological approaches strengthen these observations: inhibition of the NMDA receptor NR2B subunit in the mPFC disrupts the expression of recent trace-conditioned memories (Zhao et al. 2005). Intra-mPFC injections of the MEK inhibitor U0126 impair fear (Runyan et al. 2004) and spatial memory (Leon et al. 2010). 5-HT_{2A} receptor blockade in the mPFC prevents object recognition shortly after training (Bekinschtein et al. 2013). During retrieval, the mPFC might particularly control rule-based contextual memories, behavioral flexibility and strategy selection, but also segregate relevant from non-relevant associations, more generally guide adaptive responses in close interrelation with the Hip (e.g., Rich and Shapiro 2009; rev Euston et al. 2012; Preston and Eichenbaum, 2013). These studies suggest an involvement of the mPFC in memory processes not depending on the age of a memory, in accordance with mPFC implications in functions like working memory, attention, evaluative mechanisms and top-down control of hippocampal processes (e.g., Tomita et al. 1999; rev Euston et al. 2012). This view also finds support in studies showing an implication of the human ventromedial PFC (homolog to the mPFC in rodents) in retrieving relational and inferential memories (Zeithamova et al. 2012) or associative information congruent with established knowledge (van Kesteren et al. 2010, 2012). Churchwell et al. (2010) demonstrated the necessity of the Hip-mPFC circuit for encoding and retrieving allocentric goal locations. This observation is in line with data showing that activity of mPFC and Hip cells is highly correlated (rev Benchenane et al. 2011; Gordon, 2011), and that mPFC neurons display goal-, location- and time-specific firing patterns (Hok et al. 2005, 2013; Hyman et al. 2012).

Building on these findings, we assessed, in rats, spatial memory retrieval 24 h after the acquisition of a Morris water-maze task. Using different amounts (30, 50, 80 and 250 ng), muscimol (MSCI) was infused into the mPFC or the dorsal Hip (dHip) before the probe trial. The extent of the induced inactivation was verified by c-Fos immunohistochemistry. Our data clearly show that mPFC and dHip inactivation both impaired retrieval of a recent spatial memory when the c-Fos expression decrease exceeded 80% in each structure.

Materials and methods

Subjects

The study respected the rules and guidelines of the European Parliament 2010/63/UE of September 22nd, 2010 and the French Department of Agriculture (references for personal authorization licenses are n° 67-7 for APV, 67-215 for JCC; the other authors are under the formers' responsibility). This project has also been validated by the local ethical committee (CREMEAS - authorization n° AL/32/39/02/13). The experiments used 76 male Long-Evans rats aged 3 months and weighting 250-280 g at their arrival in the laboratory. Animals were housed individually in quiet facilities under a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 A.M.) with *ad libitum* access to food and water, controlled temperature (~23°C) and a hygrometry of ~55%. All rats were maintained in the same room for the whole duration of the experiment. Animals were individually handled for 2-3 min each day over 5 consecutive days before surgery and again before maze training.

Surgical procedure

Surgeries were conducted under aseptic conditions. Rats were anesthetized with a ketamine (98 mg/kg)-xylazine (13 mg/kg) mixture administered intraperitoneally. They were secured in a stereotaxic frame (incisor bar: -3 mm). Stainless steel guide cannulae (external diameter 0.4 mm) were implanted bilaterally in the mPFC, targeting the prelimbic area (AP: +3.1 mm, ML: ±0.7 mm, DV: -3.2 mm from skull) or in the dHip, targeting CA1 (AP: -3.8 mm, ML: ±2.4 mm, DV: -2.2 mm from skull). All coordinates are given from bregma according to Paxinos and Watson (2007). Each guide cannula was secured to the skull by acrylic dental cement and stainless steel screws. At the end of the surgery, a stainless steel mandrel (external diameter 0.28 mm) was inserted into each guide cannula. After surgery, rats were allowed to recover under a warm lamp for 20-30 min before being placed back into their home cage. A 7-day rest was given before behavioral experiment.

Reversible inactivation by MSCI infusions

In contrast to lidocaine or tetrodotoxin, MSCI reportedly induces inactivation of neurons in its diffusion radius without changing the excitability of the fibers en passant therein (Edeline et al. 2002; van Duuren et al. 2007). Rats were first habituated to be handled and maintained for drug infusions over 5 consecutive days. For infusions, rats were gently restrained by hand, the mandrels were removed, and infusion needles (external diameter 0.28 mm) were slowly lowered into the guide cannulae. The tip of each infusion needle protruded 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula into the dHip or the mPFC. The other needle tip was connected to a 10 μ L Hamilton syringe by polyethylene tubing. Using a microinjection pump (CMA/100), MSCI (Sigma, Saint-Louis, USA; dissolved in phosphate buffered saline [PBS]) was infused bilaterally (1 μ L over 90 s) using 4 amounts (30, 50, 80 or 250 ng) to induce inactivation. Controls received a bilateral infusion of PBS (same volume). At the completion of infusion, the needles were left in place for 30 s before retraction to allow drug diffusion into the parenchyma. Needles were then slowly removed and mandrels repositioned into the guide cannulae. Right after the infusion, rats were returned to their home cage until the start of the probe trial, 30 min later.

Water-maze task

The water maze consisted of a circular pool (diameter 160 cm; height 60 cm) filled with water ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) made opaque by addition of powdered milk (about 1.5g/L). The first day consisted in one 4-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, painted black, protruding 1 cm above the water surface and located in the South-East quadrant of the pool), starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool. During this pre-training day, a blue curtain surrounded the pool to prevent the use of distal cues and thus incidental encoding of spatial information. For the following days, the curtain was removed. Rats were given an 8-day drug-free training (4 consecutive trials/day, maximum duration of a trial = 60 s, intertrial interval = 10-15 s) with a hidden platform located at a fixed position in the North-West quadrant. Animals were starting randomly from each of the four cardinal points at the edge of the pool and the sequence of the start points was randomized over days. At the end of acquisition, all rats implanted either in the dHip or the mPFC were allocated randomly to one of the 5 treatment subgroups (i.e., PBS or MSCI 30, 50 80 or 250 ng/ μ L). On the following day, they were tested for retention in a 24h-delay probe trial, 30 min after a bilateral infusion of 1 μ L of MSCI. Control rats received an equivalent volume of PBS. For the probe trial, the platform was removed; the rats were introduced in the pool from the North-East (a start point never used during acquisition) and allowed a 60-s swimming time to explore the pool. Data analyses (computed by a video-tracking system [SMART; PanLab]) used, for the training trials, the distance

travelled as well as the latency before reaching the platform. For the probe trial, the time (in percent) spent in the target quadrant (i.e., where the platform was located during acquisition), as well as the number of annulus crossings (corresponding to the size of the platform enlarged by a 10 cm wide annulus), which was used as an index of memory precision (Lopez et al. 2012), were analysed. Thigmotaxic behaviour (i.e., the time spent swimming along the edge of the pool) and swim speed were also collected during training and probe trials (see Lopez et al. 2012; Loureiro et al. 2012a,b). After exclusion of animals displaying misplaced infusion sites, the total number of rats was as follow: for dHip-implanted rats, $n_{\text{PBS}} = 8$, $n_{\text{MSCI-30}} = 8$, $n_{\text{MSCI-50}} = 8$, $n_{\text{MSCI-80}} = 8$, $n_{\text{MSCI-250}} = 6$; for mPFC-implanted rats, $n_{\text{PBS}} = 8$, $n_{\text{MSCI-30}} = 8$, $n_{\text{MSCI-50}} = 8$, $n_{\text{MSCI-80}} = 8$, $n_{\text{MSCI-250}} = 6$.

Fluorescent MSCI infusions and histology

Sixty min after probe test completion, all rats received a bilateral infusion of fluorescent MSCI (Invitrogen™, Oregon, USA), using amounts identical to those used for the behavioral experiments. Fluorescent MSCI was used to i) verify that the infusion system was still efficient at the end of our experiments, ii) verify the location of the infusion sites, in addition to cresyl violet staining, iii) evaluate the radius of diffusion of the drug in the parenchyma. Fluorescent MSCI produces a red color when excited at 544 nm wavelength, enabling the intra-parenchymal detection of the presence, location and diffusion radius of the drug. This fluorescent MSCI was previously shown to have similar electrophysiological and behavioral effects as the classical form of MSCI, although having a higher molecular weight (Allen et al. 2008).

Thirty min after fluorescent MSCI infusion, corresponding to 90 min after the probe test, rats received an overdose of pentobarbital (200 mg/kg i.p.) and were perfused transcardially with a 4% phosphate-buffered (0.1 M) paraformaldehyde solution (PFA, 4°C). Brains were removed, post-fixed for 2 h (4 % PFA, 4°C) and transferred to a 20% sucrose solution for 48 h at 4°C before being snap-frozen (isopentane, -40°C, 1 min) and stored at -80°C. Free-floating coronal sections (40 µm) were cut using a cryostat (Reichert Jung, Frigocut 2800) in serial sections within a block of tissue extending from -2.28 mm to -4.20 mm from Bregma for dHip and from +4.00 to +2.52 mm from Bregma for mPFC (Paxinos and Watson, 2007). Considering our water-maze behavioral data showing that the two lower amounts of MSCI (30 and 50 ng) infused in the dHip did not allow to obtain a significant decrease of retrieval performance as compared to PBS, we focused our interest for estimation of the drug diffusion area, as well as quantification of neuronal activity (c-Fos immunohistochemistry) around the infusion site towards the two highest MSCI amounts (i.e., 80 and 250 ng). Starting at a random position, every sixth section was selected for immunohistochemistry, the following one for cresyl violet staining to be viewed under a light microscope for implantation site localization, and the next one for MSCI fluorescent imaging. Brain sections dedicated to both cresyl violet staining and

fluorescent MSC1 were mounted onto gelatin-coated slides. Seriations devoted to fluorescent MSC1 spread were directly observed under a fluorescent microscope and seriations for cresyl violet were stained and examined under light microscopy.

C-Fos immunohistochemistry, imaging and quantification

All sections dedicated to c-Fos immunohistochemistry were processed at the same time with all group conditions equally represented (n=6 rats for each group: 0, 80 and 250 ng MSC1) in each of the 24-well boxes used for staining. These precautions minimized technical bias. The sections were first rinsed three times during 10 min in PBS before being soaked for 1 h in 5% normal donkey serum in PBS containing 0.5% Triton X-100. The sections were subsequently transferred into the primary anti-Fos rabbit polyclonal antibody (1:4000, Rabbit anti-Fos polyclonal IgG; Santa Cruz, USA) solution for 18 h at room temperature, then soaked in a buffer solution containing biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:500, Biotin-SP-conjugated affiniPure Goat anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Staining was revealed with the avidin-biotin peroxidase method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) coupled to diaminobenzidine (Lopez et al. 2012).

Stereological analyses of c-Fos expression

The quantitative analyses of c-Fos-positive nuclei were performed in the three mPFC subregions, the anterior cingulate (ACC), prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices, as well as in the primary motor cortex (M1), from +4.00 mm to +2.52 mm from Bregma, and in the dHip areas considering Ammon's horn CA1, CA3 and the dentate gyrus (DG) subregions, as well as the lateral posterior thalamus (LPT), the primary somatosensory (S1) and primary auditory (Au1) cortices from -2.28 mm to -4.20 mm from Bregma (according to Paxinos and Watson, 2007; see Fig. 5). A single investigator, blind to the identity of the rats, analyzed all sections. The overall number of c-Fos immunoreactive neurons was estimated with the optical fractionator technique using optical disectors and allowing unbiased counting (West, 1991, 2013). Our stereological image analyses system consists of a Leica DM5500B light microscope coupled to a Microfire CCD color camera (Optronics) and equipped with a motorized x-y-z stage control. Stereological analyses were performed using the Mercator software (Explora Nova, La Rochelle, France) and all cell counts were processed online on the video image. The same intensity of light in the microscope as well as the same parameters in the exposure time of the digital camera were used for all sections. Cell counting was performed using one or two rectangular zone(s) (720 x 135 μm for CA1, CA3, and DG, 875 x 455 μm for M1, S1, Au1 and LPT, and 655 x 505 μm for ACC, PL and IL regions) centered on the area of interest (see Fig. 5). This procedure allowed to standardize the position and size of the counting zones between animals, treatment groups, and

antero-posterior levels of the sections. Areas of interest in stained sections were first outlined using a 2.5x objective and c-Fos-positive neurons counting was performed using a 100x (1.40 NA) oil-immersion objective. Counting grids (80 x 80 μm for dHip subregions and LPT, 100 x 100 μm for mPFC subregions, S1, M1 and Au1 cortices) containing counting frames (40 x 40 μm) equidistant from each other were randomly positioned within the area of interest using the Mercator software. The total number of c-Fos positive nuclei was estimated in 6 sections/animal (section sampling fraction (ssf) = 1/6, from the total number of nuclei counted in all optical dissectors). Details of stereological parameters were as follow: section interval = 240 μm , dissector height = 10 μm and guard zone = 2 μm (corresponding to upper and lower border exclusion zone, mean section thickness being at 14 μm). The coefficients of error (Gundersen et al. 1988) for each estimation and animal ranged from 0.09 to 0.17.

Statistical analysis

Water maze data were analyzed using a 2-way- or 3-way ANOVA with Structure (dHip, mPFC) and Treatment (PBS, 30, 50, 80, 250 ng MSCI) as the between-subject factors, and Day (1, 2...8) as the repeated measure for acquisition data, followed by *Post hoc* comparisons when required (Newman-Keuls multiple range test). The time spent in the target quadrant during the probe trial was also compared to chance (i.e. 25%) using one-sample Student's *t* test. C-Fos immunohistochemistry data were first analyzed using a two-way ANOVA with Treatment (PBS, 80, 250 ng MSCI) and Structure (CA1, CA3, DG, IL, PL, ACC, S1, M1, Au1, LPT) as the factors. A 1-way ANOVA was subsequently performed in each structure. Newman-Keuls *post-hoc* tests were used when appropriate. A $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Infusion sites and diffusion radius of MSCI in the mPFC and dHip

Figure 1 shows the location of the injector tips in the dHip (A) and mPFC (B). In the dHip, all infusion sites were localized between the coordinates -3.00 mm and -4.36 mm posterior to Bregma, according to Paxinos and Watson 2007. In the mPFC, infusion sites were found between +2.76 mm and +4.20 mm anterior to Bregma (Paxinos and Watson 2007). Figure 2 illustrates the area of diffusion around infusion sites 30 min after 80 or 250 ng fluorescent MSCI in 3 representative animals for each structure and dose. Both the diffusion radius and fluorescence intensity were depending on the amount infused. Even with 250 ng, the area of diffusion remained quite restricted to the target structure, i.e., the dHip and, for the mPFC, mostly the PL and ACC regions.

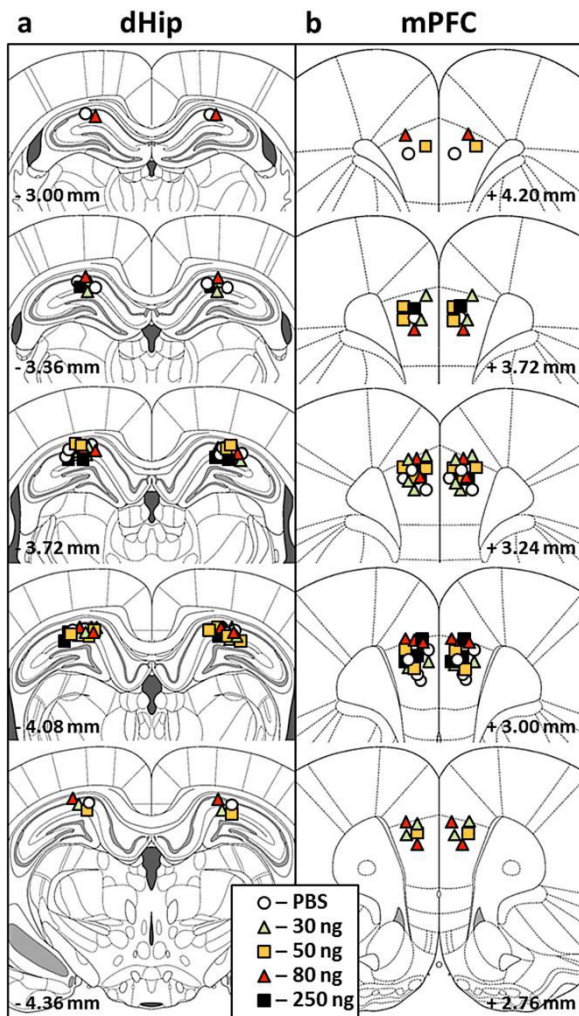


Figure 1. Location of the infusion sites on coronal sections through the dHip (A) and mPFC (B) in rats subjected to PBS (white symbols) or MSCI (green, yellow, red and black symbols referring to 30, 50, 80 and 250 ng MSCI, respectively) infusions before the probe trial in the water-maze. Each infusion site corresponds to the location of the tip of the infusion needle. Coordinates are given in mm from Bregma, according to Paxinos and Watson (2007).

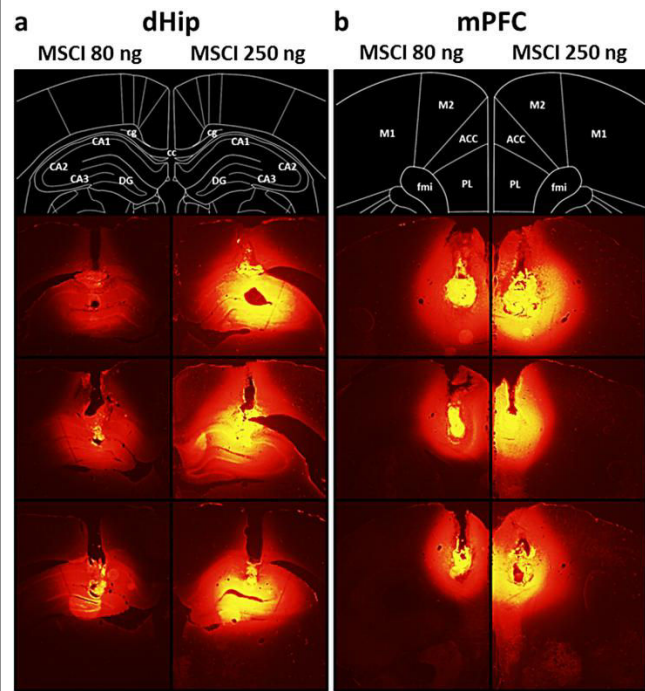


Figure 2. Schematic representations of the rat brain at the level of the infusion sites (upper part) and photomicrographs showing representative locations and diffusion radiuses of 80 or 250 ng fluorescent MSCI (bottom part) in the dHip and mPFC. **Top Panel:** in **A (dHip)**, White lines delineate the limits of the corpus callosum (cc), the cingulum (cg), regions CA1, CA2 and CA3 of the Ammon’s horn, and the dentate gyrus (DG), and in **B (mPFC)** the limits of the anterior cingulate cortex (ACC), the prelimbic cortex (PL), regions 1 and 2 of the motor cortex (M1, M2), and the forceps minor of the corpus callosum (fmi). **Bottom Panel:** Fluorescent MSCI infusions in 12 different animals: 3 dHip rats received 80 ng (**A – left column**) and 3 other rats 250 ng (**A – right column**) fluorescent MSCI; 3 mPFC rats received 80 ng (**B – left column**) and 3 other rats 250 ng (**B – right column**) fluorescent MSCI. Notice the larger diffusion radiuses and strongest labelling intensity after 250 ng as compared to 80 ng fluorescent MSCI infusions. It is however likely that the diffusion area of the fluorescent MSCI underestimated the diffusion area obtained with the MSCI used for the behavioral tests.

Water maze task

Training phase. As no infusion was performed during acquisition, we first used a 2-way ANOVA considering Structure (dHip, mPFC) and Day (1, 2, 3...) as factors (Fig. 3A). The distance to reach the platform decreased over days ($F_{(7,518)} = 110.9$, $p < 0.00001$), showing progressive learning of the platform location. The 2-way ANOVA showed no overall effect of the Structure ($F_{(1,74)} = 1.2$, *ns*), indicating no significant impact of the location of the cannulae on spatial learning abilities. We then analyzed the training data using a 3-way ANOVA to verify the absence of any bias in acquisition performance between treatment groups to be infused before the probe trial. Thus, the 3-way ANOVA considering, in addition to Structure and Day factors, the Treatment (PBS, 30, 50, 80, 250 ng MSCI) factor, showed no effect of the Treatment ($F_{(4,66)} = 0.9$, *ns*), and none of the interactions was significant. The statistical analyses of latencies, swim speed and thigmotaxic behavior showed a similar pattern of effects (data not illustrated). Therefore, learning was comparable in all dHip- and mPFC-implanted rats, whatever their future probe trial sub-group.

Probe trial. Results of the 2-way ANOVA considering the time spent in the target quadrant (Fig. 3B) showed a significant effect of the Treatment ($F_{(4,66)} = 6.8$, $p < 0.001$), of the Structure ($F_{(1,66)} = 6.3$, $p < 0.01$), and a significant interaction between the two factors ($F_{(4,66)} = 3.7$, $p < 0.01$). *Post-hoc* comparisons indicated in dHip-infused rats that 80 and 250 ng MSCI significantly impaired performance, in comparison with PBS controls ($p < 0.05$ in both cases). The Student's *t* test also showed that memory performance was significantly above chance (25%) level only in PBS- and 30 ng MSCI-dHIP rats ($p < 0.01$). In mPFC-infused rats, the only significant performance decrease was in rats given 250 ng MSCI, as compared to PBS controls ($p < 0.05$), and performance significantly exceeded chance level after PBS, 30, 50 and 80 ng MSCI (Student's *t* test).

Analysis of the number of annulus crossings confirmed the performance deficit in the 80 and 250 ng MSCI dHip groups (Fig. 3C) as the ANOVA showed a significant effect of the Treatment ($F_{(4,66)} = 7.8$, $p < 0.0001$) and of the Structure ($F_{(1,66)} = 5.4$, $p < 0.05$); there was no interaction between the two factors ($F_{(4,66)} = 1.8$, *ns*). *Post hoc* comparisons indicated that dHip rats given 80 or 250 ng MSCI were impaired in comparison with their PBS controls ($p < 0.05$). In mPFC-infused rats, no significant effect of MSCI was found on the number of crossings, although after 250 ng MSCI, this number decreased by about 50%, as compared to PBS (Fig. 3C). Thigmotaxic behavior and swim speed were not significantly affected by the Treatment or the Structure, and the ANOVA showed no interaction between the two factors (data not shown).

Thus, following drug-free learning of the platform location in the Morris water maze (which is considered a typical hippocampus-dependent task), spatial memory retrieval at 24-h was impaired after infusion of 50, 80 or 250 ng MSCI in the dHip, and of 250 ng MSCI in the mPFC. These results

confirm that recall of a recently acquired spatial memory requires the dHip. They also indicate that 250 ng MSCI infused into the mPFC hindered performance to the same extent as after efficient dHip inactivation.

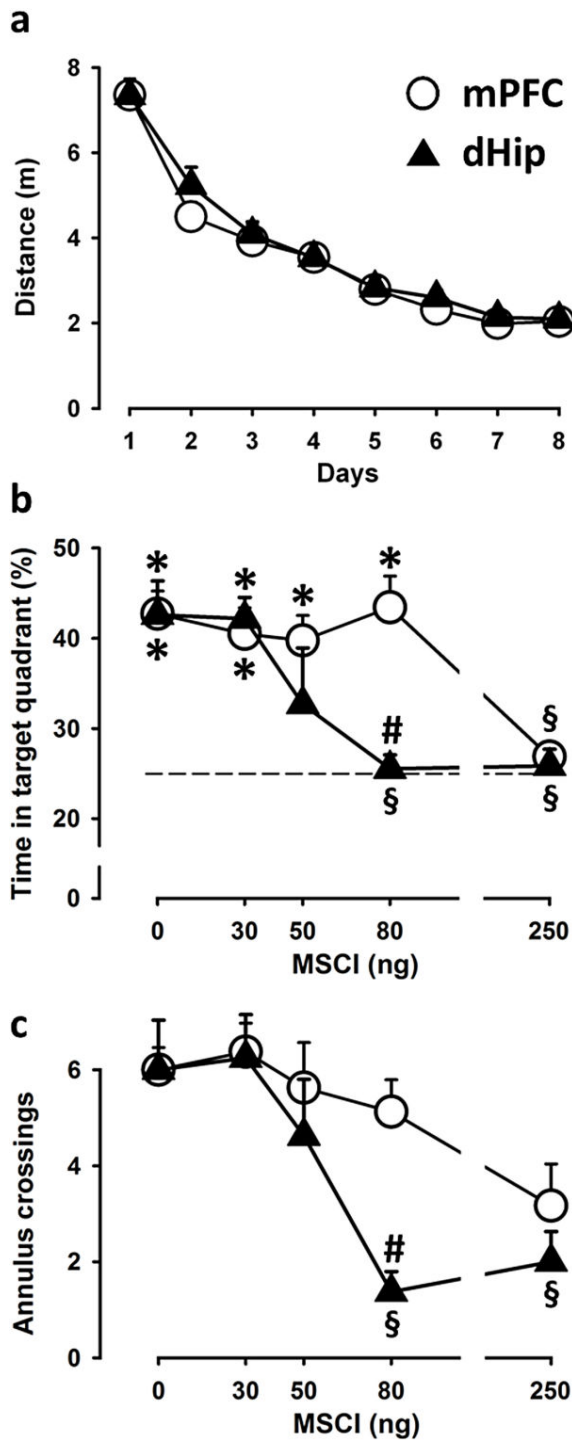


Figure 3. Spatial memory in the water-maze task: effects of dHip or mPFC inactivation on spatial memory retrieval. **A.** Drug-free acquisition over 8 consecutive days, expressed as average \pm SEM distance (in meters) to reach the hidden platform. **B, C.** Performance during the probe trial: mean \pm SEM percentage of time spent in the target quadrant (**B**) and number of crossings of a virtual annulus centered on the platform location during the acquisition (**C**) in 10 different groups of rats as a function of the infusion site (mPFC vs. dHip) and the amount of MSCI infused (0, 30, 50, 80 or 250 ng). The dashed line in **B** represents chance level (i.e., 25 %). Statistics: * $p < 0.05$, significant difference compared to chance; $\$p < 0.05$, significant difference compared to control animals (PBS); # $p < 0.05$, significant difference compared to mPFC counterparts (80 ng). In dHip rats, probe trial performance was altered from 50 to 250 ng MSCI, whereas in mPFC rats performance was only impaired with the highest amount of MSCI.

Gradual MSCI inactivation as shown by c-Fos imaging

The expression of the immediate early gene c-Fos is correlated with the level of neuronal activity (rev. Barry and Commins 2011) and can be used to compare the degrees of inactivation after MSCI infusion. To evidence region-specific MSCI-induced inactivation, we assessed neuronal activity in the target areas, i.e. the dHip (CA1, CA3, DG) and mPFC (ACC, PL, IL), as well as in surrounding areas, i.e., LPT, S1 and Au1 in dHip-infused rats, and M1 in mPFC-infused rats (Figs. 4 and 5). Figure 4 shows typical examples of c-Fos expression patterns in control (PBS) and MSCI conditions (MSCI 80, MSCI 250).

The 2-way ANOVA considering Treatment (PBS, 80 and 250 ng MSCI) and Structure (CA1, CA3, DG, IL, PL, ACC, S1, M1, Au1, LPT) showed significant Treatment ($F_{(2,150)} = 50.9, p < 0.0001$) and Structure ($F_{(9,150)} = 10.8, p < 0.0001$) effects, as well as a significant interaction between the two factors ($F_{(18,150)} = 2.7, p < 0.001$). The Structure effect reflects a much higher number of c-Fos-positive neurons in ACC, S1 and Au1 as compared to IL, PL, CA1, CA3 and LPT ($p < 0.05$ at least), among other significant *post-hoc* differences. Concerning the Treatment effect, *post-hoc* tests indicated that 80 and 250 ng MSCI groups globally differed from the PBS controls ($p < 0.0001$; Fig. 5). In the three subregions of the dHip, *post-hoc* analyses showed a significant decrease (>80%) of c-Fos expression in the 80 and 250 ng MSCI groups, as compared to the dHip PBS controls ($p < 0.01$), indicating a strong reduction of neuronal activity. Subsequent 1-way ANOVAs by structure revealed a Treatment effect in CA1, CA3, and DG ($F_{(2,15)} = 8.7, p < 0.01, F_{(2,15)} = 8.6, p < 0.01$ and $F_{(2,15)} = 9.2, p < 0.01$, respectively). In mPFC subregions, *post-hoc* tests showed that c-Fos expression was significantly decreased by >80% in 250 ng MSCI rats, as compared to PBS animals in the three subregions ($p < 0.05$ for IL and PL, $p < 0.01$ for ACC) while in 80 ng MSCI rats, only the ACC showed a significant 80% decrease, as compared to controls ($p < 0.01$). These results indicate that 80 ng MSCI was not sufficient to reduced c-Fos expression in all mPFC subregions, contrary to 250 ng MSCI (Fig. 5). Subsequent 1-way ANOVAs by structure showed a significant Treatment effect in IL, PL and ACC ($F_{(2,15)} = 4.7, p < 0.05, F_{(2,15)} = 4.4, p < 0.05$ and $F_{(2,15)} = 11.2, p < 0.01$ respectively).

Finally, concerning surrounding regions, the 1-way ANOVA showed a significant Treatment effect in S1 and LPT ($F_{(2,15)} = 11.2, p < 0.01$ and $F_{(2,15)} = 5.7, p < 0.05$, respectively). In comparison with PBS controls, the decrease of the number of c-Fos positive cells was significant in S1 for 80 and 250 ng MSCI (–45% and –76%, respectively, $p < 0.01$), and in LPT for 250 ng MSCI (–85%, $p < 0.05$). M1 and Au1 cortices showed no significant change in their neuronal activity whatever the MSCI amount (Fig. 5).

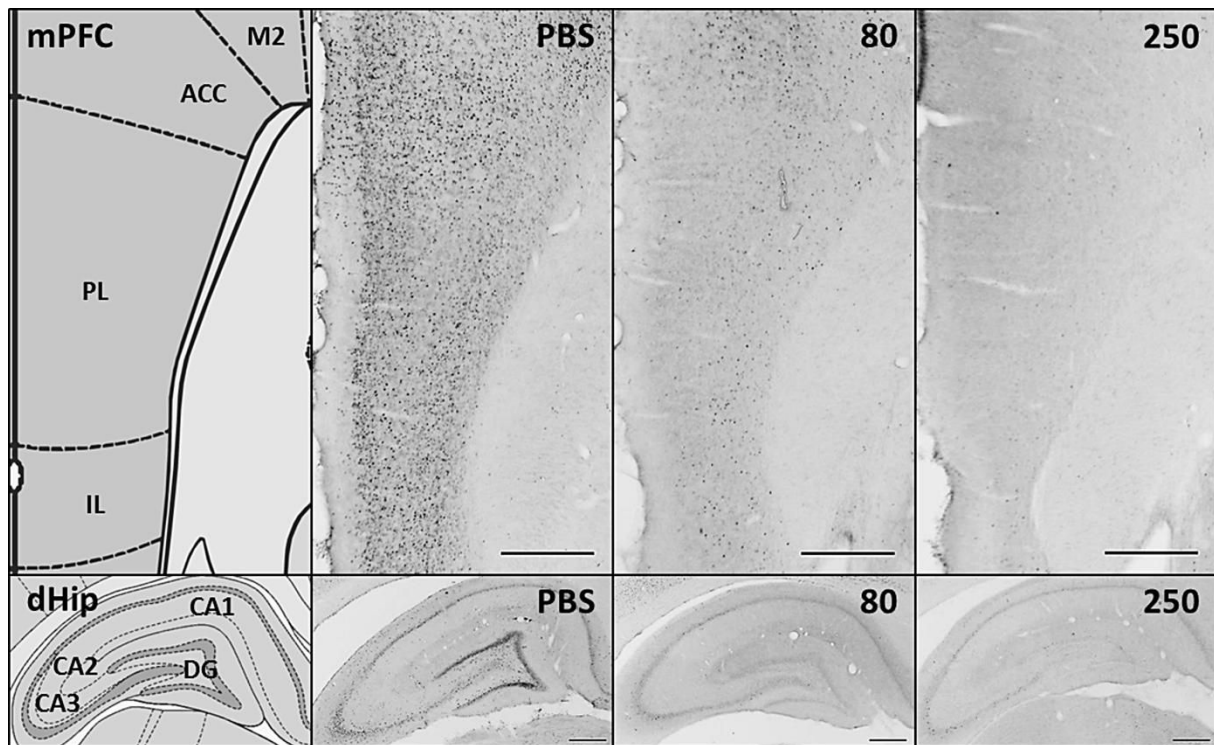


Figure 4. Schematic representations of the mPFC and dHip subregions (*left panel*, according to Paxinos and Watson, 2007) and corresponding coronal sections showing typical neuronal activity patterns (revealed by c-Fos immunocytochemistry) after PBS, 80 or 250 ng MSCI infusions (*center and right panels*). Notice the progressive decrease in c-Fos expression (especially in the mPFC) with the increase of MSCI amount. IL, infralimbic cortex; PL, prelimbic cortex; ACC, anterior cingulate cortex; M2, motor cortex, region 2; CA1, CA2 and CA3: fields 1, 2 and 3 of the Ammon's corn of the hippocampus; DG, dentate gyrus. Scale bars = 500 μ m.

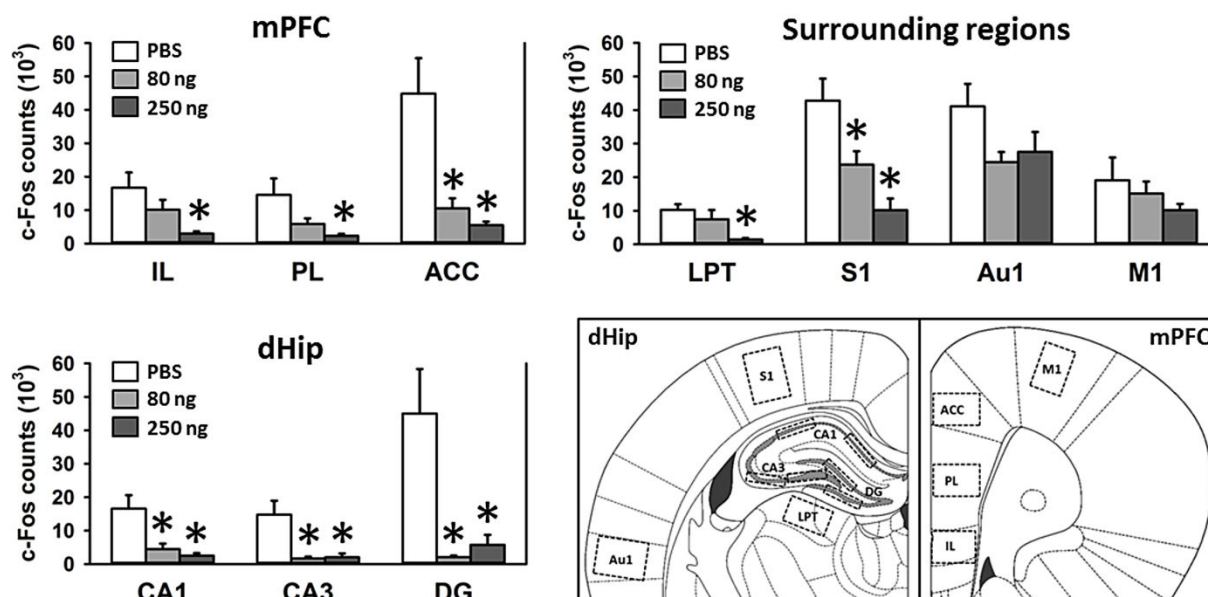


Figure 5. Quantification of c-Fos positive nuclei in 3 subregions of the mPFC (IL, PL and ACC), 3 subregions of the dHip (CA1, CA3 and DG) and 4 regions surrounding the structures of interest (LPT, S1, Au1 and M1) after PBS, 80 or 250 ng MSCI infusions. Data represent the mean number of c-Fos positive cells in thousands (10^3) + SEM. A significant decrease of the number of neurons expressing c-Fos was noticed in the ACC, CA1, CA3, DG and S1 regions at the amounts of 80 and 250 ng MSCI compared to the PBS control group; the same was true in the IL, PL and LPT at the amount of 250 ng MSCI only. C-Fos expression was not significantly modified in the Au1 and M1 cortices. The location of the counting zones for c-Fos quantification is indicated by the rectangles in the bottom right figure representing coronal sections at one typical anterior-posterior levels. Statistics: * $p < 0.05$ when compared to the control group (PBS). Abbreviations: IL, infralimbic cortex; PL, prelimbic cortex; ACC, anterior cingulate cortex; M2, motor cortex, region 2; CA1 and CA3: fields 1 and 3 of the Ammon's corn of the hippocampus; DG, dentate gyrus; LPT, lateral posterior thalamic nuclei; S1, somatosensory cortex, region 1; Au1, auditory cortex, region 1; M1, motor cortex, region 1.

Discussion

The present experiment compared the effects of different amounts of MSCI (30 to 250 ng) infused into the dHip or the mPFC on spatial memory retrieval 24h after the last of 8 consecutive training days in a Morris water maze. Our behavioral data show a contribution of both the dHip and the mPFC to such retrieval. Although obtained with different amounts of MSCI, namely 80 ng or more in the dHip and 250 ng in the mPFC, our cellular imaging data indicate that the magnitude of the c-Fos expression decrease was comparable in both structures (80-90% reduction) and, under this condition, showed equivalent efficiency in preventing the retrieval of a recent spatial memory. This is the first demonstration of disrupted recent spatial memory retrieval in response to a reasonably low amount of MSCI in the mPFC.

Methodological considerations

Among other options, many reversible inactivation studies assessing the implication of a particular brain region in memory processes have used sodium channel blockers like lidocaine or tetrodotoxin (e.g. Maviel et al, 2004; Pereira de Vasconcelos et al., 2006; Teixeira et al., 2006; Lopez et al. 2012; Loureiro et al. 2012a,b), or the GABA_A agonist MSCI (e.g., Izquierdo et al. 2007; Wang and Cai 2008; Haddon et al. 2011; Barbosa et al. 2012). Conversely to lidocaine or tetrodotoxin, MSCI has the advantage to act on neurons without affecting the fibers en passage. One of the big concerns when drugs are infused directly in the brain parenchyma is the magnitude of their diffusion radius. A few studies indicate that inactivation induced by MSCI infusion can extend far beyond the target region, with inhibition observed up to approximately 3 mm from the infusion site (Martin 1991; Martin and Ghez 1999; Edeline et al. 2002). These studies, however, did not distinguish direct drug effects in the diffusion radius from their covert functional consequences. In fact, however, extent of the diffusion was rarely assessed, and effects mediated by spreading of the drug into areas bordering their infusion site cannot be discarded easily. It is also interesting to note that amounts of infused MSCI undergo much variability among studies. When infused in the mPFC or dHip before memory retrieval, they usually range from 250 ng (e.g. Haddon et al. 2011; Barbosa et al. 2012) to 1 µg (e.g. Blum et al. 2006; Parnell et al. 2012), 0.5 µg being the most frequent option (e.g. Jo et al. 2007; Izquierdo et al. 2007; Wang and Cai 2008). To the best of our knowledge, there is one exception with 8 µg (Churchwell and Kesner 2011). Thus, based on the literature, the highest amount used in the current experiment, namely 250 ng, can still be considered reasonably small. Studies using MSCI amounts in the mPFC below 250 ng are sparse. These were by Cholvin et al. (2013; 30 and 80 ng), Rich and Shapiro (2007; 50 ng), Shaw et al. (2013; 50 ng) and Lee and Solivan (2008; 200 ng). All of them pointed to the contribution of the mPFC to recent memory recall and/or behavioral flexibility (using

the novel Double-H maze, a plus-shaped maze, a tactile visuospatial conditional discrimination task and a radial maze, respectively). The amounts used in the present study are amongst the lowest in the literature demonstrating a contribution of the dHip or the mPFC to recent spatial memory retrieval. Furthermore, we found no evidence for excessive MSCl diffusion outside the target area, except in the S1 cortex (localized just above the dHip formation and exposed to leakages along the guide-cannula) and the LPT (but only with the amount of 250 ng MSCl). C-Fos expression in Au1 and M1 cortices was not affected by MSCl infusion, whatever the amount. Furthermore, and although fluorescent MSCl is heavier than the original molecule and might have underestimated the diffusion radius, it enabled to document a diffusion that was mostly restricted to the dHip and mPFC, and to demonstrate a larger diffusion radius with 250 ng than with 80 ng. Altogether, these observations confirm that the behavioral consequences of the MSCl infusion were most probably related to the inactivation of the dHip and the mPFC.

The contribution of mPFC to spatial memory retrieval is not hanging upon memory remoteness

Leon et al. (2010) reported that acquisition of spatial information in a Morris water maze (single-day learning) induced a significant ERK activation in the hippocampus, not in the mPFC. However, when animals were tested for recent memory recall, the same authors observed an activation of the ERK pathway in both structures. Furthermore, Blum et al. (2006) reported mPFC activation during the recall of remote and recent fear memory. Runyan et al. (2004) showed that if the mPFC does not directly participate in the encoding of fear conditioning, this region is required for memory storage. Such observations in rodents are in line with a recent fMRI report in humans by Bonnici et al. (2012). Using multivoxel pattern analysis, these authors showed that the ventromedial prefrontal cortex (homolog of the mPFC in rodents) is engaged in addition to the hippocampus during the retrieval of recent as well as remote autobiographical memories. The mPFC might also play an active role to sort out conflicting information within related but competing memories (e.g., Rich and Shapiro 2007; Lee and Solivan 2008; Cholvin et al. 2013). In the latter three reports demonstrating the implication of the mPFC in recent memory retrieval, the tasks required both spatial navigation and behavioral flexibility.

Theoretical models and experimental/clinical data support a mPFC contribution to the retrieval of remote declarative-like memories only, recent ones being proposed to mainly depend on the hippocampus (e.g. Frankland and Bontempi 2005; Nadel and Hardt 2011). Others suggest a permanent role of the mPFC for retrieval processes, whatever the memory's age (e.g. Runyan et al. 2004; Blum et al. 2006). Our present data clearly support the latter assumption, in line with the literature arguing that the executive control exerted by the mPFC does actively contribute, together with the Hip, to retrieval processes, and do not seem to do so on a memory age-dependent manner

(e.g. Leon et al. 2010; Weible et al. 2012; Gonzales et al. 2013; rev Preston and Eichenbaum, 2013). Therefore, it seems that findings in line with the opposite assumption could be questioned in terms of type of drug infused (lidocaine, muscimol, CNQX, AP-5...), amounts used and inactivation extent achieved (as illustrated herein), although the latter were rarely verified.

Our results could also be compatible with a functional heterogeneity within the mPFC subregions. Indeed, reducing neuronal activity by 40-60% in the PL and IL and by 76% in the ACC, as seen after MSCI 80 ng in the mPFC, had no impact on memory retrieval. With 250 ng MSCI, which produced an about 85% reduction of c-Fos expression in the three mPFC subregions, and a reduction that did not differ significantly from that induced in the ACC by 80 ng, retrieval performance was at chance level. If not simply reflecting a mass effect, this amount-dependent effect might point to the fact that the PL and/or IL cortices contribute to recent memory retrieval more than the ACC does. A few studies have addressed the question of a possible functional heterogeneity in the mPFC. Experimental data based on reversible inactivation showed that ACC inactivation specifically disrupted the expression of remote, but not recent contextual fear (Frankland et al. 2004). The same is true for discrimination memory in a 5-arm device (Maviel et al. 2004) and for spatial memory in the water maze (Teixeira et al. 2006). Likewise, using c-Fos and/or zif268 immunohistochemistry, Frankland et al. (2004) in a fear conditioning task, as well as Teixeira et al. (2006) and Lopez et al. (2012) in a Morris water maze, found a strong activation of the ACC following remote but not recent memory retrieval. These data could reflect the progressive engagement of this mPFC subregion during the course of systems-level consolidation, in line with previous studies demonstrating a specific role of the ACC in processes underlying remote memory retrieval (Bontempi et al. 1999; Maviel et al. 2004; rev Frankland and Bontempi, 2005). Interestingly, Lopez et al. (2012) showed activation patterns (c-Fos expression) in the IL and PL cortices that were similar for the retrieval of recent and remote spatial memories, indicating their possible contribution to retrieval processes that would not depend on the age of a memory.

Conclusion

In conclusion, the present study demonstrates a contribution of the mPFC to spatial memory retrieval shortly after task acquisition. Our results also suggest that this retrieval could engage the IL and PL cortices more than the ACC, which could be more involved during remote memory recall.

References

- Allen TA, Narayanan NS, Kholodar-Smith DB, et al. (2008) Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. *Journal of Neuroscience Methods* 171:30–38. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.01.033
- Barbosa FF, de Oliveira Pontes IM, Ribeiro S, et al. (2012) Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. *Behavioural Brain Research* 232:269–277. doi: 10.1016/j.bbr.2012.04.022
- Barry DN, Commins S (2011) Imaging spatial learning in the brain using immediate early genes: insights, opportunities and limitations. *Reviews in the Neurosciences*. doi: 10.1515/rns.2011.019
- Bekinschtein P, Renner MC, Gonzalez MC, Weisstaub N (2013) Role of Medial Prefrontal Cortex Serotonin 2A Receptors in the Control of Retrieval of Recognition Memory in Rats. *Journal of Neuroscience* 33:15716–15725. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2087-13.2013
- Benchenane K, Tiesinga PH, Battaglia FP (2011) Oscillations in the prefrontal cortex: a gateway to memory and attention. *Current Opinion in Neurobiology* 21:475–485. doi: 10.1016/j.conb.2011.01.004
- Blum S, Hebert AE, Dash PK (2006) A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport* 17:341–344.
- Bonnici HM, Chadwick MJ, Lutti A, et al. (2012) Detecting Representations of Recent and Remote Autobiographical Memories in vmPFC and Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 32:16982–16991. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2475-12.2012
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400:671–675. doi: 10.1038/23270
- Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, et al. (2013) The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. *J Neurosci* 33:8772–8783. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013
- Churchwell JC, Kesner RP (2011) Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: Interactions and independent parallel processing. *Behavioural Brain Research* 225:389–395. doi: 10.1016/j.bbr.2011.07.045
- Depue BE (2012) A neuroanatomical model of prefrontal inhibitory modulation of memory retrieval. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 36:1382–1399. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.02.012

- Van Duuren E, van der Plasse G, van der Blom R, et al. (2007) Pharmacological Manipulation of Neuronal Ensemble Activity by Reverse Microdialysis in Freely Moving Rats: A Comparative Study of the Effects of Tetrodotoxin, Lidocaine, and Muscimol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323:61–69. doi: 10.1124/jpet.107.124784
- Edeline J (2002) Muscimol Diffusion after Intracerebral Microinjections: A Reevaluation Based on Electrophysiological and Autoradiographic Quantifications. *Neurobiology of Learning and Memory* 78:100–124. doi: 10.1006/nlme.2001.4035
- Frankland PW (2004) The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. *Science* 304:881–883. doi: 10.1126/science.1094804
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6:119–130. doi: 10.1038/nrn1607
- Gonzalez C, Kramar C, Garagoli F, et al. (2013) Medial prefrontal cortex is a crucial node of a rapid learning system that retrieves recent and remote memories. *Neurobiology of Learning and Memory* 103:19–25. doi: 10.1016/j.nlm.2013.04.006
- Gordon JA (2011) Oscillations and hippocampal–prefrontal synchrony. *Current Opinion in Neurobiology* 21:486–491. doi: 10.1016/j.conb.2011.02.012
- Haddon JE, Killcross S (2011) Inactivation of the infralimbic prefrontal cortex in rats reduces the influence of inappropriate habitual responding in a response-conflict task. *Neuroscience* 199:205–212. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.09.065
- Hok V, Lenck-Santini P-P, Roux S, et al. (2007) Goal-Related Activity in Hippocampal Place Cells. *Journal of Neuroscience* 27:472–482. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2864-06.2007
- Hok V, Save E, Lenck-Santini PP, Poucet B (2005) Coding for spatial goals in the prelimbic/infralimbic area of the rat frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4602–4607.
- Hyman JM, Ma L, Balaguer-Ballester E, et al. (2012) Contextual encoding by ensembles of medial prefrontal cortex neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:5086–5091. doi: 10.1073/pnas.1114415109
- Izquierdo LA, Barros DM, da Costa JC, et al. (2007) A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 88:160–166. doi: 10.1016/j.nlm.2007.04.014

- Jo YS, Park EH, Kim IH, et al. (2007) The Medial Prefrontal Cortex Is Involved in Spatial Memory Retrieval under Partial-Cue Conditions. *Journal of Neuroscience* 27:13567–13578. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3589-07.2007
- Van Kesteren MTR, Rijpkema M, Ruitter DJ, Fernandez G (2010) Retrieval of Associative Information Congruent with Prior Knowledge Is Related to Increased Medial Prefrontal Activity and Connectivity. *Journal of Neuroscience* 30:15888–15894. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2674-10.2010
- Van Kesteren MTR, Ruitter DJ, Fernández G, Henson RN (2012) How schema and novelty augment memory formation. *Trends in Neurosciences* 35:211–219. doi: 10.1016/j.tins.2012.02.001
- Lee I, Solivan F (2008) The roles of the medial prefrontal cortex and hippocampus in a spatial paired-association task. *Learning & Memory* 15:357–367. doi: 10.1101/lm.902708
- Leon WC, Bruno MA, Allard S, et al. (2010) Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learn Mem* 17:297–305. doi: 10.1101/lm.1804410
- Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, et al. (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22:827–841. doi: 10.1002/hipo.20943
- Loureiro M, Lecourtier L, Engeln M, et al. (2012a) The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Structure and Function* 217:93–106. doi: 10.1007/s00429-011-0332-y
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, et al. (2012b) The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *Journal of Neuroscience* 32:9947–9959. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0410-12.2012
- Martin JH (1991) Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 127:160–164.
- Martin JH, Ghez C (1999) Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. *Journal of neuroscience methods* 86:145–159.
- Maviel T (2004) Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science* 305:96–99. doi: 10.1126/science.1098180
- Nadel L, Hardt O (2011) Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology* 36:251–273.

