



HAL
open science

Bases neuronales de l'apprentissage associatif multisensoriel : implication différentielle du cortex entorhinal et de l'hippocampe chez le rat

Lise Boisselier

► To cite this version:

Lise Boisselier. Bases neuronales de l'apprentissage associatif multisensoriel : implication différentielle du cortex entorhinal et de l'hippocampe chez le rat. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1261 . tel-01437130

HAL Id: tel-01437130

<https://theses.hal.science/tel-01437130>

Submitted on 17 Jan 2017

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

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



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1261

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°476
Ecole Doctorale Neurosciences et Cognition

Spécialité de doctorat : Neurosciences

Soutenue publiquement le 02/12/2016, par :
Lise BOISSELIER

Bases neuronales de l'apprentissage associatif multisensoriel :

Implication différentielle du cortex entorhinal et
de l'hippocampe chez le rat

Devant le jury composé de :

Pr Emiliano MACALUSO
Dr Etienne COUTUREAU
Dr Laure RONDI-REIG
Dr Ingrid BETHUS
Dr Sébastien BOURET

Professeur des universités
Directeur de Recherche
Directrice de Recherche
Maître de Conférences
Chargé de recherche

Président du jury
Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examineur

Dr Barbara FERRY
Pr Rémi GERVAIS

Chargée de recherche
Professeur des universités

Directrice de thèse
Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

A mes grands-parents paternels.

- Always and Forever -

Et puis, doucement, sans le vouloir, on passe du cœur, à la mémoire.

- Roméo & Juliette -

Merci...

Aux membres de mon jury : mes rapporteurs, Laure Rondi-Reig et Etienne Coutureau, pour avoir accepté d'évaluer ce travail ; mes examinateurs, Ingrid Bethus et Sébastien Bouret d'avoir accepté de se joindre à mon jury ; ainsi qu'à Emiliano Macaluso pour avoir accepté d'être président de mon jury de thèse.

A mon directeur de thèse, Rémi Gervais, pour m'avoir accueillie dans son équipe et dans son projet scientifique. Je lui suis très reconnaissante pour le temps qu'il m'a accordé, nos précieuses discussions scientifiques, sa patience, son enthousiasme, sa confiance et sa gentillesse (sans oublier ses blagues et ses jeux de mots !).

A ma co-directrice de thèse, Barbara Ferry, pour ses conseils avisés, sa rigueur et ses remarques constructives, ainsi que pour m'avoir guidée à travers les nombreux aléas de la neurochirurgie (vive les soudures !).

A Damien Gervasoni, pour sa participation au projet électrophysiologie, ainsi que sa patience pour m'apprendre les diverses procédures techniques et chirurgicales.

A Ounsa Jelassi Ben-Hellal, pour sa gentillesse, son attention pour nos petits protégés, et son aide pour la phase expérimentale la plus délicate...

Aux ingénieurs du laboratoire pour tout l'aspect technique qui se cache derrière toute expérience scientifique : Hervé Huguenet pour le côté informatique, Marc Thévenet pour l'acquisition et l'analyse vidéo avec son logiciel Volcan, Belkacem Messaoudi pour l'acquisition (si capricieuse !) des signaux électrophysiologiques, et Samuel Garcia pour l'acquisition des signaux électrophysiologiques avec son logiciel Neurolabscope, ainsi que pour le traitement des données – un grand merci pour ton efficacité et ta patience face à mes faibles compétences de programmation...

A Anne-Marie Mouly, Nathalie Buonviso et Nadine Ravel pour leur gentillesse, leurs remarques constructives et leurs précieux conseils, notamment en électrophysiologie, à Philippe Litaudon et Belkacem Messaoudi pour nos débats footballistiques, ainsi qu'à l'ensemble des membres du laboratoire pour l'atmosphère stimulante et conviviale.

A l'équipe pédagogique du département de neurosciences de l'Université Lyon 1, notamment Anne Didier, Marion Richard, et surtout Karyn Julliard, pour sa gentillesse, ses conseils avisés et sa confiance pour les cours qu'elle m'a donné l'occasion de dispenser. A l'ensemble des moniteurs, et notamment Anaïs et Romain : il faut l'avouer, notre monitorat a été riche en fous rires (nerveux) !

Aux étudiants de Master 1 que j'ai eu le plaisir d'encadrer lors de leur stage, Mickaël et Lucile, pour leur motivation, leur travail et leur sympathie.

Aux différents étudiants de passage dans le bureau ou dans « l'igloo », pour les échanges scientifiques, l'entre-aide et surtout pour les blagues, surnoms, jeux de mots et moments détentes : Vincent, Laura, Dolly, Joffrey, Baptiste, Marina, Anne, Maxime, Clément...

A Messieurs Thierry Bouvier et François Martin, respectivement instituteur du cours moyen et professeur de Sciences de la Vie et la Terre au lycée, le premier pour m'avoir fait adorer l'école (et m'avoir fait la surprise d'assister à ma soutenance !), et le second pour m'avoir passionnée pour les sciences naturelles.