- Parnell R, Grasby K, Talk A (2012) The prefrontal cortex is required for incidental encoding but not recollection of source information in rodents. *Behavioural Brain Research* 232:77–83. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.040
- Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier/Academic, Amsterdam; Boston; London
- Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, et al. (2006) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: A comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. *Neuroscience* 141:1649–1663. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.05.023
- Rich EL, Shapiro M (2009) Rat Prefrontal Cortical Neurons Selectively Code Strategy Switches. *Journal of Neuroscience* 29:7208–7219. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6068-08.2009
- Rich EL, Shapiro ML (2007) Prelimbic/Infralimbic Inactivation Impairs Memory for Multiple Task Switches, But Not Flexible Selection of Familiar Tasks. *Journal of Neuroscience* 27:4747–4755. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0369-07.2007
- Runyan JD (2004) A Role for Prefrontal Cortex in Memory Storage for Trace Fear Conditioning. *Journal of Neuroscience* 24:1288–1295. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4880-03.2004
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571–582.
- Shaw CL, Watson GDR, Hallock HL, et al. (2013) The role of the medial prefrontal cortex in the acquisition, retention, and reversal of a tactile visuospatial conditional discrimination task. *Behavioural Brain Research* 236:94–101. doi: 10.1016/j.bbr.2012.08.024
- Takehara-Nishiuchi K (2006) Systems Consolidation Requires Postlearning Activation of NMDA Receptors in the Medial Prefrontal Cortex in Trace Eyeblink Conditioning. *Journal of Neuroscience* 26:5049–5058. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4381-05.2006
- Teixeira CM (2006) Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in the Expression of Remote Spatial Memory. *Journal of Neuroscience* 26:7555–7564. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1068-06.2006
- Tomita H, Ohbayashi M, Nakahara K, et al. (1999) Top-down signal from prefrontal cortex in executive control of memory retrieval. *Nature* 401:699–703.

- Wang G-W, Cai J-X (2008) Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic cortical circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 90:365–373. doi: 10.1016/j.nlm.2008.05.009
- Weible AP, Rowland DC, Monaghan CK, et al. (2012) Neural Correlates of Long-Term Object Memory in the Mouse Anterior Cingulate Cortex. *Journal of Neuroscience* 32:5598–5608. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5265-11.2012
- West MJ (2013) Getting Started in Stereology. *Cold Spring Harbor Protocols* 2013:pdb.top071845–pdb.top071845. doi: 10.1101/pdb.top071845
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482–497. doi: 10.1002/ar.1092310411
- Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B (2010) Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2339–2356. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2010.04.016
- Zeithamova D, Dominick AL, Preston AR (2012) Hippocampal and Ventral Medial Prefrontal Activation during Retrieval-Mediated Learning Supports Novel Inference. *Neuron* 75:168–179. doi: 10.1016/j.neuron.2012.05.010
- Zhao M-G, Toyoda H, Lee Y-S, et al. (2005) Roles of NMDA NR2B Subtype Receptor in Prefrontal Long-Term Potentiation and Contextual Fear Memory. *Neuron* 47:859–872. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.014

PUBLICATION 4

PUBLICATION 4

L'ACTIVATION DU CORTEX PREFRONTAL MEDIAN DURANT LE RAPPEL D'UNE MEMOIRE ANCIENNE DEPEND DES NOYAUX ReRh DU THALAMUS

Cette quatrième publication avait pour objectif de préciser l'implication des noyaux ReRh du thalamus au sein du circuit hippocampo-cortico-thalamique dans la persistance d'une mémoire spatiale (publication 1). Les rats ont subi une lésion excitotoxique (NMDA) des noyaux ReRh, puis la mémoire spatiale a été évaluée dans la piscine de Morris. Nous avons confirmé l'implication de ces noyaux thalamiques dans les processus aboutissant à la rétention à long-terme d'une mémoire spatiale. Puis à l'aide de l'imagerie du gène précoce *c-Fos*, et d'un comptage stéréologique des neurones *c-fos* positifs, nous avons montré, dans le mPFC, une augmentation du nombre de cellules exprimant la protéine *c-Fos* lors du rappel d'une mémoire ancienne (25 jours) en comparaison du rappel d'une mémoire récente (5 jours) chez les rats Sham (contrôles). Ces résultats sont en accord avec des données obtenues précédemment au laboratoire (Lopez et al. 2012) et dans la littérature (Maviel et al. 2004 ; Frankland et al. 2004). Chez les rats lésés, nos résultats indiquent l'absence d'une telle augmentation du recrutement neuronal avec le délai (pas de différences entre 5 et 25 jours). Ainsi, en cas de lésion des noyaux ReRh, le niveau d'expression de la protéine *c-Fos* dans le mPFC est comparable entre 5j et à 25j, et donc significativement diminué à 25j par rapport à celui des animaux Sham. Ces résultats concordent avec la baisse des performances de rappel observée chez les rats lésés dans le test de la piscine de Morris à 25j. De plus, le cortex cingulaire antérieur (ACC) serait la région dont l'activité cellulaire lors du rappel à 25j dépend le plus de l'intégrité des noyaux ReRh, avec une forte baisse de l'expression de la protéine *c-Fos* chez les rats lésés, alors que celle-ci n'est pas affectée dans le cortex infralimbique (IL), et légèrement diminuée dans le cortex prélimbique (PL). Ces résultats confirment le rôle prépondérant de l'ACC dans la formation et l'expression d'une mémoire ancienne (rev. Frankland et Bontempi, 2005 ; Winocur et al. 2010), et appuient l'hypothèse d'une participation des noyaux ReRh dans la consolidation systémique. Dans l'hippocampe dorsal, la lésion des noyaux ReRh induit une diminution modérée de l'activité neuronale (dans les trois sous-régions CA1, CA3 et DG), et ce quel que soit le délai. Ainsi, l'incapacité des animaux porteurs d'une lésion des noyaux ReRh à rappeler une mémoire spatiale ancienne pourrait être liée à l'absence, au sein du mPFC, du recrutement neuronal nécessaire à l'expression de cette mémoire ancienne.

ACTIVATION OF THE MEDIAL PREFRONTAL CORTEX DURING SPATIAL REMOTE MEMORY RETRIEVAL DEPENDS ON THE REUNIENS AND RHOMBOID NUCLEI OF THE VENTRAL MIDLINE THALAMUS

Authors: Thibault Cholvin, Cosquer B, Kelche C, Jean-Christophe Cassel, Anne Pereira de Vasconcelos.

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives

UMR 7364, CNRS – Université de Strasbourg

Neuropôle de Strasbourg, GDR 2905 du CNRS

Faculté de Psychologie

12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France

Corresponding author: Anne Pereira de Vasconcelos, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364 University of Strasbourg – CNRS, Faculty of Psychology, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. Phone: +33 368 851 971. E-mail address: pereira@unistra.fr.

Conflict of interest: None of the authors has any established or potential conflict of interest to declare in relation with the current work.

Acknowledgements: The authors wholeheartedly acknowledge the precious contribution of O. Bildstein, G. Edomwonyi and O. Egesi to animal care. They also thank the University of Strasbourg, the CNRS and the INSERM for their financial support, and the French government for a PhD fellowship to TC.

Abstract

Systems-level consolidation of declarative or declarative-like memories engages interactions between the hippocampus and the medial prefrontal cortex (mPFC). In rodent models, the reuniens and rhomboid nuclei (ReRh) of the thalamus are known to be reciprocally connected with both structures and could therefore represent a major functional link for the information flow between them. Using fiber-sparing excitotoxic lesions of the ReRh, c-Fos immediate early gene imaging and unbiased stereological quantification, we provide evidence demonstrating a contribution of the ReRh to mPFC-dependent activation of a remote (25-d old) spatial memory. Rats subjected to fiber-sparing NMDA lesions of the ReRh normally acquired the platform location in a water maze and recalled it at a 5-d post-acquisition delay, their performance being not different from that of sham-operated controls. At a 25-d delay, however, there was no evidence for recall: rats with ReRh lesions performed at chance level. In the dorsal hippocampus of control rats, the increase of c-Fos expression was not different between recent and remote time points. It was not affected by ReRh lesions. However, in the mPFC of control animals, c-Fos expression significantly increased after remote as compared to recent memory retrieval. Most interestingly, such an augmentation was not seen in ReRh rats. Taken together, these data indicate a determinant role for the ReRh either in the retrieval of a remote spatial memory depending on an engagement of the mPFC, or, as proposed earlier (Loureiro et al., J Neurosci, 2012), in the perseveration of a memory during systems-level consolidation.

Keywords: Spatial memory . Rat . Morris water maze . Hippocampus . Medial prefrontal cortex . Reuniens nucleus . Rhomboid nucleus . Retrieval . Consolidation . Fos immunohistochemistry.

Introduction

Processes underlying memory persistence and anatomo-functional mechanisms engaged in systems-level consolidation are still debated. The hippocampus is usually seen as the most crucial site for the formation and consolidation of declarative memories in humans and of declarative-like ones in animal models (Winocur et al., 2010; Nadel and Hardt, 2011). There is, however, growing evidence that several sites may act in concert with the hippocampus. These sites form a network of interconnected structures which enable construction, consolidation and retrieval of a memory trace. Thalamic nuclei are part of this network (Aggleton and Brown, 1999; Gold and Squire, 2006; Lopez et al., 2009). Diencephalic lesions, as seen in Korsakoff syndrome or in thalamic stroke, produce cognitive deficits akin to those characterizing hippocampal amnesia or prefrontal dysfunctions (Kopelman, 2002; Aggleton et al., 2011; Carlesimo et al., 2011). Among other thalamic nuclei whose role in memory processes remains to be clarified, two ventral midline nuclei are the subject of increasing attention: the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei. Indeed, anatomical and electrophysiological studies point to the involvement of the ReRh nuclei in the information flow between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (Vertes, 2006; Vertes et al., 2007). The ReRh is the major source of excitatory thalamic projections to the hippocampus (Bertram and Zhang, 1999; Cavdar et al., 2008; Di Prisco and Vertes, 2006). It has dense bilateral connections with the mPFC (Vertes et al., 2006), and some of its neurons even project to both structures at the same time (Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014). This neuroanatomical organization places the ReRh at a hub position in hippocampo-cortical interactions. Experimental approaches in animals using permanent lesions, reversible functional inactivation or optogenetic functional manipulations suggest that the ReRh could play an essential role in the generalization of memory attributes (Xu and Sudhof, 2013), working memory, recognition memory (Hembrook and Mair, 2011; Hembrook et al., 2012), strategy-shifting (Dolleman-Van Der Weel et al., 2009, Cholvin et al., 2013) and systems-level consolidation (Loureiro et al., 2012). Regarding this type of consolidation, we showed evidence demonstrating a contribution of the ReRh to spatial memory persistence. Based on neuroanatomical evidence and previous findings, we therefore hypothesized that mPFC or dHip cellular activation patterns during the retrieval of remote spatial memory might be affected by ReRh lesions. The present study explored this hypothesis by combining fiber-sparing excitotoxic lesion, c-Fos immediate early gene imaging and unbiased stereological quantification methods. Rats subjected to ReRh lesions showed both normal task acquisition and recent memory recall, but exhibited no evidence for remote memory retrieval, as reported previously (Loureiro et al., 2012). Furthermore, there was a dramatic ReRh lesion-induced decrease of c-Fos expression in the mPFC at only the post-acquisition delay corresponding to remote memory recall.

Materials and methods

Subjects

The study conformed to the rules of the European Community council directive of 22 September 2010 (2010-63) and the French Department of Agriculture (personal authorization licenses are n° 67-7 for APV, 67-215 for JCC; the other authors are under the formers' responsibility), and has been validated by the local ethical committee (CREMEAS - authorization n° AL/32/39/02/13). The experiments used 75 male Long-Evans rats aged 3 months and weighting 250-280 g at their arrival in the laboratory. Animals were housed individually in quiet facilities under a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 A.M.) with *ad libitum* access to food and water, controlled temperature (~23°C) and a hygrometry of about 55%. All rats were maintained in this housing room for the whole duration of the experiment. Animals were individually handled for 2-3 min each day over 5 consecutive days before surgery, and again so before maze training. Part of them have been trained and tested in a water-maze task. The others have been kept in their home cage (HC) as controls for c-Fos expression.

Surgical procedure: fiber-sparing excitotoxic lesions

Surgeries were conducted under aseptic conditions. Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and secured in a stereotaxic frame (incisor bar: -3 mm). Excitotoxic fiber-sparing lesions targeting the ventral midline thalamus (ReRh) were made using slow microinfusions of 0.1 M NMDA (0.1 µL/site over 2 min, dissolved in phosphate buffered saline; Sigma-Aldrich) via an infusion needle (0.28 mm in diameter) connected to a motorized infusion pump. After leaving the needle *in situ* for an additional 5 min to ensure diffusion of NMDA into the target structure, it was slowly retracted. The three infusions sites had the following coordinates (in mm): AP = -1.5, -2.1 and -2.7 (from bregma), DV = -7.0, -7.1 and -7.2 (from skull), ML = +1.8, +1.8 and + 1.9, respectively (from midline of the sagittal sinus, Paxinos and Watson, 2007) using a ML angle of 15°. The sham-operated controls (Sham) were infused with phosphate-buffered saline at the same coordinates. After surgery, rats were allowed to recover under a warm lamp for 20-30 min before being placed back into their home cage, where they were given a two-week rest before the start of the behavioral experiments.

The water-maze task

The water maze consisted of a circular pool (diameter 160 cm; height 60 cm) filled with water (21 +/- 1°C) made opaque by addition of powdered milk (about 1.5g/L). The first day consisted in one 4-trial session using a visible platform (diameter 11 cm, painted black, protruding 1 cm above the water surface and located in the South-East quadrant of the pool), starting randomly from each of the four

cardinal points at the edge of the pool. During this pre-training day, a blue curtain surrounded the pool to prevent the use of distal cues and thus incidental encoding of spatial information. This pre-training session facilitates the subsequent acquisition of the hidden platform task, as the animals have already learned that they have to find and climb onto the escape platform. After this day, the curtain was removed. Rats were then given an 8-day training with four successive acquisition trials per day (intertrial interval, 10–15 s) of a maximum duration of 60 s to learn the location of a platform (diameter 11 cm) hidden 1 cm below the water surface (in the northwest quadrant). Animals were starting from each of the four cardinal points at the edge of the pool and the sequence of the start points was randomized on each day. During acquisition, data analyses (computed by a video-tracking system: SMART; PanLab) comprised the distance travelled, the average swim speed, the latency before reaching the platform as well as the thigmotactic behavior (i.e., the time spent swimming along the edge of the pool). For the probe trial, the platform was removed. The rats were introduced in the pool from a start point never used previously in the experiment (the North-East) and allowed a 60-s swimming time to explore the pool. The time (in percent) spent in the target quadrant (i.e., where the platform was located during acquisition), the number of crossings above the annulus (corresponding to the size of the platform enlarged by a 10 cm wide annulus, and which is used as an index of memory precision: Lopez et al., 2012), as well as the latency to reach the former platform location were analyzed. Thigmotactic behavior and swim speeds were also collected. After exclusion of animals displaying misplaced NMDA infusion sites (n=10), the total number of rats was as follow: for rats with ReRh lesions, recent memory (5d-WM): n = 8; remote memory (25d-WM): n = 8; home cage: n = 6 and 7 at the recent and remote time point (5d-HC and 25d-HC), respectively; for sham-operated rats, recent memory (5d-WM): n = 11; remote memory (25d-WM): n = 10; home cage: n = 8 and 7 at the recent and remote time point (5d-HC and 25d-HC), respectively.

Histology and NeuN immunocytochemistry for lesions verification (placement/extent)

Brain preparation and section processing. 90 min after the probe test in the water maze, rats received an overdose of pentobarbital (200 mg/kg i.p.) and were perfused transcardially with a 4% phosphate-buffered (0.1 M) paraformaldehyde (PFA, 4°C). Brains were removed, post-fixed for 2 h (4 % PFA, 4°C) and transferred to a 20% sucrose solution for 48 h at 4°C before being snap-frozen (isopentane, -40°C, 1 min) and stored at -80°C. Free-floating coronal sections (40 µm) were cut in serial sections using a cryostat (Microm, HS 500). These sections were prepared from two tissue blocks corresponding to mPFC and ReRh-dHip (as the two latter structures partly overlap in their antero-posterior extent). These blocks are extending from +4.00 to +2.52 mm from Bregma for mPFC and from -1.20 mm to -4.36 mm from Bregma for ReRh-dHip (according to Paxinos and Watson, 2007). Home Cage (HC) animals were treated exactly the same way and at the same time. For

stereological needs, all sections per block of tissue were collected and stored in cryoprotectants at -20°C before being processed.

Immunohistochemistry protocol. Starting at a random position, every sixth section was selected for NeuN immunohistochemistry and the following one for cresyl violet staining (for verification of the location and extent of the lesion). The next section was selected for c-Fos immunohistochemistry for neuronal activity assessment. Brain sections dedicated to cresyl violet staining were mounted onto gelatin-coated slides, stained and examined under light microscopy. NeuN immunohistochemistry was performed using a mouse anti-NeuN antibody (1:2000, ref MAB377; Millipore) as the primary antibody, and a biotinylated anti-mouse horse antibody (1:500; Vector Laboratories) as the secondary antibody, as described in Loureiro et al. (2012). Briefly, sections were rinsed three times during 10 min in a PBS merthiolate buffer before being soaked for 1 h in 5% normal donkey serum in PBS containing 0.5% Triton X-100 (PBST). The sections were subsequently transferred into the primary anti-NeuN antibody solution for 18 h at room temperature. Then, they were soaked in a buffer solution containing the secondary antibody. Staining was revealed with the avidin-biotin peroxidase method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) coupled to diaminobenzidine. C-Fos immunohistochemistry protocol is described hereafter in a dedicated paragraph.

Lesion verification (placement/extent). Serial sections throughout the thalamus stained with NeuN were used to visualize the lesion placement and extent (Fig. 1). Lesions were drawn using the relevant plates of the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 2007) and replicated on electronic copies of the atlas. Automated pixel counts of the thalamic nuclei in the target regions could then be used to estimate lesion extent. According to Groenewegen and Witter (2004), the Re nucleus *per se* is bordered by the so-called perireuniens (pRe). As for the Re, the pRe has connections with limbic structures, particularly the mPFC (Hoover and Vertes, 2012). Acceptable lesions were defined as having at least 50% damage to the Re area and 25% damage to the Rh and pRe nuclei, but no more than 10% damage to the adjacent thalamic region.

C-Fos immunohistochemistry, imaging and quantification

Immunohistochemistry protocol. All sections dedicated to c-Fos immunohistochemistry were processed at the same time with all groups for each delay, equally represented in each of the 24-well boxes used for staining (including HC animals). These precautions minimized technical bias. The protocol was similar to the one used for NeuN immunohistochemistry : the sections were first rinsed three times during 10 min in PBS before being soaked for 1 h in 5% normal donkey serum in PBS, subsequently transferred into the primary anti-Fos rabbit polyclonal antibody (1:4000, Rabbit anti-Fos polyclonal IgG; Santa Cruz, USA) solution for 18 h at room temperature, then soaked in a buffer solution containing the biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:500, Biotin-SP-conjugated

affiniPure Goat anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Staining was revealed with avidin-biotin peroxidase coupled to diaminobenzidine (Lopez et al., 2012).

Stereological analyses of c-Fos labelled sections. The quantitative analyses of c-Fos-positive nuclei were performed in the three mPFC subregions (the anterior cingular (ACC), prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices) from +4.00 mm to +2.52 mm from Bregma, as well as in the dHip areas considering Ammon's horn CA1, CA3 and the dentate gyrus (DG) subregions from -2.28 mm to -4.20 mm (dHip) from Bregma (according to Paxinos and Watson, 2007). Quantifications have been performed on eight sections for each animal. A single investigator, blind to the rats' treatment, stereologically analyzed all specimens. The overall number of c-Fos immunoreactive neurons was estimated using the optical fractionator technique allowing unbiased counting (West, 1991, 2013). The image analyses system used consisted of a Leica DM5500B light microscope coupled to a Microfire CCD color camera (Optronics) and equipped with a motorized x-y-z stage control. Stereological analyses were performed using the Mercator software (Explora Nova, La Rochelle, France) and all cell counts were processed online on the video image. The same intensity of light in the microscope as well as the same parameters in the exposure time of the digital camera were used for all sections. For each section, areas of interest were first outlined using a x 2.5 objective (Fig. 2), and c-Fos-positive neurons counting was performed using x 100 (1.40 NA) oil-immersed objective (Fig. 7-8). Randomly positioned grids (120 x 120 μm) containing counting frames (40 x 40 μm) equidistant from each other were superimposed in the area to be counted. For each animal, the estimated total number of c-Fos positive nuclei was calculated from the total number of nuclei counted in all optical dissectors. Parameters of the optical fractionator program were as follow: area of counting frame of grid = 40x40 μm , section interval = 240 μm , dissector height = 10 μm and guard zones = 2 μm each (the latter corresponding to upper and lower borders exclusions, the mean section thickness is 14 μm). The coefficients of error are the variation in sampling within each animal and represent the estimated precision of the population size calculated by the optical fractionator (Gundersen et al. 1988); they ranged from 0.04 to 0.14.

Statistical analysis

Water maze acquisition data were analyzed using a three-way ANOVA with Group (ReRh vs Sham) and Delay (5 days vs 25 days) as between-subject factors, and Day (1, 2 ...8) as the repeated measure. Probe trial performance was analyzed using a two-way ANOVA with Group and Delay as factors. These analyses were followed by *post-hoc* comparisons when required (Newman-Keuls multiple range test). The time spent in the target quadrant during the probe trial was also compared to chance (i.e. 25%) using the one-sample Student's *t* test. c-Fos immunohistochemistry data were analyzed using a two-way ANOVA in each structure (CA1, CA3 and DG for the dHip and IL, PL and ACC

for the mPFC) with Group and Delay as factors. Newman-Keuls *post-hoc* tests were used when appropriate. All these analyses considered $p < 0.05$ as pointing to significance.

Results

Location and extent of the lesions

Figure 1 shows the smallest and largest ReRh lesions observed in the rats that were kept for behavioral and c-Fos analyses (see also Table 1). Ten ReRh rats (two from the 5d-WM group, three from the 25d-WM group, three from the 5d-HC group and two from the 25d-HC group) had insufficient damage to the Re area (<50%) and/or excessive damage to the surrounding thalamic nuclei (>10%) and were discarded from the analyses. No significant differences in the extent of the ReRh lesions were found between the 5d-WM, 25d-WM, 5d-HC and 25d-HC groups ($F_{(3,27)} = 1.92$ for Re and $F_{(3,27)} = 2.17$ for Rh; ns for both; see Table 1). In the selected 8 ReRh rats of the 5d-WM group, there was an average of $69.1\% \pm 4.6$ damage to the Re (range 54.6–97.4%), $59.8\% \pm 13.5$ to the left pRe (range 37.1–75.3%), $35.2\% \pm 9.4$ to the right pRe (range 27.3–59.9%), and $48.7\% \pm 8.5$ damage to the Rh (range 26.3–93.5%). In the selected 8 ReRh rats of the 25d-WM group, there was an average of $68.1\% \pm 4.3$ damage to the Re (range 54.1–88.5%), $44.6\% \pm 7.8$ to the left pRe (range 25.8–67.2%), $40.7\% \pm 7.4$ to the right pRe (range, 29.4–51.9%), and $36.3\% \pm 9.7$ damage to the Rh (range, 27.2–65.1%). In the selected 6 ReRh rats of the 5d-HC group, there was an average of $73.1\% \pm 5.9$ damage to the Re (range 56.6–94.5%), $38.3\% \pm 5.9$ to the left pRe (range 28.5–59.4%), $41.4\% \pm 6.2$ to the right pRe (range, 30.1–62.1%), and $47.3\% \pm 8.9$ damage to the Rh (range, 26.4–77.2%). In the selected 7 ReRh rats of the 25d-HC group, there was an average of $78.5\% \pm 4.6$ damage to the Re (range 63.5–92.7%), $34.6\% \pm 6.1$ to the left pRe (range 27.2–48.8%), $45.1\% \pm 4.9$ to the right pRe (range, 33.2–59.2%), and $55.1\% \pm 8.7$ damage to the Rh (range, 30.3–88.1%). Damage to thalamic structures other than ReRh and pRe nuclei were generally minimal to modest, even when considering needle tract damage to dorsal thalamic nuclei. The average damage was <10% in all groups for each and every nucleus surrounding the region of interest (centromedial nucleus, interanteromedial thalamic nucleus, mediodorsal nucleus, posterior hypothalamic area...), except for the submedius nucleus. Lying just above the pRe and laterally to the ReRh, this nucleus is particularly prone to unwanted damage in our experiments: therein, the mean damage was of 15.6% in the 5d-WM group, 12.2% in the 25d-WM group, 17.4% in the 5d-HC group and 9.5% in the 25d-HC group. Overall, our lesions were highly specific to the ReRh region, with minimal damage to other adjacent thalamic nuclei in animals kept for analyses. Moreover, incidental unilateral damage due to the passage of the cannula to overlying areas comprising the thalamus, hippocampus and cortex remained very limited.

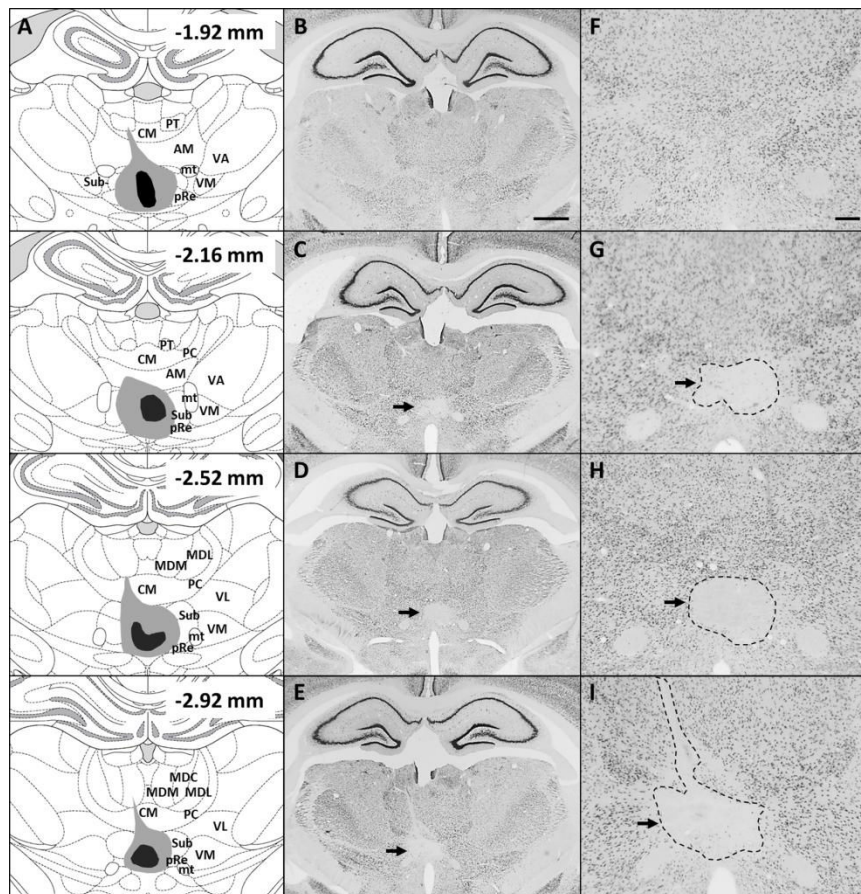


Figure 1. Location and extent of the ReRh lesions. (A) Schematic representation of the smallest (black) and largest (gray) lesions of the ventral midline thalamic nuclei (centered on ReRh) at four levels along the rostrocaudal axis. Numbers indicate the distance in millimeters from Bregma (according to Paxinos and Watson, 2007). Abbreviations: AM, anteromedial thalamic nucleus; CM, central medial thalamic nucleus; MDC, mediodorsal thalamic nucleus, central part; MDL, mediodorsal thalamic nucleus, lateral part; MDM, mediodorsal thalamic nucleus, medial part; mt, mammillothalamic tract; PC, paracentral thalamic nucleus; pRe, perireuniens thalamic nucleus; PT, paratenial thalamic nucleus; Sub, submedius thalamic nucleus; VA, ventral anterior thalamic nucleus; VL, ventrolateral thalamic nucleus; VM, ventromedial thalamic nucleus. (B-E) Photomicrographs showing typical examples of NeuN-immunostained brain sections from a Sham rat (B) and three rats showing small (C), median (D) or large (E) ReRh lesions following NMDA instillations. Black arrows point to the lesion site. Scale bar = 1 mm. (F-I) Photomicrographs showing higher magnification of the corresponding ventral midline thalamic region shown in A. The dotted lines delineate the lesion sites. Scale bar = 250 μ m.

	5d-HC	25d-HC	5d-WM	25d-WM
Re	73.1% \pm 5.9	78.5% \pm 4.6	69.1% \pm 4.6	68.1% \pm 4.3
Rh	47.3% \pm 8.9	55.1% \pm 8.7	48.7% \pm 8.5	36.3% \pm 9.7
pRe(left)	38.3% \pm 5.9	34.6% \pm 6.1	59.8% \pm 13.5	44.6% \pm 7.8
pRe(right)	41.4% \pm 6.2	45.1% \pm 4.9	35.2% \pm 9.4	40.7% \pm 7.4

Table 1. Average lesion extents of the ventral midline thalamic nuclei expressed as percentage in each experimental group. Abbreviations: HC, home cage; Re, reuniens nucleus; Rh, rhomboid nucleus; pRe, peri-reuniens nucleus; WM, water maze.

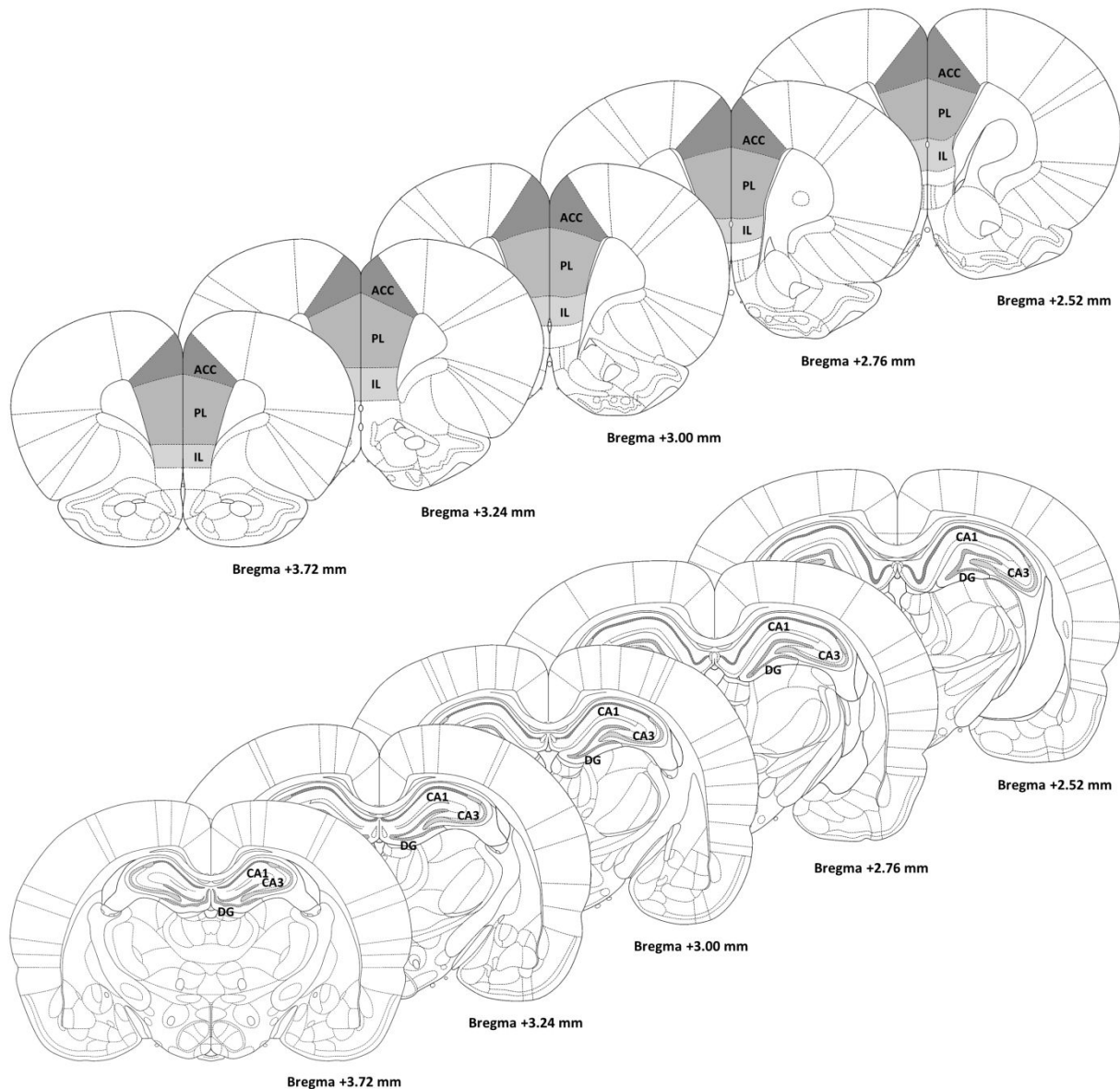


Figure 2. Limits of the subregions considered for the stereological quantification of the c-Fos positive neurons. Drawings of coronal sections at five rostrocaudal levels (according to Paxinos and Watson, 2007) of the mPFC (upper part) and the dHipp (bottom part) showing delineation of the subregions considered for the c-Fos stereological countings. Counting of immunolabeled cells was performed within the boundaries shown in the figures. MPFC subterritories comprise the ACC (anterior cingulate), the PL (prelimbic) and the IL (infralimbic) cortices. DHipp subregions taken into consideration were the CA1 (field 1 of the Ammon's horn, stratum pyramidale), the CA3 (Field 3 of the Ammon's horn, stratum pyramidale, including CA2) and the DG (dentate gyrus, stratum granulosum). The drawings have been adapted from Paxinos and Watson, 2007.

ReRh lesions have little effects on basal neuronal activity in the mPFC and the dHip

In addition to the study assessing the activation of mPFC and dHip subregions following recent or remote spatial memory retrieval, we also assessed the impact of the ReRh lesion on basal neuronal activity. To this end, we evaluated the level of c-Fos expression in ReRh lesioned and Sham rats taken from their home cage. These rats were housed in the exact same conditions (same room and cages) as their counterparts trained and tested in the water maze. They were also handled twice a week. Moreover, we used two delays, similarly to what we did in the experiment with the water maze (5 d vs 25 d, which refers to an average of 30 days post-lesion for the 5 d – HC group, and an average of 50 days post-lesion for the 25 d – HC animals). All the 5 d animals (both water maze and home cage rats) were killed at the same time and their brains were processed according to the exact same way. The same applies to 25 d delay animals. The figure 2 shows the drawings of the areas at the different rostrocaudal levels considered for c-Fos stereological counting in both cortical and hippocampal regions.

mPFC areas (Fig. 3A): For the ACC subregion, the two-way ANOVA showed no Group or Delay effects, but there was a significant Group x Delay interaction ($F_{(1,24)} = 7.35, p < 0.05$); the Newman-Keuls multiple range test revealed no significant difference. For the PL and IL subregions, there was no significant effect of the lesion under basal conditions: in both structures, the two-way ANOVA showed neither Group or Delay effect, nor a significant interaction between the two factors.

dHip areas (Fig. 3B): For CA1 subregion, the two-way ANOVA revealed no Group or Delay effects, but the interaction between the two factors was significant ($F_{(1,24)} = 14.03, p < 0.01$). It was mainly due to a significant difference between Sham-HC and ReRh-HC at the 5 d delay ($p < 0.05$) and to a marked decrease of c-Fos expression in sham-HC animals from 5 d to 25 d ($p < 0.01$). On the contrary, there was no difference in ReRh animals between 5 d and 25 d delays. For CA3 subregion, there was a significant Delay effect ($F_{(1,24)} = 5.41, p < 0.05$) and Group x Delay interaction ($F_{(1,24)} = 18.96, p < 0.001$), which was due to a decrease in c-Fos expression at 25 d delay (as compared to 5 d delay) in the Sham group and to a significant difference in the Sham-25d group, as compared to the three other groups ($p < 0.05$ for all). For the DG subregion, no effect of the Group or Delay was observed.

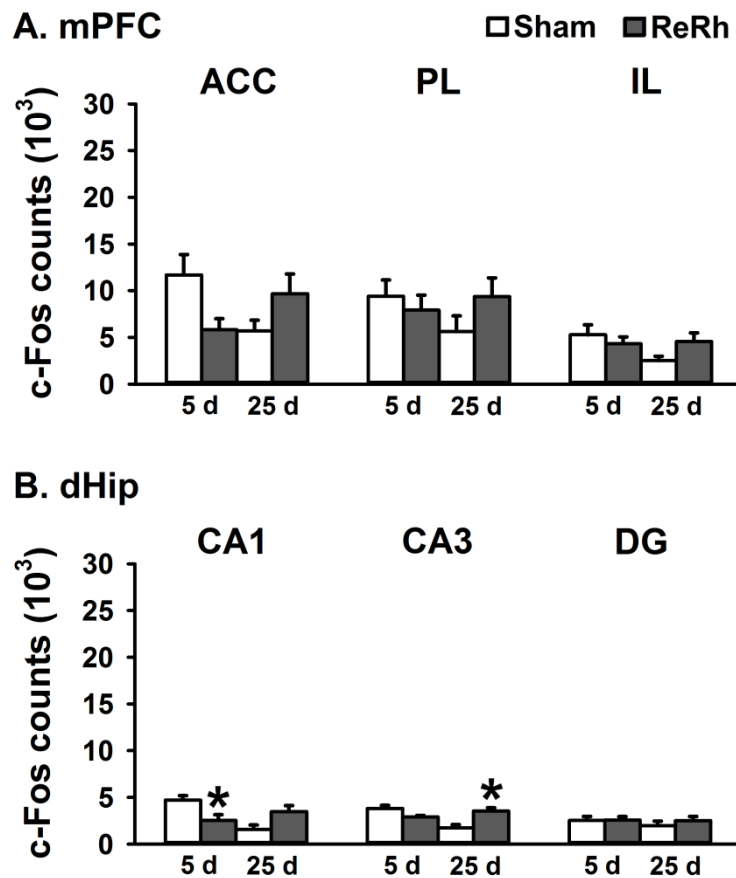


Figure 3. c-Fos expression in rats taken from their home cage. Quantification of c-Fos positive cells in the 3 subregions of the mPFC (IL, PL and ACC; **A**) and the 3 subregions of the dHip (CA1, CA3 and DG; **B**), using the stereological unbiased method, in Sham and ReRh rats taken from their home cage without prior testing. The two delays (5 d and 25 d) were strictly synchronized with the delays at which the spatial memory (WM) animals were killed. Data are shown as the mean \pm SEM c-Fos positive cells in thousands (10^3). Statistics: * $p < 0.05$ versus Sham counterparts (same delay). Abbreviations: ACC, anterior cingulate cortex; PL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; CA1 and CA3: fields 1 and 3 of the Ammon's horn of the hippocampus, stratum pyramidale; DG, dentate gyrus.

ReRh lesions selectively disrupt remote spatial memory retrieval in the Morris water maze

Acquisition. Using the Morris water maze task, we tested whether a pre-acquisition excitotoxic lesion of the ReRh modified the formation and/or expression of a spatial memory. We first analyzed the performance during the pretraining day with a visible platform (habituation phase). We found no effects of the Group (Lesion / Sham), of the Delay (5 d / 25 d) or of the interaction between these factors (Group: $F_{(1,33)} = 0.15$; Delay: $F_{(1,33)} = 1.61$; Group X Delay interaction: $F_{(1,33)} = 0.002$; ns for all). We also checked for thigmotactic behavior, latencies to reach the platform and swim speed discrepancies between groups during this habituation phase, but found no significant differences (data not illustrated). Thus, as previously shown (Dolleman-Van Der Weel et al., 2009; Loureiro et al., 2012), we found no evidence for an impairment in ReRh animals in this cued test assumed to be able to underscore sensorimotor and/or motivation deficiencies. Lesioned and Sham rats were then trained over 8 consecutive days to locate a platform hidden at a fixed location, and then tested in a single probe trial either 5 d or 25 d later. As ventral midline thalamic lesions have been previously

shown not to impact non-mnemonic aspects of the water maze task acquisition (Loureiro et al, 2012), we focused our interest on mnemonic aspects of the task. We first analyzed the performance during the acquisition phase. As shown in Figure 4A, the distance to reach the hidden platform decreased over days, showing progressive learning of the platform location, as demonstrated by a significant Day effect ($F_{(7,231)} = 58.49, p < 0.0001$). No effects of the Group (Lesion / Sham), of the Delay (5 d / 25 d) or of the interaction between these factors were observed (Group: $F_{(1,33)} = 0.09$; Delay: $F_{(1,33)} = 0.005$; Group X Delay interaction: $F_{(1,33)} = 0.08$; ns for all). Similarly, the time required to reach the platform decreased over days ($F_{(7,231)} = 33.31, p < 0.0001$) without any effect of the Group ($F_{(1,33)} = 2.39$, ns), the Delay ($F_{(1,33)} = 0.99$, ns) or the Group X Delay interaction ($F_{(1,33)} = 1.61$; ns) (data not shown). All rats also showed a decrease in thigmotactic behavior over days ($F_{(7,231)} = 45.73, p < 0.0001$) with no effect of Group, Delay or any interaction ($F_{(1,33)} = 0.40, F_{(1,33)} = 0.80$ and $F_{(1,33)} = 0.02$ respectively; ns for all, data not shown). Finally, swim speed decreased over days during acquisition ($F_{(7,231)} = 12.63, p < 0.0001$) again with no effect of Group, Delay or any interaction ($F_{(1,33)} = 2.72, F_{(1,33)} = 1.84$ and $F_{(1,33)} = 0.57$ respectively; ns for all, data not shown). Thus, ReRh lesions had no impact on the acquisition of the hidden platform location in the water maze task, confirming our previous data (Loureiro et al., 2012).

Probe trial. Memory retrieval performance was assessed by considering the time spent in the target quadrant (Fig. 4B), the number of annulus crossings and the latency to reach the annulus during the probe trial (Figs. 4C-D), as well as the average swim speed (Fig. 5A), the thigmotactic behavior (Fig. 5B) and Whishaw's error (not illustrated). Concerning the time spent in the target quadrant, there was no significant Group effect ($F_{(1,33)} = 2.79$, ns), but we found a significant Delay effect ($F_{(1,33)} = 15.15, p < 0.001$) and no interaction between the two factors ($F_{(1,33)} = 7.86, p < 0.01$). The Newman-Keuls multiple range test showed that the interaction effect was due to a significant difference between Sham and ReRh animals at the 25 d delay ($p < 0.01$). We also compared the time spent in the target quadrant to chance level (i.e., 25% in the water maze). For recent memory retrieval (5 d), both groups showed a strong preference for the quadrant of the pool where the platform had been located during acquisition ($p < 0.0001$ for Sham, $p < 0.001$ for ReRh). For remote memory retrieval (25 d), rats with a ReRh lesion did not remember the platform location ($p = 0.52$ vs chance level, ns), whereas Sham rats did ($p < 0.001$) (Fig. 4B). The analysis of the number of annulus crossings showed a significant effect of the Group ($F_{(1,33)} = 7.87, p < 0.01$) and of the Delay ($F_{(1,33)} = 9.82, p < 0.01$), but no interaction between the two factors ($F_{(1,33)} = 1.36$, ns). The Newman-Keuls multiple range test indicated a significant decrease of the number of annulus crossings in the ReRh-25 d group, compared with the Sham-25 d group ($p < 0.01$), confirming the performance deficits in the ReRh group at the 25 d delay (Fig. 4C). Concerning the latency to reach the target area (i.e., the annulus

surrounding the previous platform location), we observed significant effects of Group ($F_{(1,33)} = 10.68$, $p < 0.01$), Delay ($F_{(1,33)} = 4.31$, $p < 0.05$) and Group X Delay interaction ($F_{(1,33)} = 6.14$, $p < 0.05$); the Newman-Keuls multiple range test again pointed to a significant difference between the ReRh – 25 d group and the Sham – 25 d rats ($p < 0.01$) (Fig. 4D). The analysis of the Whishaw's error (i.e., the percentage of time spent by the rats inside a corridor between the start point of the probe trial and the previous platform location calculated on the time before the first target area entrance) showed no significant effect of the Group, Delay or interaction ($F_{(1,33)} = 1.09$, $F_{(1,33)} = 0.06$ and $F_{(1,33)} = 0.80$ respectively; ns for all, not illustrated). Swim speed and thigmotaxis were not significantly affected. As previously described (Loureiro et al., 2012), we observed no evidence of non-mnemonic alterations in the water maze following ReRh lesions (such as sensorimotor (swim speed) or anxiety (thigmotactic behavior) impairments). Thus, the present data confirm the previous work pointing a specific role of the ReRh nuclei in remote memory processing (Loureiro et al., 2012), not in water maze task acquisition or recent memory retrieval.

mPFC activation during remote spatial memory retrieval relies on ReRh integrity

We investigated the activation of dHip and mPFC subregions during recent and remote memory retrieval following ReRh lesions. To this end, we assessed the expression of the activity-regulated gene *c-fos* 90 min after the completion of 5 d and 25 d probe trials in the water maze. Indeed, the expression of this immediate early gene is correlated with neuronal activity (Sheng et al., 1990; rev. Barry and Commins, 2011). It can be used to track changes in the organization of memories at different time points after learning (Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; Teixeira et al., 2006; Lopez et al., 2012). Following behavioral experiment, we used immunohistochemistry to reveal the presence of c-Fos protein in the parenchyma, and the unbiased stereological approach to evaluate the number of c-Fos positive neurons in cerebral regions strongly connected with the ReRh and known to be implicated in memory processes, namely the mPFC and the dHip (Vertes et al., 2007, Hoover and Vertes, 2012, Cassel et al., 2013). Statistical analyses have been done on mPFC subregions and dHip subregions. Figures 7 and 8 illustrate typical c-Fos expression patterns in the mPFC (Fig. 7) and the dHip (Fig. 8) subregions in Sham and ReRh animals during 5 d or 25 d probe trials in the water maze.

mPFC areas (Fig. 6A-7A): For the ACC subregion, the two-way ANOVA showed significant Group, Delay and interaction effects ($F_{(1,33)} = 8.60$, $p < 0.01$, $F_{(1,33)} = 24.75$, $p < 0.0001$ and $F_{(1,33)} = 4.35$, $p < 0.05$, respectively). The Newman-Keuls multiple range test indicated that the interaction was due to a significant difference between Sham and ReRh animals at the 25 d delay ($p < 0.01$). Furthermore, while c-Fos expression was significantly increased in Sham animals at the 25 d delay, as compared to

5 d ($p < 0.001$), no such increase was seen in the ReRh animals (5 d vs 25 d, ns). This effect might reflect the impossibility to recruit additional neurons in the ACC during remote spatial retrieval after a ReRh lesion, as compared to the marked increase in neuronal activity observed in Sham animals at the remote time point, compared with the recent one. For the PL subregion, the two-way ANOVA indicated significant Group ($F_{(1,33)} = 5.17, p < 0.05$) and Delay ($F_{(1,33)} = 21.25, p < 0.0001$) effects, but no significant interaction between the two factors: c-Fos expression was increased in the 25 d groups (Sham, ReRh) compared with their 5 d counterparts, and in Sham animals as compared to their ReRh counterparts. Similarly, for the IL subregion, the two-way ANOVA showed a significant Delay effect ($F_{(1,33)} = 19.66, p < 0.0001$) and a tendency towards a Group effect ($F_{(1,33)} = 3.59, p = 0.066$). The interaction between these two factors was not significant. In fact, c-Fos expression was increased in 25 d animals, as compared to their 5 d counterparts, and tended to be higher in Sham rats as compared to ReRh rats.

dHip areas (Fig. 6B-7B): Two-way ANOVAs revealed no Group, Delay or interaction effect in CA1, but a significant Group effect in CA3 and DG subregions ($F_{(1,33)} = 4.39$ and $F_{(1,33)} = 6.12$ respectively, $p < 0.05$ for both), indicating an overall decrease in c-Fos expression for ReRh animals in these subregions, whatever the delay. No other comparison yielded significant differences.

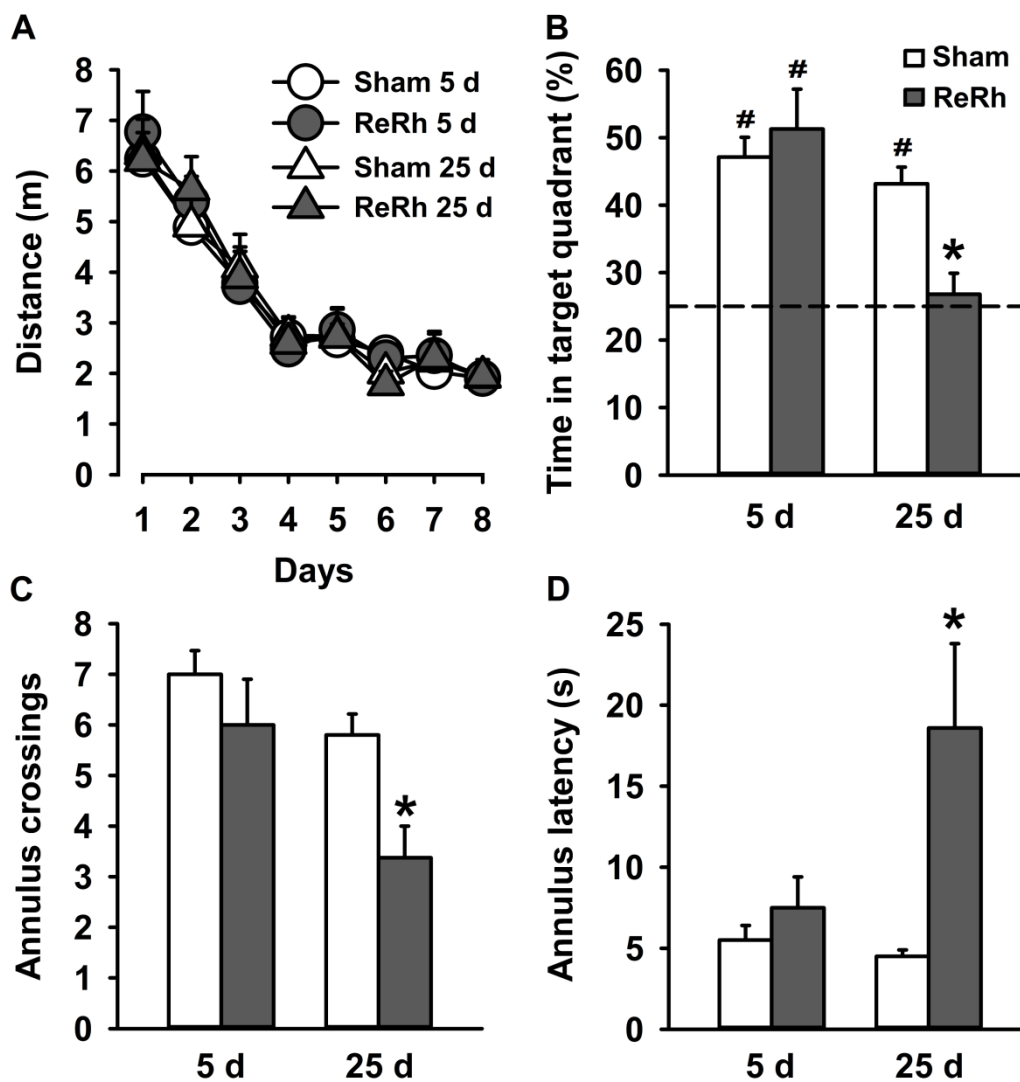


Figure 4. Spatial learning and memory performance in the water-maze. Effects of pre-acquisition ReRh lesion on spatial memory performance. **(A)** Acquisition over 8 consecutive days, expressed as the mean \pm SEM distance to reach the hidden platform for recent (5 d) or remote (25 d) memory in ReRh (dark grey) and Sham (white) groups. All rats were subjected to 4 trials/day. There were no significant differences between the four groups. **(B-D)** Performance during the probe trial: mean \pm SEM percentage of time spent in the target quadrant **(B)**, number of crossings of a virtual annulus centered on the former platform location **(C)**, and time to reach the platform annulus **(D)** in Sham and ReRh rats at the 5-day (left) and 25-day (right) post-acquisition delays. The dashed line in **B** represents chance level (i.e., 25 %). Statistics: * $p < 0.05$, significant difference compared to Sham; # $p < 0.05$, significant difference compared to chance level. At the 5-day delay, Sham and ReRh animals expressed a comparable preference for the target quadrant. At the 25-day delay, Sham rats remembered the platform location and concentrated their searches in the target quadrant. Conversely, rats with ReRh lesions were impaired.

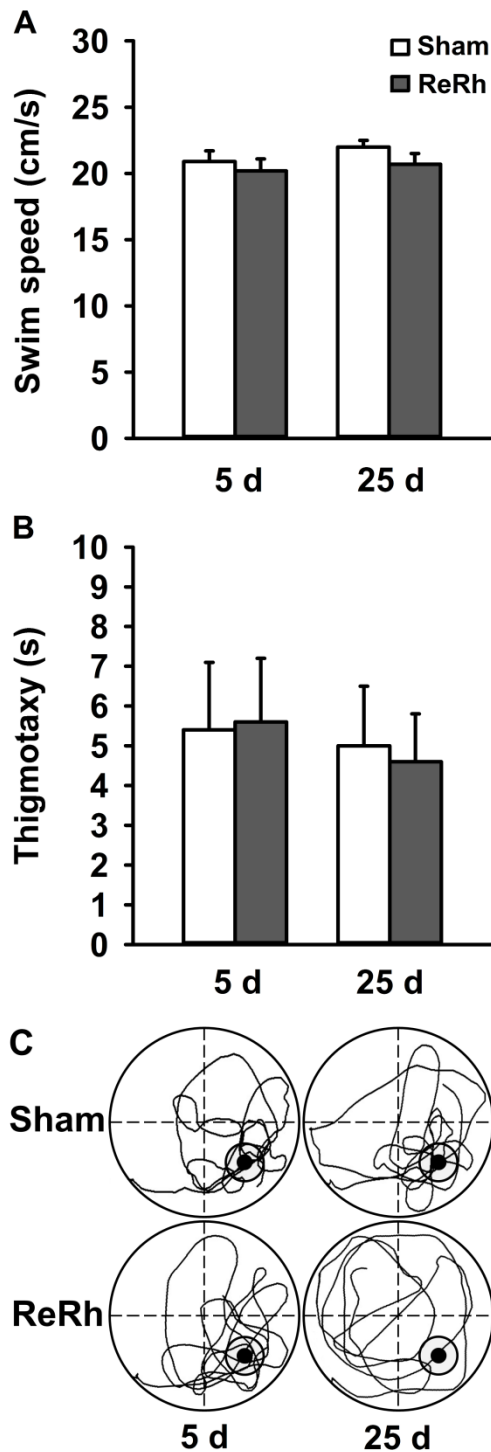


Figure 5. Non-mnemonic parameters in the water maze. Evaluation of non-mnemonic parameters in the water maze following ReRh lesions (**A, B**). Mean \pm SEM swim speed (**A**) and time spent swimming near the walls (thigmotaxis; **B**) in Sham (white) and ReRh (dark grey) rats at the 5-day (left) and 25-day (right) post-acquisition delays. No significant effect of the ReRh lesions was observed. (**C**) Typical examples of swim paths recorded during the probe trial in sham and ReRh rats having displayed close-to-mean performances.

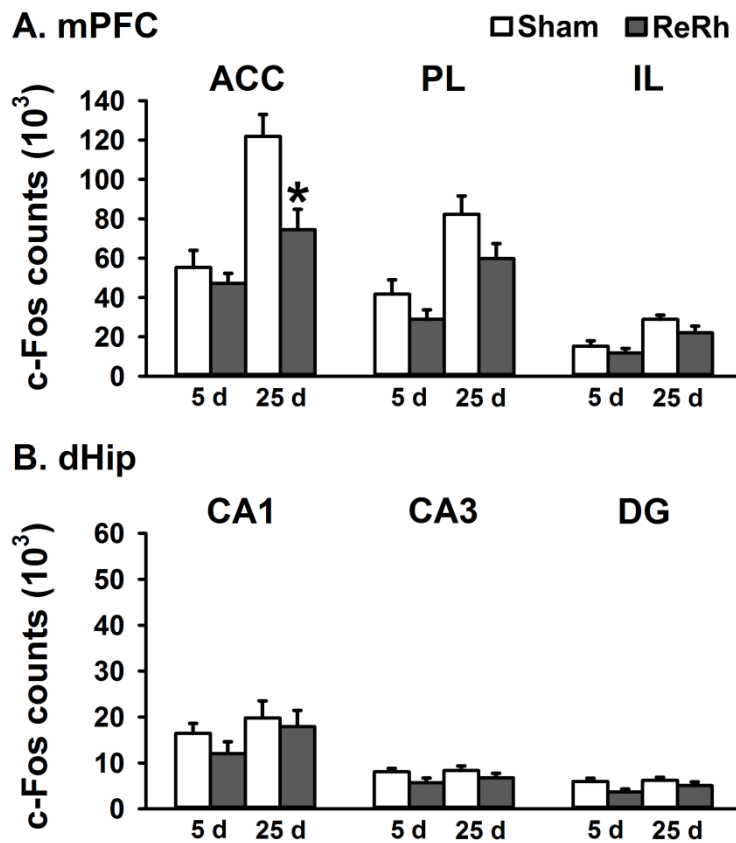


Figure 6. c-Fos expression in water maze (WM) rats. Quantification of c-Fos positive cells in 3 subregions of the mPFC (IL, PL and ACC; **A**) and 3 subregions of the dHip (CA1, CA3 and DG; **B**), using the stereological unbiased method, following 5 days or 25 days delayed probe trials in the water maze, in Sham (white) and ReRh lesion (dark grey) groups. Data are expressed as mean \pm SEM c-Fos positive cells in thousands (10^3). Statistics: * $p < 0.05$ versus Sham (same delay). Abbreviations: ACC, anterior cingulate cortex; PL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; CA1 and CA3: fields 1 and 3 of the Amon's horn of the hippocampus, stratum pyramidale; DG, dentate gyrus. Note the significant decrease in c-Fos expression observed in the ACC of ReRh rats compared to Sham animals at the 25 days delay.

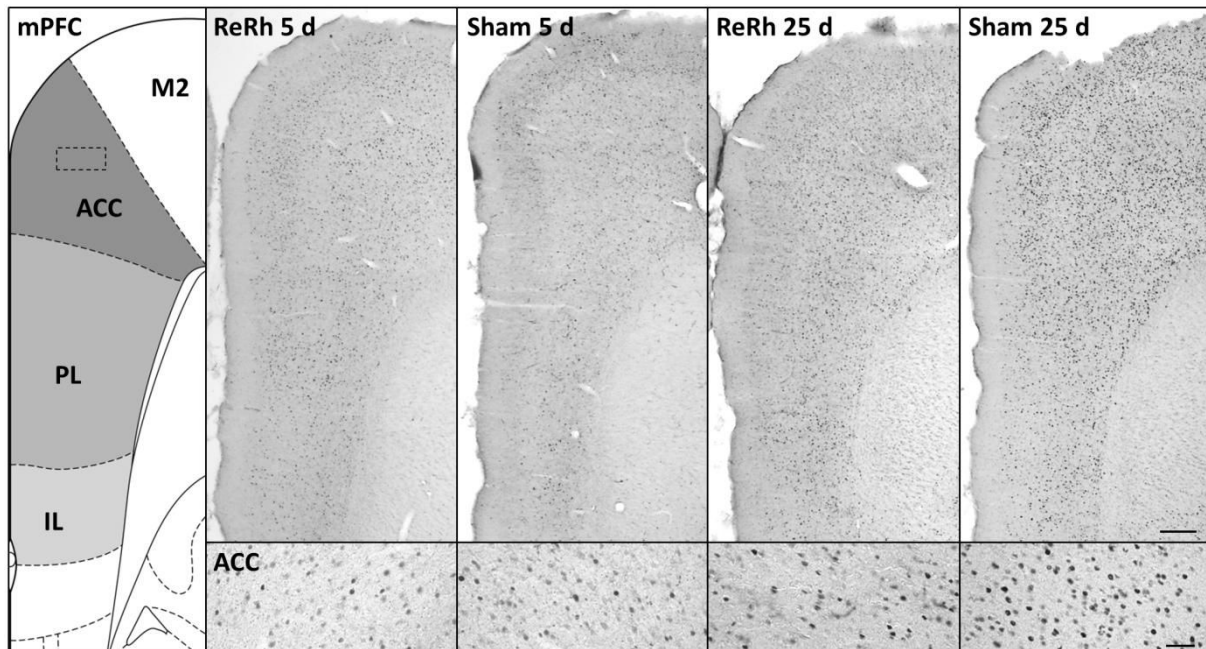


Figure 7. Illustrations of c-Fos immunocytochemistry in the mPFC. Schematic representations of the mPFC subregions (*left panel*, according to Paxinos and Watson, 2007, Bregma +3.00 mm) and coronal sections through these structures showing typical neuronal activity patterns after 5 days or 25 days probe trials (*center and right panels*) in Sham and ReRh rats. The bottom part of each panel shows c-Fos expression in the ACC at a higher magnification. Abbreviations: ACC, anterior cingulate cortex; PL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex. Scale bar: upper part = 500 μm ; bottom part = 50 μm . Note the increase in c-Fos expression at the 25-day delay in Sham animals, barely not visible in ReRh animals, and the significant difference between Sham and ReRh lesion animals at the 25-day delay.

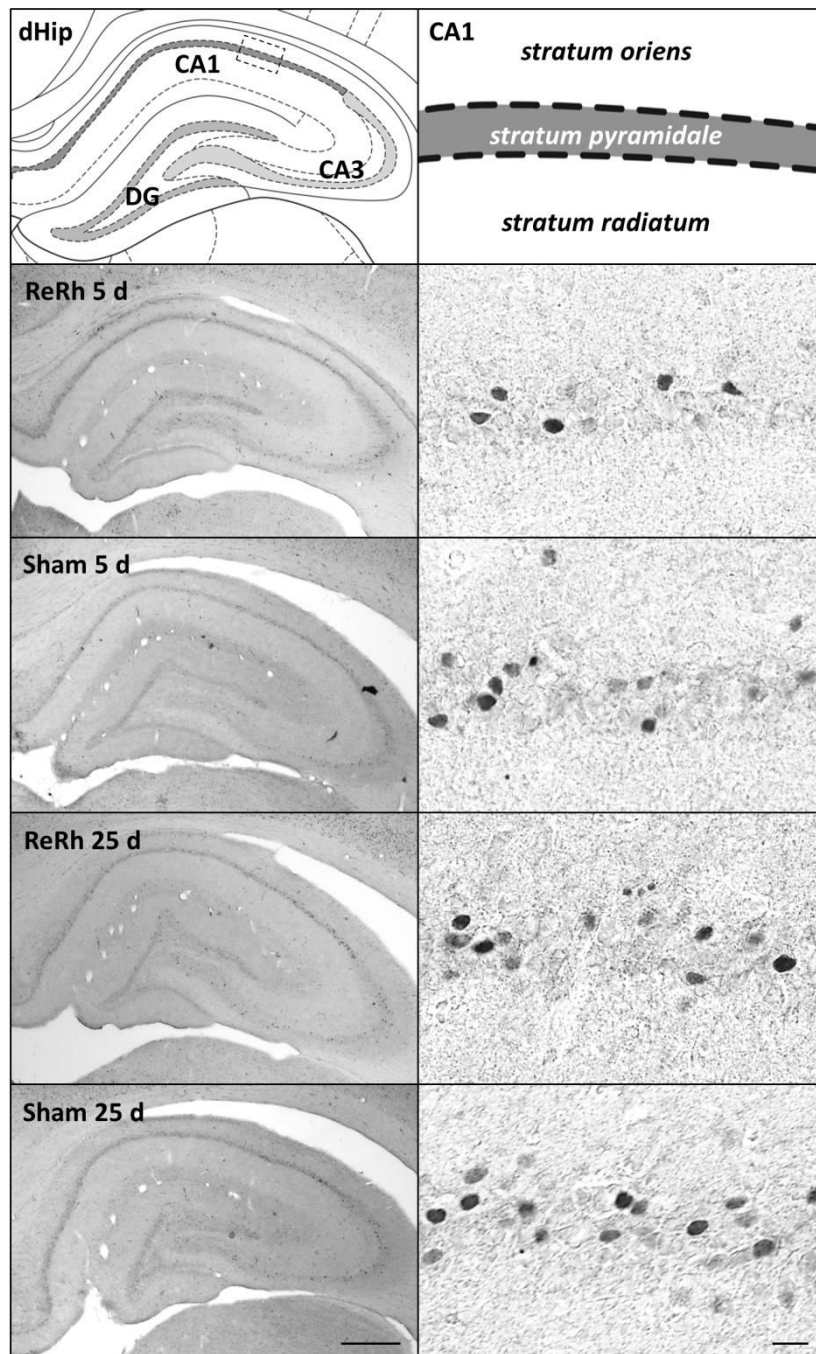


Figure 8. Illustrations of c-Fos positive neurons in the dHip. Schematic representations of the dHip subregions (*upper part*, according to Paxinos and Watson, 2007) and coronal sections through these structures showing typical neuronal activity patterns after 5 days or 25 days probe trials (*center and bottom parts*) in Sham and ReRh rats. The left column shows c-Fos labelled hippocampal overviews for each group, the right column shows typical c-Fos expression in CA1 layer at a higher magnification. Abbreviations: CA1, Field 1 of the Ammon's horn, stratum pyramidale; CA3, Field 3 of the Ammon's horn, stratum pyramidale, including CA2; DG, dentate gyrus, stratum granulosum. Scale bar: left column = 500 μm ; right column = 20 μm .

Discussion

In a previous study combining c-Fos imaging, reversible inactivation, and excitotoxic lesions, we showed an implication of the ReRh in spatial memory persistence, not in the retrieval process per se: under the effects of lidocaine in the ReRh, rats retrieved the remote memory (Loureiro et al., 2012). The current experiment confirms that ReRh lesions do not affect the acquisition of the platform location in a water maze and have no effect on its retrieval after a 5-d post-acquisition delay. These lesions, however, dramatically impaired memory performance at the 25-d delay. Non-mnemonic behavioral parameters such as swim speed and thigmotactic behavior were not modified. The present experiment is the first one to document the impact of ReRh lesions on the activation of the dHip and mPFC during recent vs. remote spatial memory retrieval. In the dHip of both Sham and lesioned rats, the neural activity was similar at both recent and remote time points, and was not affected by the ReRh lesion. In the ACC of the mPFC, the marked increase observed in Sham rats at the remote time point, compared with the recent one, was dramatically attenuated in ReRh lesioned rats. These results point to a participation of the ReRh to the functional network involved in spatial memory processing at systems-level.

The ventral midline thalamus and memory processes

Evidence for a thalamic contribution to memory functions comes from patients with diencephalic damage (Van der Werf et al., 2003a,b). Some symptoms of diencephalic amnesia are similar to those produced by temporal lobe damage; others are akin to those accompanying PFC dysfunctions (Van der Werf et al., 2000, 2003a; Aggleton, 2008). Thalamic nuclei best known to participate in memory processing are the anterior and the medial thalamus, including the intralaminar and mediodorsal nuclei. Recently, attention has been focused on the ReRh nuclei, which occupy a nodal hub position between the mPFC and the hippocampus (Vertes et al., 2007, Hoover and Vertes, 2012). In animal models, lesions or functional inactivation of the ReRh alter performance in tasks specifically requiring interactions between the hippocampus and the mPFC (Cholvin et al., 2013; Hembrook et al., 2012; Xu and Südhof, 2013). Conversely, in tasks requiring only one of these structures, performance is not altered by ReRh lesions (Hembrook and Mair, 2011). In the probe trial of a water maze task, Dolleman-van der Weel et al. (2009) found a faster shift in strategy after an initial search focused on the correct quadrant, possibly reflecting maladaptation to environmental constraints as a consequence of mPFC dysfunction. We did not confirm this observation, as was already the case in our former experiment (Loureiro et al., 2012). Xu and Südhof (2013) discovered a role for the Re in fear memory generalization. Consistent with our data on c-Fos expression in the home cage, these authors reported that a reduction or an increase of activity in the Re had no effects on basal c-Fos

expression. This observation is at variance with the covert hypoactivity seen after damage to the anterior thalamus (Dumont et al., 2012; Poirier and Aggleton, 2009). In mice exposed to a context previously associated with a fear memory, however, Xu and Südhof observed an increased number of c-Fos-positive neurons in several brain regions, including the hippocampus (CA1, CA3, DG) and the mPFC (ACC and amygdala). Interestingly, experimental manipulations of the activity levels in the Re during fear conditioning affected c-Fos expression changes only in CA1 and in the ACC. When c-Fos expression was weakened during contextual information encoding, the corresponding memory is established with less detail. Altogether, these data indicate that the mPFC, the ReRh and the hippocampus form a tripartite network contributing to the persistence and precision of memories.

Cellular activity during spatial memory retrieval

By comparison with rats taken from their home cage, it is evident that c-Fos expression has undergone a marked increase in the dHip (more in CA1 than in CA3 or DG) during the recall of the platform location. That the memory to be recalled was recent or remote did not affect the activation pattern, and this information is at variance with previous experiments showing that c-Fos expression in the dHip was larger at the long (25-d) than at the short (5-d) post-acquisition delay (e.g., Lopez et al., 2012; Schlesiger et al., 2013). This discrepancy, however, could be due to stronger training in the current experiment (8 days vs. only 6 in e.g., the Lopez et al. study). In the experiment of Schlesiger et al., the task was completely different (radial maze) and rats were food-deprived. In another study by Teixeira et al. (2006) in mice, hippocampal levels of c-Fos expression during a water maze probe trial were comparable at short and late post-acquisition delays. In the current study, an increase of c-Fos expression has also been noticed in the mPFC. This increase was largest in the ACC of sham-operated rats after remote memory retrieval, an observation mirroring our previous findings (Lopez et al., 2012). Although there is a direct unilateral pathway connecting the hippocampus (CA1 and subiculum) to the mPFC (IL) (Thierry et al., 2000), a monosynaptic projection back from the mPFC to the hippocampus has not been described (Vertes, 2004; Xu and Südhof, 2013). The Re projects massively to the mPFC, CA1, subiculum and parahippocampal cortices (retrosplenial, entorhinal and perirhinal). The Rh has additional connections with other cortices (e.g., sensorimotor), the amygdala and the ventral striatum (Su and Bentivoglio, 1990; Dolleman-Van Der Weel and Witter, 1996; Vertes et al., 2006). Furthermore, a small proportion (6-8%) of Re neurons project to both the mPFC and the hippocampus (Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014). Electrical stimulations of the midline thalamus induce responses in CA1 that are similar to the responses obtained with stimulations of the contralateral hippocampus (Bertram and Zhang, 1999). In addition, the Re exerts strong direct excitatory effects on the mPFC (Di Prisco and Vertes, 2006). Taken together, these results indicate that the ReRh may play an important role in hippocampo-cortical interactions. They also support the

idea that the remote memory impairment produced by ReRh lesions (Loureiro et al., 2012) might be explained by an altered information flow between the hippocampus and the mPFC during systems-level consolidation, leading to a weakened increase of neural activation in the mPFC during the recall test at the remote time point. The lesion-induced reduction of the retrieval-related increase of c-Fos expression in the mPFC was subregion-specific: whereas cellular activity in the IL was not affected by ReRh lesions, it was dramatically reduced in the ACC, and less so in the PL. These results are in line with the emerging assumption that the ReRh participate in the consolidation of memories at the level of systems, and that remote memories require a contribution of the ACC (rev. Frankland and Bontempi, 2005; Winocur et al., 2010).

Subregions of the mPFC have differential roles in memory persistence

The medial prefrontal cortex (mPFC) has been associated with a variety of cognitive functions including attentional processes, visceromotor activity, working memory, decision making, behavioral flexibility, goal-directed behavior and remote memory (rev. Dalley et al., 2004, 2008; Wise, 2008). In 2004, in a study investigating cortical regions implicated in remote memory, Frankland and al. found that the three subregions of the mPFC (IL, PL and ACC) expressed a high level of c-Fos-positive cells following the recall of a remote contextual fear memory in comparison with that of a recent one. In the same study, these authors found that only ACC, not PL pharmacological inactivation was able to disrupt remote (36 days) memory retrieval. Frankland et al. came to the conclusion of a specific involvement of the ACC in remote contextual fear memory (Frankland et al., 2004; see also Restivo et al., 2009; Vetere et al., 2011). The implication of this subregion of the mPFC in processes involved in remote memory has since been confirmed in conditioned taste aversion memory (Ding et al., 2008) and spatial memory (Teixeira et al., 2006; Lopez et al., 2011; Wartman and Holahan, 2013). The role of IL and PL cortices in remote memory has received far less attention and has been proposed to be restrained to top-down modulation of behavior in interaction with the ACC (Weible, 2013). The significant difference in neural activity we specifically observed in the ACC at the 25 d delay in ReRh rats as compared to their sham-operated counterparts is consistent with previous reports and can account for a specific implication of the ACC in memory persistence. Thus, the present study shows for the first time that ReRh implication in remote memory processing is related to the influence of these thalamic nuclei on mPFC activity, and that the ACC is the subregion of the mPFC whose activity is most dependent on ReRh integrity. Furthermore, they point to the idea of a greater involvement of the ACC than the IL and PL in memory persistence, as already proposed in previous reports (Weible, 2013).

Conclusion

The results of the current study provide new arguments supporting an important role of the ReRh nuclei in mechanisms leading to memory persistence within an interconnected network of structures encompassing the ReRh, the hippocampus and the mPFC.

References

- Aggleton JP (2008) Understanding anterograde amnesia: Disconnections and hidden lesions. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology* 61:1441–1471.
- Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal–anterior thalamic axis. *Behavioral and brain sciences* 22:425–444.
- Aggleton JP, Dumont JR, Warburton EC (2011) Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: A review. *Learning & Memory* 18:384–400.
- Barry DN, Commins S (2011) Imaging spatial learning in the brain using immediate early genes: insights, opportunities and limitations. *Reviews in the Neurosciences* 22.
- Bertram EH, Zhang DX (1999) Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92:15–26.
- Carlesimo GA, Lombardi MG, Caltagirone C (2011) Vascular thalamic amnesia: A reappraisal. *Neuropsychologia* 49:777–789.
- Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A, Loureiro M, Cholvin T, Dalrymple-Alford JC, Vertes RP (2013) The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Progress in Neurobiology* 111:34–52.
- Çavdar S, Onat FY, Çakmak YÖ, Yananlı HR, Gülçebi M, Aker R (2008) The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reuniens nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat. *Journal of Anatomy* 212:249–256.
- Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, Cassel J-C (2013) The Ventral Midline Thalamus Contributes to Strategy Shifting in a Memory Task Requiring Both Prefrontal Cortical and Hippocampal Functions. *Journal of Neuroscience* 33:8772–8783.

- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28:771–784.
- Dalley JW, Mar AC, Economidou D, Robbins TW (2008) Neurobehavioral mechanisms of impulsivity: Fronto-striatal systems and functional neurochemistry. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90:250–260.
- Di Prisco GV, Vertes RP (2006) Excitatory actions of the ventral midline thalamus (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60:45–55.
- Ding HK, Teixeira CM, Frankland PW (2008) Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory* 15:290–293.
- Dolleman-van der Weel MJ, Morris RGM, Witter MP (2009) Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Structure and Function* 213:329–342.
- Dolleman-Van Der Weel MJ, Witter MP (1996) Projections from the nucleus reuniens thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. *J Comp Neurol* 364:637–650.
- Dumont JR, Amin E, Poirier GL, Albasser MM, Aggleton JP (2012) Anterior thalamic nuclei lesions in rats disrupt markers of neural plasticity in distal limbic brain regions. *Neuroscience* 224:81–101.
- Frankland PW (2004) The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. *Science* 304:881–883.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6:119–130.
- Gold JJ, Squire LR (2006) The anatomy of amnesia: Neurohistological analysis of three new cases. *Learning & Memory* 13:699–710.
- Groenewegen HJ, Witter MP (2004) Thalamus. In: *The Rat Nervous System*, pp 407–453. Elsevier.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857–881.
- Hembrook JR, Mair RG (2011) Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21(8):815–26.

- Hembrook JR, Onos KD, Mair RG (2012) Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus* 22:853–860.
- Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Structure and Function* 217:191–209.
- Kopelman MD (2002) Disorders of memory. *Brain* 125:2152–2190.
- Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel J-C, de Vasconcelos AP (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22:827–841.
- Lopez J, Wolff M, Lecourtier L, Cosquer B, Bontempi B, Dalrymple-Alford J, Cassel J-C (2009) The Intralaminar Thalamic Nuclei Contribute to Remote Spatial Memory. *Journal of Neuroscience* 29:3302–3306.
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A (2012) The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *Journal of Neuroscience* 32:9947–9959.
- Maviel T (2004) Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science* 305:96–99.
- Nadel L, Hardt O (2010) Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology* 36:251–273.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. Amsterdam; Boston; London: Elsevier/Academic.
- Poirier GL, Aggleton JP (2009) Post-surgical interval and lesion location within the limbic thalamus determine extent of retrosplenial cortex immediate-early gene hypoactivity. *Neuroscience* 160:452–469.
- Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M (2009) The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. *Journal of Neuroscience* 29:8206–8214.

- Schlesiger MI, Cressey JC, Boubil B, Koenig J, Melvin NR, Leutgeb JK, Leutgeb S (2013) Hippocampal activation during the recall of remote spatial memories in radial maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory* 106:324–333.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571–582.
- Su HS, Bentivoglio M (1990) Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 297:582–593.
- Teixeira CM (2006) Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in the Expression of Remote Spatial Memory. *Journal of Neuroscience* 26:7555–7564.
- Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411–419.
- Van Der Werf YD, Jolles J, Witter MP, Uylings H (2003a) Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex* 39:1047–1062.
- Van der Werf YD, Scheltens P, Lindeboom J, Witter MP, Uylings HBM, Jolles J (2003b) Deficits of memory, executive functioning and attention following infarction in the thalamus; a study of 22 cases with localised lesions. *Neuropsychologia* 41:1330–1344.
- Van der Werf YD, Witter MP, Uylings H, Jolles J (2000) Neuropsychology of infarctions in the thalamus: a review. *Neuropsychologia* 38:613–627.
- Varela C, Kumar S, Yang JY, Wilson MA (2014) Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Structure and Function* 219(3):911–29.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20.
- Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ (2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 499:768–796.
- Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C (2007) Nucleus reuniens of the midline thalamus: Link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Research Bulletin* 71:601–609.

- Vetere G, Restivo L, Cole CJ, Ross PJ, Ammassari-Teule M, Josselyn SA, Frankland PW (2011) Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:8456–8460.
- Wartman BC, Holahan MR (2013) The use of sequential hippocampal-dependent and -non-dependent tasks to study the activation profile of the anterior cingulate cortex during recent and remote memory tests. *Neurobiology of Learning and Memory* 106:334–342.
- Weible AP (2013) Remembering to attend: The anterior cingulate cortex and remote memory. *Behavioural Brain Research* 245:63–75.
- Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B (2010) Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2339–2356.
- Xu W, Sudhof TC (2013) A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science* 339:1290–1295.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Chez l'Homme, l'étude de patients souffrants de lésions diencephaliques indique la contribution du thalamus dans les fonctions cognitives (Van Der Werf et al. 2003a,b). Certains symptômes neuropsychologiques des amnésies diencephaliques sont semblables à ceux visibles à la suite de lésions du lobe temporal ; d'autres ressemblent à des déficits caractéristiques du dysfonctionnement du mPFC (Van der Werf et al, 2000, 2003a ; Aggleton, 2008). En raison du nombre important de noyaux thalamiques généralement atteints chez ces patients, et de la fréquente co-occurrence de lésions extra-thalamiques (Van Der Werf et al. 2000 ; Carlesimo et al. 2011), la question de la contribution spécifique des différentes sous-régions thalamiques dans les processus mnésiques n'a pas encore été élucidée. Les noyaux thalamiques dont la participation dans les processus mnésiques est la mieux caractérisée sont les noyaux antérieurs et les noyaux médians du thalamus (incluant les noyaux intralaminaires (ILN) et médiodorsaux (MD)). Les ILN et les MD sont fortement connectés avec le mPFC (Van der Werf et al. 2003a,b). Compte tenu de la position clé des noyaux ReRh, à l'interface entre l'Hip et le mPFC (Hoover et Vertes, 2012), le nombre réduit d'études ayant porté attention à l'implication fonctionnelle de ces noyaux est surprenant.

Cette thèse avait pour objectif d'étudier le rôle du circuit composé de l'hippocampe, du cortex préfrontal médian et des noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus dans les processus cognitifs qui sous-tendent la mémoire spatiale chez le Rat, à l'aide d'approches comportementales et anatomo-fonctionnelles comprenant la lésion excitotoxique, l'inactivation fonctionnelle réversible et l'imagerie du gène précoce *c-fos*. Dans une première série d'expériences, nous avons montré que les noyaux ReRh pourraient être impliqués dans la consolidation systémique, mécanisme nécessaire à la persistance à long terme des souvenirs et qui nécessite un dialogue hippocampo-cortical (e.g. rev. Frankland et Bontempi 2005 ; Nadel et Hardt, 2011 ; Nadel et al. 2012). Nous avons ensuite confirmé ces résultats au cours d'une seconde étude montrant que l'activité neuronale du mPFC durant le rappel d'une mémoire spatiale ancienne dépend de l'intégrité des noyaux ReRh du thalamus. Nous avons également montré l'implication de ces noyaux thalamiques dans une tâche mnésique nécessitant à la fois l'utilisation d'informations spatiales (dépendantes de l'Hip) et une flexibilité comportementale (impliquant le mPFC). Enfin, une quatrième série d'expériences

nous a permis de mettre en évidence l'implication du mPFC dans le rappel d'une mémoire spatiale récente. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans le traitement et la persistance des informations spatiales chez le Rat.

Cette discussion générale abordera quatre grands points. Le premier concerne des considérations méthodologiques au sujet de l'approche d'inactivation fonctionnelle réversible et des substances pouvant être utilisées dans ce but. La seconde partie est consacrée au rôle des noyaux ReRh dans la persistance d'une mémoire spatiale, d'un point de vue comportemental et fonctionnel (capacité de ces noyaux à moduler l'activité de l'Hip et du mPFC). Le rôle des noyaux ReRh dans la flexibilité comportementale est le sujet de la troisième partie, et la quatrième et dernière partie de cette discussion traite de l'implication du mPFC et de ses sous-régions dans le rappel d'une mémoire récente et ancienne.

1. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES : L'INACTIVATION FONCTIONNELLE REVERSIBLE

L'inactivation fonctionnelle réversible est un outil de choix pour l'évaluation du rôle d'une structure dans un processus cognitif. Par rapport à l'approche lésionnelle (permanente), l'inactivation offre l'avantage d'être temporaire, réversible, et de ne pas induire de mécanismes compensatoires de plasticité (e.g. Witte et al. 1997 ; Lomber, 1999 ; Boehnke et Rasmusson, 2001). Nous avons utilisé deux substances dans le but d'inactiver les noyaux ReRh, le mPFC ou l'Hip : la lidocaïne (LIDO) afin de montrer le rôle possible des noyaux ReRh dans le rappel d'une mémoire spatiale récente ou ancienne (publication 1) et le muscimol (MSCI) pour mettre en évidence i) le rôle du ReRh, de l'Hip et du mPFC dans la mémoire spatiale nécessitant une flexibilité comportementale (publication 2) et ii) celui du mPFC en comparaison avec l'Hip dans le rappel d'une mémoire spatiale récente (publication 3).

La LIDO est un bloquant des canaux sodiques voltage-dépendants, le MSCI un agoniste des récepteurs GABA_A. La LIDO a l'avantage de ne pas faire appel à un système de neurotransmission spécifique pour induire l'inactivation. Cela évite un déséquilibre entre inhibition et excitation neuronales, déséquilibre qui peut induire des effets secondaires (pouvant aller jusqu'à la crise d'épilepsie) quand il se produit dans certains noyaux thalamiques notamment (Steriade, 2006). Mais de par son mécanisme d'action, la LIDO inactive à la fois les corps cellulaires et les fibres de passage au niveau du site d'instillation,

ce qui pose un problème de spécificité neuroanatomique. Le MSCI n'a pas cet inconvénient : il n'inactive que les corps cellulaires, et non les axones, ces derniers étant dépourvus de récepteurs GABA_A. Le MSCI est ainsi spécifique des neurones résidents de la zone instillée. La LIDO agit rapidement : elle atteint son effet maximal 8 min après instillation et a une durée d'action courte de l'ordre de la demi-heure (Tehovnik et Sommer, 1997). C'est pourquoi nous avons utilisé un délai de 10 min entre l'instillation intracérébrale de LIDO et la tâche comportementale. Le muscimol atteint son effet maximal après 25 min, et a une durée d'action d'au moins 2 h (Edeline et al. 2002). Nous avons utilisé un délai de 30 min lors des inactivations à l'aide de MSCI. Ce délai plus long offre deux avantages. D'une part, l'instillation de PBS, le diluant du MSCI et de la LIDO, peut induire une diminution de l'activité neuronale (pouvant atteindre 40%) durant les 10 premières min environ à la suite de l'instillation, l'activité neuronale retrouvant son niveau basal après 15-20 min (Edeline et al. 2002). L'utilisation d'un délai de 30 min permet ainsi de s'assurer que les performances comportementales des animaux contrôles sont peu ou pas affectées par un possible effet transitoire du PBS. D'autre part, ce délai laisse aussi plus de temps de récupération aux animaux entre l'instillation (et le protocole de manipulation/contention qui y est associé) et la tâche comportementale, réduisant notamment le stress lié à l'instillation. Enfin, le MSCI dispose d'un analogue fluorescent (MSCI couplé à un fluorochrome, Bodipy, Invitrogen, USA). Cependant, de par la présence du fluorochrome, le poids moléculaire du MSCI fluorescent atteint 607.46 g/mol, celui du MSCI seul étant de 114,10 g/mol. L'encombrement stérique inhérent à la présence d'un fluorochrome, ainsi que le fait que ce dernier soit lipophile, modifient donc les propriétés de diffusion du MSCI fluorescent en comparaison du MSCI standard. Il est probable que le MSCI diffuse plus loin que son analogue fluorescent (Allen et al. 2008), mais à ma connaissance, aucune étude n'a vérifié ce point. Cependant, contrairement au MSCI standard, le MSCI fluorescent offre la possibilité de visualiser facilement la diffusion de ce composé dans le parenchyme. Pour toutes ces raisons, nous avons opté pour le MSCI après notre 1^{ère} étude (publication 1).

LIDO, ReRh et rappel d'une mémoire spatiale

Ainsi, seule la première expérience d'inactivation fonctionnelle réversible de cette thèse (publication 1), visant à évaluer l'implication des noyaux ReRh dans le rappel d'une mémoire spatiale récente ou ancienne dans la piscine de Morris, a été réalisée à l'aide de LIDO. Les résultats indiquent une absence d'effet de l'inactivation de ces noyaux sur le rappel aux deux délais testés (5/25 jours). Nous en avons conclu que les noyaux ReRh ne sont vraisemblablement pas impliqués au cours du rappel quel que soit l'âge de la mémoire, et que les effets d'une lésion permanente pré-acquisition affectaient probablement plutôt l'étape de consolidation systémique d'une mémoire spatiale de référence (d'après les effets de la lésion de ces noyaux, montrant un déficit lors du rappel à 25 jours et non à 5 jours, cf. publications 1 et 4). Une autre explication pourrait être que le degré d'inactivation atteint suite à l'instillation de LIDO (20µg/0.3µL) n'a pas été suffisant pour altérer les performances des animaux et révéler l'implication des noyaux ReRh dans le rappel d'une mémoire ancienne. Cependant, cette dose de LIDO a été choisie suite à des études antérieures au laboratoire ayant montré le rôle de l'Hip dorsal dans le rappel d'une mémoire spatiale récente, et de l'Hip dorsal et du mPFC dans le rappel d'une mémoire ancienne (Lopez et al. 2012). De même, Loureiro et al (2012) ont utilisé cette dose de LIDO pour montrer le rôle de l'Hip ventral plutôt dans l'expression que dans l'acquisition d'une mémoire spatiale récente, alors que l'Hip dorsal apparaît essentiel aux deux étapes. Cependant, l'hypothèse selon laquelle la LIDO instillée dans les noyaux ReRh ait pu être inefficace à la dose de 20 µg est appuyée par notre expérience d'inactivation des noyaux ReRh à l'aide de MSCI lors du rappel d'un mémoire récente (24 h) dans la piscine de Morris (publication 2) : à ce délai, l'inactivation réduit significativement les performances des animaux par rapport aux contrôles au cours du test de rétention, sans néanmoins empêcher le rappel. Il est intéressant de constater que l'utilisation de deux substances visant à inactiver ces noyaux (LIDO et MSCI), certes à deux délais post-acquisition différents, mais proches (1 et 5 jours, mémoire récente) amène à des résultats différents. Etant donné que nos résultats de la publication 3 ainsi que ceux de Lopez et al. (2012) mettent en évidence un rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire spatiale récente et ancienne, et que les noyaux ReRh pourraient coordonner les interactions hippocampo-corticales tel que proposé dans la publication 2 et par d'autres auteurs (Hembrook et Mair, 2011 ; Hembrook et al. 2012), ces noyaux pourraient participer au rappel d'une mémoire spatiale, et ce quel que soit son âge.

Des expériences complémentaires utilisant le MSCI, voire une autre substance (CNQX) ou encore une concentration plus élevée de LIDO pourraient permettre de préciser le rôle des noyaux ReRh lors de la phase de rappel d'une mémoire récente ou ancienne.

MSCI et ReRh, Hip et mPFC dans le rappel d'une mémoire spatiale

Dans la publication 2, nous avons comparé l'effet de l'inactivation du mPFC, de l'Hip et des noyaux ReRh du thalamus sur le rappel à 24 h d'une mémoire de référence (piscine de Morris) et dans une tâche spatiale nécessitant de faire preuve de flexibilité comportementale (Double-H) en utilisant 2 doses de MSCI. Dans la piscine de Morris, l'inactivation du mPFC à l'aide de MSCI à la dose de 30 ng (0,26 nmol) ou 80 ng (0,70 nmol) ne provoque pas de déficit de rappel. Nous en avons conclu à l'absence d'implication de cette structure dans le rappel d'une mémoire spatiale récente, comme montré précédemment par d'autres auteurs (e.g. Bontempi et al. 1999 ; Maviel et al. 2004 ; Frankland et al. 2004). Cependant, dans notre publication 3, à l'aide du même test, nos résultats comportementaux et d'imagerie de la protéine c-Fos suite à l'instillation de MSCI aux doses de 30, 50, 80 et 250 ng, montrent une contribution à la fois de l'Hip et du mPFC dans le rappel d'une mémoire spatiale récente à la condition que, suite à l'instillation de MSCI, l'activité neuronale baisse de 80 à 90 % dans l'ensemble des sous-régions de la structure cible. Ainsi, lorsque l'inactivation fonctionnelle est suffisamment forte (80 ou 250 ng de MSCI dans l'Hip, 250 ng dans le mPFC), le rappel à 24 h est empêché. Ces deux structures sont donc indispensables au rappel d'une mémoire spatiale récente, et la dose de MSCI efficace dans le mPFC est supérieure à celle nécessaire pour obtenir un effet comparable au niveau de l'Hip (mesurée par l'expression de la protéine c-Fos, voir Fig. 5 de la publication 3).

Ces données soulignent l'importance d'une évaluation de l'intensité et de l'étendue de l'inactivation obtenue à la suite de l'instillation de substances pharmacologiques. De nombreuses études ont utilisé l'inactivation fonctionnelle pour évaluer le rôle d'une structure cérébrale dans un processus mnésique, et notamment au laboratoire avec la LIDO (e.g. Pereira de Vasconcelos et al. 2006 ; Klur et al. 2009 ; Lopez et al. 2012 ; Loureiro et al. 2012) et le MSCI (Majchrzak et Di Scala, 2000). Certains auteurs ont cherché à évaluer l'étendue et l'intensité de l'inactivation de ces deux substances (e.g. Martin et Ghez, 1999 ; Edeline et al. 2002 ; Pereira de Vasconcelos et al. 2006 ; Allen et al. 2008 ; Herry et al. 2008 ;

Jacobs et al. 2013). Ainsi, à l'aide de l'autoradiographie du glucose marqué au carbone 14, Martin a été le premier à montrer que l'instillation de MSC1 (1 µg/1µL) dans le cortex préfrontal et le tronc cérébral peut diffuser au-delà de la région d'intérêt, dans un rayon pouvant atteindre 3 mm autour du site d'instillation (Martin, 1991 ; voir aussi Martin et Ghez 1999). Plus récemment, Edeline et al. (2002) ont montré, à l'aide d'approches électrophysiologiques et autoradiographiques, que la baisse d'activité neuronale à la suite de l'instillation de MSC1 dans le noyau basal de Meynert ou le noyau réticulaire du thalamus pouvait s'étendre jusqu'à 3.25 mm autour du site d'instillation (volume : 0.1 à 0.4 µL, concentration : 1 µg/µL). Enfin, plus généralement, Nicholson et al. ont étudié la diffusion de substances pharmacologiques dans le parenchyme, et concluent que l'étendue de diffusion d'un composé instillé est fonction de la concentration initiale : plus la concentration est élevée, plus la substance diffusera loin (Sykova et Nicholson, 2008). Nos données obtenues à l'aide de l'imagerie du muscimol fluorescent sont en accord avec ces résultats : nous avons montré qu'aux doses de 30 ng (0.26 µmol) et 80 ng (0.70 nM), la diffusion du MSC1 fluorescent est restreinte à la zone d'instillation (soit le dHip, le mPFC ou les noyaux ReRh), et cette zone est plus étendue pour la dose la plus élevée (Figs. 2, 3 et 6 de la publication 2). Il en est de même pour les doses de 80 et 250 ng instillées dans le dHip et le mPFC (publication 3, Fig. 2). Néanmoins, dans nos expériences, la diffusion du MSC1 fluorescent autour du site d'instillation est restreinte au mPFC ou au dHip, y compris à la dose la plus élevée, confirmant que les conséquences comportementales de l'instillation peuvent être attribuées à l'inactivation des structures cibles. Malheureusement, dans la littérature utilisant le MSC1, l'étendue de la diffusion ou le degré d'inactivation ont rarement été évalués, et des effets non-spécifiques dus à une propagation au-delà de la structure d'intérêt ne sont pas à exclure. Ce point pourrait être une des causes des résultats contradictoires dans la littérature au sujet de l'implication du mPFC dans le rappel d'une mémoire récente. Dans les études précédentes mettant en œuvre des instillations de MSC1 dans le mPFC et/ou le dHip, les doses utilisées varient de 250 ng (Haddon et Killcross, 2011 ; Markham et al. 2012 ; Hallock et al. 2013b ; Barbosa et al. 2013) à 1 µg (Blum et al. 2006 ; Parnell et al. 2012), la dose la plus fréquemment utilisée étant de 0,5 µg (Holt and Maren, 1999 ; Allen et al. 2008 ; Lee and Kesner, 2003 ; Jo et al. 2007 ; Izquierdo et al. 2007 ; Marquis et al. 2007 ; Wang et Cai, 2008 ; Gilmartin et al. 2012), et une publication utilise une dose de 8 µg (Churchwell and Kesner, 2012). Seules quelques études ont utilisées une dose inférieure à

250 ng de MSCI : Rich et Shapiro, en 2007 (50 ng), Shaw et al., en 2013 (50 ng), Lee et Solivan, en 2008 (200 ng), et ces cinq études (en incluant les deux études présentées dans cette thèse), ont permis de montrer l'efficacité de l'inactivation en mettant en évidence un rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire récente et/ou dans la flexibilité comportementale (testés dans un labyrinthe en croix, une tâche de discrimination visuo-spatiale, un labyrinthe radial, le Double-H et la piscine de Morris, respectivement). Il est à noter que toutes les études citées ci-dessus n'ont utilisé qu'une seule dose de MSCI. Dans l'ensemble, les doses que nous avons utilisées (publications 2 et 3) sont parmi les plus faibles de la littérature montrant une implication du mPFC ou de l'Hip dans des processus mnésiques, et mettent en évidence que la réponse neuronale à l'instillation de MSCI pourrait différer en fonction de la structure.

Une approche d'inactivation fonctionnelle nécessite ainsi de prendre en considération un ensemble de paramètres tels que la taille de la structure, les limites neuroanatomiques (fibres blanches qui peuvent agir comme une barrière à la diffusion des composés instillés, ventricules qui entraînent la dispersion du produit dans le parenchyme), mais aussi l'organisation cellulaire et les propriétés intrinsèques du tissu cérébral qui peuvent changer d'une structure à l'autre. Ces éléments pourraient expliquer la différence de réponse entre mPFC et dHip en ce qui concerne la réduction de l'expression de c-Fos à la suite de l'instillation de MSCI.

L'inactivation fonctionnelle pharmacologique est très utile dans le cadre de l'étude du rôle fonctionnel de régions/sous-régions cérébrales dans un processus donné. Une nouvelle technique pourrait néanmoins venir la remplacer avantageusement dans un futur proche : l'approche optogénétique. Cette technique permet de contrôler en temps réel l'activité neuronale d'une structure cérébrale chez l'animal au cours de tâches comportementales (rev. Bernstein et Boyden, 2011 ; Packer et al. 2013 ; Goshen, 2014). Cette prouesse est rendue possible par la modification génétique de populations neuronales d'intérêt à l'aide de vecteurs viraux, dans le but de leur faire exprimer des protéines sensibles à la lumière (opsines). Une fibre optique est ensuite implantée par chirurgie stéréotaxique au sein de la structure étudiée, permettant son illumination. Au moment voulu (la résolution temporelle est de l'ordre de la milliseconde), l'illumination entraîne l'activation ou l'inactivation des neurones génétiquement modifiés (en fonction des opsines exprimées par les neurones, et

de la longueur d'onde de la lumière émise). Grâce à l'expression de deux opsines différentes dont les longueurs d'onde d'excitation sont distinctes, il est même possible d'inactiver puis activer (ou l'inverse) une structure cérébrale, voire une population neuronale spécifique, en temps réel au sein de la même expérience (Zhang et al. 2007). Une illustration de l'apport de l'optogénétique dans l'étude du rôle d'une structure cérébrale a été donnée par Goshen et al. (2011). Ces auteurs ont montré que l'inactivation de CA1 spécifiquement durant le test de rétention d'un conditionnement de peur au contexte ancien empêche le rappel, mais que si cette région est inactivée suffisamment longtemps (30 min avant, puis pendant toute la durée du test de rétention), de manière à simuler le décours temporel d'une inactivation pharmacologique, le rappel n'est plus dépendant de l'Hip. Ainsi, le rappel d'une mémoire ancienne peut être assuré par d'autres structures extra-hippocampiques lorsque l'Hip est inactivé, mais implique cette structure en conditions physiologiques (Goshen et al. 2011). Cette technique récente, en pleine évolution, est une avancée méthodologique très prometteuse pour l'étude de l'implication d'une région cérébrale et/ou d'une population neuronale donnée dans les processus cognitifs.

2. ROLE DES NOYAUX ReRh DANS LA PERSISTANCE D'UNE MEMOIRE SPATIALE

2.1. APPROCHE COMPORTEMENTALE

Nous avons montré i) une augmentation de l'activité neuronale (à l'aide de l'imagerie du gène précoce *c-fos*) des noyaux ReRh spécifiquement lors du rappel d'une mémoire spatiale ancienne (25 jours), et pas d'une mémoire récente (5 jours) ; ii) que la lésion excitotoxique des noyaux ReRh effectuée avant l'acquisition n'altère pas cette dernière, ni ne modifie le rappel d'une mémoire spatiale récente, mais empêche le rappel d'une mémoire ancienne ; iii) que l'inactivation fonctionnelle réversible des noyaux ReRh à l'aide de lidocaïne, effectuée juste avant les tests de rétention d'une mémoire spatiale de référence à 5 et 25 jours, n'a pas d'impact significatif sur les performances des animaux (publications 1 et 4). Ces résultats indiquent l'implication des noyaux ReRh du thalamus dans la persistance d'une mémoire spatiale chez le Rat.

L'encodage d'un évènement commence avec l'activation des aires corticales primaires et associatives, puis l'information est intégrée au niveau de l'Hip qui les organise en une trace mnésique cohérente. Selon les théories de la consolidation systémique, la stabilisation des traces mnésiques nécessite la réactivation des connexions hippocampo-corticales mises en

jeu au moment de l'encodage (rev. Frankland et Bontempi 2005 ; Winocur et al. 2010 ; Nadel et Hardt, 2011 ; Preston et Eichenbaum, 2013). Ces réactivations se produisent *off-line* (en marge de l'encodage de nouvelles informations), principalement durant le sommeil (rev. Diekelmann et Born, 2010 ; Born et Wilhelm, 2012), mais aussi, bien que probablement dans une moindre mesure, pendant l'éveil (e.g. Carr et al. 2011 ; Diekelmann et al. 2011). Elles seraient à l'origine du renforcement progressif des connexions cortico-corticales, renforcement qui pourrait aboutir *in fine* au désengagement de l'Hip lors du rappel, en fonction de l'âge et de la nature de la trace mnésique. Ce processus nécessite d'importants échanges réciproques d'informations entre l'Hip et le cortex, et notamment le mPFC, dont le rôle dans la formation et le rappel d'une mémoire ancienne a été démontré (Maviel et al. 2004 ; Frankland et Bontempi, 2005 ; Teixeira et al. 2006 ; Lopez et al. 2012). Cependant, s'il existe bien une connexion directe, monosynaptique entre l'Hip et le mPFC (Thierry et al. 2000), aucune projection directe en retour n'a été mise en évidence (Vertes, 2004 ; Vertes et al. 2006). Ces échanges ne pouvant pas avoir lieu de manière directe, les noyaux ReRh du thalamus sont idéalement situés pour jouer le rôle de relai et de coordinateur entre l'Hip et le mPFC, notamment dans les processus *off-line* permettant la consolidation au niveau des systèmes : ces noyaux sont connectés de manière réciproque à l'Hip et au mPFC (Vertes et al. 2006, 2010), envoient des collatérales vers ces deux structures (Hoover et Vertes, 2011 ; Varela et al. 2014) et sont capables de moduler l'activité du mPFC (Di Prisco et Vertes, 2006 ; Eleore et al. 2011) ainsi que celle de l'Hip (Dolleman-Van Der Weel, 1997 ; Bertram et Zhang, 1999 ; Morales et al. 2007). Avant nos travaux, aucune étude ne s'était intéressée au rôle de ces noyaux dans la consolidation systémique et le rappel d'une mémoire ancienne. Il avait par contre été démontré que le rappel d'une mémoire ancienne dans la piscine de Morris nécessite à la fois l'Hip et le mPFC, tandis que le rappel d'une mémoire récente dans ce test implique l'Hip seul (Clark et al. 2005 ; Broadbent et al. 2006 ; Teixeira et al. 2006 ; Wiltgen et al. 2010 ; Lopez et al. 2012) (même si une implication du mPFC dans le rappel d'une mémoire récente, au moins sous certaines conditions, n'est pas à exclure ; cf. partie 4 de cette discussion). De plus, Hembrook et Mair (2011) et Hembrook et al. (2012) ont montré une implication des noyaux ReRh spécifiquement dans une tâche de mémoire spatiale de travail dans un labyrinthe radial à 8 branches (tâche dépendante à la fois de l'Hip et du mPFC), ce qui n'est pas le cas dans une tâche dépendante de l'Hip seul. Ces résultats indiquent une participation des noyaux ReRh dans des processus nécessitant une implication

conjointe de l'Hip et du mPFC. Dans notre publication 1, nous avons montré que la lésion des noyaux ReRh effectuée avant l'apprentissage d'une tâche de mémoire de référence dans la piscine de Morris n'altère ni l'acquisition, ni le rappel d'une mémoire récente, mais empêche le rappel d'une mémoire ancienne. L'activité neuronale élevée dans les noyaux ReRh au cours du rappel d'une mémoire ancienne dans la piscine de Morris indique que ceux-ci sont sollicités au cours de ce processus (publication 1), en accord avec l'hypothèse d'un engagement de ces noyaux lorsque l'Hip et le mPFC sont requis pour réaliser la tâche (e.g. Lopez et al. 2012). Mais l'absence d'effet de l'inactivation de ces noyaux (à l'aide de LIDO ; voir la partie 1 « considérations méthodologiques » de cette discussion) au cours de ce test semble montrer que leur participation n'est pas cruciale pour le rappel, et indiquer plutôt un rôle des noyaux ventraux de la ligne médiane du thalamus dans l'étape de consolidation d'une mémoire spatiale chez le Rat.

Vers un rôle du thalamus non-spécifique dans la consolidation systémique

Nos données obtenues avec la lésion des noyaux ReRh peuvent être comparées à celles obtenues au laboratoire à la suite de lésions des noyaux intralaminaires (ILN) et latéraux (LT) du thalamus (Lopez et al. 2009). Dans cette étude, les animaux porteurs d'une lésion ILN/LT ont été testés dans un protocole de mémoire spatiale de référence dans la piscine de Morris (identique à celui que nous avons utilisé). Les résultats de la lésion des noyaux ILN/LT et des noyaux ReRh sont similaires : les performances durant la phase d'acquisition et le test de rétention à 5 jours sont normales, tandis que le rappel à 25 jours est altéré. Ces noyaux ont en commun leur implication dans les processus d'éveil cortical et de motivation, notamment via leurs connexions avec le mPFC et les noyaux du tronc cérébral régulant la vigilance (Van der Werf et al. 2002 ; Llinàs et Steriade, 2006). De plus, ils projettent de manière relativement diffuses vers les aires corticales, ont la capacité d'activer des assemblées de neurones corticaux, et sont impliqués dans des boucles thalamo-cortico-thalamiques capables de synchroniser l'activité corticale (Miller, 1996 ; Jones, 2001 ; Llinàs et Steriade, 2006). Ces propriétés anatomo-fonctionnelles pourraient permettre à ces noyaux de participer activement à la réactivation de réseaux neuronaux nécessaire à la consolidation des traces mnésiques, et le thalamus « non-spécifique » faire ainsi partie intégrante d'un réseau distribué de structures extra-hippocampiques impliquées dans la réorganisation spatio-temporelle des traces mnésiques. Ces deux études (Lopez et al. 2009 et la publication

1 de cette thèse) sont les premières à proposer l'existence d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique (et non plus seulement hippocampo-cortical) à la base de la formation et de la persistance de nos souvenirs à très long terme.

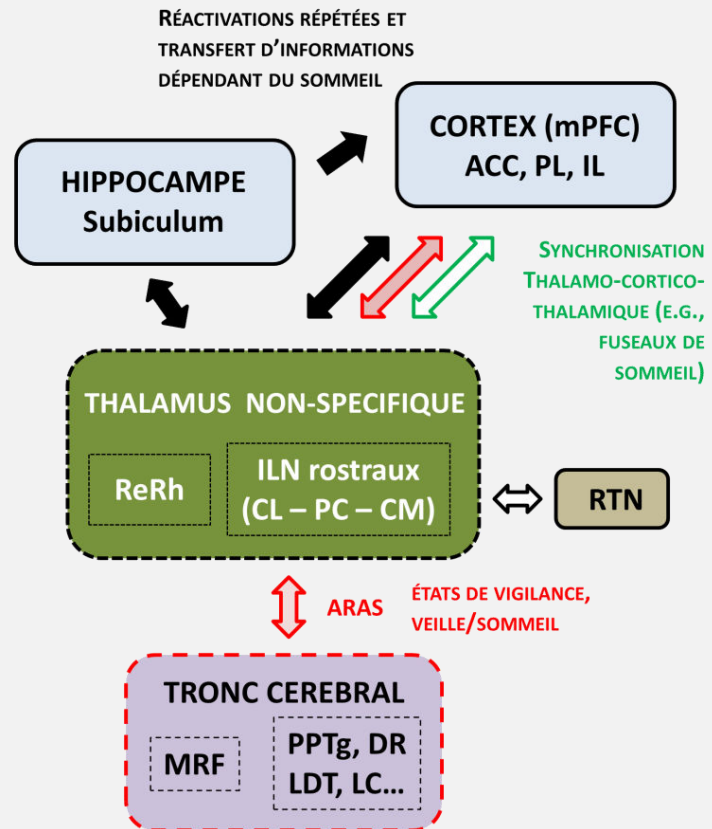
2.2. APPROCHE EN IMAGERIE FONCTIONNELLE : MODULATION DE L'ACTIVITE DE L'HIP ET DU MPFC PAR LES NOYAUX ReRH

A l'aide de lésions excitotoxiques (NMDA) et de l'imagerie du gène précoce *c-Fos*, nous avons montré, dans le mPFC, que l'augmentation du recrutement neuronal normalement visible lorsque le délai de rappel d'une mémoire spatiale de référence augmente (rats Sham, 5j vs 25j, et comme précédemment observé, e.g. Lopez et al. 2012) n'a pas lieu chez les animaux porteurs d'une lésion ReRh (publication 4, Fig. 6). Ces résultats d'imagerie fonctionnelle sont en accord avec la baisse des performances de rappel observée dans le test de la piscine de Morris à 25 jours chez les rats lésés. A l'inverse, la lésion des noyaux ReRh n'affecte pas significativement l'activité neuronale dans l'Hip dorsal, et ce quel que soit le délai (publication 4, Fig. 6). L'incapacité des animaux porteurs d'une lésion des noyaux ReRh à rappeler une mémoire spatiale ancienne pourrait ainsi être liée à l'absence, au sein du mPFC, du recrutement neuronal nécessaire à l'expression d'une mémoire spatiale ancienne.

Le rôle du noyau Re sur l'activité cortical et hippocampique a été élégamment étudié par Xu et Sudh f (2013) qui ont identifié un circuit sous-tendant les processus de spécificité et de généralisation des composants d'un souvenir. Ce circuit serait composé du mPFC, de l'Hip et du Re. Dans un protocole de conditionnement de peur au contexte, ils ont montré que l'inactivation spécifique des neurones du mPFC projetant vers le Re (induite par l'expression de la toxine tétanique), provoque une 'sur-généralisation' de la peur au contexte à un délai court post-apprentissage (24h) ; les souris expriment alors une peur dans un contexte dégradé, indiquant une perte de spécificité du souvenir. Dans ce même protocole, l'expression de la toxine tétanique directement dans le Re induit également une 'sur-généralisation' de la peur au contexte. Xu et Sudh f ont ensuite évalué le niveau d'expression du gène précoce *c-fos* dans le mPFC et l'Hip à la suite de cette inactivation : le niveau basal d'expression de la protéine *c-Fos* ne change pas ou peu dans ces deux structures, en accord avec nos résultats d'imagerie de ce gène précoce obtenus chez des animaux 'Home Cage' à la suite de lésions ReRh (publication 4, Fig. 3). Par contre, l'augmentation de l'expression de *c-Fos* dans CA1 et dans l'ACC provoquée par la tâche

Figure 59. Modèle de la consolidation d'une mémoire déclarative basé sur les propriétés anatomo-fonctionnelles d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique centré sur les noyaux ReRh et ILN du thalamus. La consolidation d'une mémoire déclarative nécessite une réorganisation des traces mnésiques, initialement hippocampiques, les amenant à devenir dépendantes de sites néocorticaux (rev. Frankland et Bontempi, 2005). Ce processus est dépendant du sommeil : du sommeil à ondes lentes (SWS) pour les réactivations hippocampo-corticales successives de nouvelles traces

mnésiques (consolidation au niveau des systèmes) et du sommeil paradoxal pour la plasticité synaptique locale (rev. Diekelmann et Born, 2010). Les noyaux ILN et ReRh appartiennent au thalamus non spécifique, qui participe au système d'activation réticulaire ascendant (ARAS) prenant son origine dans différents noyaux du tronc cérébral et régulant l'éveil cortical et les états de vigilance (flèches rouges). De plus, les projections réciproques entre le thalamus et le cortex sont responsables de la synchronisation des rythmes électrophysiologiques du cerveau antérieur (flèche verte) (rev. Jones, 2001). Enfin, le noyau Re a de fortes connexions réciproques avec l'hippocampe et le subiculum. En considérant que le mPFC n'a pas de projections directes vers l'hippocampe (e.g., Jay et al, 1996) et que la lésion ReRh altère la persistance d'un souvenir, ces noyaux pourraient être un relai essentiel pour les interactions hippocampo-corticales sous-tendant la consolidation systémique. Ces noyaux sont ainsi particulièrement bien situés pour influencer fortement la formation et la persistance des souvenirs, processus nécessitant une réorganisation hippocampo-corticale dépendante de l'alternance veille/sommeil (éveil, SWS, REM). Abréviations : ACC, cortex cingulaire antérieur ; CL, noyau centrolatéral ; CM, noyau centromédian ; DR, noyau raphé dorsal ; IL, cortex infralimbique ; ILN, noyaux intralaminaires ; LC, locus coeruleus ; LDT, tegmentum latérodorsal ; MRF, formation réticulée mésencéphalique ; PC, noyau paracentral ; PL, cortex prélimbique ; PPTg, noyau pédonculo-pontin ; Re, noyau reuniens ; Rh, noyau rhomboïde ; RTN, noyau réticulaire thalamique. Schéma de Pereira de Vasconcelos et Cassel, pour l'article "The nonspecific thalamus: a place in a wedding bed for making memories last?" en soumission au journal *Neuroscience and Biobehav Reviews*.



d'acquisition chez des animaux contrôles n'est pas visible chez des animaux dont le Re est inactivé (Xu et Sudh f, 2013).

Ces résultats indiquent que les neurones du Re sont capables de réguler l'activité de l'Hip et du mPFC au cours de l'acquisition d'un conditionnement de peur au contexte. Enfin, grâce à une approche optogénétique, ces auteurs ont ensuite montré que l'activité des neurones Re durant la phase d'acquisition définit le niveau de spécificité avec lequel le conditionnement de peur au contexte sera consolidé à long terme. Ils ont induit des stimulations toniques (4 Hz continu) ou phasiques (30 Hz durant 0,5 secondes toutes les 5 secondes) durant le conditionnement de peur. Aucune de ces deux stimulations n'a d'effet sur l'acquisition en tant que telle, mais elles induisent des changements opposés sur la spécificité du souvenir encodé. La stimulation phasique génère une augmentation de l'immobilité comportementale dans un contexte dégradé (qui ne provoque normalement pas de réponse de peur), indiquant une perte de spécificité, tandis que la stimulation tonique induit une réduction de l'immobilité comportementale dans ce même contexte, signe de l'augmentation de la spécificité du souvenir. Ainsi, l'activité du Re durant l'acquisition détermine le niveau de détail avec lequel le souvenir est encodé et consolidé à long terme (Xu et Sudh f, 2013). Ces résultats indiquent l'implication du mPFC et du Re dans le contrôle de la spécificité d'un souvenir, et apportent des éléments supplémentaires en faveur d'un rôle du Re dans la consolidation au niveau des systèmes et d'un lien fonctionnel fort entre l'Hip, le mPFC et le Re au sein d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique qui sous-tendrait à la fois la spécificité et la persistance d'un souvenir. Les travaux de Xu et Sudh f indiquent par ailleurs que ce circuit pourrait être à l'œuvre dès l'encodage. Ce point nécessite d'être exploré plus avant en ce qui concerne la mémoire ancienne, qui n'a pas été abordée dans leur étude.

Imagerie fonctionnelle dans l'Hip

Dans les travaux ayant amené à la publication 4 de cette thèse, nous avons constaté l'augmentation de l'expression du gène *c-fos* au niveau du dHip (notamment CA1)   la suite du rappel de l'emplacement d'une plateforme dans la piscine de Morris chez les deux groupes de rats, Sham et lésés (par rapport à des animaux Home Cage), mais le fait que le rappel ait lieu à 5 jours (mémoire récente) ou 25 jours (mémoire ancienne) ne modifie pas le niveau d'activité neuronale dans cette structure (publication 4, Fig. 6). Ce résultat diffère

d'études précédentes indiquant que l'expression de ce gène *c-fos* augmente dans l'Hip avec le délai de rappel (e.g. Lopez et al. 2012 ; Schlesiger et al. 2013). Cette différence pourrait être due à un apprentissage plus poussé dans notre étude (8 jours au lieu de 6 jours dans la publication de Lopez et al.), tandis que la tâche n'était pas la même (labyrinthe radial) et que les animaux étaient en restriction alimentaire dans l'étude de Schlesiger et al. (2013). Dans une autre étude chez la souris (Teixeira et al. 2006), les niveaux d'expression du gène *c-fos* sont comparables au cours des tests de rétention de la mémoire récente et ancienne dans la piscine de Morris. D'autres auteurs ont décrit un désengagement de l'Hip lors du rappel d'une mémoire ancienne (Maviel et al. 2004 ; Frankland et Bontempi, 2005), mais jamais lorsqu'il s'agit de mémoire impliquant une navigation spatiale, pour laquelle l'Hip est impliqué quel que soit le délai de rappel (e.g. Teixeira et al. 2006 ; Lopez et al. 2012).

De plus, la lésion des noyaux ReRh n'affecte pas de manière significative l'activité de l'Hip dorsal, et ce quel que soit le délai (publication 4). Les projections du Re sur la formation hippocampique terminent au niveau de CA1 et de manière très dense dans le présubiculum, le parasubiculum et le subiculum, mais pas du tout au niveau de CA2/CA3 ou du DG. Sur l'axe dorso-ventral, la densité des projections apparaît bien supérieure (jusqu'à 10x) dans la partie ventrale de l'Hip par rapport à sa partie dorsale, suggérant une connexion privilégiée du Re avec le vHip (Vertes et al. 2007 ; Hoover et Vertes, 2011). Le dHip et le vHip sont organisés de manière identique au niveau cytoarchitectural, notamment en ce qui concerne la boucle tri-synaptique intra-hippocampique : les connexions entre le DG, CA1 et CA3 sont comparables du pôle septal au pôle temporal de l'Hip (Witter et Amaral, 2004). L'Hip possède ainsi des connexions intrinsèques permettant aux sous-régions hippocampiques de communiquer entre elles sur toute leur étendue dorso-ventrale. Cette organisation est susceptible de permettre l'engagement de l'intégralité de l'Hip dans un processus mnésique donné, notamment dans le cas du traitement d'informations spatiales. Ainsi, Loureiro et al. (2012) ont montré, à l'aide d'inactivations réversibles (LIDO) du dHip ou du vHip au cours de l'acquisition ou du rappel d'une mémoire spatiale récente (24h) chez le Rat, que le vHip participerait plutôt au rappel, et le dHip à la fois à l'acquisition et au rappel. A ce jour, Nous avons uniquement étudié l'activité neuronale au niveau du dHip ; en raison de l'intensité des connexions neuroanatomiques entre le Re et le vHip (Vertes et al. 2007 ; Hoover et Vertes, 2011), il n'est pas à exclure que la quantification de l'expression de *c-fos* dans le vHip mette

en évidence un effet de la lésion des noyaux ReRh dans cette partie de l'Hip ; il pourrait en être de même au niveau du subiculum / parasubiculum ventral, également fortement connecté avec les noyaux ReRh (Vertes et al. 2006 ; Hoover et Vertes, 2007).

Imagerie fonctionnelle dans le mPFC

Comme attendu (e.g. Lopez et al. 2012), nous avons observé une augmentation du recrutement neuronal au niveau du mPFC chez les animaux Sham lorsque le délai de rappel d'une mémoire spatiale de référence augmente (5j vs 25j), mais cette augmentation n'a pas eu lieu chez les animaux porteurs d'une lésion ReRh. Ces résultats pourraient s'expliquer par une interruption du transfert d'informations entre l'Hip et le mPFC suite à la lésion, et notamment pendant la phase de consolidation systémique qui grâce aux réactivations hippocampo-corticales, puis cortico-corticales successives, induisent un renforcement des connexions existantes et/ou la création de nouvelles connexions corticales. Ce processus de consolidation systémique amènerait, chez les rats Sham, à l'augmentation de l'activité neuronale dans le mPFC avec le délai, lors du test de rétention de mémoire ancienne ; phénomène qui pourrait être altéré chez les rats lésés. Ces données d'imagerie fonctionnelle sont en accord avec le déficit de rappel d'une mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris à la suite de lésions ReRh observé uniquement en mémoire ancienne (publication 1, Fig. 4 ; publication 4, Fig. 4). De plus, les effets de la lésion ReRh sur l'expression du gène *c-fos* dans le mPFC à 25 jours varient en fonction de la sous-région : l'activité cellulaire dans le cortex IL n'est pas affectée par la lésion ReRh, tandis qu'elle est faiblement diminuée dans le cortex PL, et fortement réduite dans l'ACC (publication 4, Fig. 6). Le rôle du mPFC et de ses sous-régions dans le rappel d'une mémoire sera l'objet de la partie 4 de cette discussion. Des études précédentes ont en effet montré que la formation et l'expression d'une mémoire ancienne requiert la participation de l'ACC (Frankland et Bontempi, 2005 ; Restivo et al. 2009 ; Winocur et al. 2010 ; Vetere et al. 2011) ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle les noyaux ReRh participeraient à la consolidation au niveau des systèmes, notamment de par leurs connexions avec le mPFC, dont l'ACC (Vertes, 2002 ; Vertes et al. 2006).

Sur la base de nos résultats, des travaux de Lesburguères et al. (2011) au sujet du *tagging* cortical (montrant que les réseaux neuronaux hippocampiques et corticaux doivent tous deux être marqués de manière simultanée au moment de l'encodage pour assurer le rappel à très long terme, cf. partie 4.3.10 de l'introduction) et de ceux de Xu et Sudhöff (2013)

montrant qu'en cas d'inactivation du ReRh durant l'acquisition, le mPFC est moins recruté qu'en situation physiologique, nous pouvons proposer : i) qu'un *tagging* initial des neurones corticaux, en particulier du mPFC, est généré lors de la phase d'acquisition ; ii) que ce processus permettrait le renforcement ultérieur des connexions au niveau du mPFC, amenant à la stabilisation au niveau cortical de la trace initialement hippocampique, et donc l'engagement du mPFC au cours du rappel d'une mémoire ancienne ; iii) que ce processus serait dépendant de l'intégrité des noyaux ReRh. L'incapacité des animaux porteurs d'une lésion des noyaux ReRh à rappeler une mémoire spatiale ancienne serait ainsi liée à l'absence, au sein du mPFC, du recrutement neuronal nécessaire à ce rappel, et ceci pourrait être déterminé dès la phase d'encodage de la trace mnésique. L'Hip étant prépondérant pour l'expression d'une trace mnésique récente, ce déficit initial de *tagging* cortical ne se révélerait que lors du rappel d'une mémoire ancienne, ainsi que l'ont montré Lesburguères et al. (2011) au niveau du cortex orbito-frontal dans une tâche de transmission d'une préférence alimentaire.

Une autre hypothèse est celle du rôle-clé des noyaux non-spécifiques du thalamus, dont font partie les noyaux ReRh, dans les états de vigilance et dans l'éveil cortical. Via la synchronisation de rythmes EEG corticaux impliquant des boucles thalamo-corticales, ces noyaux sont impliqués dans la régulation de l'alternance veille/sommeil, mais aussi dans les processus cognitifs (rev. Jones 2001). Ces mécanismes pourraient jouer un rôle clé dans la réactivation offline de traces mnésiques nouvellement formées, réactivations qui se produisent essentiellement pendant le sommeil et sont impliquées dans la stabilisation et la consolidation d'une mémoire (rev Diekelmann et Born, 2010).

3. ROLE DES NOYAUX RERH DANS LA FLEXIBILITE COMPORTEMENTALE

A l'aide du labyrinthe en Double-H et d'inactivations fonctionnelles réversibles (muscimol), nous avons pu mettre en évidence l'implication des noyaux ReRh (ainsi que de l'Hip et du mPFC) dans le rappel d'une mémoire spatiale lorsque le test de rétention nécessite de faire preuve de flexibilité comportementale (requiert un changement de stratégie) pour obtenir de bonnes performances de rappel. Ces résultats confirment l'implication des noyaux ReRh dans des processus mnésiques engageant à la fois l'Hip et le mPFC, telle qu'indiquée par Vertes et al (2007) et Hoover et Vertes (2012) sur la base des connections anatomo-fonctionnelles, par Hembrook et al. en ce qui concerne la mémoire de travail (Hembrook et

Mair, 2011 ; Hembrook et al. 2012), ainsi que par nos données sur la consolidation au niveau des systèmes d'une mémoire spatiale (publications 1 et 4).

Le mPFC est impliqué dans les fonctions exécutives, qui comprennent la prise de décision, la planification et l'organisation d'une action orientée vers un but (rev Dalley et al. 2004), et il a été montré que cette structure est essentielle pour la flexibilité comportementale et la capacité à changer de stratégie pour adapter au mieux le comportement au contexte (Ragozzino et al. 2003 ; Haddon et Killcross, 2011 ; Bissonnette et al. 2013). Euston et al. (2012) ont proposé que la fonction du mPFC soit d'apprendre des associations entre les contextes, les emplacements et les évènements, ce qui serait facilité par ses interactions privilégiées avec l'Hip. Durant le rappel d'une mémoire, le mPFC pourrait en particulier intervenir dans le contrôle des stratégies et des règles basées sur le contexte, ainsi que dans la distinction entre les associations pertinentes et celles qui ne le sont pas (e.g. Rich et Shapiro 2009 ; rev. Depue 2012 ; Preston et Eichenbaum, 2013).

Dans leur étude de 2009 visant à évaluer l'effet de lésions excitotoxiques du noyau Re sur la mémoire de référence dans la piscine de Morris, Dolleman-van Der Weel et al. ont montré que ces lésions n'empêchent pas le rappel d'une mémoire spatiale récente, mais modifient la stratégie utilisée par l'animal durant le test de rétention. Dans cette étude, les animaux porteurs d'une lésion du noyau Re recherchent tout d'abord la plateforme comme les animaux Sham, et empruntent une trajectoire initiale directe entre le point d'introduction dans la piscine de Morris et l'emplacement de la plateforme durant l'acquisition. Mais d'après les auteurs, les rats lésés semblent se désintéresser rapidement du quadrant cible, et ne persistent pas à rechercher la plateforme dans celui-ci. Ils concluent à une capacité accrue à changer de stratégie chez les animaux lésés, phénomène qui résulterait de l'altération des mécanismes de contrôle de l'inhibition du comportement. Or, le contrôle de l'inhibition comportementale implique à la fois le mPFC et l'Hip (Floresco et al. 2008 ; Chudasama et al. 2012), et la lésion du noyau Re entraîne des comportements impulsifs chez le Rat. Ainsi, le déficit d'inhibition comportementale observé serait lié à l'interruption des connexions réciproques entre le Re et le mPFC (Prasad et al. 2013). C'est sur la base de ces études et des connexions privilégiées qu'entretiennent l'Hip, le mPFC et les noyaux ReRh que nous avons décidé d'étudier le rôle d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans la flexibilité comportementale (publication 2).

Pour évaluer le changement de stratégie au cours d'un test de rétention d'une mémoire spatiale récente, nous avons utilisé le test du labyrinthe en Double-H (publication 2), test inventé et validé au sein du laboratoire (Pol Bodetto et al. 2011 ; Cassel et al. 2012). La particularité de ce test réside dans la possibilité d'étudier la formation et le rappel d'une stratégie égocentrique ou allocentrique dans une tâche consistant à retrouver une plateforme immergée (comme c'est également le cas dans la piscine de Morris). En fonction du protocole d'acquisition utilisé, il est possible de privilégier la mise en place d'une stratégie égocentrique ou allocentrique, puis d'étudier la capacité d'un Rat à passer de l'une à l'autre lorsqu'une modification du point de lâcher rend la stratégie égocentrique inadaptée à la situation. Le protocole que nous avons mis en place implique que les rats apprennent à se rendre sur la plateforme depuis deux points de lâcher différents. Puis lors du test de rétention à 24 h, les rats sont introduits dans le dispositif depuis une branche différente, jamais utilisée en tant que point de départ durant l'acquisition. Ce nouveau point de lâcher correspond à la position obtenue après translation de 60 cm vers la gauche de l'un des deux points de départs utilisés précédemment (voir Fig. 1 de la publication 2 et Fig. 44 de la section matériels et méthodes de cette thèse). Ainsi, lors du rappel, la plupart des animaux reproduisent d'abord le parcours appris à partir de la branche Sud (tourner à droite, puis tourner à gauche), ce qui les conduit dans la branche Nord (qui ne contenait pas la plateforme durant l'acquisition). Les rats contrôles réalisant leur erreur se dirigent ensuite vers la branche cible (branche Nord-Est, contenant la plateforme durant l'acquisition) et y passent significativement plus de temps que dans le reste du dispositif. L'inactivation du mPFC, de l'Hip ou des noyaux ReRh (par instillation intracérébrale de muscimol) avant le rappel à 24h abolit cette préférence de place pour la branche cible (Figs. 5 et 8 de la publication 2). Par contre, l'analyse de la première entrée dans une branche indique que l'inactivation ne perturbe pas l'utilisation initiale d'une stratégie égocentrique, quelle que soit la structure inactivée. Cette expérience nous a permis de vérifier dans une autre tâche et en ciblant un autre processus cognitif, l'hypothèse selon laquelle lorsque l'Hip et le mPFC sont indispensables à la réalisation/réussite d'un test de mémoire, alors les noyaux ReRh le sont aussi. Nous avons donc exploité le test du Double-H pour tester l'implication du mPFC, de l'Hip et des noyaux ReRh dans une tâche mettant en jeu la nécessité pour le rat de basculer d'une approche égocentrique de la tâche vers une approche allocentrique, et montré qu'un changement de stratégie, nécessaire à l'adaptation comportementale en

réponse à une modification des contingences de la tâche dans un test spatial, est dépendant à la fois de l'Hip, du mPFC et des noyaux ReRh. Ces résultats peuvent être mis en relation avec ceux de Hembrook et Mair (2011) : dans un labyrinthe radial à 8 branches, une tâche nécessitant de sélectionner et d'entrer uniquement dans les bras précédemment non-appâtés est affectée par la lésion des noyaux ReRh (Hembrook et Mair, 2011). Ces auteurs ont ainsi montré un rôle des noyaux ReRh dans une tâche de mémoire spatiale de travail qui requiert la mémorisation d'informations spécifiques à l'essai en cours et est affectée par des lésions hippocampiques et/ou préfrontales (Porter et Mair, 1997 ; Mair et al. 1998).

Un comportement adapté au contexte, notamment si celui-ci diffère de la situation d'apprentissage, requiert ainsi un circuit hippocampo-cortico-thalamique permettant des interactions entre l'Hip (pour le rappel de l'information spatiale), le mPFC (pour la sélection et l'exécution de la stratégie adaptée à la situation) et les noyaux ReRh du thalamus (probablement pour la coordination et le transfert d'informations entre ces deux structures).

4. ROLE DU MPFC ET DE SES SOUS-REGIONS (IL, PL, ACC) DANS LE RAPPEL D'UNE MEMOIRE DECLARATIVE (-LIKE) RECENTE /ANCIENNE

4.1. MPFC ET RAPPEL D'UNE MEMOIRE DECLARATIVE(-LIKE)

Le rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire ancienne et celui de l'Hip dans le rappel d'une mémoire en général sont aujourd'hui largement acceptés ; la participation du mPFC dans le rappel d'une mémoire récente est par contre toujours discutée. Grâce à des inactivations fonctionnelles réversibles à l'aide de muscimol, nous avons pu mettre en évidence que l'inactivation de l'Hip ou du mPFC lors du rappel à 24 h d'une mémoire de référence récente empêche le rappel (publication 3, Fig.3). En effet, nous avons évalué l'impact de l'inactivation du mPFC ou de l'Hip dorsal sur le rappel à 24 h de l'emplacement d'une plateforme dans la piscine de Morris. Le MSCI (30, 50, 80 ou 250 ng) a été instillé 30 min avant le test de rappel. La dose la plus faible (30 ng) n'a pas d'impact sur le rappel quelle que soit la structure cible. Dans l'hippocampe dorsal, la dose de 50 ng de muscimol altère les performances de rappel, et aux doses supérieures (80 et 250 ng), les rats ne présentent aucun souvenir de l'emplacement de la plateforme. Instillé dans le mPFC, seule la dose la plus élevée de 250 ng de muscimol empêche le rappel. Ces résultats suggèrent un rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire récente et confirment l'implication de l'Hip dans ce processus.

Un nombre croissant de publications remettent en questions l'implication spécifique du mPFC dans la consolidation et le rappel d'une mémoire ancienne, et indiquent un rôle de cette structure dans la formation et l'expression à la fois de souvenirs récents et anciens. Le mPFC pourrait notamment être impliqué dans l'expression d'une mémoire récente en raison de sa participation dans les processus de contrôle exécutif au cours du rappel (e.g. Leon et al. 2010 ; Weible et al. 2012 ; Gonzalez et al. 2013). Leon et al. (2010) ont mis en évidence que l'acquisition d'informations spatiales dans le test de la piscine de Morris (au cours d'une unique session d'acquisition) induit l'activation d'ERK dans l'Hip, mais pas dans le mPFC ; par contre le rappel d'une information spatiale récente active la voie de ERK à la fois dans l'Hip et le mPFC. Ces résultats sont en accord avec ceux de Runyan et al. (2004), montrant que si le mPFC n'est pas directement impliqué dans l'encodage d'une mémoire de peur conditionnée, cette région est nécessaire à son expression à 48 h. Blum et al. (2006) ont également montré, à l'aide d'inactivations induites par l'instillation de MSCI, le rôle du mPFC à la fois dans le rappel d'une mémoire récente et dans le rappel d'une mémoire ancienne dans une tâche de conditionnement de peur. Des résultats similaires ont été obtenus dans une tâche d'évitement passif (Gonzalez et al. 2013), et dans une tâche d'appariement spatial dans un labyrinthe radial (Lee et Solivan, 2008). Chez l'Homme, une récente étude en IRMf montre que le cortex préfrontal ventromédian est engagé, tout comme l'Hip, lors du rappel de souvenirs épisodiques récents ou anciens (Bonnici et al. 2012). Dans le cadre du débat opposant les données expérimentales et cliniques appuyant un rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire déclarative ancienne uniquement (le rappel récent étant alors proposé comme dépendant de l'Hip seul ; e.g. rev. Frankland and Bontempi, 2005 ; Winocur et al. 2010), et les études qui indiquent un rôle permanent du mPFC quel que soit l'âge du souvenir, nos données sont davantage en accord avec cette seconde proposition.

Preston et Eichenbaum (2013) proposent que les interactions entre l'Hip et le mPFC permettent l'assimilation de nouveaux souvenirs au sein de schémas de connaissances préexistants, et que la modification de ces schémas soit à l'origine de la consolidation mnésique. L'intégration de nouvelles informations au sein d'un schéma serait fonction du caractère conflictuel d'une information vis-à-vis d'une autre (i.e., intégrer le fait que la plateforme est désormais absente de la piscine de Morris se fait au détriment de l'information précédente, indiquant sa présence dans le quadrant cible). Ces auteurs

suggèrent ainsi que le rôle stratégique du mPFC dans la formation et la consolidation résiderait dans l'accommodation des schémas de manière à y intégrer les informations nouvelles, i.e., dans la résolution des conflits entre information entrante et information stockée (Preston et Eichenbaum, 2013).

Dès lors, si l'Hip et le mPFC sont tous deux impliqués dans le rappel d'une mémoire spatiale récente, la question du rôle des noyaux ReRh à ce délai peut se poser. Les données de notre publication 1 (lésions et inactivations à l'aide de LIDO avant le rappel) ne sont pas en faveur d'un rôle de ces noyaux thalamiques dans ce processus. Cependant, l'inactivation à l'aide de MSCI affecte la performance de rappel à 24 h ; mais sans toutefois empêcher le rappel de l'information (Fig. 7 de la publication 2). Ce point nécessitera d'être éclairci et fera très probablement l'objet d'une étude au laboratoire dans un futur proche.

4.2. ROLE DIFFERENTIEL DES SOUS-REGIONS DU MPFC DANS LA CONSOLIDATION ET LE RAPPEL D'UNE MEMOIRE DECLARATIVE(-LIKE) ?

Nos résultats indiquent également une possible hétérogénéité fonctionnelle au sein des sous-régions du mPFC. En effet, une réduction de 40 à 60 % de l'activité neuronale des cortex IL et PL et de 76 % de l'activité au sein de l'ACC, provoquée par l'instillation de 80 ng de MSCI, n'a pas d'impact sur les performances de rappel d'une mémoire de référence dans la piscine de Morris. A la dose de 250 ng, l'instillation de MSCI amène à une réduction de 82 à 88 % de l'activité neuronale dans ces trois sous-régions, et les performances de rappel s'effondrent au niveau du hasard, indiquant l'impossibilité d'exprimer le souvenir de l'emplacement de la plateforme (Fig. 5, publication 3). Ces données pourraient indiquer le rôle prépondérant des cortex IL/PL (en comparaison de l'ACC) dans le rappel d'une mémoire récente.

L'hypothèse d'une hétérogénéité fonctionnelle au sein du mPFC a déjà été proposée sur la base de propriétés neuroanatomiques et neurochimiques distinctes (rev. Heidbreder et Groenewegen, 2003). Les cortex IL et la partie ventrale du PL reçoivent principalement des projections depuis l'Hip et l'amygdale, ainsi que des cortex limbiques et associatifs, tandis que la partie dorsale du PL et l'ACC sont principalement la cible d'aires néocorticales sensorimotrices et associatives. Les cortex IL et PL projettent vers des structures sous-corticales « limbiques » (septum et amygdale notamment) et exercent une influence plus

importante sur les systèmes monoaminergiques du tronc cérébral, en comparaison de l'ACC. Les projections de l'IL et du PL diffèrent également entre elles : le PL projette sur des régions impliquées dans les processus cognitifs – ou exerçant une influence sur celles-ci (e.g., le cortex insulaire agranulaire, le claustrum, le noyau accumbens, l'amygdale basolatérale, les noyaux ReRh thalamus, l'aire tegmentale ventrale, la substance noire et les noyaux du raphé), tandis que l'IL projette principalement sur des structures impliquées dans le contrôle de l'activité viscéromotrice (le septum latéral, le noyau du lit de la strie terminale, les noyaux préoptiques médian et latéral, la substantia innominata, l'amygdale, l'hypothalamus et les noyaux solitaire et parabrachial du tronc cérébral; Vertes, 2004). Ces données neuroanatomiques mettent en évidence des profils de connexions spécifiques à chaque sous-région et compatibles avec une hétérogénéité des fonctions au sein du mPFC.

Probablement en grande partie pour des raisons techniques, la plupart des études comportementales chez le Rat ont considérées le mPFC dans son ensemble. Quelques études ont néanmoins ciblé spécifiquement l'une ou l'autre de ces sous-régions. Ragozzino et al. (1998) ont montré que la lésion des cortex IL et PL altère la mémoire de travail spatiale, et induit un déficit transitoire dans une tâche de discrimination spatiale, tandis que ce n'est pas le cas de la lésion de l'ACC. Plus récemment, Hok et al. (2005) ont montré, à l'aide de techniques électrophysiologiques chez le Rat, qu'une proportion non négligeable des neurones des cortex IL et PL présentent des champs d'activité codant pour l'emplacement du but à atteindre dans une tâche de navigation spatiale. D'après cette même étude, la proportion de neurones faisant état de propriétés similaires dans l'ACC est nettement inférieure. De plus, l'inactivation du mPFC (centrée sur le PL) entraîne une modification des caractéristiques des champs d'activité des neurones hippocampiques (Hok et al. 2013). Ce mécanisme apparaît primordial pour la planification de trajectoires et la flexibilité comportementale : les neurones du PL codant pour l'emplacement des objectifs au cours de la tâche, et en interaction avec les cellules de lieu hippocampiques, pourraient jouer un rôle majeur dans l'adaptation et le changement de stratégie en fonction des indices spatiaux environnementaux (Hok et al. 2005, 2007, 2013).

Qu'en est-il du rôle des sous-régions du mPFC dans la consolidation au niveau des systèmes? Lopez et al. (2012) ont montré, à l'aide de l'imagerie de l'expression de la protéine c-Fos, qu'au cours d'un test de rétention dans la piscine de Morris, l'activité

neuronale des cortex IL et PL est comparable à 5 et 25 jours. Ces résultats suggèrent une implication de ces deux sous-régions dans le rappel d'une mémoire spatiale quel que soit son âge. Par contre, dans une tâche de conditionnement de peur ou de discrimination spatiale dans un labyrinthe à 5 branches, les cortex IL et PL ne montrent pas une telle implication en mémoire récente, et sont spécifiquement activés au cours du rappel d'une mémoire ancienne, d'après l'imagerie de l'expression des protéines c-Fos et Zif268 (Frankland et al. 2004 ; Maviel et al. 2004). De même, Wheeler et al. (2013) ont montré, dans un paradigme de conditionnement de peur au contexte, et grâce à l'analyse de l'expression c-Fos à la suite du rappel (récent ou ancien), une implication de l'ACC et du PL dans le rappel d'une mémoire ancienne, mais pas d'une mémoire récente. Ces résultats contradictoires sur l'implication des cortex IL et PL pourraient s'expliquer par la demande spatiale de la tâche : ces régions corticales pourraient jouer un rôle prépondérant dans des tâches nécessitant d'importantes capacités de navigation (tel le test de la piscine de Morris), en accord avec nos résultats (publication 3) et la mise en évidence dans le PL de cellules codant pour l'emplacement des objectifs (Hok et al. 2005, 2007, 2013).

En ce qui concerne le rôle de l'ACC, cette région est généralement associée à la formation et à l'expression d'une mémoire ancienne, mais pas récente (Bontempi et al. 1999 ; Frankland et al. 2004 ; Maviel et al. 2004 ; Teixeira et al. 2006 ; rev. Frankland et Bontempi, 2005). En effet, les résultats obtenus par imagerie des protéines c-Fos et/ou Zif268 et/ou à l'aide d'inactivations fonctionnelles réversibles indiquent un engagement de cette sous-région du mPFC dans le rappel d'une mémoire ancienne dans une tâche de conditionnement de peur (Frankland et al. 2004 ; Maviel et al. 2004) ainsi que dans une tâche spatiale dans la piscine de Morris (Teixeira et al. 2006 ; Lopez et al. 2012), ce qui n'est pas le cas lors du rappel d'une mémoire récente. Ces données pourraient refléter l'engagement progressif de l'ACC au cours de la consolidation systémique. Nos données n'indiquent pas un rôle majeur de l'ACC dans la mémoire récente, puisqu'à la dose de 80 ng de MSCI, malgré le fait que cette sous-région du mPFC soit fortement inactivée (-76 %), les performances comportementales des animaux ne sont pas affectées (publication 3, Figs. 3 et 5). Enfin, dans les expériences ayant abouti à la publication 4 de cette thèse, nous avons montré que la réduction de l'expression de la protéine c-Fos à 25 jours dans le mPFC chez les animaux porteurs d'une lésion des noyaux ReRh est fonction de la sous-région du mPFC : l'activité cellulaire dans le cortex IL ne

semble pas affectée par la lésion ReRh, tandis qu'elle est légèrement amoindrie dans le cortex PL, et fortement réduite dans l'ACC. Ces données sont en accord avec un rôle clé de l'ACC dans la formation et le rappel d'une mémoire ancienne (e.g. Bontempi et al. 1999 ; Maviel et al. 2004 ; Teixeira et al. 2006 ; Lopez et al. 2012), et appuient l'hypothèse d'une hétérogénéité fonctionnelle des sous-régions du mPFC, qui cependant demande à être mieux précisée dans le cadre de la consolidation et du rappel d'une mémoire déclarative.

Ainsi, la participation et le degré d'implication de ces trois sous-régions du mPFC dans le rappel d'un souvenir pourrait dépendre de l'âge de la trace, mais également des exigences de la tâche. Sur la base de nos résultats et de la littérature actuelle, nous pouvons suggérer un rôle distinct des sous-régions du mPFC dans les processus mnésiques : l'IL ferait partie intégrante d'un réseau distribué de structures impliquées dans la régulation des fonctions autonomes/viscéro-motrices et l'intégration des états physiologiques internes ; le PL jouerait un rôle majeur dans la flexibilité comportementale, la navigation orienté vers un but et la mémoire de travail ; enfin, l'ACC serait principalement impliqué dans les apprentissages associatifs ainsi que la formation et l'expression de mémoires anciennes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Cette thèse avait pour objectif l'étude du rôle possible des noyaux ReRh au sein d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique impliqué dans la formation, la consolidation et le rappel d'une mémoire spatiale récente ou ancienne chez le Rat, ainsi que dans la flexibilité comportementale (soit les capacités d'adaptation à des modifications de l'environnement), à l'aide d'approches comportementales et anatomo-fonctionnelles. Grâce aux expériences réalisées au cours de cette thèse, j'ai contribué à démontrer, chez le Rat : i) un rôle des noyaux ReRh du thalamus dans la persistance d'un souvenir spatial qui nécessite de fortes interactions hippocampo-corticales, ii) la capacité de ces noyaux à moduler l'activité neuronale du mPFC au cours d'une tâche de rappel d'une mémoire spatiale ancienne ; iii) un rôle de ces noyaux dans une tâche spatiale nécessitant de faire preuve de flexibilité comportementale, et de ce fait, impliquant de manière conjointe l'Hip et le mPFC ; iv) un rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire spatiale récente, structure dont l'implication dans l'expression d'un souvenir pourrait dépendre des exigences (notamment spatiales) de la tâche, et non uniquement de l'âge de la trace mnésique. L'ensemble de ces travaux a ainsi participé à une meilleure compréhension des interactions fonctionnelles au sein d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique impliqué dans différents aspects des processus permettant la formation d'une mémoire spatiale. Ce travail ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour l'étude du rôle des noyaux non-spécifiques du thalamus, dont l'atteinte chez l'Homme (syndrome de Korsakoff, tumeur, infarctus ou traumatisme...) entraîne non seulement des amnésies dites diencéphaliques, mais aussi d'autres atteintes cognitives, notamment mnésiques.

PERSPECTIVES

1. Confirmer l'implication des noyaux ReRh du thalamus spécifiquement dans la phase de consolidation d'une mémoire spatiale

Les résultats de nos expériences de lésion et d'inactivation (publications 1 et 4) semblent indiquer que le rôle des noyaux ReRh dans la persistance d'une mémoire spatiale se situerait principalement au niveau de l'étape de consolidation systémique (même si l'étude du rôle de ces noyaux dans le rappel d'une mémoire quel que soit son âge mériterait également d'être approfondie). L'hypothèse d'une implication forte des noyaux ReRh au sein d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans la consolidation d'une mémoire au niveau des systèmes pourrait être testée à l'aide d'inactivations (chroniques) post-acquisition des noyaux ReRh. Lesburguères et al. (2011) ont notamment utilisé avec succès cette approche (à l'aide de CNQX, un antagoniste des récepteurs AMPA) pour démontrer la nécessité d'un recrutement cortical précoce post-apprentissage (au niveau du cortex orbito-frontal, OFC) dans la consolidation d'une mémoire olfactive associative. Les auteurs ont divisé le délai entre l'apprentissage et le test de rappel à 30 jours en deux périodes de 12 jours chacune (précoce et tardive), et procédé à des instillations de CNQX quotidiennes dans l'OFC durant l'une ou l'autre de ces périodes. Cette méthode pourrait être employée (avec du CNQX ou du MSCI par exemple) pour évaluer l'implication des noyaux ReRh spécifiquement dans l'étape de consolidation d'une trace mnésique spatiale. Dans le cas d'une mémoire spatiale, la difficulté de l'étude de la phase de consolidation vient notamment du fait que celle-ci débute dès le 1^{er} jour d'apprentissage. Or, dans un protocole classique de mémoire de référence en piscine de Morris, la phase d'acquisition dure jusqu'à 8 jours, durée nécessaire pour assurer la rétention à 25 jours de l'information spatiale. Dès lors, dans nos conditions expérimentales actuelles, la consolidation a très probablement lieu en parallèle de l'acquisition et du rappel, d'un jour sur l'autre durant ces 8 jours, notamment durant le sommeil mais aussi durant les périodes de veille entre deux sessions quotidiennes. Une option envisageable est la mise au point d'un protocole ne nécessitant qu'une seule journée d'acquisition et permettant la rétention à très long terme (mémoire ancienne) d'un apprentissage spatial (idéalement dans la piscine de Morris), ce qui implique la multiplication des sessions et/ou des essais au cours de la journée d'acquisition. Ce type de protocole a déjà été utilisé avec succès mais uniquement dans le cadre de l'étude du rappel

d'une mémoire récente (24 h ; Florian et Roullet, 2004 ; Gulinello et al. 2009 ; Feldman et al. 2010 ; Ferretti et al. 2010). Florian et Roullet (2004) ainsi que Ferretti et al. (2010) ont par exemple utilisé, chez la Souris, 4 sessions avec 3 essais/session et un délai de 15-20 min entre chaque session. Il n'est néanmoins pas certain qu'un protocole de ce type permette au souvenir de persister dans le temps. Une autre approche pourrait consister à inactiver les noyaux ReRh immédiatement après la fin de chaque session quotidienne d'acquisition (peut-être à l'aide d'un protocole plus court mais plus dense, par exemple 8 essais / jour durant 4/5 jours, de manière à limiter le nombre d'instillations). Une dernière alternative consisterait à étudier le rôle des noyaux ReRh sur la consolidation systémique dans un paradigme de conditionnement de peur au contexte (*e.g.* Frankland et al. 2004) ou de transmission sociale d'une préférence alimentaire (*e.g.* Lesburguères et al. 2011), dont l'acquisition offre l'avantage de ne nécessiter qu'une seule session, mais au détriment de la composante spatiale de la tâche. Cependant, l'étude du rôle de ces noyaux dans une autre tâche de mémoire permettrait de généraliser le rôle de ces noyaux thalamiques dans la dynamique des réorganisations hippocampo-corticales nécessaires à la stabilisation / consolidation d'une trace mnésique au niveau cortical.

2. Etudier, au sein du circuit hippocampo-cortico-thalamique, les mécanismes en lien avec la plasticité neuronale intervenant dans la consolidation au niveau des systèmes

Dans la poursuite de ce projet de recherche concernant le rôle des noyaux ReRh dans les processus mnésiques et la cognition spatiale, il serait pertinent d'évaluer les conséquences d'une lésion pré-acquisition, ou d'une inactivation pendant l'acquisition, de ces noyaux sur les mécanismes de plasticité intervenant au niveau de l'Hip et du mPFC en fonction du délai (mémoire récente vs mémoire ancienne). Restivo et al. (2009) ont utilisé un conditionnement de peur chez la Souris, et montré des changements dans le sens d'une augmentation de la densité des épines dendritiques dans l'Hip au délai de 1 jour post-acquisition (mémoire récente) mais pas au délai de 36 jours (mémoire ancienne), et l'inverse dans le mPFC. De plus, ces auteurs ont mis en évidence qu'une lésion du dHip réalisée juste après l'acquisition d'un conditionnement de peur au contexte induit une altération des performances de rappel lors d'un test réalisé à 36 jours, et empêche l'augmentation du nombre des épines dans le mPFC chez des animaux porteurs de la lésion, reflétant un défaut de plasticité synaptique corticale qui accompagne la consolidation au niveau des systèmes.

Lesburguères et al. (2011) ont également montré, dans une tâche de transmission sociale de préférence alimentaire, que la consolidation d'une trace mnésique est accompagnée de modifications structurales des neurones, et notamment de la croissance d'épines dendritiques au niveau de l'OFC (cortex orbito-frontal). L'étude du nombre et de la morphologie des épines dendritiques dans le mPFC et l'Hip à la suite d'une lésion des noyaux ReRh du thalamus s'inscrit ainsi dans la continuité de mon projet scientifique. J'ai eu, au cours ces trois ans de thèse, l'occasion de mettre au point un protocole de marquage Golgi-Cox permettant de révéler l'arborisation dendritique, tout en autorisant le prélèvement d'une partie des coupes de cerveaux pour l'identification de la localisation et de l'étendue des lésions ReRh, mais pas de réaliser l'ensemble des expériences *ad hoc*, qui restent à mettre en œuvre. D'autre part, l'imagerie de marqueurs de la plasticité synaptique et structurale, et notamment de la protéine GAP-43 (protéine présynaptique impliquée dans la potentialisation à long terme) ou encore de la reeline ou de la cofiline (deux protéines impliqués dans la dynamique de la formation/stabilisation des épines dendritiques), pourrait également apporter de précieuses informations quant au rôle des noyaux ReRh dans les réorganisations spatio-temporelles d'une trace mnésique au sein d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique (en particulier dans le décours temporel de la plasticité synaptique et structurale qui accompagne la stabilisation et la persistance à très long terme d'un souvenir). Enfin, l'étude des mécanismes épigénétiques sous-tendant la consolidation au sein de ce circuit hippocampo-cortico-thalamique est également une piste très prometteuse.

ANNEXES :

PUBLICATION 5

PUBLICATION 5

LES NOYAUX REUNIENS ET RHOMBOÏDE : NEUROANATOMIE, CARACTERISTIQUES ELECTROPHYSIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS COMPORTEMENTALES [REVUE]

Cette cinquième publication est une revue ayant pour sujet les noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus. Elle fait état des connaissances actuelles concernant ces noyaux et leur implication dans les processus cognitifs et mnésiques. La première partie de cet article est consacrée aux aspects neuroanatomiques : localisation, organisation, afférences et efférences des noyaux Reuniens et Rhomboïde (ReRh) y sont décrites avec une attention particulière portée aux connexions entre ces noyaux et l'hippocampe (Hip) et le cortex préfrontal médian (mPFC). La seconde partie est dédiée aux aspects électrophysiologiques, et notamment aux études mettant en évidence la modulation de l'activité de l'Hip et du mPFC par les noyaux ReRh. Enfin, la troisième et dernière partie s'intéresse aux études comportementales chez le rongeur montrant l'implication de ces noyaux dans des processus cognitifs et mnésiques (et notamment la mémoire spatiale et la flexibilité comportementale). Cette revue aborde également la question du rôle des noyaux ReRh dans la consolidation systémique, et résume les résultats présentés dans ma thèse (les résultats des publications 1 et 2 y sont notamment présentés et discutés).



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pneurobio

The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications



Jean-Christophe Cassel^{a,*}, Anne Pereira de Vasconcelos^a, Michaël Loureiro^a,
Thibault Cholvin^a, John C. Dalrymple-Alford^b, Robert P. Vertes^c

^aLaboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364, Université de Strasbourg, CNRS, Faculté de Psychologie, Neuropôle de Strasbourg GDR 2905 du CNRS, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France

^bNew Zealand Brain Research Institute, and Department of Psychology, University of Canterbury, Christchurch 8140, New Zealand

^cCenter for Complex Systems and Brain Sciences, Florida Atlantic University, Boca Raton, FL 33431, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2012

Received in revised form 27 August 2013

Accepted 31 August 2013

Available online 8 September 2013

Keywords:

Behavioral flexibility

Hippocampus

Medial prefrontal cortex

Non specific thalamus

Reference memory

Reuniens nucleus

Rhomboid nucleus

Spatial memory

Systems-level consolidation

Ventral midline thalamus

Working memory

ABSTRACT

The reuniens and rhomboid nuclei, located in the ventral midline of the thalamus, have long been regarded as having non-specific effects on the cortex, while other evidence suggests that they influence behavior related to the photoperiod, hunger, stress or anxiety. We summarise the recent anatomical, electrophysiological and behavioral evidence that these nuclei also influence cognitive processes. The first part of this review describes the reciprocal connections of the reuniens and rhomboid nuclei with the medial prefrontal cortex and the hippocampus. The connectivity pattern among these structures is consistent with the idea that these ventral midline nuclei represent a nodal hub to influence prefrontal-hippocampal interactions. The second part describes the effects of a stimulation or blockade of the ventral midline thalamus on cortical and hippocampal electrophysiological activity. The final part summarizes recent literature supporting the emerging view that the reuniens and rhomboid nuclei may contribute to learning, memory consolidation and behavioral flexibility, in addition to general behavior and aspects of metabolism.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	35
2. Neuroanatomical organization of the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei	36
2.1. Generalities	36
2.2. Inputs to the Reuniens and Rhomboid nuclei	37
2.2.1. Reuniens nucleus	37
2.2.2. Rhomboid nucleus	37
2.3. Outputs from the Reuniens and Rhomboid nuclei	37
2.3.1. Reuniens nucleus	37
2.3.2. Rhomboid nucleus	38
2.4. Trajectories of Reuniens and Rhomboid efferents	39
2.4.1. Reuniens nucleus	39

Abbreviations: 5-CSRT, 5-choice serial reaction time; Alv, alveus; CRF, corticotrophin releasing factor; DNMT, delayed nonmatching to place (or to position); EEG, electroencephalogram or electroencephalographic; FG, fluorogold; FR, fluororuby; GABA, gamma aminobutyric acid; IL, infralimbic cortex; Lac-mol, stratum lacunosum-moleculare; LTP, long term potentiation; MdT, midline thalamus; MFB, medial forebrain bundle; mPFC, medial prefrontal cortex; mol, stratum moleculare; NGF, Nerve growth factor; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; Ori, stratum oriens; PHA-L, *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin; PL, prelimbic cortex; pRe, perireuniens nucleus; pyr, stratum pyramidale; rad, stratum radiatum; Re, reuniens nucleus; Rh, rhomboid nucleus; sEPSCs, spontaneous excitatory post-synaptic currents.

* Corresponding author.

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

0301-0082/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.08.006>

2.4.2.	Rhomboid nucleus	39
2.5.	Trajectories of main afferents to Reuniens and Rhomboid nuclei	39
3.	Electrophysiological evidence for modulation of cortical and hippocampal activity by reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei	39
3.1.	Generalities	39
3.2.	Modulation of medial prefrontal cortex activity by reuniens and rhomboid nuclei	39
3.3.	Modulation of hippocampal activity by reuniens and rhomboid nuclei	40
4.	Evidence for the role of the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei in behavior and cognition	41
4.1.	Regulation of physiology, reproduction, feeding, nociception, arousal, stress, and anxiety	42
4.1.1.	Circadian regulation and reproduction	42
4.1.2.	Feeding behavior	42
4.1.3.	Nociception	42
4.1.4.	Arousal, stress, anxiety	42
4.1.5.	Concluding remarks	43
4.2.	Attention and impulsivity	43
4.3.	Passive avoidance memory	43
4.4.	Working memory, including spatial working memory	44
4.5.	Spatial reference memory in the water maze	44
4.6.	Systems-level consolidation	45
4.7.	Strategy shifting and behavioral flexibility	48
5.	Discussion and general conclusions	48
	Acknowledgements	48
	References	49

1. Introduction

According to [Bentivoglio et al. \(1991\)](#), Wernicke was among the first authors to underline a possible relationship between damage adjacent to the third ventricle, including the nuclei of the midline thalamus, and behavioral alterations, including amnesia. Thalamic damage in humans most often occurs as a consequence of infarcts or an alcoholic Korsakoff's syndrome and the associated thiamine deficiency ([Savage et al., 2012](#)). The clinical evidence suggests that many thalamic nuclei may participate in cognition, including executive functions, attention and memory ([Van Der Werf et al., 2000, 2002, 2003a, 2003b](#)). In case of stroke, the symptoms associated with thalamic damage vary with the territory of the disrupted blood supply. Blood flow to the thalamus is supplied by the tuberohalamic, paramedian, inferolateral and posterior choroïdal arteries, two of which supply thalamic regions associated with cognitive functions. The tuberohalamic artery irrigates the rostral thalamus, including the reticular, intralaminar, anterior nuclei and mammillo-thalamic tract. The paramedian artery supplies more caudal regions encompassing the medial dorsal, dorsal intralaminar, posteromedial, ventrolateral, paraventricular and laterodorsal thalamic nuclei ([Schmahmann, 2003](#)). Infarcts of these arteries are often associated with impairments of learning and memory, as well as impaired executive functions ([Amici, 2012; Bentivoglio et al., 1997; Carlesimo et al., 2011; Carrera and Bogousslavsky, 2006; Carrera et al., 2004; Markowitsch, 1982; Mennemeier et al., 1992; Pergola et al., 2012; Schmahmann, 2003; Van Der Werf et al., 2000](#)). The amnesia resulting from thalamic stroke affecting these two arteries, and from the midline diencephalic lesions found in the Korsakoff's syndrome, often bears close resemblance to the amnesic syndrome associated with dysfunction of the temporal lobe, especially of the hippocampus ([Aggleton and Brown, 1999; Aggleton et al., 2011; Van Der Werf et al., 2003a](#)). Evidence from patients with thalamic stroke and other sources of thalamic injury suggests a direct relationship between the extent of damage and symptom severity, with maximal thalamic destruction usually associated with a vegetative state ([Carrera and Bogousslavsky, 2006; Maxwell et al., 2006; Schmahmann, 2003](#)).

Thalamic damage in humans invariably affects more than one nucleus or group of nuclei and may encroach on extrathalamic structures (e.g. [De Witte et al., 2011; Kril and Harper, 2012;](#)

[Markowitsch, 1982; Squire et al., 1989](#)). It is therefore difficult for neuropsychological studies to establish a functional link between different thalamic nuclei and the various cognitive symptoms of thalamic syndromes (but see [Serra et al., 2013](#)). Regional specificity is improved by lesions made in animal models, but even animal studies rarely produce damage that is restricted to individual thalamic nuclei, which are small and often have irregular shapes.

Nonetheless, both human and animal research is approaching a consensus regarding the involvement of several thalamic nuclei in learning and memory. The anterior, midline, intralaminar and mediodorsal nuclei are primary candidates for this association ([Carlesimo et al., 2011; De Witte et al., 2011; Van Der Werf et al., 2003a](#)). In rats, lesions of anterior thalamic nuclei produce deficits on a variety of learning and memory tasks, all of which are also affected by hippocampal lesions ([Aggleton and Brown, 1999; Aggleton et al., 2010; Bailey and Mair, 2005; Gibb et al., 2006; Gold and Squire, 2006; Mair et al., 2003; Mitchell and Dalrymple-Alford, 2005, 2006; Moreau et al., 2013; Savage et al., 2011; Warburton et al., 2001; Wolff et al., 2006, 2008](#)). For example, [Lopez et al. \(2009\)](#) recently demonstrated that fiber-sparing excitotoxic lesions of the intralaminar nuclei in rats influence the consolidation/retrieval of remote (at 25 days), but not recent (at 5 days), spatial memory. As in earlier studies, lesions of the anterior thalamic nuclei but not the rostral intralaminar lesions impaired spatial memory acquisition. However, rostral intralaminar lesions disrupt a preoperatively-acquired egocentric working memory task ([Mitchell and Dalrymple-Alford, 2006; see also Bailey and Mair, 2005; Mair et al., 1998; Newman and Burk, 2005](#)). [Mair and Hembrook \(2008\)](#) showed that the rostral intralaminar thalamic nuclei influence memory retrieval in delayed non-matching and matching to position tasks in rats. For example, continuous stimulation of this region improved or impaired memory functions with low and high frequency of stimulation, respectively (see also [Shrivalkar et al., 2006; Xu and Südhof, 2013](#)).

While the historical focus on diencephalic amnesia has been the anterior nuclei, the mediodorsal nuclei and the rostral intralaminar nuclei, new evidence suggests it is also important to evaluate ventral nuclei of the midline thalamus (MdT). These nuclei include the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei, (hereafter termed Re/Rh) and the perireuniens (adjacent to the Re). The midline thalamic nuclei, together with the intralaminar group, are often described as 'non specific' thalamic nuclei, a designation that is primarily due to

their relatively widespread influence on the cortical mantle (Groenewegen and Berendse, 1994), but also to neuroanatomical characteristics (e.g., Bentivoglio et al., 1991; Groenewegen and Berendse, 1994). According to Bentivoglio et al. (1991), the distinction between ‘specific’ and ‘non specific’ thalamic projections can be traced back to the work of Lorente de No (1938). On Golgi impregnations, Lorente de No identified thalamocortical projections arborizing densely in layer IV of restricted cortical regions, which he differentiated from projections arborizing sparsely in layer I of multiple cortical regions. More recent work, however, indicates that the non specificity of these nuclei might require qualification, as reflected in e.g., the book chapter by Bentivoglio et al. (1991) and the review by Groenewegen and Berendse (1994). Reasons to that, among others, are that “individual midline and intralaminar nuclei each receive specific sets of afferents and project to specific parts of the cerebral cortex and striatum” (Groenewegen and Berendse, 1994, pp. 52).

It is surprising that Re and Rh have received little attention. These nuclei have dense and reciprocal connections with both the prefrontal cortex and the hippocampus. Such connections suggest that they are ideally situated to have a strong bi-directional influence on the flow of information between the hippocampus and the medial prefrontal cortex (mPFC), and thereby orchestrate behavioral functions that engage these two important brain structures (Vertes, 2006; Vertes et al., 2007). Given the involvement of the hippocampus and the mPFC in many cognitive functions, it seems likely that the Re/Rh nuclei have an influence on the cognitive processes associated with each of these two cortical structures, and particularly processes associated with co-operation between hippocampus and prefrontal cortex.

The present review will first focus on the connectivity between subregions of the mPFC, the hippocampus and the Re and Rh. It is acknowledged that other connections, including with other thalamic nuclei (e.g., Lopez et al., 2009) and non-thalamic structures (e.g., septum, amygdala or entorhinal cortex; Hurley et al., 1991; Sesack et al., 1989; Vertes, 2004; Witter et al., 1989) are also significant. The review then summarizes electrophysiological studies showing that strong modulation of cortical and hippocampal activity results from stimulation or blockade of the Re/Rh. The final section explores the small, but growing, literature indicating that the Re/Rh nuclei contribute to cognitive processes such as memory, in addition to previously recorded associations with functions such as reproduction and feeding. Evidence also implicates the Re/Rh in the persistence of newly established memories and behavioral flexibility. We conclude that the cognitive significance of the Re/Rh is that it is strongly associated with dynamic interactions between the mPFC and the hippocampus with respect to the consolidation of enduring memories and behavioral flexibility. By contrast, when cognitive actions are more exclusively associated with the mPFC but not the hippocampus, or with the hippocampus but not the mPFC, they appear largely unaffected by experimental manipulations of the Re/Rh.

2. Neuroanatomical organization of the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei

2.1. Generalities

Midline nuclei cover the entire dorso-ventral extent of the thalamus (Swanson, 2004). According to Groenewegen and Witter (2004; see also Jones, 2007), the rostral midline nuclei consist dorsally of the paraventricular nucleus and the paratenial nucleus, beneath the rostral fornix, and the Rh and Re more ventrally, the latter just above the third ventricle (Fig. 1A). More caudally, the two wing-like extensions of the Rh appear below the level of the most anterior extent of the hippocampus, and these extensions

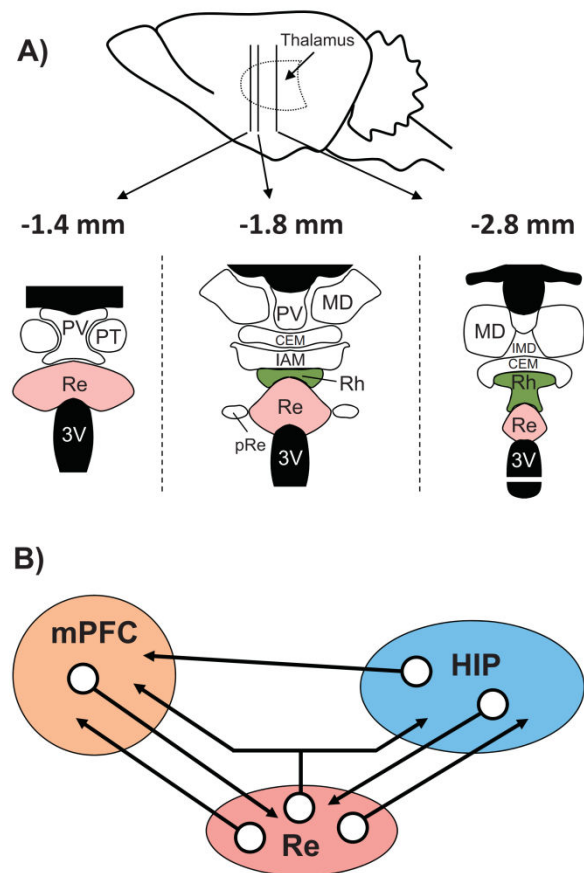


Fig. 1. Neuroanatomical organization of the midline thalamus (A) and connectivity diagram between the prefrontal cortex, the reuniens nucleus and the hippocampus (B). A: Nuclei of the ventral midline thalamus, with particular focus on the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei at 3 anterior-posterior levels (the most caudal is on the left). Abbreviations: CEM, central medial nucleus; IAM, interanteromedial nucleus; IMD, intermediodorsal nucleus; MD, mediodorsal nucleus; pRe, perireuniens nuclei; PT, paratenial nucleus; PV, paraventricular nucleus; Re, reuniens nucleus; Rh, rhomboid nucleus. B: Schematic representation of the organization of the network connectivity within a system formed by the reuniens nucleus (Re), which is the largest of the ventral midline thalamus, the hippocampus (HIP) and the medial prefrontal cortex (mPFC). It is noteworthy that whereas the HIP has pronounced projections to the mPFC, there are no direct return ones from the mPFC to the hippocampus. The Re has dense projections to both the mPFC and the HIP (see also Fig. 2), and a small proportion of neurons of the Re (between 3 and 6%) even send axon collaterals to both structures, as described very recently (Hoover and Vertes, 2012). Finally, the mPFC and the HIP have dense projections to the Re/Rh. This organization places the Re, and perhaps more generally the ventral midline thalamus (which also encompasses the rhomboid and perireuniens nuclei), in a pivotal position to influence prefrontal cortical and hippocampal functions, and perhaps even in a more specific way functions which depend on information exchange between or coordination of these two structures.

then merge on the midline more posteriorly. More caudally again, just above the Rh, resides the last of the midline nuclei, the intermediodorsal nucleus. It is separated from the Rh by the central medial nucleus of the intralaminar thalamus, which, in a coronal view, sits like a roof to the Re/Rh (Vertes et al., 2012).

The Re/Rh nuclei are thought to use excitatory amino acids as the primary neurotransmitter. Bokor et al. (2002) injected retrograde tracer (tritiated D-aspartate) into stratum lacunosum moleculare of hippocampal region CA1 and found that most Re neurons projecting to the hippocampus (and septum) were aspartatergic/glutamatergic. Calcium-binding protein-positive cells – namely, calretinin- and calbindin-positive – have been found in varying degrees in the ventral midline nuclei, but

parvalbumin-positive neurons are absent (Arai et al., 1994). Parvalbumin-positive fibers, however, have been identified in virtually all midline nuclei, but generally at a very low density; these are projections from other brain regions. There is a much higher concentration of calretinin- and calbindin-positive cell bodies in the Re compared to Rh, and evidence that calretinin fibers arising from Re project to the subiculum has been provided (Drexel et al., 2011). Interestingly, numerous cells in Re stain for both calretinin and calbindin (Arai et al., 1994), a characteristic of the thalamus in general (e.g., Winsky et al., 1992), but this feature is absent from Rh (Séquier et al., 1990). In fact, two classes of thalamic relay cells can be distinguished based on differential staining for calbindin and parvalbumin; the former (calbindin-positive) form a matrix with terminals in superficial cortical layers, the latter (parvalbumin-positive) are localized to specific thalamic nuclei and form a core that projects to middle cortical layers (for review, Jones, 1998, 2001, 2002, 2009). Calbindin-positive matrix cells receive subcortical input from less-defined pathways and project more widely and diffusely over the cortex, compared with parvalbumin-positive cells which are innervated by major subcortical sensory and motor pathways and project with a high degree of topographic order onto a single cortical area (Jones, 2009). Thus, interactions of core and matrix cells with corticothalamic projections promote widespread synchrony in the thalamo-corticothalamic network that may play a key role in perception and cognition (Jones, 2009; Llinas et al., 1998, 2002; Llinas and Paré, 1997).

A comprehensive analysis of the afferent and efferent connections of the Re and Rh nuclei requires a dedicated review article and is therefore beyond the scope of the present contribution. Similarly, the neuroanatomical organization of ventral midline thalamus nuclei in general, and their efferent and afferent projections in particular, are not described here. Such information is available in the reviews by Groenewegen and Witter (2004), Berendse and Groenewegen (1991) and Van Der Werf et al. (2002), as well as the studies of Vertes and colleagues (Hoover and Vertes, 2012; Vertes, 2002; Vertes et al., 2006, 2010) or others (e.g., Cavdar et al., 2008). However, to illustrate how the Re and Rh connect with an extremely broad set of brain structures, the main inputs and outputs of these two nuclei are briefly described with a focus on the mPFC and the hippocampal formation. A unique feature of this tripartite network of connections as illustrated in Fig. 1B is the fact that there are reciprocal connections between Re/Rh and both the mPFC and the hippocampus, plus direct projections from the hippocampus to the mPFC, via CA1 and the subiculum but no reverse direct mPFC projections to the hippocampus (Barbas and Blatt, 1995; Ferrino et al., 1987; Hoover and Vertes, 2007; Swanson, 1981; Thierry et al., 2000; Vertes, 2004). Thus, any influence of the mPFC on the hippocampus must be mediated indirectly by other structures. The anatomical properties of the Re and Rh render them potentially significant in this neural network. As stated by Vertes et al. (2006), “Re is uniquely positioned to influence simultaneously major structures of the brain (hippocampus and mPFC) subserving memory” (pp. 793), and this may also be true for the Rh (see Section 4). Obviously, the influence of the mPFC on the hippocampus is likely also to be mediated by many polysynaptic routes such as those involving the septal region, the amygdala or parts of the entorhinal cortex (e.g., Hurley et al., 1991; Sesack et al., 1989; Vertes, 2004; Witter et al., 1989). These alternatives are not considered in the current review.

2.2. Inputs to the Reuniens and Rhomboid nuclei

2.2.1. Reuniens nucleus

The Re is a convergence zone of fibers originating from many telencephalic, diencephalic and brainstem structures. The first detailed description of afferent fibers to Re was published by

Herkenham (1978). Neurons of the medial agranular, anterior cingulate, infralimbic (IL) and prelimbic (PL) cortices provide a dense innervation of Re (Deschênes et al., 1998; Herkenham, 1978, 1980, 1986; Hurley et al., 1991; McKenna and Vertes, 2004; Vertes, 2002; Witter et al., 1990). Other sources of cortical afferents are the medial orbital, insular, ecto-rhinal, perirhinal and retrosplenial cortices, as well as the subiculum and Ammon's horn of the hippocampus, but not the dentate gyrus (McKenna and Vertes, 2004; Witter et al., 1990; Wouterlood et al., 1990). Inputs also originate from the medial and anterior nuclei of the amygdala (Herkenham, 1978), the horizontal limb of the diagonal band of Broca, and the lateral septum and adjacent regions of the basal forebrain (McKenna and Vertes, 2004). Diencephalic projections to the Re also include the reticular nucleus of thalamus, the lateral geniculate nucleus, the zona incerta, the medial and lateral preoptic area, the medial and lateral hypothalamus and the premammillary and supramammillary nuclei. From the brainstem, Re receives input from the ventral tegmental area, the reticular formation, the laterodorsal tegmental nucleus, the superior colliculus, the periaqueductal gray, the rostral raphé nuclei, the locus coeruleus and the parabrachial nucleus (Krout et al., 2002; Vertes et al., 2010). Some fibers also originate from the cuneate nucleus. For a more detailed description see Table 1 in McKenna and Vertes (2004).

2.2.2. Rhomboid nucleus

Less is known about Rh afferents (Groenewegen and Witter, 2004). The brainstem is a major source of input to Rh, particularly serotonergic afferents from the raphé nuclei (Vertes et al., 2010). Other significant sources of projections are from the reticular formation, the lateral dorsal tegmental nucleus, the substantia nigra, the supramammillary nucleus (Vertes et al., 2010), and the locus coeruleus (Rassnick et al., 1998). The medial and ventral lateral parabrachial nuclei also project to Rh (Krout and Loewy, 2000). In addition, Rh receives cortical afferents arising from the infralimbic, prelimbic, anterior cingulate and medial agranular cortices (Vertes, 2002), as well as from primary and secondary motor cortices and the primary somatosensory cortex (Vertes, 2004). Some fibers innervating Rh are CRF-like (corticotrophin releasing factor) (Merchenthaler et al., 1984), others are reactive to a substance P antibody (Battaglia et al., 1992).

2.3. Outputs from the Reuniens and Rhomboid nuclei

2.3.1. Reuniens nucleus

The outputs of Re were also first described by Herkenham (1978). Since then, several studies by Groenewegen and colleagues and others have examined the efferent projections of Re (Baisden and Hoover, 1979; Berendse and Groenewegen, 1990, 1991; Conde et al., 1990; Groenewegen and Berendse, 1994; Hoover and Vertes, 2007; Ohtake and Yamada, 1989; Varela et al., 2013; Van Der Werf et al., 2002; Wouterlood et al., 1990; Wouterlood, 1991). Vertes et al. (2006) used the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) to extend these earlier studies by examining overall projection patterns of both the Re and Rh nuclei instead of concentrating on hippocampal or cortical connectivity or on only the Re, as was done in earlier studies. Following an injection centered on Re, a dense terminal distribution of PHA-L-labeled fibers was found in the rostral forebrain, with the heaviest labeling in the anterior piriform, medial frontal polar, medial orbital, ventral and ventrolateral orbital cortices, the dorsal tenia tecta and the claustrum. Labeling was dense in the mPFC, particularly throughout the PL and IL (heaviest in layers I, V and VI, see Fig. 2), and weaker in the anterior cingulate cortex and medial granular cortex. Labeling was also present in the stratum lacunosum-moleculare (Lac-mol) of the CA1 region throughout the

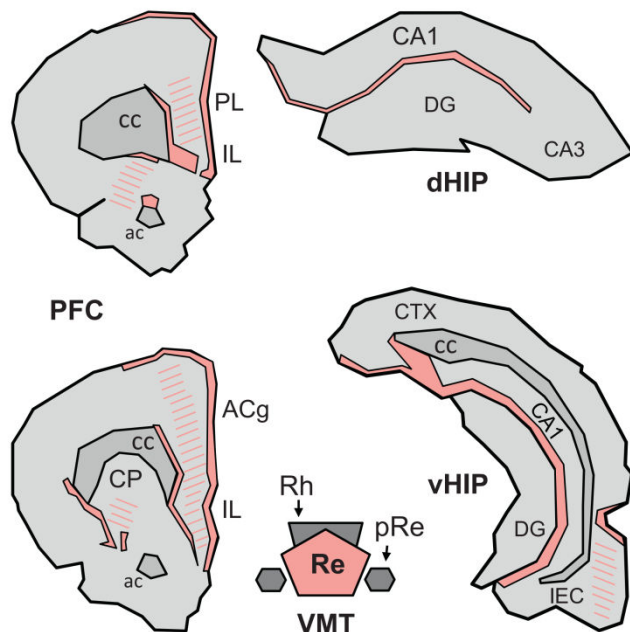


Fig. 2. Terminal projection fields of the reuniens nucleus in the prefrontal cortex and the hippocampus of the Rat. Illustration of the location and extent of the regions of densest (filled) and weaker (hatched) fiber staining at two A-P levels of the medial prefrontal cortex (mPFC) and in the dorsal and ventral hippocampus (dHIP and vHIP, respectively) produced by an injection of the anterograde anatomical tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin into the Re. The drawings were made according to the darkfield microphotographs (Figs. 5 and 6) and the schematic representations (Fig. 3) shown in Vertes et al. (2006). Abbreviations: ac, anterior commissure; ACg, anterior cingulate cortex; cc, corpus callosum; CP, caudate putamen; DG, dentate gyrus; IL, infralimbic cortex; IEC, lateral entorhinal cortex; pRe, perireuniens nucleus; PL, prelimbic cortex; Re, reuniens nucleus; Rh, rhomboid nucleus.

dorso-ventral extent of the hippocampus. There was no labeling in subregions CA2 and CA3 of Ammon's horn, or in the dentate gyrus. There was also an abundance of fibers in the subiculum, pre- and parasubiculum, confined to the molecular layer (mol), as well as in the entorhinal, perirhinal and lateral entorhinal cortices. Re fibers innervating the hippocampus were most probably those that gave rise to retrogradely labeled neurons in Re following NGF injections in the hippocampus (Venero et al., 1995). In a more recent study, Hoover and Vertes (2012) mapped Re connections using two retrograde tracers to double label Re/Rh neurons. Fluorogold (FG) was infused in the IL and PL subregions of the mPFC, while Fluororuby (FR) was deposited into the dorsal hippocampus, various sites of the ventral hippocampus (CA1 region) or into the ventral subiculum. A parallel approach has been published more recently by Varela et al. (2013) who used cholera toxin B conjugated to different fluorophores to trace connections. The toxin was injected into the medial prefrontal cortex (PL or IL regions) and the dorsal or ventral hippocampus. In another recent article, Xu and Südhof (2013) used adeno-associated viral transfection techniques to trace synaptic Re connections, although not with the aim of examining collateral Re projections to the mPFC and the hippocampus.

Hoover and Vertes (2012) found that the greatest number of labeled neurons (range 193–438) were located at mid-levels of the Re, where the nucleus shows its largest mediolateral and dorsoventral expansion. *Second*, at the anterior Re, there were more neurons labeled with FR than with FG (about 60% from hippocampus vs. 40% from mPFC), but the opposite pattern was observed at the caudal Re (FG > FR). *Third*, the number of labeled neurons was about ten times more abundant following injections

into the ventral compared to the dorsal CA1 of the hippocampus, indicating much stronger Re projections to the ventral than to the dorsal hippocampus. Following injections of the tracer into the ventral subiculum, the number of labeled neurons was yet greater than that seen following injections into the ventral hippocampus, demonstrating stronger Re projections to the ventral subiculum than to CA1 of the ventral hippocampus. *Fourth*, and importantly, when one tracer was infused into the mPFC and the other one into the ventral hippocampus or subiculum, between 3 and 6% Re neurons were double labeled. With the cholera toxin B conjugates injected into the same regions as in the Hoover and Vertes (2012) study, Varela et al. (2013) reported that approximately 8% of cells of Re were double-labeled and thus had collaterals to the mPFC and the hippocampus. In these two studies, the proportion of double-labeled cells was much higher than shown in previous studies, which did examine connections of Re neurons with other regions than the mPFC. Xu and Südhof (2013) injected their marker directly into the Re and also found monosynaptic connections in both the mPFC and hippocampus (beside several other structures); these authors, however, could not distinguish what proportion was from different or same neurons.

Su and Bentivoglio (1990) described only a very small proportion of Re neurons with collateral projections, but the targets analyzed in this study were the hippocampus, amygdala and the nucleus accumbens. A report by Dolleman-van der Weel and Witter (1996) showed that Re projections to the entorhinal cortex, subiculum and hippocampus arose from neuroanatomically distinct populations of cells: neurons of the dorsolateral Re projected to CA1, those of the medial Re to the medial entorhinal cortex, those from the ventral Re to the lateral entorhinal cortex, those from the lateral Re to the subiculum, and finally cells from the perireuniens (pRe) (or lateral wings of Re) to the perirhinal cortex. Vertes et al. (2006) described a rostro-caudal neuroanatomical organization of the origin of cortical projections of Re, such that the innervation of the medial entorhinal cortex mainly originated from the rostral Re, that of the lateral entorhinal cortex from the caudal Re, and that of the perirhinal cortex primarily from the pRe. Bokor et al. (2002) also described a topographical segregation of Re projections to the hippocampus and to the medial septum. In the hippocampus, neurons arising from Re formed exclusively asymmetrical (and thus excitatory) synapses on spines or dendrites of CA1 pyramidal cells. Dolleman-Van der Weel and Witter (2000) demonstrated that Re neurons also project onto GABAergic cells (inhibitory interneurons) in CA1 of the hippocampus. This suggests that Re not only exerts excitatory influences on CA1 neurons, but can also inhibit them via excitation of inhibitory interneurons. Finally, Otake and Nakamura (1998), using two fluorescent retrograde tracers injected into the nucleus accumbens and the medial and lateral prefrontal cortex, identified double-labeled neurons in Re (and Rh), thus indicating that Re/Rh cells project to both regions via axon collaterals. For further delineation of other terminal fields of Re neurons, see Table 1 in Vertes et al. (2006).

2.3.2. Rhomboid nucleus

Considerably fewer reports have examined the efferent projections of Rh compared to Re (Berendse and Groenewegen, 1991; Ohtake and Yamada, 1989; Van Der Werf et al., 2002; Vertes et al., 2006). After an injection of PHA-L into the Rh, Vertes et al. (2006) found a dense terminal distribution of labeled fibers in medial and ventrolateral regions of the prefrontal and frontal cortices, as well as in the dorsal and ventral striatum, mainly concentrated within the rostral-ventral and caudal-ventromedial striatum. In the prefrontal cortex, labeling was heaviest in inner layers of the frontal polar, prelimbic, medial orbital and the anterior cingulate cortices. Fibers were also present in other regions of the prefrontal cortex, weaker but still evident caudally in

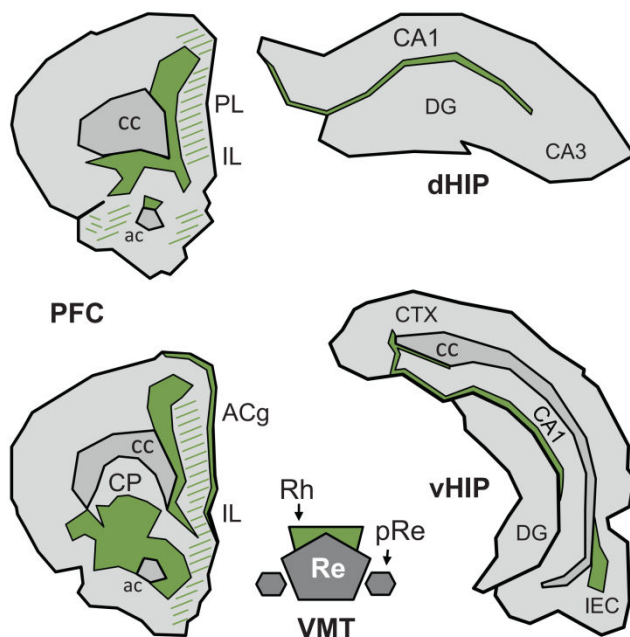


Fig. 3. Terminal projection fields of the rhomboid nucleus in the prefrontal cortex and the hippocampus of the Rat. Illustration of the location and extent of the regions of densest (filled) and of weaker (hatched) fiber staining at two A-P levels of the medial prefrontal cortex (mPFC) and in the dorsal and ventral hippocampus (dHIP and vHIP, respectively) produced by an injection of the anterograde anatomical tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin into the Rh. The drawings were made according to the darkfield microphotographs (Figs. 9–12) and the schematic representations (Fig. 9) shown in Vertes et al. (2006). Abbreviations: ac, anterior commissure; ACg, anterior cingulate cortex; cc, corpus callosum; CP, caudate putamen; DG, dentate gyrus; IL, infralimbic cortex; IEC, lateral entorhinal cortex; pRe, perireuniens nucleus; PL, prelimbic cortex; Re, reuniens nucleus; Rh, rhomboid nucleus.

the anterior cingulate, medial agranular, prelimbic and infralimbic cortices (see Fig. 3 for a schematic illustration). At the level of the septum, labeling was most dense laterally and was mainly confined to regions bordering the anterior commissure including the core of nucleus accumbens. Dorsomedial and ventrolateral regions of the cortex (anterior cingulate and granular insular) were also labeled, as was the rostral portion of the lateral septum. Further posterior, at the level of the dorsal hippocampus, a dense although narrow band of fibers was present in the Lac-mol of CA1. Towards the midline, this band extended in the dorsal subiculum, but at more caudal levels of the hippocampus, labeling remained confined to the dorsal half of the hippocampus and never extended ventrally as was the case for Re. There were also labeled fibers in several cortical regions including the retrosplenial, occipital, entorhinal and perirhinal cortices. For further description of other terminal fields of Rh fibers, many of which overlap with those of Re (Fig. 4), see Table 1 in Vertes et al. (2006).

2.4. Trajectories of Reuniens and Rhomboid efferents

2.4.1. Reuniens nucleus

Efferent Re fibers primarily course ventrolaterally traversing the ventromedial nucleus of thalamus, the zona incerta and the dorsolateral hypothalamus to reach the medial forebrain bundle (MFB) (Berendse and Groenewegen, 1991; Van Der Werf et al., 2002; Varela et al., 2013; Vertes et al., 2006; Wouterlood et al., 1990). The bulk of Re fibers ascends through the lateral hypothalamus/MFB to the basal forebrain where it joins the internal capsule and continues forward, in discrete fascicles, through ventromedial regions of the striatum to the rostral

forebrain. At the anterior forebrain, Re fibers either distribute terminally to parts of the frontal cortex or turn caudally and pass through the cingulum bundle to the hippocampus or through layer I of frontal cortex to caudal regions of the cortex. A second prominent bundle of Re fibers exits laterally from the lateral hypothalamus *en route* to the amygdala and to ventrolateral regions of cortex bordering the rhinal fissure. Some fibers of this tract continue caudally to innervate parts of the subiculum of the hippocampus. The smallest of the three bundles descends through the lateral hypothalamus/MFB to caudal regions of the diencephalon and to the rostral midbrain (Berendse and Groenewegen, 1991; Van Der Werf et al., 2002; Varela et al., 2013; Vertes et al., 2006; Wouterlood et al., 1990).

2.4.2. Rhomboid nucleus

Similar to Re, the bulk of Rh fibers courses ventrolaterally from Rh and splits into two main bundles (Berendse and Groenewegen, 1991; Ohtake and Yamada, 1989; Van Der Werf et al., 2002; Vertes et al., 2006). One ascends to the rostral forebrain in the general region of the MFB, and the other courses laterally to parts of the amygdala and to parahippocampal cortices. At the caudal septum, some Rh axons of the ascending bundle continue forward to distribute to parts of the basal forebrain; the majority, however, turn dorsolaterally into the striatum to join the internal capsule and course dorsomedially through the striatum to the anterior forebrain. At the rostral forebrain, fibers of this bundle either distribute terminally to regions of the frontal cortex or travel caudally within the cingulum bundle to the hippocampus or laterally through the frontal cortex to posterior regions of cortex. Fibers of the secondary bundle exit laterally from Rh and primarily target the amygdala, parahippocampal cortices and the ventral subiculum (Berendse and Groenewegen, 1991; Ohtake and Yamada, 1989; Van Der Werf et al., 2002; Vertes et al., 2006).

2.5. Trajectories of main afferents to Reuniens and Rhomboid nuclei

Subcortical afferents to Re/Rh arising from the brainstem and hypothalamus mainly ascend via the medial forebrain bundle and at the level of the thalamus take a ventrolateral to dorsomedial course to Re/Rh, whereas those originating from the cortex descend through the internal capsule and primarily reach Re/Rh through the anterior thalamic peduncle.

3. Electrophysiological evidence for modulation of cortical and hippocampal activity by reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei

3.1. Generalities

Given the connections between the Re/Rh and both the mPFC and the hippocampus, it is reasonable to expect the Re/Rh to exert a significant influence on cortical and hippocampal functions. This may also be true of other structures to which the Re/Rh project such as the striatum or amygdala. Conversely, changes in cortical and hippocampal activity should impact the functioning of the Re and Rh. Surprisingly only a few studies have described the effects of Re or Rh electrophysiological stimulation or blockade on activity of the hippocampus or the mPFC. To our knowledge, there are no reports that examined the responses of the Re or Rh to hippocampal or cortical stimulation.

3.2. Modulation of medial prefrontal cortex activity by reuniens and rhomboid nuclei

The first evidence supporting an influence of midline thalamic nuclei on the activity of cortical regions was reported just over 70

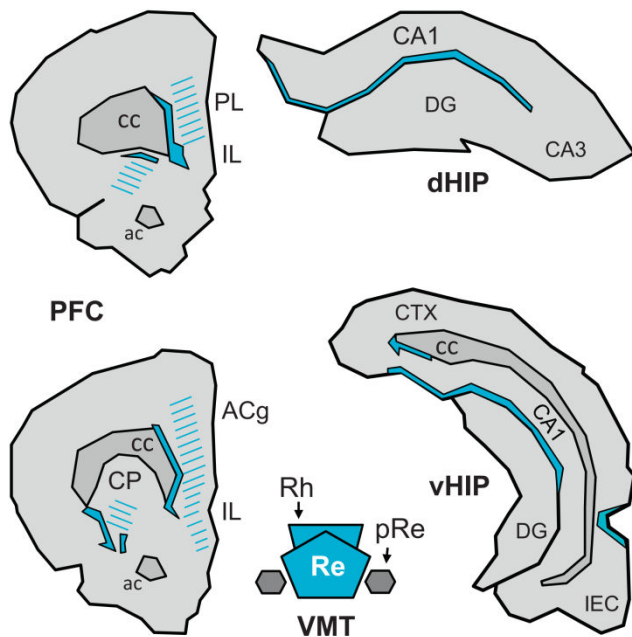


Fig. 4. Regions in which the terminal projection fields of the reuniens nucleus and the rhomboid nucleus show a clear-cut overlapping. The filled regions delimited by continuous lines correspond to the areas in which densest staining after PHA-L injections into the Re overlaps with densest staining after injection of the same tracer into the Rh. The hatched areas correspond to the region where a weaker but nonetheless clear-cut density of projections from one nucleus overlaps with a strong or a weaker density of projections from the other nucleus. This figure has been drawn from Figs. 2 and 3 of the current article.

years ago (Dempsey and Morison, 1942; Morison and Dempsey, 1942). Morison and Dempsey found that repetitive stimulation of the MdT in cats induced recruiting responses in non-primary cortical sites, with an attenuated response also found in primary cortical areas. When the MdT is stimulated, the cortical response consists in a surface-positive wave followed by a larger surface-negative wave. When the stimulation is repeated several times, the amplitude of the response increases and a maximum is reached after 3–5 stimulations. This progressive increase of the response amplitude is due to the recruitment of thalamic neurons, as shown by Arduini and Terzuolo (1951). This recruiting response could be elicited from a relatively large region of the thalamus of which the Re and Rh nuclei were only one component (e.g., in addition to the intralaminar nuclei, ventromedial and ventral anterior nuclei, and the thalamic reticular nucleus). More recently, Viana Di Prisco and Vertes (2006) lowered stimulating electrodes along the dorsoventral axis of the MdT. At the same time, recording electrodes placed in the mPFC enabled the collection of field potentials in the medial agranular, anterior cingulate, PL and IL cortices. The stimulation of the interoanterior thalamic nucleus failed to produce any significant change in the cortex, leading the authors to describe this region as a “null zone”. Stimulation of the paraventricular, the most dorsal aspect of the MdT, and the Re nuclei induced large amplitude evoked potentials in the PL. In the ventral mPFC (i.e., IL, PL), these waves showed an initial small positive deflection (P1; +0.1 mV), followed by a large negative one (N2; –0.85 mV) and a later large positive one (P2; +0.68 mV). Respective latencies were approximately 5, 22 and 70 ms. The N2 deflection corresponds to excitatory evoked potentials at monosynaptic latencies, compatible with a direct projection from Re to the mPFC. The authors also found a paired-pulse facilitation, with the largest changes in the IL (+83%) and PL (+75%) cortices, and non significant changes in the

anterior cingulate cortex (+22%). The changes at PL and IL were comparable to those observed in the dorsal hippocampus (+62%) using the same stimulation parameters. More recently, Eleore et al. (2011) also reported that paired-pulse stimulation of Re in mice resulted in facilitation of the second relative to the first response in the mPFC, again showing that activation of Re may modulate mPFC activity. There is good evidence, therefore, that the neuroanatomical connections of the Re and Rh with the mPFC shown in Fig. 1 convey excitatory influences.

3.3. Modulation of hippocampal activity by reuniens and rhomboid nuclei

The contribution of Re to hippocampal function has been more frequently examined. Vanderwolf et al. (1985) reported that radiofrequency lesions of the medial thalamus which encompassed the Re/Rh (see Fig. 8D, pp. 68) produced little or no influence on hippocampal atropine-resistant theta. Hirayasu and Wada (1992a,b) reported that massive activation of the Re by infusions of the glutamate receptor agonist N-methyl-D-aspartate (NMDA) induced EEG discharge patterns characteristic of generalized limbic seizures. Hippocampal kindling was also observed later (see also Miller and Ferrendelli, 1990; Miller et al., 1989; Patel et al., 1988). Further support that the activity of the midline thalamus, including the mediodorsal, paraventricular and Re nuclei, has lasting functional consequences in the hippocampus is provided by evidence that selective pharmacological blockade of thalamic midline nuclei suppresses limbic seizure activity in a model of CA3 kindling (Bertram et al., 2001). Interestingly, in this CA3 kindling model, Bertram et al. (2001) reported on significant neuronal loss in the Re/Rh, to which they had no functional explanation to propose. None of these studies, however, explicitly showed a direct influence of the Re/Rh on hippocampal activity.

Dolleman-van der Weel et al. (1997) examined the effects of Re stimulation on unit and field potential activity in the CA1 region of the hippocampus. Using urethane anesthetized rats, they found positive deflections between the alveus and stratum radiatum (rad) and negative deflections in the Lac-mol. These changes were never observed when electrodes were inadvertently advanced too ventrally into the dentate gyrus, consistent with the absence of Re projections to the dentate gyrus. For negative deflections, monosynaptic latencies were found after stimulation of the rostral Re, whereas the disynaptic latencies were observed following stimulation of a more caudal region of Re, with complex responses when the stimulation was applied in both Re localities. These observations led the authors to suggest that the caudal Re projects to the rostral Re, where these projections establish synapses with neurons that directly target the hippocampus. This hypothesis was confirmed following injections of the anterograde tracer biotin dextran amine into the caudal Re. Based on their electrophysiological/anatomical findings, Dolleman-van der Weel et al. (1997) proposed an anatomical-functional model (see Fig. 5) in which Re neurons monosynaptically (when rostral) or disynaptically (when caudal) have an excitatory influence on pyramidal neurons of CA1 via synapses on apical dendrites at Lac-mol. Other Re afferents to CA1 might synapse on dendrites of inhibitory interneurons and then extend branches from stratum rad to stratum Lac-mol to exert an excitatory influence, which together would result in dual inhibitory/excitatory actions on CA1 pyramidal cells. A final population of hippocampal interneurons influenced by the Re was located in the alveus and stratum oriens (ori) which, when activated, exerted feed forward inhibition on pyramidal cells. Via the subiculum, pyramidal neurons project back to the Re, thereby closing a functional loop. Theoretically, in this loop Re activity may (i) modulate CA1 activity and/or (ii) be modulated by information from the hippocampus.

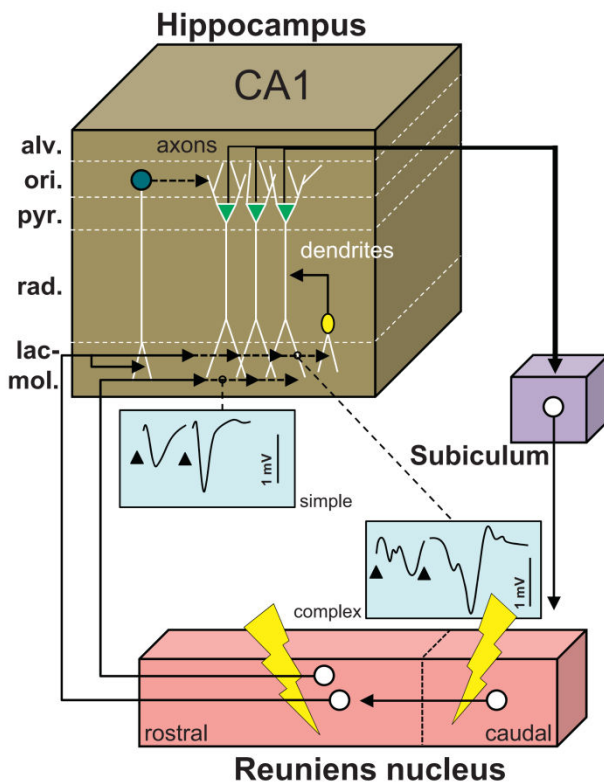


Fig. 5. Functional scheme of the connectivity between the reuniens nucleus and the hippocampus. Drawing providing a summary of the main findings reported by Dolleman-van der Weel et al. (1997) and hence derived connectivity loop which they proposed. Neurons from the caudal region of the Re project to the rostral Re, from where neurons establish monosynaptic contacts with the dendrites of pyramidal CA1 cells in the stratum lacunosum-moleculare, of interneurons with their soma in the stratum radiatum, and of interneurons with their soma in the stratum oriens. Most contacts in this model are excitatory, except the contacts of the interneurons of the stratum oriens which mediate feedforward inhibition on CA1 pyramidal neurons. The axons of the latter, which course in the alveus, project back to the Re via the subiculum. A stimulation of the Re using a paired stimulation protocol will produce facilitation and exhibit two types of evoked activity profiles in the stratum lacunosum-moleculare depicted as simple (one negative deflection/stimulation) and complex (2 deflections/stimulation). The complex profiles are obtained with caudal stimulation of Re and most probably correspond to the disynaptic EPSPs. This figure has been drawn after Fig. 6 in Dolleman-van der Weel et al. (1997). Abbreviations: alv.: alveus; lac-mol.: stratum lacunosum-moleculare; ori.: stratum oriens; pyr.: stratum pyramidale; rad.: stratum radiatum.

The comparative effects of electrophysiological stimulation of the Re and CA3 on CA1 activity was examined by Bertram and Zhang (1999). Interestingly, Re or CA3 stimulation had excitatory effects of similar amplitude on CA1 neurons, but with different time courses. Response latencies were shorter after Re than after CA3 stimulation, and short-interval paired stimulations resulted in facilitation when applied to Re, but only a non-significant increase when delivered to CA3, suggesting differences in the immediate plasticity of the respective synapses. Furthermore, high frequency stimulation of the Re, but not CA3, induced LTP in CA1. These findings show that Re and CA3 exert independent effects on CA1 neurons, suggesting a topographical segregation of respective inputs to specific synaptic targets. Bertram and Zhang (1999) did not find inhibitory actions of Re stimulation on CA1 neurons, a finding which is at variance with the report by Dolleman-van der Weel et al. (1997). This discrepancy, however, may reflect differences in the extent of Re region stimulation. The functional observations by Dolleman-van der Weel et al. (1997) show that the neuroanatomical connections of the Re and Rh with the hippocampus, as illustrated in Fig. 1, might provide a major

influence on hippocampal CA1 neurons. The specificity of these interactions is supported by evidence that Re stimulation elicited evoked shorter-latency potentials at CA1 during theta activity (elicited by tail pinch or occurring spontaneously) compared to non-theta states, and that Re neurons showed a marked increase in rate of discharge before or after theta periods as opposed to non-theta periods (Morales et al., 2007). Interestingly, stimulation of the midline thalamus (which would include the mediodorsal thalamic nuclei to the Re in the dorsoventral axis) also results in excitatory actions on the amygdala (Zhang and Bertram, 2002)—an indirect way for information to reach the hippocampus. Although the authors found effects of most of their stimulations in the entorhinal cortex, Fig. 4 of their study (pp. 3281) suggests no incidence of Re stimulation in this cortex.

An interesting observation linking the Re and the hippocampus concerns the pathophysiology of schizophrenia. Lisman and colleagues proposed that Re could be a point of initiation of a functional loop in which excitation of the hippocampus leads to the activation of dopaminergic cells of the ventral tegmental area and consequently to the excitation of thalamocortical systems (Lisman et al., 2010; Zhang et al., 2012). They proposed that this loop produces the positive feedback that results in the psychotic episodes in schizophrenia. In support of this hypothesis, Zhang et al. (2012) recently demonstrated that the systemic administration of the NMDA receptor (NMDAR) antagonist ketamine in rats (50 mg/kg) gave rise to increased firing of neurons in Re and in CA1 of the hippocampus. Furthermore, delta oscillations in the Re are accompanied by activation of region CA1 of the hippocampus, a region showing an altered activity pattern in prodromal patients and an increased activity in schizophrenic patients (Schobel et al., 2009; see also Lisman, 2012). Interestingly, the increase in delta power in the hippocampus was also found using intra-Re infusions of ketamine in awake rats, and this effect was blocked by the infusion of muscimol into the Re. These results show that NMDAR antagonism elevates the firing of Re neurons which in turn excites CA1. These effects were not observed when a lower dose of ketamine was used (20 mg/kg), but there was an increase in hippocampal gamma power. The link between these data and schizophrenia is that a variety of typical or atypical antipsychotic agents enhance the expression of Fos-like protein in midline thalamic nuclei, including Re and Rh (Cohen et al., 1998; see also Vaisanen et al., 2004).

The electrophysiological data regarding the functional interactions between the Re/Rh, the mPFC and the hippocampus are still relatively sparse. Only a few studies have directly investigated the effects of Re/Rh stimulation on neuronal activity in the mPFC or the hippocampus. While the functional characteristics of the nodal model presented in Fig. 1 remains tentative, they are in line with existing electrophysiological and neuroanatomical evidence and clearly suggest fruitful lines for future research. Such research should also include approaches focusing on the functional consequences of mPFC or/and hippocampal stimulations in the Re/Rh, a *terra incognita* for now.

4. Evidence for the role of the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei in behavior and cognition

The third part of this review focuses on the influence of the Re/Rh nuclei on behavior in general, and cognition in particular, with a focus on memory and behavioral flexibility. The earlier review by Van Der Werf et al. (2002) reported that there was no evidence of human cases with injuries confined to the Re/Rh, and we are not aware of any new cases. Alzheimer's disease, in which progressively severe memory loss is the functional hallmark, produces numerous neurofibrillary tangles, neuropil threads, and degeneration in the Re (Braak and Braak, 1991, 1998). By itself, this

interesting observation does not necessarily imply a link between the Re nucleus and memory function. The experimental evidence summarized in the following sections is beginning to corroborate the neuroanatomical and electrophysiological evidence for a role of Re/Rh in mPFC- and hippocampus-dependent cognition. Before addressing memory and cognition, we first summarise studies that suggest an influence of these nuclei in the regulation of basic physiology and behavior such as reproduction, feeding, nociception, arousal, stress and anxiety.

4.1. Regulation of physiology, reproduction, feeding, nociception, arousal, stress, and anxiety

4.1.1. Circadian regulation and reproduction

Studies with siberian hamsters suggest a role of the Re in the encoding and retrieval of day length and a contribution to the long day-induced termination of the reproductive photorefractoriness (Freeman and Zucker, 2001; Teubner and Freeman, 2007; Teubner et al., 2008). These observations have made the Re a target for melatonin experiments. Infusions of melatonin directly into the Re induced an 80% reduction of the testicular weight (Badura and Goldman, 1992). The Re and the Rh are also among the brain regions showing a circadian fluctuation of opiate receptors (Giardino et al., 1989). A related finding is that direct retinal projections to all midline (dorsal + ventral) nuclei and to intralaminar thalamic nuclei have been described in the marmoset (Cavalcante et al., 2005), and few such projections are found in the mediodorsal nuclei (De Sousa et al., 2013). If the same is true in other species (e.g., as is also the case in the rock cavy, Nascimento et al., 2010), then it is likely that these retinal projections participate in photoperiod-dependent regulation associated with the Re and perhaps Rh. The retinal neurons may provide diurnal modulation of neuron excitability in the Re/Rh, similar to that described in the paraventricular nucleus (Kolaj et al., 2012). While not definitive, such observations suggest a role of the Re/Rh in the integration of photoperiodic information. Recently, Iwasaki et al. (2010) reported that a low intensity electrical stimulation of the Re was able to elicit penile erection in unanesthetized rats, indicating another functional link to reproduction.

4.1.2. Feeding behavior

Wilmot et al. (1988) reported that 1 out of 3 rats fed with a rich diet (sweetened condensed milk + corn oil) showed increased body weight and higher concentrations of plasma insulin. In these “obese” rats, alpha2 receptor binding sites in the Re (among other regions) were decreased by 30%, suggesting a synaptic plasticity in the Re responsive to feeding behavior. An interesting related finding is that anorexia can be induced by an injection of calcitonin into the Re, a blood calcium-reducing hormone (Chait et al., 1995). The Re may also influence circadian and seasonal adaptations affecting body weight. In siberian hamsters, Re lesions may potentiate weight gain during long photoperiods and inhibit loss of body weight during short photoperiods (Purvis and Duncan, 1997), but this latter effect was not replicated in a more recent study (Leitner and Bartness, 2011).

4.1.3. Nociception

The Re/Rh may also be involved in nociception. Indeed, c-Fos expression is decreased in the Re/Rh when nociceptive-bearing fibers from muscles or skin to the thalamus are electrically stimulated in anesthetized rats, suggesting inhibition of midline nuclei associated with the integration of noxious inputs (Gholami et al., 2006). On the contrary, Bullitt (1990) reported increased c-Fos expression in the Re of anesthetized rats subjected to peripheral noxious stimulation. Dostrovsky and Guilbaud (1990) found that a few neurons of the Re or Rh were selectively activated

by nociceptive stimuli (i.e., joint press) in a model of arthritic rats. We, however, recently used the calibrated forceps protocol to measure thresholds for mechanical pain (protocol in Erendira Luis-Delgado et al., 2006) and found that lidocaine-induced inactivation of the Re/Rh had no effect on paw pressure threshold (Loureiro et al., unpublished data). It seems likely that more dorsal thalamic nuclei (e.g., paraventricular, centrolateral intralaminar, and mediodorsal nuclei) as well as more ventral ones (nucleus submedialis) play a greater role in mediating responses to noxious stimuli (e.g., Baffi and Palkovits, 2000; Ness, 2000; Ren et al., 2009; Tang et al., 2009; Wilson et al., 2008).

4.1.4. Arousal, stress, anxiety

A few sources suggest an influence of Re/Rh nuclei on stress and arousal. Using c-Fos, c-jun and zif268 mRNA expression as markers of brain activation, Cullinan et al. (1995) found that acute swim or restraint stress in rats increased expression levels of the immediate early genes in various brain structures, including the Re and Rh nuclei, especially that of c-Fos. These changes, however, were more pronounced in other brain regions than in the Re/Rh, suggesting that the response to stress is not a major feature of these nuclei. More recently, midline (including the ventral part) as well as intralaminar thalamic nuclei, which directly target the apical tufts of layer V of the prefrontal cortex, were shown to be selectively excited by hypothalamic hypocretin 1 and 2 (orexin A and B) (Peyron et al., 1998). Liu and Aghajanian (2008) showed that mild restraint stress induced a deficit in spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) to hypocretin in pyramidal neurons in prefrontal slices as well as a decrease in dendritic spine density, suggesting a disruption of midline and intralaminar thalamic inputs that normally innervate the apical dendrites of prefrontal cortex neurons (see also Lambe and Aghajanian, 2003). In their review, Lambe et al. (2007) proposed that stress via impairment of such excitatory thalamocortical actions on the mPFC might exacerbate a breakdown in cortical processing of information from the ascending arousal system observed in various psychiatric illnesses such as schizophrenia. However, we found no influence of lesion or inactivation of the Re/Rh on anxiety or open field activity (Loureiro et al., 2012). To our knowledge, there are no other published studies showing an influence of the Re/Rh on measures of anxiety. By contrast, the dorsal MdT, and particularly the paraventricular nucleus, affects anxiety, as shown by in vivo lesion and infusion, as well as in vitro drug application evidence (e.g., Bhatnagar et al., 2003; Hermes and Renaud, 2011; Li et al., 2010). Based on anatomical approaches of connectivity and stimulation experiments, the midline and intralaminar thalamic nuclei have been associated with mechanisms of arousal and attention (Groenewegen and Berendse, 1994; Van Der Werf et al., 2002). The so-called ‘non specific’ thalamic nuclei are different to other thalamic nuclei in that they also receive prominent innervation from orexin neurons that are known for a key role in brain arousal (Sakurai, 2007). Once again, however, it is the dorsal midline thalamus, especially the paraventricular nucleus, that receives a particularly dense input from orexin neurons and is associated with arousal and anxiety (Li et al., 2009), presumably related to its dense connections with the nucleus accumbens and moderate projections to the amygdala (unlike the Re, see Section 2.2, Vertes et al., 2006). Another study reported that rats subjected to fiber-sparing lesions of the Re and the anteromedial thalamic nuclei, which both receive afferents from the hypothalamic defensive system, produced normal freezing responses to predator cues during training (Carvalho-Netto et al., 2010). As such, they responded normally to a natural stressor. When subsequently exposed to the context associated with predator cues, rats subjected to Re-only lesions showed no deficit. A deficit, however, was seen in rats with anteromedial nucleus lesions, which was

more pronounced with a combined lesion that also involved the Re. These observations suggest that the Re might have indirect effects on this type of associative memory rather than on the regulations of stress responses.

4.1.5. Concluding remarks

Beyond the more direct role in cognitive processes described below, the foregoing suggests that the Re and Rh have some influence on basic functions such as feeding, metabolism, reproduction, seasonal adaptations and perhaps also on the integration of some kind of noxious stimuli.

4.2. Attention and impulsivity

Patients with thalamic damage show distractibility and deficits in inhibitory control, which are believed to be the result of prefrontal denervation and an example of a thalamic influence on executive functions and attention (e.g., Bougousslavsky et al., 1988; Van Der Werf et al., 1999, 2003a,b). One method to test some of these functions in laboratory animals employs the 5-choice serial reaction time (5-CSRT) test (see Fig. 6), which measures sustained and selective visual attention (e.g., Chudasama et al., 2003; Muir et al., 1996; Paine et al., 2009; Robbins, 2002). Maddux and Holland (2011) provided evidence for the differential involvement of the dorsal vs. ventral mPFC in the use of reinforcement prediction requiring rats to allocate attention for new learning and for the control of action. In the hippocampus, dorsal lesions do not affect the 5-CSRT task, but ventral lesions increase premature responses and reduce accuracy, suggesting an increase in impulsivity (Abela et al., 2013). Lesions of the mediodorsal thalamic nuclei also increase premature responding in this task, especially when the inter-trial interval is varied unpredictably, whereas anterior thalamic lesions have no effect (Chudasama and Muir, 2001). Based in part on pronounced Re input to the ventral hippocampus, and considerably less so to the dorsal hippocampus (Hoover and Vertes, 2012; Vertes et al., 2006), the question of whether lesions of the Re/Rh could affect attention becomes relevant. To the best of our knowledge, only one study thus far examined the effects of a Re/Rh lesion on the 5-CSRT task. In that study, rats with neurotoxic Re lesions showed less perseveration, did not inhibit premature responses, and exhibited fewer omissions than controls. Rats with Re lesions were also quicker to respond to rewards when the inter-trial intervals were unpredictable (Prasad et al., 2013). Thus, the Re/Rh appears to influence inhibitory control processes, particularly impulse inhibition and motivational control, rather than attention per se. Part of this influence could implicate the projections of the Re to the ventral hippocampus.

4.3. Passive avoidance memory

The passive (or inhibitory) avoidance test is when an animal is expected to refrain from engaging a species-specific response that has been punished in a prior, often one-trial, acquisition session. Yasoshima et al. (2007) used a brain imaging technique based on immediate early gene c-Fos immunostaining to visualize the activation patterns of the anterior and dorsal midline thalamic nuclei (that is, above the Re/Rh) during the retrieval of either inhibitory avoidance or conditioned taste aversion. During a 2 min retrieval test 48 h after conditioning, the paraventricular thalamic nucleus exhibited a large increase of Fos-like immunoreactivity, suggesting strong activation when recalling a context-shock association, and the same was true for a taste-malaise association. More recently, Zhang et al. (2011) described increased c-Fos activity levels after acquisition of an inhibitory avoidance memory in limbic cortical regions that are neuroanatomically connected

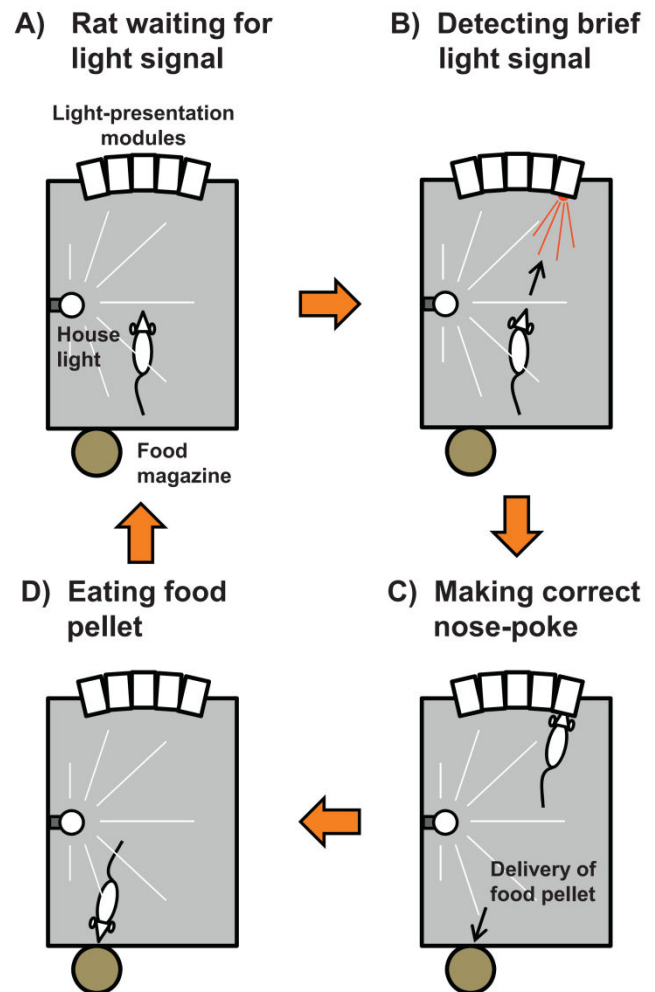


Fig. 6. The 5-choice serial reaction time task. This test measures sustained visual attention in rodents. It uses a sound-attenuated chamber with five light stimulus presentation modules on one rear wall. The chamber is illuminated by a house light (yellow bulb + stripes), which can be turned off upon request (e.g., in order to indicate a failed trial). Each of the five modules is equipped with an infrared photocell beam enabling both light stimulus presentation (e.g., as indicated by the red triangle in B) and detection of a rat's nose-poke in the hole of the module. At the opposite, a reward pellet is delivered from an automated food magazine, but only when the rat has made a correct response. At the start of the test, the rat faces the 5 light-presentation modules (A), focusing visual attention on them (as symbolized by the white triangle). A brief light signal (0.5 s or even less; red triangle) is presented in one of the modules (B). Upon detection, the rat has to move towards this module and make a nose-poke in its hole (C). If so, the trial is recorded as correct and a reward pellet is delivered automatically at the opposite wall from an engine-driven magazine (D). A nose-poke in any other module is counted as an incorrect trial. No nose-poke before a fixed delay is counted as an omission. A nose-poke during the hold period preceding the light signal in the module is considered a premature response. Repeated nose-pokes in the same module despite a light signal that has been shifted to another module are accounting for perseverative responses. In case of a correct response, once the pellet has been collected, the next trial is started after a fixed (light signal occurrence can be anticipated by the rat) or a variable (light signal occurrence cannot be anticipated by the rat) hold period.

with the Re/Rh, i.e., the lateral and basolateral amygdala, CA1 and CA3 (but not the dentate gyrus) of the hippocampus, as well as prelimbic and infralimbic cortices. The same was found with Arc expression except that it was also increased in the anterior cingulate cortex, another brain region connected with the Re/Rh.

It appears that only one study has examined the effects of functional alterations of the Re on passive avoidance responding (Davoodi et al., 2011). These authors infused tetracaine into the Re

either immediately prior to task acquisition or at delays of 5, 90 or 360 min after drug-free acquisition. Retention trials were given 24 h later and were drug-free. In other rats, acquisition occurred drug-free and retention after 24 h was tested 5 min after the rats received Re infusions of tetracaine. Pre-acquisition inactivation of Re resulted in impaired retention, as did tetracaine infused 5 min post-acquisition, but not at longer post-acquisition delays. The pre-retention trial infusion of tetracaine abolished memory retrieval. These findings suggest that the Re (and also the Rh, which is always within the diffusion radius of the drug) has a role in associative information encoding, in the immediate post-acquisition period, but not during later phases of memory consolidation. The data also show that this region influences information retrieval.

Temporary inactivation studies can dissect different stages of memory (encoding, consolidation, retrieval) that are altered by dysfunction of a neural structure. Davoodi et al.'s results (2011) suggest that Re plays a role in all processes. Can their data be interpreted with respect to the connectivity of Re/Rh with the hippocampus or mPFC? If so, one may expect similarities between effects of Re/Rh inactivation and inactivation or lesions of the hippocampus or mPFC. Lorenzini et al. (1996, 1997) used uni- or bilateral tetrodotoxin infusions into the dorsal or ventral hippocampus. Unilateral infusions produced retention performance that was impaired by pre-acquisition and pre-retention inactivation, but not when the infusion was made immediately post-acquisition. With bilateral infusions, all conditions produced impairment. The correspondence between the effects reported by Davoodi et al. (2011) and those of Lorenzini et al. (1996, 1997) resonates with the idea that a disruption of the information flow between the Re/Rh and the hippocampus accounts for the pattern of the reported inactivation effects. Evidence consistent with this suggestion comes from the study by Wang and Cai (2008) who found that pre-acquisition infusions of muscimol into the ventral hippocampus impaired subsequent retention of passive avoidance. Alternatively, the tetracaine infusions made by Davoodi et al. (2011) may have reached the Rh, which has projections to the amygdala, and hence the reported effects could actually involve a disruption in the processing of emotional information by the amygdala. Consistent with the conclusion by Davoodi et al., however, is an observation by Zhang et al. (2011) who recently reported that inhibition of protein synthesis in the hippocampus blocked the consolidation of an inhibitory avoidance memory, and similar effects were obtained by the same (Zhang et al., 2011) or by other manipulations (e.g., Blanco et al., 2009; Fritts et al., 1998; Jinks and McGregor, 1997) in the mPFC or anterior cingulate cortex. Thus, impairments of avoidance responses by Re/Rh damage or inactivation could be the consequence of disrupting mechanisms encompassing prefrontal cortical or/and hippocampal regulation, and which could be important for acquiring and retrieving such learned responses. Regarding consolidation of avoidance memory, only early post-acquisition phases seem to be sensitive to experimental manipulations of Re/Rh.

4.4. Working memory, including spatial working memory

In animals, working memory tasks usually measure performance after a short delay interposed between an information-sampling and a test trial. This type of memory can be assessed in a variety of discrimination tasks, including tasks taxing spatial memory such as in a radial maze. Depending on the protocol used, performance in this class of tasks may rely on the mPFC, the hippocampus or require cooperative engagements of both structures (e.g., Aujla and Beninger, 2001; Floresco et al., 1997, 1999; Mair et al., 1998; McDonald and White, 1995; Porter and Mair, 1997; Porter et al., 2000; Seamans et al., 1995, 1998; Vann

et al., 2000; for reviews, see e.g., Laroche et al., 2000; Marshuetz and Smith, 2006; Newman and Grace, 1999).

To investigate a possible contribution of the Re/Rh to working memory, Hembrook and Mair (2011) used a fiber-sparing permanent NMDA lesion of the Re/Rh in rats. The lesion effects were compared to those of other thalamic lesions. The rats were tested for visually guided responding capabilities (implicating dorsal frontal cortical areas innervated by intralaminar nuclei and lateral striatal regions) and for the classic win/shift radial-arm maze performance, the latter with and without a delayed choice protocol (implicating the hippocampus). The delayed version of the radial maze task consisted of blocking all arm entries after four visits for a given time before the trial could be continued with all arms again open. In the visually-guided responding task, the Re/Rh lesions produced no effect. In the classical working memory version of the task (no delay), Hembrook and Mair found that Re/Rh lesions induced a significant deficit. Deficits were also found in the delayed choice task. These observations implicate the Re/Rh nuclei in hippocampus-dependent spatial working memory while they are not implicated in the visuo-spatial reaction time task depending on other structures/connections. More recently, Hembrook et al. (2012) reported the effects of reversible inactivation of the Re/Rh nuclei in two discrimination tasks. For the first task, which is sensitive to both hippocampal and mPFC damage, the authors used a delayed nonmatching to position (DNMTP) protocol and two levers in a conditioning chamber. In a sample trial, rats were presented one lever and then, after memory delays of 1, 5 or 25 s, they were presented the same lever plus an alternate one; a response on the latter was rewarded with food. Even with their smallest dose of muscimol (i.e., 0.4 nmol vs. 1.0 or 2.5 nmol) and thus a diffusion radius probably well restricted to the Re/Rh, the authors observed a delay-independent decrease of operant DNMTP performance. The same rats were also tested in a varying choice, delayed eight arm radial-maze task according to a protocol known to be sensitive to hippocampal but not to mPFC disruption (Porter et al., 2000). Rats had to hold information that they just sampled in order to select an appropriate target again on the basis of a nonmatch principle. In this task, inactivation confined to the Re/Rh was not sufficient to induce a significant deficit, except at the highest dose tested (2.5 nmol). Based on their observations, the authors suggested that the localised inactivation of the Re/Rh nuclei only produced effects in a task that is sensitive to damage to both the hippocampus and the mPFC, namely the operant DNMTP task and not in a hippocampus-only-dependent task. The effect obtained with the highest dose in the DNMTP task was interpreted as non specific, probably reflecting an additional inactivation of regions neighbouring the Re/Rh, an interpretation supported by the effects of muscimol infusions into an anatomical control site 1.5 mm dorsal to the Re/Rh. These observations led Hembrook et al. (2012) to hypothesize that "*Re and Rh... may be critical for tasks that require coordinated activation of prefrontal cortex and the hippocampal system, for instance executive functions like working memory or temporal integration...*" (pp. 853).

4.5. Spatial reference memory in the water maze

The Morris water maze task is a popular task assessing spatial reference memory (e.g., D'Hooge and De Deyn, 2001; McNamara and Skelton, 1993; Morris, 1984; Terry, 2009). Over a series of days, a rat (or mouse) learns to locate an escape platform hidden underneath the water surface in a water-filled circular tank. Once the animal has learned the room cues that help it navigate to this location, a probe trial is introduced in which the platform is removed. The probe trial assesses the animal's ability to perform a search pattern focused on the former location of the platform,

thereby indicating that it knows where the platform should be, and not just how to get to it (Whishaw et al., 1995).

Three recent articles dealt with a contribution of the Re/Rh to spatial memory processes in the water maze. Davoodi et al. (2009) reported that pre-training tetracaine infusions into the Re/Rh impaired acquisition without affecting retention, that post-training inactivation impaired subsequent retrieval, and that inactivation immediately prior to the probe test impaired retention. At face value, these findings suggest that these deficits reflect disruption of the connections between the Re/Rh and the hippocampus, given the hippocampus-dependence of water-maze performance (e.g., D'Hooge and De Deyn, 2001; Silva et al., 1998). Unfortunately, however, the angled guide-cannula in this study produced very large unilateral lesions in the dorsal hippocampus and dorsal thalamus (see Davoodi et al.'s Fig. 1, pp. 131). Second, perhaps as a consequence of this, the control rats (saline infusions) did not perform above chance during the retention trials (see e.g., Davoodi et al.'s Figs. 2–4, panel B, pp. 132–133).

The second study (Dolleman-van der Weel et al., 2009) provides more convincing evidence of a contribution of the Re to performance in the water maze. These authors compared the effects of neurotoxic Re lesions with those of the mediadorsal thalamic nuclei or of the hippocampus on task acquisition and retrieval. Dolleman-van der Weel et al. (2009) found that Re lesions affected the probe trial (acquisition was normal), but perhaps not reflecting a spatial memory dysfunction per se. Indeed, a strategy analysis of the swim tracks in the probe trial showed that Re rats initially swam as directly to the former platform location as their controls, but then rapidly shifted to a search pattern encompassing the entire pool with infrequent returns or less consistent swimming to the correct quadrant. Conversely, lesions of the hippocampus or the mediadorsal thalamus impaired acquisition, while only hippocampal lesions resulted in a genuine impairment of the ability to search in the previous platform location during the probe trial. Dolleman-Van der Weel et al. therefore proposed that Re lesions resulted in enhanced flexibility, to explain why Re rats gave up searching for the platform sooner than their sham-operated counterparts. More recently, Cholvin et al. (2013) made similar observations following muscimol inactivation of the Re/Rh: the swim patterns of the Re/Rh group during the probe trial demonstrated memory retrieval but were less directed to the target quadrant than that of control rats (see Section 4.7 for more details).

The two latter studies suggest that the Re/Rh do not influence spatial reference memory, but rather strategy selection/organization for goal-directed behaviors in a spatial context.

4.6. Systems-level consolidation

Systems-level consolidation involves an *off line* and progressive functional exchange between the hippocampus, which processes recent declarative-like memories and triggers long-term memory consolidation, and the mPFC, which play an increasing role in supporting remote memories that become independent of the hippocampus as well as their retrieval (Frankland and Bontempi, 2005, 2009; see Fig. 7). The idea that the hippocampus exerts direct and persistent influence on the prefrontal cortex has been substantiated by electrophysiological recordings of immediate responses or delayed changes in the mPFC after hippocampal stimulation in anesthetized and awake animals using e.g., paired pulse, high frequency or low frequency stimulation (e.g., Burette et al., 1997; Jay et al., 1996; Laroche et al., 1990; Takita et al., 1999).

Neuronal assemblies in the cortex, perhaps more selectively in the mPFC, provide a potential substrate to memory consolidation resulting from hippocampo-cortical and cortico-cortical reactivation/replay sequences. This replay may be preferentially linked to

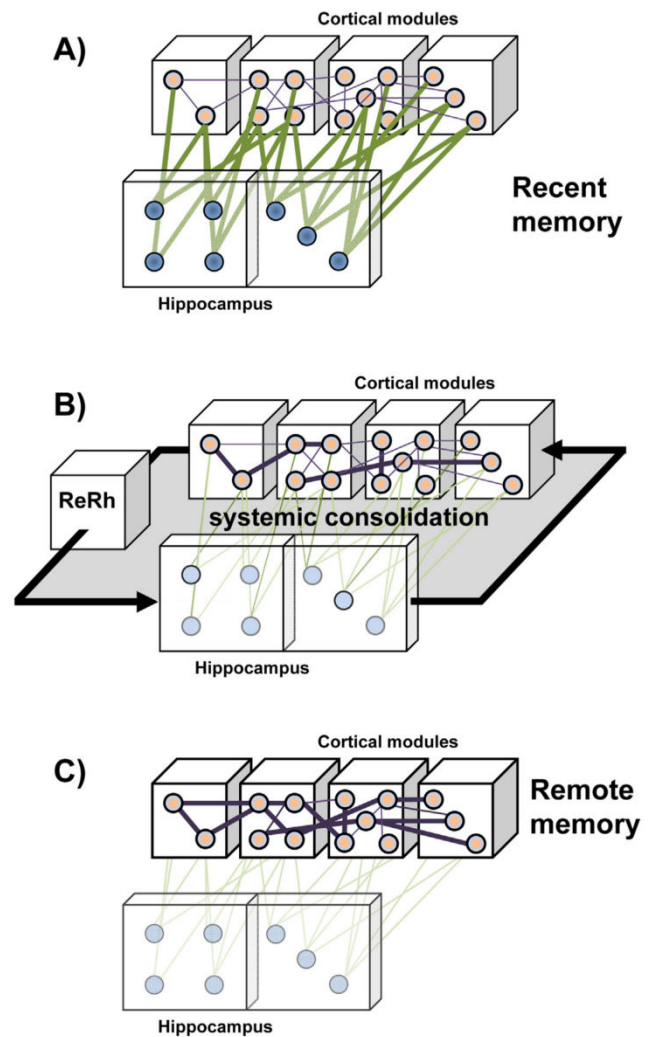


Fig. 7. A role for the reuniens nucleus and the rhomboid nucleus in systems-level consolidation of a memory. (A) During encoding, the different perceptual features of an experience are processed in primary and associative areas of the cortex, from where a representation is integrated in the hippocampus as a recent memory trace. (B) Over time, *off line* reactivation – probably during particular stages of sleep – of hippocampo-cortical networks progressively leads to a strengthening of existing connections within and between cortical modules as well as to the establishment of new connections therein. This process probably requires bidirectional information flow between the mPFC and the hippocampus, wherein the Re and Rh nuclei might play the role of a hub relaying at least the information transmission from the prefrontal cortex to the hippocampus. (C) These strengthened connections in the cortex provide, in whole or in part, cortical support to remote memories, which therefore may become, though not necessarily completely as shown by e.g., Lopez et al. (2012), independent of the hippocampus. This figure has been drawn after Frankland and Bontempi (2005).

sleep (e.g., Diekelmann and Born, 2010; Diekelmann et al., 2011; Hebb, 1949; Mölle and Born, 2011; Sirota et al., 2003; reviewed by Battaglia et al., 2011), but also involves wakefulness (Carr et al., 2011; Foster and Wilson, 2006; Karlsson and Frank, 2009). Evidence supporting this anatomo-functional reorganization of memories can be found in a series of experiments using brain imaging approaches and reversible inactivation studies. These studies show preferential engagement of the hippocampus, but not the mPFC, during recall of recent declarative-like memories, and the opposite pattern during recall of remote ones (e.g., Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004; reviewed in Frankland and Bontempi, 2005; Squire, 2009). Regarding remote

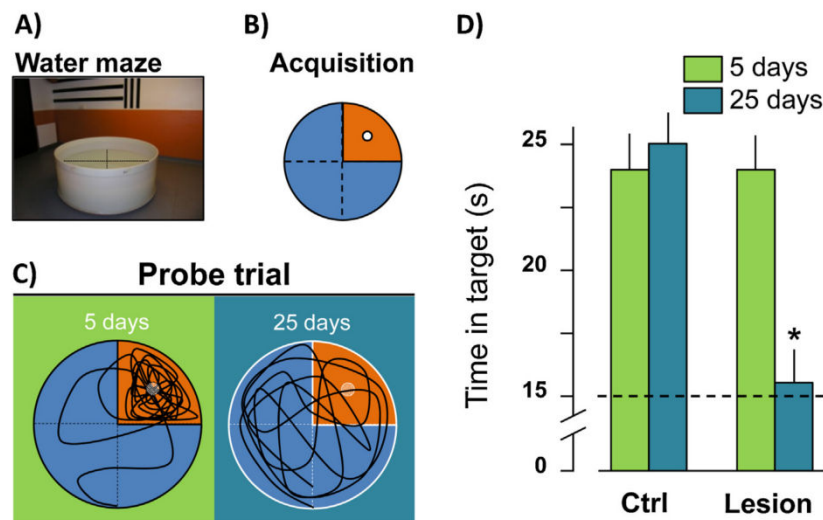


Fig. 8. The Re/Rh lesion prevents the formation of a remote memory for place. (A) Photograph of the water maze in which the rats were trained and tested. (B) Location of the platform (white circle) in the water maze during the 8-day training protocol (4 trials/day). (C) Typical swim paths as recorded during a probe trial given 5 or 25 days after the end of training in rats subjected to Re/Rh lesions before training. (D) Time spent in the target quadrant (former location of the platform) during the probe trial 5 and 25 days post-acquisition in sham-operated control rats and rats with Re/Rh lesions (analysis of lesion location and extent showed no difference between rats tested at the delay of 5 post-acquisition days vs. those tested at that of 25 days). The * indicates a significant difference with lesion rats tested at the delay of 5 days ($p < 0.001$). This figure has been drawn after Loureiro et al. (2012).

spatial memory, however, it seems that both the mPFC and the hippocampus remain necessary to a correct recall (Jo et al., 2007; Lopez et al., 2012; Teixeira et al., 2006).

In a recent study combining c-Fos expression immunohistochemistry, permanent lesions and reversible inactivation approaches, Loureiro et al. (2012) assessed the effects of fiber-sparing Re/Rh NMDA lesions on recent and remote spatial memory in the Morris water maze. Two key findings were described. First, as in the study by Dolleman-van der Weel et al. (2009), the lesions did not prevent task acquisition. Second, whereas probe trial performance was normal at a 5-day post-acquisition delay, showing intact recent memory, there was no evidence for memory retrieval in lesioned rats at the 25-day post-acquisition delay (see Fig. 8), suggesting a lesion-associated disruption of the processes that translate a recent memory into a remote one. These observations were recently replicated *in extenso* in a separate experiment (Cholvin et al., unpublished). The findings by Loureiro et al. (2012), and similar findings by Lopez et al. (2009) after intralaminar thalamic nuclei lesions, show that injury to nuclei of the “non specific” thalamus disrupts long term memory consolidation, perhaps in connection with their strong projections to the mPFC and anterior cingulate cortex, and their influence on cortical arousal (for a review, see e.g., Llinas and Steriade, 2006; Van Der Werf et al., 2002). Such findings suggest a participation of these nuclei in the hippocampo-cortical and cortico-cortical dialogue necessary for the progressive reorganization of a memory trace at the systems level. An alternative interpretation could of course be that the functional engagement of “non specific” thalamic nuclei is required to retrieve a remote spatial memory. This alternative would be supported by the fact that the Re/Rh showed a dramatic increase of c-Fos expression during the retrieval process (Loureiro et al., 2012). However, the inactivation of the Re/Rh nuclei right before a probe trial did not prevent correct retrieval. It is possible that this apparently paradoxical observation could be the result of a participation of the Re/Rh that would not be crucial to the retrieval process. On the other hand, the system could compensate by an alternative mechanism which becomes engaged as a consequence of an acute and reversible functional disconnection of the Re/Rh. Here, it is noteworthy that changes in c-Fos expression are always identified as relative modifications in

comparison with controls (e.g., Shires and Aggleton, 2008). As such, the kind of control is a critical point and it is not impossible that the controls of the Loureiro et al. (2012) study did not permit an appropriate interpretation of the increased c-Fos expression during the memory retrieval test. Another possibility would be that the lidocaine inactivation performed in the Loureiro et al. (2012) experiment has produced less complete activity suppression in the Re/Rh than the lesions. In summary, the available evidence suggests that the Re/Rh participate in the interactions between hippocampus and mPFC involved in consolidation of enduring memories. Their implication in the remote memory retrieval process, however, seems minor.

In a recent publication, Xu and Südhof (2013) described a series of experiments using a contextual fear conditioning paradigm, wherein they identified a circuit processing specificity and generalization of memory attributes. They found this circuit to be composed of the mPFC, the hippocampus and the Re. In an earlier study, Xu et al. (2012) had demonstrated in mice that the inactivation of synaptic transmission by tetanus toxin expression across the mPFC resulted in overgeneralization of fear memory (i.e., mice expressed fear towards a highly degraded context, thus indicating loss of memory specificity). In the follow-up article, Xu and Südhof (2013) showed that the same effect could be obtained by tetanus toxin expression in only those mPFC neurons that project to the Re. They showed that generalization during the subsequent formation of a remote memory was actually determined during memory acquisition, not afterwards, i.e. not once training was complete and memory formation/consolidation had already persisted for 2–3 days. Because Re neurons are connected to both the mPFC and hippocampus (among other sites; see above, Section 2), and the hippocampus plays a crucial role in processing the details of a memory and thus its degree of specificity (Wiltgen et al., 2010), Xu and Südhof induced overexpression of tetanus toxin in Re neurons and obtained overgeneralization of contextual fear memory. They additionally investigated the effects of viral transfection-induced tetanus toxin expression in Re neurons on c-Fos expression in the target structures. They also focused on the effects of neuroligin 2 knockdown of Re neurons, an experimental manipulation that increases hippocampal excitability by altering GABA-mediated inhibition originating in the Re (e.g., Jedlicka et al.,

2011). None of these manipulations affected baseline c-Fos expression in the mPFC or hippocampus. However, as a consequence of tetanus toxin expression, the training-triggered increase of c-Fos was reduced in region CA1 of the hippocampus as well as in the anterior cingulate cortex. On the opposite, it was enhanced following neuroigin 2 knockdown. These findings indicate that Re neurons dynamically regulate hippocampal and mPFC activity during the acquisition of a contextual fear.

What could be the cognitive purpose of this regulation? To answer this question, Xu and Südhof used optogenetic tools to test the possibility that, during the acquisition phase, Re neurons, by their activity pattern, provide the level of specificity by which contextual fear memory will be consolidated in the long term. For this experiment, an optical fiber was implanted such as to allow the targeting of blue light to the Re. The channel rhodopsin-derivative ChIEF was expressed in Re neurons, which could then be activated by light stimulation delivered tonically (4 Hz stimulus trains) or phasically (15-pulse stimulus bursts) during fear conditioning. Neither stimulations had effects on fear conditioning *per se*: mice acquired fear normally. These stimulations, however, induced opposite changes on the specificity of a remote fear memory. The phasic stimulation resulted in increased fear responses towards a degraded context, and thus in a situation which should normally not elicit fear. On the contrary, tonic stimulation resulted in decreased freezing in the degraded context, indicating enhanced memory specificity. Together these findings demonstrate that the mPFC has a role in controlling memory specificity, and that this control involves its connections with the Re. The Re relays incoming signals from the mPFC both to the hippocampus and back to the mPFC. The results of the study by Xu and Südhof (2013) thus provide additional evidence for a role of the Re in memory consolidation at the systems level, as first demonstrated by Loureiro et al. (2012). Indeed, the activation pattern of Re neurons during task acquisition determines the level of detail with which the content of a memory is subsequently constructed and stabilized at the systems level. They also provide further support for the existence of an important functional link between the mPFC, the Re and the hippocampus

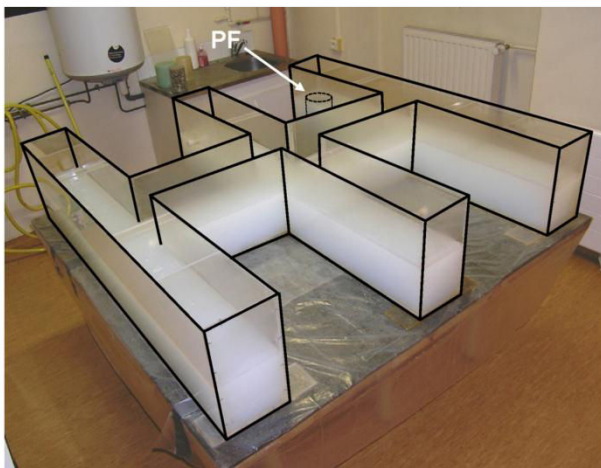


Fig. 9. The double-H maze. Photograph showing a general picture of the testing device as it was installed for our experiment assessing behavioral flexibility (see Fig. 10 for an illustrated summary of the protocol used). Holding in a square of 160 cm × 160 cm and placed on a 80-cm high table, this device has been filled with opaque water (obtained by addition of powdered milk) to about 14 cm height. For each training session, an invisible escape platform is immersed in the water at the extremity of a constant arm; it is removed for each of the two probe trials. For further details about this test and protocol variants, see e.g., Cassel et al. (2012) and Pol-Bodetto et al. (2011).

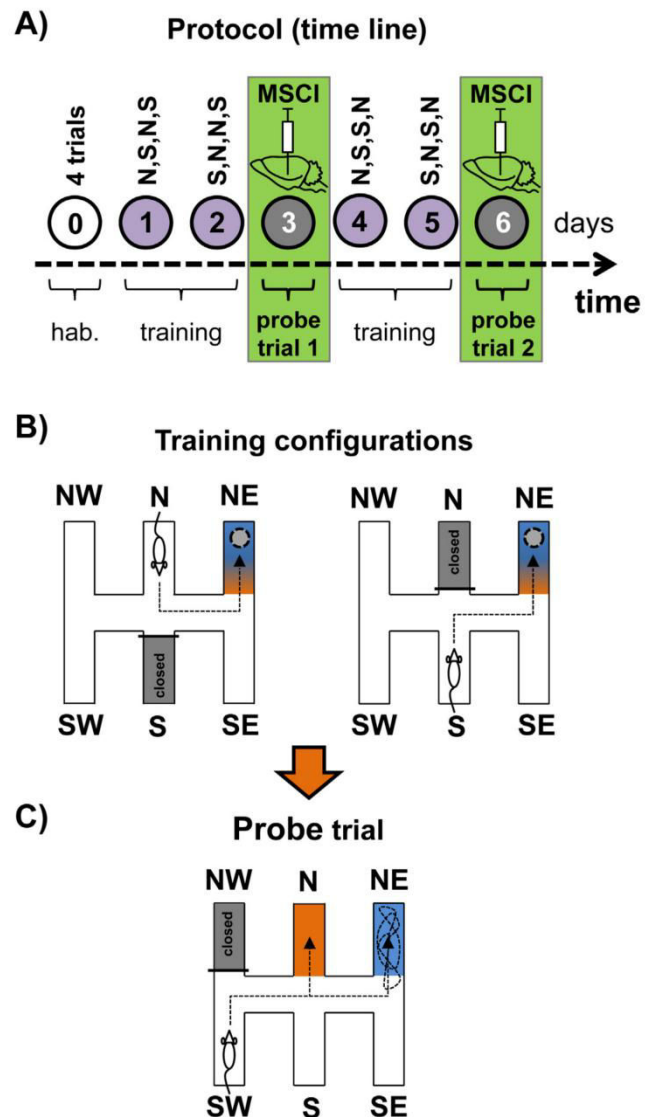


Fig. 10. Analysis of strategy shifting capabilities in the double-H maze after reversible inactivation of the Re/Rh. (A) Time line of the experiment. After a habituation day (0), rats were trained for two consecutive days (1,2), given a first 24 h-delayed probe trial (3), trained for two additional days to strengthen learning (4,5) and given a second 24 h-delayed probe trial (6). On each training day they were released from the north (N) or south (S) arm according to the indicated sequence. Before each probe trial, rats were infused with muscimol (MSCI; 250 ng in 0.3 μ L) or PBS. (B) Illustration of the configurations used during maze training. The rats were given 4 daily trials for which they were released twice from the S and twice from the N (in a randomized order; e.g., N,S,S,N, then S,N,N,S, then N,S,N,S...). The platform was always located in the NE arm. The arm opposite to the one in which the rats were placed at the start of a trial was always closed by a transparent guillotine door (it corresponds to the grey-filled arm). Rats could reach the target arm by one of both efficient response behavior (left-left or right-left turn sequences) or learn the place, and most probably, as shown earlier (Pol-Bodetto et al., 2011), made both in the place-response order. (C) On days 3 and 6, thirty min before each probe trial, about half the rats were infused with MSCI in the Re/Rh, the other half being infused with an equivalent volume of PBS as a control. For both probe trials, rats were released from the SW arm, the NW one was closed by a guillotine door; the platform had been removed from the device. We analyzed the capability of the rats to shift to a response based on place memory either immediately or after having entered the N arm. We found that in rats subjected to MSCI infusions into the Re/Rh such a shift was impossible, as also found in rats subjected to exactly the same protocol but given the infusions (250 ng in 1 μ L) into either the mPFC or the hippocampus (Loureiro et al., unpublished data). This figure has been adapted from Cholvin et al. (2013).

in neurobiological processes leading to the persistence and precision of memories.

4.7. Strategy shifting and behavioral flexibility

In their study assessing the effects of excitotoxic lesion of the Re in the water maze, Dolleman-van der Weel et al. (2009) showed that the Re lesion did not prevent spatial memory retrieval in a probe trial, but affected strategy: the rats with lesions gave up searching for the platform earlier than controls (see above, Section 4.5). Weakened probe trial performance in a water maze has also been found after muscimol inactivation of the Re/Rh (Cholvin et al., 2013). In several experiments, it has been shown that alterations of the mPFC, a major projection region of the Re/Rh, had little effects on learning and memory functions and rather affected the ability to shift to the correct strategy when task contingencies or environmental conditions are modified (e.g., Block et al., 2007; Dias and Aggleton, 2000; Oualian and Gisquet-Verrier, 2010; Ragozzino et al., 1999, 2003). Dolleman-van der Weel et al. (2009) discussed their finding by reference to changes in strategy shifting, speculating that rats with Re lesions exhibited deficits of inhibitory response control mechanisms.

We used our recently developed double-H task (Cassel et al., 2012; Pol-Bodetto et al., 2011; see Fig. 9) to test failure in response inhibition. Rats had to learn two escape response sequences (right-left or left-left turns) which relied on where in the maze they were positioned at the start of each trial (see Fig. 10). In the course of learning, two misleading probe trials used a 60-cm shift to the left of the start point and rats were tested for their ability to respond to the absence of an expected platform based on simple response strategy and to shift to a strategy based on a memory for place. In a first experiment, we evaluated the effects of bilateral muscimol inactivation (250 ng/side in 1 μ L) of the mPFC or the dorsal hippocampus, both of which produced identical impairments: more than 80% rats first made the right-left turns, but then failed to shift to a place search. In a second experiment using the same task, we inactivated the Re/Rh (250 ng in 0.3 μ L) and found that these rats showed the same dramatic impairment as found after inactivation of the mPFC or the hippocampus. We suggest that the shift to use of memory location required by this task engages a distributed circuit in which the mPFC provides response shift and inhibitory mechanisms, the hippocampus provides retrieval of place memory, while the Re/Rh may either orchestrate dynamic interactions between the mPFC and the hippocampus or drive the mPFC in operating the shift towards an engagement of the hippocampus. These findings were recently confirmed *in extenso* using lower doses of muscimol (i.e., 80 and 30 ng instead of 250 ng leading to the results shown in Fig. 10: Cholvin et al., 2013).

5. Discussion and general conclusions

Since the early demonstration by Dempsey and Morison (1942) that low frequency stimulation of the midline thalamus resulted in widespread synchronous activity in the cortical mantle, the ensemble of paraventricular, parataenial, intermediodorsal, reuniens and rhomboid nuclei has been considered a “non specific” region, which together with the intralaminar nuclei, relays brainstem-driven signals to the vast territories of the cortex. Subsequently, neuroanatomical evidence showed that these nuclei also had connections, and even reciprocal connections, with a much more extensive set of structures including subcortical structures (e.g., Herkenham, 1978). This large array of connections most probably explains why the effects of Re or/and Rh lesions influence functions such as feeding, metabolism, reproduction, seasonal adaptations, and perhaps to some extent nociception. The

multiplicity and variety of these influences appears in line with the idea that neuroanatomical connectivity and electrophysiological observations support no functional specificity. Beside these relatively general implications, however, these two ventral midline nuclei are, in terms of their connectivity, ideally positioned to influence – and perhaps coordinate – the information flow between the mPFC and the hippocampus. The mPFC has been found to play crucial and specific roles in encoding, attention, working memory, executive functions and remote memory storage/retrieval. There is equally strong evidence for a direct role for the hippocampus in spatial memory and in the processing and consolidation of recent declarative-like memory. The linkage between the mPFC and the hippocampus provides a conceptual scheme that may prove useful in better understanding the perhaps more “specific” functional contributions of the Re and Rh nuclei of the thalamus to cognitive functions.

Based on their neuroanatomical position and connectivity, disruption of the Re/Rh nuclei is predicted to impair functions that require both the mPFC and hippocampus. The literature concerning contributions of these nuclei to cognition remains sparse. For instance, in the study by Davoodi et al. (2011), depending on when (pre- or post-learning, pre-recall) it was infused, tetracaine inactivation of the Re altered both early consolidation – perhaps even encoding – and retrieval of avoidance memory, suggesting a contribution of the Re/Rh to both the establishment and the recall of a memory. In a series of water maze studies, however, lesions or inactivation of the Re did not disrupt task acquisition and at most slightly altered performance in a probe trial without affecting the ability to remember the learned platform location, at least under conditions of recent memory testing, i.e., at a few days post-acquisition (Dolleman-van der Weel et al., 2009; Loureiro et al., 2012). These apparently discrepant outcomes lead us to believe that it is probably too soon to propose an exhaustive and precise list of (possibly specific) functional contributions of the Re/Rh to cognitive operations. Obviously, these contributions encompass aspects of motivation, various dimensions of short- or long-term memory processes, as well as executive functions, but most probably not attention given the sparse data available so far. Further studies are clearly needed to investigate in depth the cognitive role of the Re and Rh nuclei. Given their hub position between the mPFC and the hippocampus, these nuclei could be preferentially recruited whenever a process requires an interaction between the mPFC- and the hippocampus, whether the latter occurs *on-line* in a given situation, as might have been the case in our strategy-shifting experiment (Cholvin et al., 2013, Fig. 10) or in the experiment by Xu and Südhof (2013), or *off-line*, as might have been the case in our remote memory experiment (Fig. 8; see also Loureiro et al., 2012).

Improved knowledge of Re/Rh functions may have major clinical relevance. Indeed, beyond obvious clinical cases associated with thalamic injury, such as the Korsakoff syndrome and thalamic infarcts, both Alzheimer's disease and schizophrenia present two common disorders that may benefit from a better understanding of the influence of neural processing that involves the still partly enigmatic Re/Rh nuclei.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

This review is dedicated to the memory of Professor Bruno Will, who left us accidentally in March 2012. In Strasbourg, this work was supported by the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Institut National de la

Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). In Florida, it was supported by the National Science Foundation (grant IOS 0820639).

References

- Abela, A.R., Dougherty, S.D., Fagen, E.D., Hill, C.J., Chudasama, Y., 2013. Inhibitory control deficits in rats with ventral hippocampal lesions. *Cereb. Cortex* 23 (6) 1396–1409.
- Aggleton, J.P., Brown, M.W., 1999. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav. Brain Sci.* 22, 425–444.
- Aggleton, J.P., O'Mara, S.M., Vann, S.D., Wright, N.F., Tsanov, M., Erichsen, J.T., 2010. Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. *Eur. J. Neurosci.* 31 (12) 2292–2307.
- Aggleton, J.P., Dumont, J.R., Warburton, E.C., 2011. Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: a review. *Learn. Mem.* 18 (6) 384–400.
- Amici, S., 2012. Thalamic infarcts and haemorrhages. *Front. Neurol. Neurosci.* 30, 132–136.
- Arai, R., Jacobowitz, D.M., Deura, S., 1994. Distribution of calretinin, calbindin-D28k, and parvalbumine in the rat thalamus. *Brain Res. Bull.* 33, 595–614.
- Arduini, A., Terzuolo, C., 1951. Cortical and subcortical components in the recruiting responses. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 3 (2) 189–196.
- Aujla, H., Beninger, R.J., 2001. Hippocampal-prefrontal circuits: PKA inhibition in the prefrontal cortex impairs delayed nonmatching in the radial maze in rats. *Behav. Neurosci.* 115, 1204–1211.
- Badura, L.L., Goldman, B.D., 1992. Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters. *Brain Res.* 598, 98–106.
- Baffi, J.S., Palkovits, M., 2000. Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology* 72, 102–113.
- Bailey, K.R., Mair, R.G., 2005. Lesions of specific and non specific thalamic nuclei affect prefrontal cortex-dependent aspects of spatial working memory. *Behav. Neurosci.* 119, 410–419.
- Baisden, R.H., Hoover, D.B., 1979. Cells of origin of the hippocampal afferent projection from the reuniens nucleus thalami: a combined Golgi-HRP study in the rat. *Cell Tiss. Res.* 203, 387–392.
- Barbas, H., Blatt, G.J., 1995. Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus* 5 (6) 511–533.
- Battaglia, F.P., Benchenane, K., Sirota, A., Pennartz, C.M.A., Wiener, S.I., 2011. The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn. Neurosci.* 15, 310–318.
- Battaglia, G., Spreafico, R., Rustioni, A., 1992. Substance P innervations of the rat and cat thalamus. I. Distribution and relation to ascending spinal pathways. *J. Comp. Neurol.* 315, 457–472.
- Bentivoglio, M., Aggleton, J.P., Mishkin, M., 1997. The thalamus and memory formation. In: *Experimental and Clinical Aspects*. In: Steriade, M., Jones, E.G., McCormick, (Eds.), *Thalamus*, vol II. Elsevier, Amsterdam, pp. 689–720.
- Bentivoglio, M., Balercia, G., Kruger, L., 1991. The specificity of the non specific thalamus: the midline nuclei. *Prog. Brain Res.* 87, 53–80.
- Berendse, H.W., Groenewegen, H.J., 1990. Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 299, 187–228.
- Berendse, H.W., Groenewegen, H.J., 1991. Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience* 42, 73–102.
- Bertram, E.H., Mangan, P.S., Zhang, D.X., Scott, C.A., Williamson, J.M., 2001. The midline thalamus: alterations and a potential role in limbic epilepsy. *Epilepsia* 42, 967–978.
- Bertram, E.H., Zhang, D.X., 1999. Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92, 15–26.
- Bhatnagar, S., Huber, R., Lazar, E., Pych, L., Vining, C., 2003. Chronic stress alters behavior in the conditioned defensive burying test: role of the posterior paraventricular thalamus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76, 343–349.
- Blanco, E., Castilla-Ortega, E., Miranda, R., Begega, A., Aguirre, J.A., Arias, J.L., Santin, L.J., 2009. Effects of medial prefrontal cortex lesions on anxiety-like behavior in restrained and non-restrained rats. *Behav. Brain Res.* 201, 338–342.
- Block, A.E., Dhanji, H., Thompson-Tardif, S.F., Floresco, S.B., 2007. Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting. *Cereb. Cortex* 17 (7) 1625–1636.
- Bokor, H., Csaki, A., Kocsis, K., Kiss, J., 2002. Cellular architecture of the reuniens nucleus thalami and its putative aspartergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1227–1239.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., Jaffard, R., 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400, 671–675.
- Bougousslavsky, J., Ferrazzini, M., Regli, F., Assal, G., Tanabe, H., Delaloye-Bischof, A., 1988. Manic delirium and frontal-like syndrome with paramedian infarction of the right thalamus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 51, 116–119.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Alzheimer's disease affects limbic nuclei of the thalamus. *Acta Neuropathol.* 81, 261–268.
- Braak, H., Braak, E., 1998. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 53, 127–140.
- Bullitt, E., 1990. Expression of c-Fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 296, 517–530.
- Burette, F., Jay, T., Laroche, S., 1997. Reversal of LTP in the hippocampal afferent fiber system to the prefrontal cortex in vivo with low frequency patterns of stimulation that do not produce LTD. *J. Neurophysiol.* 78, 1155–1160.
- Carlesimo, G.A., Lombardi, M.G., Caltagirone, C., 2011. Vascular thalamic amnesia: a reappraisal. *Neuropsychologia* 49, 777–789.
- Carr, M.F., Jadhav, S.P., Frank, L.M., 2011. Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat. Neurosci.* 14, 147–153.
- Carrera, E., Bogousslavsky, J., 2006. The thalamus and behavior: effects of anatomically distinct strokes. *Neurology* 66 (12) 1817–1823.
- Carrera, E., Michel, P., Bogousslavsky, J., 2004. Anteromedian, central, and posterolateral infarcts of the thalamus: three variant types. *Stroke* 35 (12) 2826–2831.
- Carvalho-Netto, E.F., Martinez, R.C.R., Baldo, M.V.C., Canteras, N.S., 2010. Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 93, 479–486.
- Cassel, R., Kelche, C., Lecourtier, L., Cassel, J.C., 2012. The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats. *Behav. Brain Res.* 230, 333–342.
- Cavalcante, J.S., Costa, M.S., Santee, U.R., Britto, L.R., 2005. Retinal projections to the midline and intralaminar thalamic nuclei in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Res.* 1043, 42–47.
- Cavdar, S., Onat, F.Y., Cakmak, Y.O., Yananli, H.R., Gülcebi, M., Aker, R., 2008. The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reuniens nucleus and the thalamic reticular in the rat. *J. Anat.* 212, 249–256.
- Chait, A., Suaudeau, C., De Beaurepaire, R., 1995. Extensive brain mapping of calcitonin-induced anorexia. *Brain Res. Bull.* 36, 467–472.
- Cholvin, T., Loureiro, M., Cassel, R., Cosquer, B., Geiger, K., De Sa Nogueira, D., Raingard, H., Robelin, L., Kelche, C., Pereira de Vasconcelos, A., Cassel, J.C., 2013. The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. *J. Neurosci.* 33 (20) 8772–8783.
- Chudasama, Y., Muir, J.L., 2001. Visual attention in the rat: a role for the prelimbic cortex and thalamic nuclei? *Behav. Neurosci.* 115, 417–428.
- Chudasama, Y., Passetti, F., Rhodes, S.E.V., Lopian, D., Desai, A., Robbins, T.W., 2003. Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. *Behav. Brain Res.* 146, 105–119.
- Cohen, B.M., Wan, W., Froimowitz, M.P., Ennulat, D.J., Cherkzian, S., Konieczna, H., 1998. Activation of midline thalamic nuclei by antipsychotic drugs. *Psychopharmacology* 135, 37–43.
- Conde, F., Audinat, E., Maire-Lepoivre, E., Crepel, F., 1990. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. *Brain Res. Bull.* 24, 341–354.
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., Akil, H., Watson, S.J., 1995. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64, 477–505.
- Davoodi, F.G., Motamedi, F., Akbari, E., Ghanbarian, E., Jila, B., 2011. Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on memory processing in passive avoidance task. *Behav. Brain Res.* 221, 1–6.
- Davoodi, F.G., Motamedi, F., Naghdi, N., Akbari, E., 2009. Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on spatial learning and memory in rats using Morris water maze task. *Behav. Brain Res.* 198, 130–135.
- D'Hooge, R., De Deyn, P.P., 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* 36, 60–90.
- De Sousa, T.B., de Santana, M.A., Silva, A.D., Guzen, F.P., Oliveira, F.G., Cavalcante, J.C., Cavalcante, J.D., Costa, M.S., Nascimento Jr., E.S., 2013. Mediodorsal thalamic nucleus receives a direct input in marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): A subunit B cholera toxin study. *Ann. Anat.* 195 (1) 32–38.
- De Witte, L., Brouns, R., Kavadias, D., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Mariën, P., 2011. Cognitive, affective and behavioural disturbances following vascular thalamic lesions: a review. *Cortex* 47 (3) 273–319.
- Dempsey, E.W., Morison, R.S., 1942. The production of rhythmically cortical recurrent potentials after localized thalamic stimulation. *Am. J. Physiol.* 135, 293–300.
- Deschênes, M., Veinante, P., Zhang, Z.W., 1998. The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res. Rev.* 28, 286–308.
- Dias, R., Aggleton, J.P., 2000. Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioral flexibility. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4457–4466.
- Diekelmann, S., Born, J., 2010. The memory function of sleep. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 114–126.
- Diekelmann, S., Büchel, C., Born, J., Rasch, B., 2011. Labile or stable: opposing consequences for memory when reactivated during waking and sleep. *Nat. Neurosci.* 14, 381–386.
- Dolleman-van der Weel, M.J., Lopes da Silva, F.H., Witter, M.P., 1997. Reuniens nucleus thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *J. Neurosci.* 17, 5640–5650.
- Dolleman-van der Weel, M.J., Morris, R.G.M., Witter, M.P., 2009. Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of water-maze learning. *Brain Struct. Funct.* 213, 329–342.
- Dolleman-van der Weel, M.J., Witter, M.P., 1996. Projections from the reuniens nucleus thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. *J. Comp. Neurol.* 364, 637–650.

- Dolleman-Van der Weel, M.J., Witter, M.P., 2000. Reunions nucleus thalami innervates γ aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. *Neurosci. Lett.* 278, 145–148.
- Dostrovsky, J.O., Guilbaud, G., 1990. Nociceptive responses in medial thalamus of the normal and arthritic rat. *Pain* 40, 93–104.
- Drexel, M., Preidt, A.P., Kirchmair, E., Sperk, G., 2011. Parvalbumin interneurons and calretinin fibers arising from the thalamic nucleus reunions degenerate in the subiculum after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 189, 316–329.
- Eleore, L., Lopez-Ramos, J.C., Guerra-Narbona, R., Delgado-García, J.M., 2011. Role of reunions nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. *Plos One* 6 (8), e25538, 1–11.
- Erendira Luis-Delgado, O., Barrot, M., Rodeau, J.L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M.J., Lasbennes, F., 2006. Calibrated forceps: a sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J. Pain* 7, 32–39.
- Ferrino, F., Thierry, A., Glowinsky, J., 1987. Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to medial prefrontal cortex. *Exp. Brain Res.* 65, 421–426.
- Floresco, S.B., Braaksma, D.N., Philipps, A.G., 1999. Thalamic-cortical-striatal circuitry subserves working memory during delayed responding on a radial maze. *J. Neurosci.* 19, 11061–11071.
- Floresco, S.B., Seamans, J.K., Philipps, A.G., 1997. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J. Neurosci.* 17, 1880–1890.
- Foster, D.J., Wilson, M.A., 2006. Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. *Nature* 440, 680–683.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 119–130.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., 2009. Fast track to the medial prefrontal cortex. *PNAS* 103, 509–510.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., Silva, A.J., 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881–883.
- Freeman, D.A., Zucker, I., 2001. Refractoriness to melatonin occurs independently at multiple brain sites in Siberian hamsters. *PNAS* 98, 6447–6452.
- Fritts, M.E., Asbury, E.T., Horton, J.E., Isaac, W.L., 1998. Medial prefrontal lesion deficits involving or sparing the prelimbic area in the rat. *Physiol. Behav.* 64 (3), 373–380.
- Gholami, S., Lambert, D., Hoheisel, U., Mense, S., 2006. Effects on c-Fos expression in the PAG and thalamus by selective input via tetrodotoxin-resistant afferent fibres from muscle and skin. *Neurosci. Res.* 56, 270–278.
- Giardino, L., Calza, L., Zanni, M., Velardo, A., Pantaleoni, M., Marrama, P., 1989. Daily modifications of 3H-naloxone binding sites in the rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Chronobiol. Int.* 6 (3), 203–216.
- Gibb, S.J., Wolff, M., Dalrymple-Alford, J.C., 2006. Odour-place paired-associate learning and limbic thalamus: comparison of anterior, lateral and medial thalamic lesions. *Behav. Brain Res.* 172, 155–168.
- Gold, J.J., Squire, L.R., 2006. The anatomy of amnesia: neurohistological analysis of three new cases. *Learn. Mem.* 13, 699–710.
- Groenewegen, H.J., Berendse, H.W., 1994. The specificity of the 'non specific' midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci.* 17, 52–57.
- Groenewegen, H.J., Witter, M.P., 2004. Thalamus. In: Paxinos, G., Paxinos, G. (Eds.), *The Rat Nervous System*, third ed. Elsevier Academic Press, pp. 407–453.
- Hebb, D., 1949. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. Wiley, New York.
- Hembrook, J.R., Mair, R.G., 2011. Lesions of reunions and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21, 815–826.
- Hembrook, J.R., Onos, K.D., Mair, R.G., 2012. Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus* 22, 853–860.
- Herkenham, M., 1978. The connections of the reunions nucleus thalamus: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J. Comp. Neurol.* 177, 589–610.
- Herkenham, M., 1980. Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science* 207, 532–535.
- Herkenham, M., 1986. New perspectives on the organization and evolution of non specific thalamocortical projections. In: Jones, E.G., Peters, A. (Eds.), *Cerebral Cortex*, vol. 5. Plenum, New York, pp. 403–445.
- Hermes, M.L., Renaud, L.P., 2011. Postsynaptic and presynaptic group II metabotropic glutamate receptor activation reduces neuronal excitability in rat midline paraventricular thalamus nucleus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 840–849.
- Hirayasu, Y., Wada, J.A., 1992a. N-methyl-D-aspartate injection into the massa intermedia facilitates development of limbic kindling in rats. *Epilepsia* 33, 965–970.
- Hirayasu, Y., Wada, J.A., 1992b. Convulsive seizures in rats induced by N-methyl-D-aspartate injection into the massa intermedia. *Brain Res.* 577, 36–40.
- Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212 (2), 149–179.
- Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2012. Collateral projections from reunions nucleus of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct. Funct.* 217, 191–209.
- Hurley, K.M., Herbert, H., Moga, M.M., Saper, C.B., 1991. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 308, 249–276.
- Iwasaki, H., Jodo, E., Kawauchi, A., Miki, T., Kayama, Y., Koyama, Y., 2010. Role of the lateral preoptic area and the bed nucleus of stria terminalis in the regulation of penile erection. *Brain Res.* 1357, 70–78.
- Jay, T.M., Burette, F., Laroche, S., 1996. Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses. *J. Physiol. (Paris)* 90, 361–366.
- Jedlicka, P., Hoon, M., Papadopoulos, T., Vlachos, A., Winkels, R., Pouloupoulos, A., Betz, H., Deller, T., Brose, N., Varoqueaux, F., Schwarzacher, S.W., 2011. Increased dentate gyrus excitability in neuroligin-2-deficient mice in vivo. *Cereb. Cortex* 21 (2), 357–367.
- Jinks, A.L., McGregor, I.S., 1997. Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res.* 772, 181–190.
- Jo, Y.S., Park, E.H., Kim, I.H., Park, S.K., Kim, H., Kim, H.T., Choi, J.S., 2007. The medial prefrontal cortex is involved in spatial memory retrieval under partial-cue conditions. *J. Neurosci.* 27, 13567–13578.
- Jones, E.G., 1998. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience* 85, 331–345.
- Jones, E.G., 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci.* 24, 595–601.
- Jones, E.G., 2002. Thalamic organization and function after Cajal. *Prog. Brain Res.* 136, 333–357.
- Jones, E.G., 2007. *The Thalamus*, second ed., vol. 1–2. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones, E.G., 2009. Synchrony in the interconnected circuitry of the thalamus and cerebral cortex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1157, 10–23.
- Karlsson, M.P., Frank, L.M., 2009. Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* 12, 913–918.
- Kolaj, M., Zhang, L., Ronnekleiv, O.K., Renaud, L.P., 2012. Midline thalamic paraventricular nucleus neurons display diurnal variation in resting membrane potentials, conductances, and fiber patterns in vitro. *J. Neurophysiol.* 107 (7), 1835–1844.
- Kril, J.J., Harper, C.G., 2012. Neuroanatomy and neuropathology associated with Korsakoff's syndrome. *Neuropsychol. Rev.* 22, 72–80.
- Krout, K.E., Belzer, R.E., Loewy, A.D., 2002. Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 448, 53–101.
- Krout, K.E., Loewy, A.D., 2000. Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 428, 475–494.
- Lambe, E.K., Aghajanian, G.K., 2003. Hypocretin (orexin) induces calcium transients in single spines postsynaptic to identified thalamocortical boutons in prefrontal slices. *Neuron* 40, 139–150.
- Lambe, E.K., Liu, R.J., Aghajanian, G.K., 2007. Schizophrenia, hypocretin (orexin) and the thalamocortical activating system. *Schizophrenia Bull.* 33, 1284–1290.
- Laroche, S., Davis, S., Jay, T.M., 2000. Plasticity at hippocampal to frontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10, 436–446.
- Laroche, S., Jay, T.M., Thierry, A.M., 1990. Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subiculum region. *Neurosci. Lett.* 114, 184–190.
- Leitner, C., Bartness, T.J., 2011. An intact dorsomedial hypothalamic nucleus, but not the subzone incerta or reunions nucleus, is necessary for short-day melatonin signal-induced responses in Siberian hamsters. *Neuroendocrinology* 93, 29–39.
- Li, Y., Li, S., Sui, N., Kirouac, G.J., 2009. Orexin-A acts in the paraventricular nucleus of the midline thalamus to inhibit locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93, 506–514.
- Li, Y., Li, S., Wei, C., Wang, H., Sui, N., Kirouac, G.J., 2010. Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus mediate anxiety-like responses in rats. *Psychopharmacol. (Berl.)* 212, 251–265.
- Lisman, J.E., 2012. Excitation, inhibition, local oscillations, or large-scale loops: what causes the symptoms of schizophrenia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 537–544.
- Lisman, J.E., Pi, H.J., Zhang, Y., Otmakhova, N.A., 2010. A thalamo-hippocampal-ventral tegmental area loop may produce the positive feedback that underlies the psychotic break in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 68, 17–24.
- Liu, R.J., Aghajanian, G.K., 2008. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *PNAS* 105, 359–364.
- Llinas, R.R., Leznik, E., Urbano, F.J., 2002. Temporal binding via cortical coincidence detection of specific and non specific thalamocortical inputs: a voltage-dependent dye-imaging study in mouse brain slices. *PNAS* 99 (1), 449–454.
- Llinas, R., Paré, D., 1997. Coherent oscillations in specific and non specific thalamocortical networks and their role in cognition. In: Steriade, M. (Ed.), *Thalamus. Experimental and Clinical Aspects*, vol. II. pp. 501–516.
- Llinas, R., Ribary, U., Contreras, D., Pedroarena, C., 1998. The neuronal basis for consciousness. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 353, 1841–1849.
- Llinas, R., Steriade, M., 2006. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J. Neurophysiol.* 95, 3297–3308.
- Lopez, J., Wolff, M., Lecourtier, L., Cosquer, B., Bontempi, B., Dalrymple-Alford, J., Cassel, J.C., 2009. The intralaminar thalamic nuclei contribute to remote spatial memory. *J. Neurosci.* 29, 3302–3306.
- Lopez, J., Herbeaux, K., Cosquer, B., Engeln, M., Muller, C., Lazarus, C., Kelche, C., Bontempi, B., Cassel, J.C., Pereira de Vasconcelos, A., 2012. Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22, 827–841.
- Lorente de No, R., 1938. Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. In: Fulton, J. (Ed.), *Physiology of the Nervous System*. Oxford University Press, London, pp. 291–340.
- Lorenzini, C.A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G., 1996. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res.* 730, 32–39.

- Lorenzini, C.A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, G., 1997. Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response memory trace. *Brain Res.* 768, 242–248.
- Loureiro, M., Cholvin, T., Lopez, J., Merienne, N., Latreche, A., Cosquer, B., Geiger, K., Kelche, C., Cassel, J.C., Pereira de Vasconcelos, A., 2012. The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J. Neurosci.* 32 (29) 9947–9959.
- Maddux, J.M., Holland, P.C., 2011. Effects of dorsal or ventral medial prefrontal cortical lesions on five-choice serial reaction time performance in rats. *Behav. Brain Res.* 221, 63–74.
- Mair, R.G., Burk, J.A., Porter, M.C., 1998. Lesions of the frontal cortex, hippocampus, and intralaminar thalamic nuclei have distinct effects on remembering in rats. *Behav. Neurosci.* 112, 772–792.
- Mair, R.G., Burk, J.A., Porter, M.C., 2003. Impairment of radial maze delayed non-matching after lesions of anterior thalamus and parahippocampal cortex. *Behav. Neurosci.* 117 (3) 596–605.
- Mair, R.G., Hembrook, J.R., 2008. Memory enhancement with event-related stimulation of the rostral intralaminar thalamic nuclei. *J. Neurosci.* 28, 14293–14300.
- Markowitsch, H.J., 1982. Thalamic mediodorsal nucleus and memory: a critical evaluation of studies in animal and man. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6, 351–380.
- Marshuetz, C., Smith, E.E., 2006. Working memory for order information: multiple cognitive and neural mechanisms. *Neuroscience* 139, 195–200.
- Maviel, T., Durkin, T.P., Menzaghi, F., Bontempi, B., 2004. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305, 96–99.
- Maxwell, W.L., MacKinnon, M.A., Smith, D.H., McIntosh, T.K., Graham, D.I., 2006. Thalamic nuclei after human blunt head injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 478–488.
- McDonald, R.J., White, N.M., 1995. Information acquired by the hippocampus interferes with acquisition of the amygdala-based conditioned-cue preference in the rat. *Hippocampus* 5 (3) 189–197.
- McKenna, J.T., Vertes, R.P., 2004. Afferent projections to reuniens nucleus of the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 480, 115–142.
- McNamara, R.K., Skelton, R.W., 1993. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res. Rev.* 18 (1) 33–49.
- Menemeier, M., Fennell, E., Valenstein, E., Heilman, K.M., 1992. Contributions of the left intralaminar and medial thalamic nuclei to memory. *Arch. Neurol.* 49, 1050–1058.
- Merchenthaler, I., Vigh, S., Schally, A.V., Stumpf, W.E., Arimura, A., 1984. Immunocytochemical localization of corticotrophin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the thalamus of the rat. *Brain Res.* 323, 119–122.
- Miller, J.W., Ferrendelli, J.A., 1990. Characterization of GABAergic seizure regulation in the midline thalamus. *Neuropharmacology* 29 (7) 649–655.
- Miller, J.W., Hall, C.M., Holland, K.D., Ferrendelli, J.A., 1989. Identification of a median thalamic system regulating seizures and arousal. *Epilepsia* 30 (4) 493–500.
- Mitchell, A.S., Dalrymple-Alford, J.C., 2005. Dissociable memory effects after medial thalamus lesions in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 22, 973–985.
- Mitchell, A.S., Dalrymple-Alford, J.C., 2006. Lateral and anterior thalamic lesions impair independent memory systems. *Learn. Mem.* 13, 388–396.
- Möller, M., Born, J., 2011. Slow oscillations orchestrating fast oscillations and memory consolidation. *Prog. Brain Res.* 193, 93–110.
- Morales, G.J., Ramcharan, E.J., Sundararaman, N., Morgera, S.D., Vertes, R., 2007. Analysis of the actions of reuniens nucleus and the entorhinal cortex on EEG and evoked population behaviour of the hippocampus. In: Conference Proceedings of IEEE Engineering in Medicine Biol. Soc. 2007, pp. 2480–2484.
- Moreau, P.H., Tsenkina, Y., Lecourtier, L., Lopez, J., Cosquer, B., Wolff, M., Dalrymple-Alford, J.C., Cassel, J.C., 2013. Lesions of the anterior thalamic nuclei and intralaminar thalamic nuclei: place and visual discrimination learning in the water maze. *Brain Struct. Funct.* 218 (3) 657–667.
- Morison, R.S., Dempsey, E.W., 1942. A study of thalamo-cortical relations. *Am. J. Physiol.* 135, 281–292.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11 (1) 47–60.
- Muir, J.L., Everitt, B.J., Robbins, T.W., 1996. The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task. *Cereb. Cortex* 6 (3) 470–481.
- Nascimento Jr., E.S., Cavalcante, J.S., Cavalcante, J.C., Costa, M.S.M.O., 2010. Retinal afferents to the thalamic mediodorsal nucleus in the rock cavy (*Kerodon rupestris*). *Neurosci. Lett.* 475, 38–43.
- Ness, T.J., 2000. Evidence for ascending visceral nociceptive information in the dorsal midline and lateral spinal cord. *Pain* 87, 83–88.
- Newman, L.A., Burk, J.A., 2005. Effects of excitotoxic thalamic intralaminar nuclei lesions on attention and working memory. *Behav. Brain Res.* 162, 264–271.
- Newman, J., Grace, A.A., 1999. Binding across time: the selective gating of frontal and hippocampal systems modulating working memory and attentional states. *Conscious Cogn.* 8, 196–212.
- Ohtake, T., Yamada, F., 1989. Efferent connections of the reuniens nucleus and the rhomboid nucleus in the rat: an anterograde PHA-L tracing study. *Neurosci. Res.* 6, 556–568.
- Otake, K., Nakamura, Y., 1998. Single midline thalamic neurons projecting to both the ventral striatum and the prefrontal cortex in the rat. *Neuroscience* 86, 635–649.
- Ouallian, C., Gisquet-Verrier, P., 2010. The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioral flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task. *Learn. Mem.* 17 (12) 654–668.
- Paine, T.A., Neve, R.L., Carlezon Jr., W.A., 2009. Attention deficits and hyperactivity following inhibition of cAMP-dependent protein kinase within the medial prefrontal cortex of rats. *Neuropsychopharmacology* 34, 2143–2155.
- Patel, S., Millan, M.H., Meldrum, B.S., 1988. Decrease in excitatory transmission within the lateral habenula and the mediodorsal thalamus protects against limbic seizures in rats. *Exp. Neurol.* 101 (1) 63–74.
- Pergola, G., Güntürkün, O., Koch, B., Schwarz, M., Daum, I., Suchan, B., 2012. Recall deficits in stroke patients with thalamic lesions covary with damage to the parvocellular mediodorsal nucleus of the thalamus. *Neuropsychologia* 50, 2477–2491.
- Peyron, C., Tighe, D.K., Van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., Kilduff, T.S., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996–10015.
- Pol-Bodetto, S., Jeltsch-David, H., Lecourtier, L., Rusnac, N., Mam Lam Fook, C., Cosquer, B., Geiger, K., Cassel, J.C., 2011. The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav. Brain Res.* 218, 138–151.
- Porter, M.C., Burk, J.A., Mair, R.G., 2000. A comparison of the effects of hippocampal and prefrontal cortical lesions on three versions of delayed non-matching-to-sample based on positional or spatial cues. *Behav. Brain Res.* 109, 69–81.
- Porter, M.C., Mair, R.G., 1997. The effects of frontal cortical lesions on remembering depend on the procedural demands of tasks performed in the radial arm maze. *Behav. Brain Res.* 87, 115–125.
- Prasad, J.A., MacGregor, E.M., Chudasama, Y., 2013. Lesions of the thalamic reuniens cause impulsive but not compulsive responses. *Brain Struct. Funct.* 218 (1) 85–96.
- Purvis, C.C., Duncan, M.J., 1997. Discrete thalamic lesions attenuate winter adaptations and increase body weight. *Am. J. Physiol.* 273, R226–R235.
- Ragozzino, M.E., Detrick, S., Kesner, R.P., 1999. Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *J. Neurosci.* 19 (11) 4585–4594.
- Ragozzino, M.E., Kim, J., Hassert, D., Minniti, N., Kiang, C., 2003. The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behav. Neurosci.* 117 (5) 1054–1065.
- Rassnick, S., Hoffman, G.E., Rabin, B.S., Sved, A.F., 1998. Injection of corticotrophin-releasing hormone into the locus coeruleus or foot shock increases neuronal Fos expression. *Neuroscience* 85, 259–268.
- Ren, Y., Zhang, L., Yang, H., Westlund, K.N., 2009. Central lateral thalamic neurons receive noxious visceral mechanical and chemical input in rats. *J. Neurophysiol.* 102, 244–258.
- Robbins, T.W., 2002. The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology* 163, 362–380.
- Sakurai, T., 2007. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 171–181.
- Savage, L.M., Hall, J.M., Resende, L.S., 2012. Translational rodent models of Korsakoff syndrome reveal the critical neuroanatomical substrates of memory dysfunction and recovery. *Neuropsychol. Rev.* 22 (2) 195–209.
- Savage, L.M., Hall, J.M., Vetreno, R.P., 2011. Anterior thalamic lesions alter both hippocampal-dependent behavior and hippocampal acetylcholine release in the rat. *Learn. Mem.* 18 (12) 751–758.
- Schmahmann, J.D., 2003. Vascular syndromes of the thalamus. *Stroke* 34, 2264–2278.
- Schobel, S.A., Lewandowski, N.M., Corcoran, C.M., Moore, H., Brown, T., Malaspina, D., Small, S.A., 2009. Differential targeting of the CA1 subfield of the hippocampal formation by schizophrenia and related psychotic disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 938–946.
- Seamans, J.K., Floresco, S.B., Philipps, A.G., 1995. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions in the rat prefrontal cortex. *Behav. Neurosci.* 109, 1063–1073.
- Seamans, J.K., Floresco, S.B., Philipps, A.G., 1998. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. *J. Neurosci.* 18, 1613–1621.
- Séquier, J.M., Hunziker, W., Andressen, C., Celio, M.R., 1990. Cabindin D-28K proteins and mRNA localization in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 2, 1118–1126.
- Serra, L., Cercignani, M., Carlessimo, G., Fadda, L., Tini, N., Giulietti, G., Caltagirone, C., Bozzali, M., 2013. Connectivity-based parcellation of the thalamus explains specific cognitive and behavioural symptoms in patients with bilateral thalamic infarct. *Plos One* 8 (6) e64578, 1–9.
- Sesack, S.R., Deutch, A.Y., Roth, R.H., Bunney, B.S., 1989. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 290 (2) 213–242.
- Shires, K.L., Aggleton, J.P., 2008. Mapping immediate-early gene activity in the rat after place learning in a water-maze: the importance of matched control conditions. *Eur. J. Neurosci.* 38 (5) 982–996.
- Shrivalkar, P., Seth, M., Schiff, N.D., Herrera, D.G., 2006. Cognitive enhancement with central thalamic electrical stimulation. *PNAS* 103, 17007–17012.
- Silva, A.J., Giese, K.P., Fedorov, N.B., Frankland, P.W., Kogan, J.H., 1998. Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 70, 44–61.
- Sirota, A., Csicsvari, J., Buhl, D., Buzsáki, G., 2003. Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *PNAS* 100, 2065–2067.

- Squire, L., 2009. Memory and brain systems: 1969–2009. *J. Neurosci.* 29, 12711–12716.
- Squire, L.R., Amaral, D.G., Zola-Morgan, S., Kritchevsky, M., Press, G., 1989. Description of brain injury in the amnesic patient N.A. based on magnetic resonance imaging. *Exp. Neurol.* 105 (1) 23–35.
- Su, H.S., Bentivoglio, M., 1990. Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 297, 582–593.
- Swanson, L.W., 1981. A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.* 217, 150–154.
- Swanson, L.W., 2004. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Elsevier, New York.
- Tang, J.S., Qu, C.L., Huo, F.Q., 2009. The thalamic nucleus submedius and ventrolateral orbital cortex are involved in nociceptive modulation: a novel pain modulation pathway. *Prog. Neurobiol.* 89, 383–389.
- Takita, M., Izaki, Y., Jay, T.M., Kaneko, H., Suzuki, S.S., 1999. Induction of stable long-term depression in vivo in the hippocampal-prefrontal cortex pathway. *Eur. J. Neurosci.* 11, 4145–4148.
- Teixeira, C.M., Pomedli, S.R., Maei, H.R., Kee, N., Frankland, P.W., 2006. Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *J. Neurosci.* 26, 7555–7564.
- Terry Jr., A.V., 2009. Spatial navigation (water maze) tasks. In: Buccafusco, J.J. (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, second ed. CRC Press, Boca Raton (FL), p. 360.
- Teubner, B.J., Freeman, D.A., 2007. Different neural melatonin-target tissues are critical for encoding and retrieving day length information in Siberian hamsters. *J. Neuroendocrinol.* 19, 102–108.
- Teubner, B.J., Smith, C.D., Freeman, D.A., 2008. Multiple melatonin target tissues mediate termination of photorefractoriness by long day lengths in Siberian hamsters. *J. Biol. Rhythms* 23, 502–510.
- Thierry, A.M., Gioanni, Y., Dégénétais, E., Glowinsky, J., 2000. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 1, 411–419.
- Vaisanen, J., Ihalainen, J., Tanila, H., Castren, E., 2004. Effects of NMDA-receptor antagonist treatment on c-Fos expression in rat brain areas implicated in schizophrenia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24, 769–779.
- Van Der Werf, Y.D., Weerts, J.G., Jolles, J., Witter, M.P., Lindeboom, J., Sheltens, P., 1999. Neuropsychological correlates of a right unilateral lacunar thalamic infarction. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 36–42.
- Van Der Werf, Y.D., Witter, M.P., Groenewegen, H.J., 2002. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res. Rev.* 39, 107–140.
- Van Der Werf, Y.D., Jolles, J., Witter, M.P., Uylings, H.B.M., 2003a. Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex* 39, 1047–1062.
- Van der Werf, Y.D., Scheltens, P., Lindeboom, J., Witter, M.P., Uylings, H.B., Jolles, J., 2003b. Deficits of memory, executive functioning and attention following infarction in the thalamus; a study of 22 cases with localised lesions. *Neuropsychologia* 41, 1330–1344.
- Van Der Werf, Y.D., Witter, M.P., Uylings, H.B.M., Jolles, J., 2000. Neuropsychology of infarction in the thalamus: a review. *Neuropsychologia* 38, 613–627.
- Vanderwolf, C.H., Leung L-W, Cooley, R.K., 1985. Pathways through cingulate, neo and entorhinal cortices mediate atropine-resistant hippocampal rhythmic slow activity. *Brain Res.* 347, 58–73.
- Vann, S.D., Brown, M.W., Aggleton, J.P., 2000. Fos expression on the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests. *Neuroscience* 101, 983–991.
- Varela, C., Kumar, S., Yang, J.Y., Wilson, M.A., 2013. Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Struct. Funct.*, in press.
- Venero, J.L., Hefti, F., Beck, K.D., 1995. Retrograde transport of nerve growth factor from hippocampus and amygdala to trkA messenger RNA expressing neurons in paraventricular and reuniens nuclei of the thalamus. *Neuroscience* 64, 855–860.
- Vertes, R.P., 2002. Analysis of the projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on reuniens nucleus. *J. Comp. Neurol.* 442, 163–187.
- Vertes, R.P., 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51, 32–58.
- Vertes, R.P., 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142, 1–20.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Do Valle, A.C., Sherman, A., Rodriguez, J.J., 2006. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the Rat. *J. Comp. Neurol.* 499, 768–796.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Rodriguez, J.J., 2012. Projections of the central medial nucleus of the thalamus in the rat: node in cortical, striatal and limbic forebrain circuitry. *Neuroscience* 219, 120–136.
- Vertes, R.P., Hoover, W.B., Szigeti-Buck, K., Leranth, C., 2007. Reuniens nucleus of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res. Bull.* 71, 601–609.
- Vertes, R.P., Linley, S.B., Hoover, W.B., 2010. Pattern of distribution of serotonergic fibers to the thalamus of the rat. *Brain Struct. Funct.* 215, 1–28.
- Viana Di Prisco, G., Vertes, R.P., 2006. Excitatory actions of the ventral midline thalamus (Rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60, 45–55.
- Wang, G.X., Cai, J.X., 2008. Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 365–373.
- Warburton, E.C., Baird, A.L., Morgan, A., Muir, J.L., Aggleton, J.P., 2001. The conjoint importance of the hippocampus and anterior thalamic nuclei for allocentric spatial learning: evidence from a disconnection study in the rat. *J. Neurosci.* 21, 7323–7330.
- Whishaw, I.Q., Cassel, J.C., Jarrard, L., 1995. Rats with fimbria-fornix lesions display a place response in a swimming pool: A distinction between getting there and knowing where. *J. Neurosci.* 15, 5779–5788.
- Wilmot, C.A., Sullivan, A.C., Levin, B.E., 1988. Effects of diet and obesity on brain alpha1- and alpha2-noradrenergic receptors in the rat. *Brain Res.* 453, 157–166.
- Wilson, H.D., Uhelski, M.L., Fuchs, P.N., 2008. Examining the role of the medial thalamus in modulating the affective dimension of pain. *Brain Res.* 1229, 90–99.
- Wiltgen, B.J., Zhou, M., Cai, Y., Balaji, J., Karlsson, M.G., Parivash, S.N., Li, W., Silva, A.J., 2010. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. *Curr. Biol.* 20, 1336–1344.
- Winsky, L., Montpied, P., Arai, R., Martin, B.M., Jacobowitz, D.M., 1992. Calretinin distribution in the thalamus of the rat: immunohistochemical and in situ hybridization histochemical analyses. *Neuroscience* 50, 181–196.
- Witter, M.P., Ostendorf, R.H., Groenewegen, H.J., 1990. heterogeneity in the dorsal subiculum of the rat: distinct neuronal zones project to different cortical and subcortical targets. *Eur. J. Neurosci.* 2, 718–725.
- Witter, M.P., Van Hoesen, G.W., Amaral, D.G., 1989. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J. Neurosci.* 9 (1) 216–228.
- Wolff, M., Gibb, S.J., Dalrymple-Alford, J.C., 2006. Beyond spatial memory: the anterior thalamus and memory for the temporal order of a sequence of odor cues. *J. Neurosci.* 26, 2907–2913.
- Wolff, M., Gibb, S.J., Cassel, J.C., Dalrymple-Alford, J.C., 2008. Anterior but not intralaminar thalamic nuclei support allocentric spatial memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 71–80.
- Wouterlood, F.G., 1991. Innervation of entorhinal principal cells by neurons of the reuniens nucleus thalami. Anterograde PHA-L Tracing Combined with Retrograde Fluorescent Tracing and Intracellular Injection with Lucifer Yellow in the Rat. *Eur. J. Neurosci.* 3 (7) 641–647.
- Wouterlood, F.G., Saldana, E., Witter, M.P., 1990. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 296, 179–203.
- Yasoshima, Y., Scott, T.R., Yamamoto, T., 2007. Differential activation of anterior and midline thalamic nuclei following retrieval of aversively motivated learning tasks. *Neuroscience* 146, 922–930.
- Xu, W., Morishita, W., Buckmaster, P.S., Pang, Z.P., Malenka, R.C., Südhof, T.C., 2012. Distinct neuronal coding schemes in memory revealed by selective erasure of fast synchronous synaptic transmission. *Neuron* 73 (5) 990–1001.
- Xu, W., Südhof, T.C., 2013. A neural circuit for memory specificity and generalization. *Science* 339, 1290–1295.
- Zhang, D.X., Bertram, E.H., 2002. Midline thalamic region: widespread excitatory input to the entorhinal cortex and amygdala. *J. Neurosci.* 22, 3277–3284.
- Zhang, Y., Fukushima, H., Kida, S., 2011. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol. Brain* 4 (4) 1–11.
- Zhang, Y., Yoshida, T., Katz, D.B., Lisman, J.E., 2012. NMDAR antagonist action in thalamus imposes delta oscillations on the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 107, 3181–3189.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE**-A-**

Addis DR, Moscovitch M, Crawley AP, McAndrews MP (2004) Recollective qualities modulate hippocampal activation during autobiographical memory retrieval. *Hippocampus* 14:752–762.

Aggleton JP (2008) Understanding anterograde amnesia: Disconnections and hidden lesions. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology* 61:1441–1471.

Aggleton JP (2014) Looking beyond the hippocampus: old and new neurological targets for understanding memory disorders. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281:20140565–20140565.

Aggleton JP, Dumont JR, Warburton EC (2011) Unraveling the contributions of the diencephalon to recognition memory: A review. *Learning & Memory* 18:384–400.

Agranoff BW, Davis RE, Brink JJ (1966) Chemical studies on memory fixation in goldfish. *Brain Res* 1:303–309.

Alberini CM (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences* 28:51–56.

Alberini CM (2008) The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiology of learning and memory* 89:234–246.

Allen TA, Narayanan NS, Kholodar-Smith DB, Zhao Y, Laubach M, Brown TH (2008) Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. *Journal of neuroscience methods* 171:30–38.

Alvarez P (2001) Differential Effects of Damage within the Hippocampal Region on Memory for a Natural, Nonspatial Odor-Odor Association. *Learning & Memory* 8:79–86.

Andersen P (2007) *The hippocampus book*. Oxford; New York: Oxford University Press.

Anderson AK, Phelps EA (2001) Lesions of the human amygdala impair enhanced perception of emotionally salient events. *Nature* 411:305–309.

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

Arnold DH, Johnston A (2003) Motion-induced spatial conflict. *Nature* 425:181–184.

-B-

Baddeley A (2000) The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends in cognitive sciences* 4:417–423.

BIBLIOGRAPHIE

Bailey KR, Mair RG (2004) Dissociable Effects of Frontal Cortical Lesions on Measures of Visuospatial Attention and Spatial Working Memory in the Rat. *Cerebral Cortex* 14:974–985.

Balderas I, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F (2013) Retrieval and reconsolidation of object recognition memory are independent processes in the perirhinal cortex. *Neuroscience* 253:398–405.

Ballarini F, Moncada D, Martinez MC, Alen N, Viola H (2009) Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:14599–14604.

Barbosa FF, Santos JR, Meurer YSR, Macêdo PT, Ferreira LMS, Pontes IMO, Ribeiro AM, Silva RH (2013) Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7:112.

Bari A, Dalley JW, Robbins TW (2008) The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nature Protocols* 3:759–767.

Bari A, Robbins TW (2013) Inhibition and impulsivity: Behavioral and neural basis of response control. *Progress in Neurobiology* 108:44–79.

Barry DN, Commins S (2011) Imaging spatial learning in the brain using immediate early genes: insights, opportunities and limitations. *Reviews in the Neurosciences* 22(2):131-42.

Bayley PJ, Gold JJ, Hopkins RO, Squire LR (2005) The Neuroanatomy of Remote Memory. *Neuron* 46:799–810.

Bentivoglio M, Balercia G, Kruger L (1991) The specificity of the nonspecific thalamus: the midline nuclei. *Prog Brain Res* 87:53–80.

Bernstein JG, Boyden ES (2011) Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior. *Trends in Cognitive Sciences* 15:592–600.

Bertram EH, Zhang DX (1999) Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92:15–26.

Bird CM, Burgess N (2008) The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature Reviews Neuroscience* 9:182–194.

Bissonette GB, Powell EM, Roesch MR (2013) Neural structures underlying set-shifting: Roles of medial prefrontal cortex and anterior cingulate cortex. *Behavioural Brain Research* 250:91–101.

Blum S, Hebert AE, Dash PK (2006) A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport* 17:341–344.

Boehnke SE, Rasmusson DD (2001) Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *Journal of neuroscience methods* 105:133–141.

BIBLIOGRAPHIE

Bokor H, Csaki A, Kocsis K, Kiss J (2002) Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat. *European Journal of Neuroscience* 16:1227–1239.

Bolhuis JJ, Stewart CA, Forrest EM (1994) Retrograde amnesia and memory reactivation in rats with ibotenate lesions to the hippocampus or subiculum. *Q J Exp Psychol B* 47:129–150.

Bonnici HM, Chadwick MJ, Lutti A, Hassabis D, Weiskopf N, Maguire EA (2012) Detecting Representations of Recent and Remote Autobiographical Memories in vmPFC and Hippocampus. *Journal of Neuroscience* 32:16982–16991.

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

Borroni AM, Fichtenholtz H, Woodside BL, Teyler TJ (2000) Role of voltage-dependent calcium channel long-term potentiation (LTP) and NMDA LTP in spatial memory. *The Journal of Neuroscience* 20:9272–9276.

Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2006) Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learning & Memory* 13:187–191.

Brown VJ, Bowman EM (2002) Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends Neurosci* 25:340–343.

Buckner RL, Carroll DC (2007) Self-projection and the brain. *Trends in Cognitive Sciences* 11:49–57.

Burgess N (2006) Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. *Trends in Cognitive Sciences* 10:551–557.

Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002) The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35:625–641.

Buritova J, Besson J-M (1999) Expression de la protéine c-Fos dans la corne dorsale de la moelle épinière: une technique pour étudier certains aspects physiopharmacologiques de la nociception. *Med Sci (Paris)*, 1999, Vol. 15, N° 10; p.1126-34.

Burk JA, Mair RG (2001) Effects of intralaminar thalamic lesions on sensory attention and motor intention in the rat: a comparison with lesions involving frontal cortex and hippocampus. *Behavioural brain research* 123:49–63.

Bush D, Barry C, Burgess N (2014) What do grid cells contribute to place cell firing? *Trends in Neurosciences* 37:136–145.

Bussolino DF, Guido ME, Gil GA, Borioli GA, Renner ML, Grabois VR, Conde CB, Caputto BL (2001) c-Fos associates with the endoplasmic reticulum and activates phospholipid metabolism. *The FASEB Journal* 15:556–558.

Buzsáki G (1991) The thalamic clock: emergent network properties. *Neuroscience* 41:351–364.

Buzsáki G, Moser EI (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature Neuroscience* 16:130–138.

-C-

Carlesimo GA, Lombardi MG, Caltagirone C (2011) Vascular thalamic amnesia: A reappraisal. *Neuropsychologia* 49:777–789.

Carr MF, Jadhav SP, Frank LM (2011) Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nature Neuroscience* 14:147–153.

Carvalho-Netto EF, Martinez RCR, Baldo MVC, Canteras NS (2010) Evidence for the thalamic targets of the medial hypothalamic defensive system mediating emotional memory to predatory threats. *Neurobiology of Learning and Memory* 93:479–486.

Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A, Loureiro M, Cholvin T, Dalrymple-Alford JC, Vertes RP (2013) The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Progress in Neurobiology* 111:34–52.

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

Chudasama Y, Doobay VM, Liu Y (2012) Hippocampal-Prefrontal Cortical Circuit Mediates Inhibitory Response Control in the Rat. *Journal of Neuroscience* 32:10915–10924.

Chudasama Y, Passetti F, Rhodes SE., Lopian D, Desai A, Robbins T. (2003) Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. *Behavioural Brain Research* 146:105–119.

Churchwell JC, Kesner RP (2011) Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: Interactions and independent parallel processing. *Behavioural Brain Research* 225:389–395.

Cipolotti L, Shallice T, Chan D, Fox N, Scahill R, Harrison G, Stevens J, Rudge P (2001) Long-term retrograde amnesia... the crucial role of the hippocampus. *Neuropsychologia* 39:151–172.

Clark RE, Broadbent NJ, Squire LR (2005) Hippocampus and remote spatial memory in rats. *Hippocampus* 15:260–272.

Clayton NS, Salwiczek LH, Dickinson A (2007) Episodic memory. *Current Biology* 17:R189–R191.

Clementz BA, Sponheim SR, Iacono WG, Beiser M (1994) Resting EEG in first-episode schizophrenia patients, bipolar psychosis patients, and their first-degree relatives. *Psychophysiology* 31:486–494.

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

Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA (2008) Leukemic Cells Create Bone Marrow Niches That Disrupt the Behavior of Normal Hematopoietic Progenitor Cells. *Science* 322:1861–1865.

Corkin S (2002) What's new with the amnesic patient HM? *Nature Reviews Neuroscience* 3:153–160.

Cosquer B, Galani R, Kuster N, Cassel J-C (2005) Whole-body exposure to 2.45GHz electromagnetic fields does not alter anxiety responses in rats: a plus-maze study including test validation. *Behavioural Brain Research* 156:65–74.

Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477–505.

-D-

D'Hooge R, De Deyn PP (2001a) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36:60–90.

D'Hooge R, De Deyn PP (2001b) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36:60–90.

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28:771–784.

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

Davoodi FG, Motamedi F, Naghdi N, Akbari E (2009) Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on spatial learning and memory in rats using Morris water maze task. *Behavioural Brain Research* 198:130–135.

De Bruin JP, Sánchez-Santed F, Heinsbroek RP, Donker A, Postmes P (1994) A behavioural analysis of rats with damage to the medial prefrontal cortex using the Morris water maze: evidence for behavioural flexibility, but not for impaired spatial navigation. *Brain Res* 652:323–333.

De Witte L, Brouns R, Kavadias D, Engelborghs S, De Deyn PP, Mariën P (2011) Cognitive, affective and behavioural disturbances following vascular thalamic lesions: A review. *Cortex* 47:273–319.

Dempsey EWM, Robert S. (1941) THE PRODUCTION OF RHYTHMICALLY RECURRENT CORTICAL POTENTIALS AFTER LOCALIZED THALAMIC STIMULATION. *American Journal of Physiology -- Legacy Content* 135:293–300.

Depue BE (2012) A neuroanatomical model of prefrontal inhibitory modulation of memory retrieval. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 36:1382–1399.

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

BIBLIOGRAPHIE

Di Prisco GV, Vertes RP (2006) Excitatory actions of the ventral midline thalamus (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60:45–55.

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

Diekelmann S, Büchel C, Born J, Rasch B (2011) Labile or stable: opposing consequences for memory when reactivated during waking and sleep. *Nature Neuroscience* 14:381–386.

Ding HK, Teixeira CM, Frankland PW (2008) Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory* 15:290–293.

Dolleman-Van der Weel MJ, Da Silva FL, Witter MP (1997) Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *The Journal of neuroscience* 17:5640–5650.

Dolleman-van der Weel MJ, Morris RGM, Witter MP (2009) Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Structure and Function* 213:329–342.

Dolleman-Van Der Weel MJ, Witter MP (1996) Projections from the nucleus reuniens thalami to the entorhinal cortex, hippocampal field CA1, and the subiculum in the rat arise from different populations of neurons. *J Comp Neurol* 364:637–650.

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

Duvarci S (2004) Characterization of Fear Memory Reconsolidation. *Journal of Neuroscience* 24:9269–9275.

-E-

Edeline J (2002) Muscimol Diffusion after Intracerebral Microinjections: A Reevaluation Based on Electrophysiological and Autoradiographic Quantifications. *Neurobiology of Learning and Memory* 78:100–124.

Eichenbaum H (2001) The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behavioural brain research* 127:199–207.

Ekstrom AD, Caplan JB, Ho E, Shattuck K, Fried I, Kahana MJ (2005) Human hippocampal theta activity during virtual navigation. *Hippocampus* 15:881–889.

Eleore L, López-Ramos JC, Guerra-Narbona R, Delgado-García JM (2011) Role of Reuniens Nucleus Projections to the Medial Prefrontal Cortex and to the Hippocampal Pyramidal CA1 Area in Associative Learning. *PLoS ONE* 6:e23538.

Ellenbogen JM, Hulbert JC, Stickgold R, Dinges DF, Thompson-Schill SL (2006) Interfering with Theories of Sleep and Memory: Sleep, Declarative Memory, and Associative Interference. *Current Biology* 16:1290–1294.

Eustache F, Desgranges B (2008a) MNESIS: Towards the Integration of Current Multisystem Models of Memory. *Neuropsychology Review* 18:53–69.

Eustache F, Desgranges B (2008b) Vers un modèle unifié de la mémoire. *Cerveau et Psycho* 28, Juillet-Août 2008.

Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL (2012) The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. *Neuron* 76:1057–1070.

-F-

Fanselow MS, Dong H-W (2010) Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron* 65:7–19.

Feldman LA, Shapiro ML, Nalbantoglu J (2010) A novel, rapidly acquired and persistent spatial memory task that induces immediate early gene expression. *Behavioral and Brain Functions* 6:35.

Ferretti V, Rouillet P, Sargolini F, Rinaldi A, Perri V, Del Fabbro M, Costantini VJ, Annesse V, Scesa G, De Stefano ME, others (2010) Ventral striatal plasticity and spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:7945–7950.

Floresco SB, Block AE, Tse MTL (2008) Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behavioural Brain Research* 190:85–96.

Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG (1997) Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *The Journal of neuroscience* 17:1880–1890.

Florian C, Rouillet P (2004) Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behavioural Brain Research* 154:365–374.

Frankland PW (2004) The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. *Science* 304:881–883.

Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6:119–130.

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

Frey U, Morris RG (1998) Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends in neurosciences* 21:181–188.

Funahashi S (2006) Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience* 139:251–261.

-G-

Gabbott PL., Warner TA, Jays PR., Bacon SJ (2003) Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Research* 993:59–71.

Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of Comparative Neurology* 492:145–177.

Gilmartin MR, Kwapis JL, Helmstetter FJ (2012) Trace and contextual fear conditioning are impaired following unilateral microinjection of muscimol in the ventral hippocampus or amygdala, but not the medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* 97:452–464.

Gonzalez C, Kramar C, Garagoli F, Rossato JI, Weisstaub N, Cammarota M, Medina JH (2013) Medial prefrontal cortex is a crucial node of a rapid learning system that retrieves recent and remote memories. *Neurobiology of Learning and Memory* 103:19–25.

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

Goshen I (2014) The optogenetic revolution in memory research. *Trends in Neurosciences* pii: S0166-2236(14)00099-X.

Grant DA, Berg EA (1948) A behavioral analysis of degree of reinforcement and ease of shifting to new responses in a Weigl-type card-sorting problem. *J Exp Psychol* 38:404–411.

Groenewegen HJ, Berendse HW (1994) The specificity of the “nonspecific” midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci* 17:52–57.

Groenewegen HJ, Witter MP (2004) Thalamus. In: Paxinos, the Rat Nervous System, third ed.

Gulinello M, Gertner M, Mendoza G, Schoenfeld BP, Oddo S, LaFerla F, Choi CH, McBride SMJ, Faber DS (2009) Validation of a 2-day water maze protocol in mice. *Behavioural Brain Research* 196:220–227.

Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *The Journal of Neuroscience* 21:5089–5098.

-H-

Haddon JE, Killcross S (2011) Inactivation of the infralimbic prefrontal cortex in rats reduces the influence of inappropriate habitual responding in a response-conflict task. *Neuroscience* 199:205–212.

Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M-B, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801–806.

BIBLIOGRAPHIE

- Hallock HL, Arreola AC, Shaw CL, Griffin AL (2013a) Dissociable roles of the dorsal striatum and dorsal hippocampus in conditional discrimination and spatial alternation T-maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory* 100:108–116.
- Hallock HL, Wang A, Shaw CL, Griffin AL (2013b) Transient inactivation of the thalamic nucleus reuniens and rhomboid nucleus produces deficits of a working-memory dependent tactile-visual conditional discrimination task. *Behavioral Neuroscience* 127:860–866.
- Hebb DO (1949) *Organization of behavior: a neuropsychological theory*.
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27:555–579.
- Hembrook JR, Mair RG (2011) Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21(8):815–26.
- Hembrook JR, Onos KD, Mair RG (2012) Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus* 22:853–860.
- Henke K (2010) A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nature Reviews Neuroscience* 11:523–532.
- Herry C, Ciocchi S, Senn V, Demmou L, Müller C, Lüthi A (2008) Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature* 454:600–606.
- Hiller--Sturmhofel S, Swartzwelder HS (2004) Alcohol's effects on the adolescent brain: What can be learned from animal models. *Alcohol Research and Health* 28(4):213–221.
- Hok V, Chah E, Save E, Poucet B (2013) Prefrontal Cortex Focally Modulates Hippocampal Place Cell Firing Patterns. *Journal of Neuroscience* 33:3443–3451.
- Hok V, Lenck-Santini P-P, Roux S, Save E, Muller RU, Poucet B (2007) Goal-Related Activity in Hippocampal Place Cells. *Journal of Neuroscience* 27:472–482.
- Hok V, Save E, Lenck-Santini PP, Poucet B (2005) Coding for spatial goals in the prelimbic/infralimbic area of the rat frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4602–4607.
- Holt W, Maren S (1999) Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *The Journal of neuroscience* 19:9054–9062.
- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Structure and Function* 212:149–179.
- Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Structure and Function* 217:191–209.

Hsu DT, Price JL (2007) Midline and intralaminar thalamic connections with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. *The Journal of Comparative Neurology* 504:89–111.

-I-

Izquierdo LA, Barros DM, da Costa JC, Furini C, Zinn C, Cammarota M, Bevilaqua LR, Izquierdo I (2007) A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 88:160–166.

-J-

Jacobs NS, Allen TA, Nguyen N, Fortin NJ (2013) Critical Role of the Hippocampus in Memory for Elapsed Time. *Journal of Neuroscience* 33:13888–13893.

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

Jay TM, Burette F, Laroche S (1996) Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses. *Journal of Physiology-Paris* 90:361–366.

Jenkins JG, Dallenbach KM (1924) Obliviscence during Sleep and Waking. *The American Journal of Psychology* 35:605.

Ji D, Wilson MA (2007) Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. *Nature Neuroscience* 10:100–107.

Jo YS, Park EH, Kim IH, Park SK, Kim H, Kim HT, Choi J-S (2007) The Medial Prefrontal Cortex Is Involved in Spatial Memory Retrieval under Partial-Cue Conditions. *Journal of Neuroscience* 27:13567–13578.

Jones BE (2003) Arousal systems. *Front Biosci* 8:438–451.

Jones EG (2001) The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends in neurosciences* 24:595–601.

Jones MW, Wilson MA (2005) Theta Rhythms Coordinate Hippocampal–Prefrontal Interactions in a Spatial Memory Task. *PLoS Biology* 3:e402.

Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL (1994) Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *The Journal of neuroscience* 14:7347–7356.

-K-

Kahana MJ, Sekuler R, Caplan JB, Kirschen M, Madsen JR (1999) Human theta oscillations exhibit task dependence during virtual maze navigation. *Nature* 399:781–784.

BIBLIOGRAPHIE

Kampa D, Cheng J, Kapranov P, Yamanaka M, Brubaker S, Cawley S, Drenkow J, Piccolboni A, Bekiranov S, Helt G, others (2004) Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome research* 14:331–342.

Kapur N (1993) Focal retrograde amnesia in neurological disease: a critical review. *Cortex* 29:217–234.

Kapur N, Brooks DJ (1999) Temporally-specific retrograde amnesia in two cases of discrete bilateral hippocampal pathology. *Hippocampus* 9:247–254.

Kjelstrup KB, Solstad T, Brun VH, Hafting T, Leutgeb S, Witter MP, Moser EI, Moser M-B (2008) Finite Scale of Spatial Representation in the Hippocampus. *Science* 321:140–143.

Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675–677.

Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani R, Certa U, Cassel J-C (2009) Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* 19:800–816.

Kopelman MD (2002) Disorders of memory. *Brain* 125:2152–2190.

Kril JJ, Harper CG (2012) Neuroanatomy and Neuropathology Associated with Korsakoff's Syndrome. *Neuropsychology Review* 22:72–80.

Krout KE, Belzer RE, Loewy AD (2002) Brainstem projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 448:53–101.

Krout KE, Loewy AD (2000) Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 428:475–494.

-L-

Lacroix L, White I, Feldon J (2002) Effect of excitotoxic lesions of rat medial prefrontal cortex on spatial memory. *Behav Brain Res* 133:69–81.

Lansink CS, Goltstein PM, Lankelma JV, Joosten RNJMA, McNaughton BL, Pennartz CMA (2008) Preferential Reactivation of Motivationally Relevant Information in the Ventral Striatum. *Journal of Neuroscience* 28:6372–6382.

Laroche S, Davis S, Jay TM (2000) Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10:438–446.

Lech RK, Suchan B (2013) The medial temporal lobe: Memory and beyond. *Behavioural Brain Research* 254:45–49.

Lee JLC (2004) Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science* 304:839–843.

BIBLIOGRAPHIE

Lee I, Kesner RP (2003) Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *The Journal of Neuroscience* 23:1517–1523.

Lee I, Solivan F (2008) The roles of the medial prefrontal cortex and hippocampus in a spatial paired-association task. *Learning & Memory* 15:357–367.

Leon WC, Bruno MA, Allard S, Nader K, Cuello AC (2010) Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learning & Memory* 17:297–305.

Lesburgueres E, Gobbo OL, Alaux-Cantin S, Hambucken A, Trifilieff P, Bontempi B (2011) Early Tagging of Cortical Networks Is Required for the Formation of Enduring Associative Memory. *Science* 331:924–928.

Lewis DJ (1979) Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol Bull* 86:1054–1083.

Li Y, Li S, Sui N, Kirouac GJ (2009) Orexin-A acts on the paraventricular nucleus of the midline thalamus to inhibit locomotor activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 93:506–514.

Li Y, Li S, Wei C, Wang H, Sui N, Kirouac GJ (2010) Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus mediate anxiety-like responses in rats. *Psychopharmacology* 212:251–265.

Llinas RR, Steriade M (2006) Bursting of Thalamic Neurons and States of Vigilance. *Journal of Neurophysiology* 95:3297–3308.

Lisman JE, Pi HJ, Zhang Y, Otmakhova NA (2010) A Thalamo-Hippocampal-Ventral Tegmental Area Loop May Produce the Positive Feedback that Underlies the Psychotic Break in Schizophrenia. *Biological Psychiatry* 68:17–24.

Lomber SG (1999) The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *Journal of neuroscience methods* 86:109–117.

Lopez J, Wolff M, Lecourtier L, Cosquer B, Bontempi B, Dalrymple-Alford J, Cassel J-C (2009) The Intralaminar Thalamic Nuclei Contribute to Remote Spatial Memory. *Journal of Neuroscience* 29:3302–3306.

Lopez J, de Vasconcelos AP, Cassel J-C (2008) Environmental cue saliency influences the vividness of a remote spatial memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 90:285–289.

Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel J-C, de Vasconcelos AP (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22:827–841.

Louie K, Wilson MA (2001) Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. *Neuron* 29:145–156.

Loureiro M, Lecourtier L, Engeln M, Lopez J, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A (2012) The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Structure and Function* 217:93–106.

-M-

Macchi G, Bentivoglio M (1999) Is the “nonspecific” thalamus still “nonspecific”? *Arch Ital Biol* 137:201–226.

Maguire EA, Frith CD (2003) Lateral asymmetry in the hippocampal response to the remoteness of autobiographical memories. *The Journal of neuroscience* 23:5302–5307.

Maguire EA, Kumaran D, Hassabis D, Kopelman MD (2010) Autobiographical memory in semantic dementia: A longitudinal fMRI study. *Neuropsychologia* 48:123–136.

Mair RG, Burk JA, Porter MC (1998) Lesions of the frontal cortex, hippocampus, and intralaminar thalamic nuclei have distinct effects on remembering in rats. *Behavioral neuroscience* 112:772.

Mair RG, Koch JK, Newman JB, Howard JR, Burk JA (2002) A double dissociation within striatum between serial reaction time and radial maze delayed nonmatching performance in rats. *The Journal of neuroscience* 22:6756–6765.

Majchrzak M, Di Scala G (2000) GABA and muscimol as reversible inactivation tools in learning and memory. *Neural plasticity* 7:19–29.

Mander BA, Santhanam S, Saletin JM, Walker MP (2011) Wake deterioration and sleep restoration of human learning. *Current Biology* 21:R183–R184.

Maquet P, Laureys S, Peigneux P, Fuchs S, Petiau C, Phillips C, Aerts J, Del Fiore G, Degueldre C, Meulemans T, others (2000) Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nature neuroscience* 3:831–836.

Markham CM, Lockett CA, Huhman KL (2012) The medial prefrontal cortex is both necessary and sufficient for the acquisition of conditioned defeat. *Neuropharmacology* 62:933–939.

Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioural brain research* 88:261–274.

Marquis J-P, Killcross S, Haddon JE (2007) Inactivation of the prelimbic, but not infralimbic, prefrontal cortex impairs the contextual control of response conflict in rats. *European Journal of Neuroscience* 25:559–566.

Marr D (1970) A theory for cerebral neocortex. *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci* 176:161–234.

Marr D (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*:23–81.

Marshall L, Born J (2007) The contribution of sleep to hippocampus-dependent memory consolidation. *Trends in Cognitive Sciences* 11:442–450.

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

BIBLIOGRAPHIE

Martin JH (1991) Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 127:160–164.

Martin JH, Ghez C (1999) Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. *Journal of neuroscience methods* 86:145–159.

Martin KC, Kosik KS (2002) Synaptic tagging -- who's it? *Nat Rev Neurosci* 3:813–820.

Martin SJ, de Hoz L, Morris RGM (2005) Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* 43:609–624.

Maviel T (2004) Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science* 305:96–99.

McClelland JL, McNaughton BL, O'Reilly RC (1995) Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychol Rev* 102:419–457.

McCormick DA, Bal T (1997) Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annual review of neuroscience* 20:185–215.

McKenna JT, Vertes RP (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *The Journal of Comparative Neurology* 480:115–142.

Mecklinger A (2010) The control of long-term memory: Brain systems and cognitive processes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34:1055–1065.

Menzel null, Geiger null, Joerges null, Muller null, Chittka null (1998) Bees travel novel homeward routes by integrating separately acquired vector memories. *Anim Behav* 55:139–152.

Miller R (1996) Cortico-thalamic interplay and the security of operation of neural assemblies and temporal chains in the cerebral cortex. *Biological cybernetics* 75:263–275.

Milner B (1963) Effects of different brain lesions on card sorting: The role of the frontal lobes. *Archives of Neurology* 9:90–00.

Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445–468.

Milot M, Plamondon H (2008) Ischemia-induced hyperactivity: Effects of dim versus bright illumination on open-field exploration and habituation following global ischemia in rats. *Behavioural Brain Research* 192:166–172.

Moncada D, Ballarini F, Martinez MC, Frey JU, Viola H (2011) Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:12931–12936.

Moncada D, Viola H (2007) Induction of Long-Term Memory by Exposure to Novelty Requires Protein Synthesis: Evidence for a Behavioral Tagging. *Journal of Neuroscience* 27:7476–7481.

BIBLIOGRAPHIE

Moosmang S (2005) Role of Hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ Channels in NMDA Receptor-Independent Synaptic Plasticity and Spatial Memory. *Journal of Neuroscience* 25:9883–9892.

Morales GJ, Ramcharan EJ, Sundararaman N, Morgera SD, Vertes RP (2007) Analysis of the actions of nucleus reuniens and the entorhinal cortex on EEG and evoked population behavior of the hippocampus. In: *Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE*, pp 2480–2484.

Morellini F (2013) Spatial memory tasks in rodents: what do they model? *Cell and Tissue Research* 354:273–286.

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11:47–60.

Morris RGM (2006) Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *European Journal of Neuroscience* 23:2829–2846.

Morris RGM, Moser EI, Riedel G, Martin SJ, Sandin J, Day M, O'Carroll C (2003) Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358:773–786.

Moscovitch M, Nadel L, Winocur G, Gilboa A, Rosenbaum RS (2006) The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology* 16:179–190.

Moscovitch M, Rosenbaum RS, Gilboa A, Addis DR, Westmacott R, Grady C, McAndrews MP, Levine B, Black S, Winocur G, others (2005) Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *Journal of anatomy* 207:35–66.

Moser EI, Kropff E, Moser M-B (2008) Place Cells, Grid Cells, and the Brain's Spatial Representation System. *Annual Review of Neuroscience* 31:69–89.

Moss HE, Kopelman MD, Cappelletti M, de Mornay Davies P, Jaldow E (2003) Lost for Words or Loss of Memories? Autobiographical Memory in Semantic Dementia. *Cognitive Neuropsychology* 20:703–732.

Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1993) An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261:1051–1055.

Muller R (1996) A quarter of a century of place cells. *Neuron* 17:813–822.

Mumby DG, Astur RS, Weisend MP, Sutherland RJ (1999) Retrograde amnesia and selective damage to the hippocampal formation: memory for places and object discriminations. *Behavioural brain research* 106:97–107.

Mura A, Murphy CA, Feldon J, Jongen-Relo A-L (2004) The use of stereological counting methods to assess immediate early gene immunoreactivity. *Brain Research* 1009:120–128.

-N-

Nádasdy Z, Hirase H, Czurkó A, Csicsvari J, Buzsáki G (1999) Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 19:9497–9507.

Nadel L, Hardt O (2010) Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology* 36:251–273.

Nadel L, Hupbach A, Gomez R, Newman-Smith K (2012) Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 36:1640–1645.

Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Current opinion in neurobiology* 7:217–227.

Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience* 10:224–234.

Niki K, Luo J (2002) An fMRI study on the time-limited role of the medial temporal lobe in long-term topographical autobiographic memory. *Journal of Cognitive Neuroscience* 14:500–507.

-O-

O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research* 34:171–175.

O'Keefe J, Nadel L (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford; New York: Clarendon Press ; Oxford University Press.

Olton DS, Becker JT, Handelmann GE (1979) Hippocampus, space, and memory. *Behavioral and Brain Sciences* 2:313–322.

Oualian C, Gisquet-Verrier P (2010) The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioral flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task. *Learning & Memory* 17:654–668.

-P-

Packer AM, Roska B, Häusser M (2013) Targeting neurons and photons for optogenetics. *Nature Neuroscience* 16:805–815.

Parnell R, Grasby K, Talk A (2012) The prefrontal cortex is required for incidental encoding but not recollection of source information in rodents. *Behavioural Brain Research* 232:77–83.

Paul C-M, Magda G, Abel S (2009) Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research* 203:151–164.

BIBLIOGRAPHIE

Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. Amsterdam ; Boston: Academic Press/Elsevier.

Paz R, Bauer EP, Pare D (2008) Theta synchronizes the activity of medial prefrontal neurons during learning. *Learning & Memory* 15:524–531.

Peigneux P, Laureys S, Fuchs S, Collette F, Perrin F, Reggers J, Phillips C, Degueldre C, Del Fiore G, Aerts J, others (2004) Are spatial memories strengthened in the human hippocampus during slow wave sleep? *Neuron* 44:535–545.

Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, Cosquer B, Lopez J, Certa U, Cassel JC (2006) Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: A comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. *Neuroscience* 141:1649–1663.

Pergola G, Suchan B (2013) Associative Learning Beyond the Medial Temporal Lobe: Many Actors on the Memory Stage. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7:162.

Plihal W, Born J (1997) Effects of early and late nocturnal sleep on declarative and procedural memory. *J Cogn Neurosci* 9:534–547.

Plihal W, Born J (1999) Effects of early and late nocturnal sleep on priming and spatial memory. *Psychophysiology* 36:571–582.

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

Porter MC, Burk JA, Mair RG (2000) A comparison of the effects of hippocampal or prefrontal cortical lesions on three versions of delayed non-matching-to-sample based on positional or spatial cues. *Behavioural brain research* 109:69–81.

Porter MC, Mair RG (1997) The effects of frontal cortical lesions on remembering depend on the procedural demands of tasks performed in the radial arm maze. *Behavioural brain research* 87:115–125.

Poucet B, Alvernhe A, Hok V, Renaudineau S, Sargolini F, Save E (2010) L'hippocampe et le code neural de la mémoire spatiale. *Biologie Aujourd'hui* 204:103–112.

Poucet B, Benhamou S (1997) The neuropsychology of spatial cognition in the rat. *Crit Rev Neurobiol* 11:101–120.

Prasad JA, Macgregor EM, Chudasama Y (2013) Lesions of the thalamic reuniens cause impulsive but not compulsive responses. *Brain Structure and Function* 218:85–96.

Preston AR, Eichenbaum H (2013) Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. *Current Biology* 23:R764–R773.

Preuss T (1995) Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert program reconsidered. *Cognitive Neuroscience, Journal of* 7:1–24.

Przybylski J, Sara SJ (1997) Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural brain research* 84:241–246.

-R-

Ragozzino ME, Adams S, Kesner RP (1998) Differential involvement of the dorsal anterior cingulate and prelimbic–infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory. *Behavioral neuroscience* 112:293.

Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP (1999a) Involvement of the prelimbic–infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *The Journal of neuroscience* 19:4585–4594.

Ragozzino ME, Kim J, Hassert D, Minniti N, Kiang C (2003) The contribution of the rat prelimbic–infralimbic areas to different forms of task switching. *Behavioral Neuroscience* 117:1054–1065.

Ragozzino ME, Wilcox C, Raso M, Kesner RP (1999b) Involvement of rodent prefrontal cortex subregions in strategy switching. *Behavioral neuroscience* 113:32.

Ranck J (1985) Head direction cells in the deep cell layer of dorsal presubiculum in freely moving rats. Buzsaki G, Vanderwolf C, eds. *Electrical Activity of the Archicortex*:217–220.

Raymond CR (2007) LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the “long” in long-term potentiation. *Trends in Neurosciences* 30:167–175.

Redondo RL, Morris RGM (2011) Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature Reviews Neuroscience* 12:17–30.

Reed JM, Squire LR (1998) Retrograde amnesia for facts and events: findings from four new cases. *The Journal of Neuroscience* 18:3943–3954.

Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M (2009) The Formation of Recent and Remote Memory Is Associated with Time-Dependent Formation of Dendritic Spines in the Hippocampus and Anterior Cingulate Cortex. *Journal of Neuroscience* 29:8206–8214.

Ribeiro S, Gervasoni D, Soares ES, Zhou Y, Lin S-C, Pantoja J, Lavine M, Nicolelis MAL (2004) Long-Lasting Novelty-Induced Neuronal Reverberation during Slow-Wave Sleep in Multiple Forebrain Areas. *PLoS Biology* 2:e24.

Ribot T (1882) *Diseases of memory - an essay in the positive psychology*.

Rich EL, Shapiro ML (2007) Prelimbic/Infralimbic Inactivation Impairs Memory for Multiple Task Switches, But Not Flexible Selection of Familiar Tasks. *Journal of Neuroscience* 27:4747–4755.

Ridderinkhof KR, van den Wildenberg WPM, Segalowitz SJ, Carter CS (2004) Neurocognitive mechanisms of cognitive control: The role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. *Brain and Cognition* 56:129–140.

Robertson EM (2009) From creation to consolidation: a novel framework for memory processing. *PLoS biology* 7:e1000019.

Robertson EM, Pascual-Leone A, Miall RC (2004) Current concepts in procedural consolidation. *Nature Reviews Neuroscience* 5:576–582.

Rose JE, Woolsey CN (1948) The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 27 (1 vol.):210–232.

Rosenbaum RS, Priselac S, Köhler S, Black SE, Gao F, Nadel L, Moscovitch M (2000) Remote spatial memory in an amnesic person with extensive bilateral hippocampal lesions. *Nature neuroscience* 3:1044–1048.

Rosenbaum RS, Winocur G, Moscovitch M (2001) New views on old memories: re-evaluating the role of the hippocampal complex. *Behavioural brain research* 127:183–197.

Roullet P, Sara S (1998) Consolidation of memory after its reactivation: involvement of β noradrenergic receptors in the late phase. *Neural plasticity* 6:63–68.

Rudy JW (2005) Prefrontal cortex and the organization of recent and remote memories: An alternative view. *Learning & Memory* 12:445–446.

Rudy JW (2009) Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learning & Memory* 16:573–585.

Runyan JD (2004) A Role for Prefrontal Cortex in Memory Storage for Trace Fear Conditioning. *Journal of Neuroscience* 24:1288–1295.

Russell WR, Nathan PW (1946) Traumatic amnesia. *Brain* 69:280–300.

-S-

Sagar HJ, Cohen NJ, Corkin S, Growdon JH (1985) Dissociations among processes in remote memory. *Ann N Y Acad Sci* 444:533–535.

Sahay A, Wilson DA, Hen R (2011) Pattern Separation: A Common Function for New Neurons in Hippocampus and Olfactory Bulb. *Neuron* 70:582–588.

Saletin JM, Walker MP (2012) Nocturnal Mnemonics: Sleep and Hippocampal Memory Processing. *Frontiers in Neurology* 3: 59.

Sara SJ (2000) Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learning & Memory* 7:73–84.

Sara SJ (2010) Reactivation, Retrieval, Replay and Reconsolidation in and Out of Sleep: Connecting the Dots. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4: 185.

Sara SJ, Roullet P, Przybylski J (1999) Consolidation of Memory for Odor–Reward Association: β -Adrenergic Receptor Involvement in the Late Phase. *Learning & Memory* 6:88–96.

Sargolini F (2006) Conjunctive Representation of Position, Direction, and Velocity in Entorhinal Cortex. *Science* 312:758–762.

Schlesiger MI, Cressey JC, Boubil B, Koenig J, Melvin NR, Leutgeb JK, Leutgeb S (2013) Hippocampal activation during the recall of remote spatial memories in radial maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory* 106:324–333.

Schmahmann JD (2003) Vascular Syndromes of the Thalamus. *Stroke* 34:2264–2278.

Schmitt WB, Deacon RM, Seeburg PH, Rawlins JNP, Bannerman DM (2003) A within-subjects, within-task demonstration of intact spatial reference memory and impaired spatial working memory in glutamate receptor-A-deficient mice. *The Journal of neuroscience* 23:3953–3959.

Schobel SA, Lewandowski NM, Corcoran CM, Moore H, Brown T, Malaspina D, Small SA (2009) Differential Targeting of the CA1 Subfield of the Hippocampal Formation by Schizophrenia and Related Psychotic Disorders. *Archives of General Psychiatry* 66:938.

Schoenbaum G, Roesch M (2005) Orbitofrontal Cortex, Associative Learning, and Expectancies. *Neuron* 47:633–636.

Schumacher A, Vasconcelos AP de, Lecourtier L, Moser A, Cassel J-C (2011) Electrical high frequency stimulation in the dorsal striatum: Effects on response learning and on GABA levels in rats. *Behavioural Brain Research* 222:368–374.

Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 20:11–21.

Seamans JK, Lapish CC, Durstewitz D (2008) Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotox Res* 14:249–262.

Shaw CL, Watson GDR, Hallock HL, Cline KM, Griffin AL (2013) The role of the medial prefrontal cortex in the acquisition, retention, and reversal of a tactile visuospatial conditional discrimination task. *Behavioural Brain Research* 236:94–101.

Siegel M, Donner TH, Engel AK (2012) Spectral fingerprints of large-scale neuronal interactions. *Nature Reviews Neuroscience* 13:121–134.

Silva AJ, Giese KP, Fedorov NB, Frankland PW, Kogan JH (1998) Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiology of learning and memory* 70:44–61.

Simons JS, Spiers HJ (2003) Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nature Reviews Neuroscience* 4:637–648.

Sloan HL, Good M, Dunnett SB (2006) Double dissociation between hippocampal and prefrontal lesions on an operant delayed matching task and a water maze reference memory task. *Behavioural Brain Research* 171:116–126.

Smith C (2001) Sleep states and memory processes in humans: procedural versus declarative memory systems. *Sleep Medicine Reviews* 5:491–506.

BIBLIOGRAPHIE

Smith CA, East BS, Colombo PJ (2010) The orbitofrontal cortex is not necessary for acquisition or remote recall of socially transmitted food preferences. *Behavioural Brain Research* 208:243–249.

Spiers HJ, Maguire EA, Burgess N (2001) Hippocampal amnesia. *Neurocase* 7:357–382.

Squire LR (2009) The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron* 61:6–9.

Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169–177.

Squire LR, Clark RE, Knowlton BJ (2001) Retrograde amnesia. *Hippocampus* 11:50–55.

Squire LR, Slater PC, Chace PM (1975) Retrograde amnesia: temporal gradient in very long term memory following electroconvulsive therapy. *Science* 187:77–79.

Squire LR, Stark CEL, Clark RE (2004) THE MEDIAL TEMPORAL LOBE*. *Annual Review of Neuroscience* 27:279–306.

Squire LR, Wixted JT (2011) The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annual Review of Neuroscience* 34:259–288.

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

Stahl EA, Dwyer G, Mauricio R, Kreitman M, Bergelson J (1999) Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature* 400:667–671.

Steriade M (2006) Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. *Neuroscience* 137:1087–1106.

Stolerman IP ed. (2010) *Encyclopedia of Psychopharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Sutherland RJ, O'Brien J, Lehmann H (2008) Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. *Hippocampus* 18:710–718.

Sutherland RJ, Sparks FT, Lehmann H (2010) Hippocampus and retrograde amnesia in the rat model: A modest proposal for the situation of systems consolidation. *Neuropsychologia* 48:2357–2369.

Sutherland RJ, Weisend MP, Mumby D, Astur RS, Hanlon FM, Koerner A, Thomas MJ, Wu Y, Moses SN, Cole C, Hamilton DA, Hoesing JM (2001) Retrograde amnesia after hippocampal damage: recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus* 11:27–42.

Sykova E, Nicholson C (2008) Diffusion in Brain Extracellular Space. *Physiological Reviews* 88:1277–1340.

-T-

Takehara K, Kawahara S, Kirino Y (2003) Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *The Journal of neuroscience* 23:9897–9905.

BIBLIOGRAPHIE

- Takehara-Nishiuchi K (2014) Entorhinal cortex and consolidated memory. *Neuroscience Research* pii: S0168-0102(14)00038-8.
- Taube JS (1998) Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Prog Neurobiol* 55:225–256.
- Teather LA, Packard MG, Smith DE, Ellis-Behnke RG, Bazan NG (2005) Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory* 84:75–84.
- Tehovnik EJ, Sommer MA (1997) Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. *Journal of neuroscience methods* 74:17–26.
- Teixeira CM (2006) Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in the Expression of Remote Spatial Memory. *Journal of Neuroscience* 26:7555–7564.
- Teng E, Squire LR (1999) Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400:675–677.
- Teyler TJ, DiScenna P (1986) The hippocampal memory indexing theory. *Behavioral neuroscience* 100:147.
- Teyler TJ, Rudy JW (2007) The hippocampal indexing theory and episodic memory: Updating the index. *Hippocampus* 17:1158–1169.
- Thierry AM, Gioanni Y, Dégénétais E, Glowinski J (2000) Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus* 10:411–419.
- Tolman EC (1948) Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev* 55:189–208.
- Torras-Garcia M (2005) Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. *Learning & Memory* 12:18–22.
- Trinh MA, Kaphzan H, Wek RC, Pierre P, Cavener DR, Klann E (2012) Brain-Specific Disruption of the eIF2 α Kinase PERK Decreases ATF4 Expression and Impairs Behavioral Flexibility. *Cell Reports* 1:676–688.
- Tronel S (2002) Mapping of Olfactory Memory Circuits: Region-Specific c-fos Activation After Odor-Reward Associative Learning or After Its Retrieval. *Learning & Memory* 9:105–111.
- Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RGM (2007) Schemas and Memory Consolidation. *Science* 316:76–82.
- Tse D, Takeuchi T, Kakeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, Bito H, Morris RGM (2011) Schema-Dependent Gene Activation and Memory Encoding in Neocortex. *Science* 333:891–895.
- Tulving E (1972) Episodic and semantic memory. *Organization of memory*:381–403.
- Tulving E (1995) Organization of memory: Quo vadis. *The Cognitive Neurosciences*:839–847.

Tulving E (2001) Episodic memory and common sense: how far apart? *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 356:1505–1515.

Tulving E, Lepage M (2000) Where in the brain is awareness of one's past? In: *Memory, Brain, and Belief*, Harvard Univ Pr. (Schacter D, Scarry E, eds), pp 208–228.

Tulving E, Markowitsch HJ (1998) Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* 8:198–204.

-U-

Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research* 146:3–17.

-V-

Van der staay F (1999) Spatial Working Memory and Reference Memory of Brown Norway and WAG Rats in a Holeboard Discrimination Task. *Neurobiology of Learning and Memory* 71:113–125.

Van Der Werf YD, Altena E, Schoonheim MM, Sanz-Arigitia EJ, Vis JC, De Rijke W, Van Someren EJW (2009) Sleep benefits subsequent hippocampal functioning. *Nature Neuroscience* 12:122–123.

Van der Werf YD, Jolles J, Witter MP, Uylings HBM (2003a) Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex* 39:1047–1062.

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

Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res Brain Res Rev* 39:107–140.

Van der Werf YD, Witter MP, Uylings H, Jolles J (2000) Neuropsychology of infarctions in the thalamus: a review. *Neuropsychologia* 38:613–627.

Van Duuren E, van der Plasse G, van der Blom R, Joosten RNJMA, Mulder AB, Pennartz CMA, Feenstra MGP (2007) Pharmacological Manipulation of Neuronal Ensemble Activity by Reverse Microdialysis in Freely Moving Rats: A Comparative Study of the Effects of Tetrodotoxin, Lidocaine, and Muscimol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323:61–69.

Van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* 10:272–282.

Vann SD, Brown MW, Aggleton JP (2000a) Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests. *Neuroscience* 101:983–991.

Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP (2000b) Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *The Journal of Neuroscience* 20:2711–2718.

Varela C, Kumar S, Yang JY, Wilson MA (2014) Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Structure and Function* 219:911–929.

Vargha-Khadem F (1997) Differential Effects of Early Hippocampal Pathology on Episodic and Semantic Memory. *Science* 277:376–380.

Vertes RP (2002) Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *The Journal of Comparative Neurology* 442:163–187.

Vertes RP (2005) Hippocampal theta rhythm: A tag for short-term memory. *Hippocampus* 15:923–935.

Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ (2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 499:768–796.

Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranath C (2007) Nucleus reuniens of the midline thalamus: Link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Research Bulletin* 71:601–609.

Vertes RP, Linley SB, Hoover WB (2010) Pattern of distribution of serotonergic fibers to the thalamus of the rat. *Brain Structure and Function* 215:1–28.

Vetere G, Restivo L, Novembre G, Aceti M, Lumaca M, Ammassari-Teule M (2011) Extinction partially reverts structural changes associated with remote fear memory. *Learning & Memory* 18:554–557.

Viola H, Ballarini F, Martínez MC, Moncada D (2014) The Tagging and Capture Hypothesis from Synapse to Memory. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, pp 391–423.

Viskontas IV, McAndrews MP, Moscovitch M (2000) Remote episodic memory deficits in patients with unilateral temporal lobe epilepsy and excisions. *The Journal of Neuroscience* 20:5853–5857.

-W-

Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2:322–328.

Walker MP (2009) The Role of Sleep in Cognition and Emotion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1156:168–197.

Wallis JD (2011) Cross-species studies of orbitofrontal cortex and value-based decision-making. *Nature Neuroscience* 15:13–19.

Walsh RN, Cummins RA (1976) The open-field test: A critical review. *Psychological bulletin* 83:482.

BIBLIOGRAPHIE

- Wang G-W, Cai J-X (2008) Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic cortical circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 90:365–373.
- Wang S-H, Teixeira CM, Wheeler AL, Frankland PW (2009) The precision of remote context memories does not require the hippocampus. *Nature Neuroscience* 12:253–255.
- Wang T, Donahoe PK, Zervos AS (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science* 265:674–676.
- Weible AP, Rowland DC, Monaghan CK, Wolfgang NT, Kentros CG (2012) Neural Correlates of Long-Term Object Memory in the Mouse Anterior Cingulate Cortex. *Journal of Neuroscience* 32:5598–5608.
- Werk CM, Chapman CA (2003) Long-term potentiation of polysynaptic responses in layer V of the sensorimotor cortex induced by theta-patterned tetanization in the awake rat. *Cerebral Cortex* 13:500–507.
- West MJ (2012) Introduction to Stereology. *Cold Spring Harbor Protocols* 2012:pdb.top070623–pdb.top070623.
- West MJ (2013a) Getting Started in Stereology. *Cold Spring Harbor Protocols* 2013:pdb.top071845–pdb.top071845.
- West MJ (2013b) Tissue Shrinkage and Stereological Studies. *Cold Spring Harbor Protocols* 2013:pdb.top071860–pdb.top071860.
- Wheeler AL, Teixeira CM, Wang AH, Xiong X, Kovacevic N, Lerch JP, McIntosh AR, Parkinson J, Frankland PW (2013) Identification of a Functional Connectome for Long-Term Fear Memory in Mice Sporns O, ed. *PLoS Computational Biology* 9:e1002853.
- Williams RW, Rakic P (1988) Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 278:344–352.
- Willshaw DJ, Buckingham JT (1990) An assessment of Marr's theory of the hippocampus as a temporary memory store. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 329:205–215.
- Wiltgen BJ, Zhou M, Cai Y, Balaji J, Karlsson MG, Parivash SN, Li W, Silva AJ (2010) The Hippocampus Plays a Selective Role in the Retrieval of Detailed Contextual Memories. *Current Biology* 20:1336–1344.
- Winocur G (1990) Anterograde and retrograde amnesia in rats with dorsal hippocampal or dorsomedial thalamic lesions. *Behavioural brain research* 38:145–154.
- Winocur G, Frankland PW, Sekeres M, Fogel S, Moscovitch M (2009) Changes in context-specificity during memory reconsolidation: Selective effects of hippocampal lesions. *Learning & Memory* 16:722–729.

BIBLIOGRAPHIE

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

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

Winocur G, Moscovitch M, Caruana DA, Binns MA (2005) Retrograde amnesia in rats with lesions to the hippocampus on a test of spatial memory. *Neuropsychologia* 43:1580–1590.

Winocur G, Moscovitch M, Rosenbaum RS, Sekeres M (2010b) An investigation of the effects of hippocampal lesions in rats on pre- and postoperatively acquired spatial memory in a complex environment. *Hippocampus* 20:1350–1365.

Winocur G, Moscovitch M, Sekeres M (2007) Memory consolidation or transformation: context manipulation and hippocampal representations of memory. *Nature Neuroscience* 10:555–557.

Wise SP (2008) Forward frontal fields: phylogeny and fundamental function. *Trends in Neurosciences* 31:599–608.

Witte OW, Buchkremer-Ratzmann I, Schiene K, Neumann-Haefelin T, Hagemann G, Kraemer M, Zilles K, Freund HJ (1997) Lesion-induced network plasticity in remote brain areas. *Trends Neurosci* 20:348–349.

Witter MP, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. In: Paxinos G, *The rat nervous system*, Elsevier, Amsterdam, pp 635–704.

Witter MP, Ostendorf RH, Groenewegen HJ (1990) Heterogeneity in the Dorsal Subiculum of the Rat. Distinct Neuronal Zones Project to Different Cortical and Subcortical Targets. *Eur J Neurosci* 2:718–725.

Woodside B., Borroni A., Hammonds M., Teyler T. (2004) NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and retention of a spatial memory task. *Neurobiology of Learning and Memory* 81:105–114.

-X-

Xu W, Sudhof TC (2013) A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science* 339:1290–1295.

-Y-

Yoo S-S, Hu PT, Gujar N, Jolesz FA, Walker MP (2007) A deficit in the ability to form new human memories without sleep. *Nature Neuroscience* 10:385–392.

-Z-

Zhang F, Wang L-P, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446:633–639.

Zhang Y (2009) Inhibition of NMDARs in the nucleus reticularis of the thalamus produces delta frequency bursting. *Frontiers in Neural Circuits* 3: 20.

Zhang DX, Bertram EH (2002) Midline thalamic region: widespread excitatory input to the entorhinal cortex and amygdala. *The Journal of neuroscience* 22:3277–3284.

Zhang Y, Yoshida T, Katz DB, Lisman JE (2012) NMDAR antagonist action in thalamus imposes delta oscillations on the hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 107:3181–3189.

Zhu Y, Chen H, Fan J, Wang Y, Li Y, Chen J, Fan J, Yang S, Hu L, Leung H, others (2000) Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* 406:718–722.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 6:2950–2967.

Rôle d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans les processus de mémoire spatiale chez le Rat

Résumé

Cette thèse avait pour objectif d'étudier le rôle du circuit composé de l'hippocampe (Hip), du cortex préfrontal médian (mPFC) et des noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) du thalamus dans les processus cognitifs qui sous-tendent la mémoire spatiale chez le Rat, à l'aide d'approches comprenant la lésion excitotoxique, l'inactivation fonctionnelle réversible et l'imagerie du gène précoce *c-fos*. Nous avons montré que les noyaux ReRh pourraient être impliqués dans la consolidation systémique, mécanisme nécessaire à la persistance à long terme des souvenirs et qui nécessite un dialogue hippocampo-cortical. Nous avons mis en évidence que l'activité neuronale du mPFC durant le rappel d'une mémoire ancienne dépend des noyaux ReRh. Nous avons également montré l'implication de ces noyaux dans une tâche de mémoire spatiale (dépendante de l'Hip) nécessitant une flexibilité comportementale (impliquant le mPFC). Enfin, nous avons montré un rôle du mPFC dans le rappel d'une mémoire spatiale récente. Ces résultats mettent en évidence l'importance d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans le traitement et la persistance des informations spatiales chez le Rat.

Mots-clés : noyaux reuniens et rhomboïde – thalamus – hippocampe – cortex préfrontal médian – mémoire spatiale – flexibilité – piscine de Morris – Double-H – lésion excitotoxique - Rat

Summary

This thesis aimed to investigate the role of a circuit encompassing the hippocampus (Hip), the medial prefrontal cortex (mPFC) and the reuniens and rhomboid nuclei (ReRh) of the thalamus in cognitive processes underlying spatial memory in rats. For this, we used excitotoxic lesions, functional reversible inactivation and *c-fos* immediate early gene imaging. In a first set of experiments, we showed that ReRh nuclei may be involved in systemic consolidation, a mechanism necessary for long-term memory persistence and requiring hippocampal-cortical interactions. We confirmed these findings in a second study showing that mPFC neuronal activity during the recall of a remote spatial memory depends on ReRh thalamic nuclei. We have also shown the involvement of the ReRh nuclei in a mnemonic task requiring the use of both spatial information (dependent on the Hip) and behavioral flexibility (involving the mPFC). Finally, we have shown a role of the mPFC in the recall of recent spatial memory. Taken together, these results highlight the importance of a hippocampo-cortico-thalamic circuit in the processing and persistence of spatial information in the Rat.

Keywords: reuniens and rhomboid nuclei - thalamus - hippocampus - medial prefrontal cortex - spatial memory - flexibility - Morris water maze - Double-H - excitotoxic lesion - Rat