A mes amies, notamment mes binômes, Louise et Jennifer, pour leur soutien quotidien, leurs patientes et constructives relectures de mon manuscrit, ainsi que pour nos projets vacances souvent peu réalisables, nos week-end « Baby », nos sorties concerts & nos sorties foot, nos débats télévisés, cinématographiques et musicaux... A Aurélie également, pour ses messages rythmés quotidiens, et à Anaïs, pour l'esprit Tiger : « le gras, c'est la vie ! ».

A ma famille et tout particulièrement à mes parents, pour me soutenir depuis ma naissance, et plus encore depuis le début de ma thèse, avec nos interminables conversations téléphoniques à raconter mes petits aléas scientifiques, ainsi que pour leur courageuse relecture de mon manuscrit et leurs chaleureux encouragements quotidiens.

A Alex, pour sa patience à toute épreuve (parce que s'il en faut de base une certaine dose pour me supporter, j'ai conscience d'atteindre des niveaux record en période de stress...), tes encouragements quotidiens, ton humour (bien souvent à mes dépens !), ton aide technique et informatique pour ma thèse, ainsi que pour ton affection.

Et pour finir, à ceux qui ont fourni la totalité (ou presque) du travail présenté dans cette thèse : les rats. Même s'ils ont été à l'origine d'un nombre incalculable d'éternuements et de quelques crises d'asthme, ces petites peluches ont été d'adorables collègues de travail.

ANNEXE ADMINISTRATIVE, PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Cette thèse a été réalisée au Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Université Lyon 1 (50 avenue Tony Garnier, 69366 LYON Cedex 07), dans l'équipe « Codage et Mémoire Olfactive », sous la direction du Professeur Rémi GERVAIS et du Docteur Barbara FERRY.

Ce travail a été financé par un contrat doctorat de l'Université Claude Bernard (Lyon 1), suite au concours organisé par l'Ecole Doctorale Neurosciences et Cognition (ED 476 NSCo) en juillet 2013. Une Activité Complémentaire d'Enseignement a été effectuée à l'Université Lyon 1 pendant les trois années de doctorat.

1. PUBLICATIONS EN LIEN AVEC LE TRAVAIL DE THESE

Ces articles sont insérés aux pages 229 et 246.

Boisselier, L., Ferry, B., Gervais, R. (2017). Respective role of the dorsal hippocampus and the entorhinal cortex during the recombination of previously learned olfactory-tactile associations in the rat. *Learning and Memory* 24, 24-34.

Boisselier, L., Ferry, B., Gervais, R. (2014). Involvement of the lateral entorhinal cortex for the formation of cross-modal olfactory-tactile associations in the rat. *Hippocampus* 24, 877-891.

2. COMMUNICATIONS ORALES

Boisselier, L., Ferry, B., Gervais, R. Neural basis supporting cross-modal olfactory-tactile associations in the rat hippocampal formation. *GDR Neuro-Mem*, 18 mai 2016, Lacanau, FRANCE.

Boisselier, L., Ferry, B., Gervais, R. Neural basis supporting cross-modal olfactory-tactile associations in the rat hippocampal formation. *Journée annuelle de l'Ecole Doctorale Neurosciences et Cognition*, 2 mai 2016, Lyon, FRANCE.

Boisselier, L., Ferry, B., Gervais, R. Neural basis supporting cross-modal olfactory-tactile associations in the rat hippocampal formation. *Workshop pour la venue d'Edi Barkai (Université de Haïfa, Israël)*, 21 mars 2016, Lyon, FRANCE.

Boisselier, L., Ferry, B., Gervais, R. Evidence for the implication of CA1 dorsal hippocampus in the flexibility of cross-modal representations. *GDR Neuro-Mem*, 14 mai 2014, Grasse, FRANCE.

3. COMMUNICATIONS AFFICHEES

- Boisselier, L.,** Ferry, B., Gervasoni, D., Garcia, S. and Gervais, R. (2016). Neural basis supporting cross-modal olfactory-tactile associations in the rat hippocampal formation. *GDR Neuro-Mem*, 17-20 Mai 2016, Lacanau, FRANCE.
- Boisselier, L.,** Goin, M., Ferry, B. and Gervais, R. (2015). Cholinergic and NMDA systems are involved in formation and recombination of cross-modal associations in the lateral entorhinal cortex and the dorsal hippocampus. *46th European Brain and Behaviour Society Meeting*, 12-15 septembre 2015, Vérone, ITALIE.
- Boisselier, L.,** Ferry, B., and Gervais, R. (2015). Differential involvement of lateral entorhinal cortex and dorsal hippocampus in the memory processes underlying acquisition and flexibility of cross-modal learning task. *Colloque de la Société Française des Neurosciences*, 19-22 Mai 2015, Montpellier, FRANCE.
- Boisselier, L.,** Ferry, B., and Gervais, R. (2014). Evidence for the implication of CA1 dorsal hippocampus in the flexibility of cross-modal representations. *GDR Neuro-Mem*, 13-16 mai 2014, Grasse, FRANCE.
- Boisselier, L.,** Ferry, B., and Gervais, R. (2013). Selective involvement of the NMDA receptors in the lateral entorhinal cortex in the acquisition of cross modal associations in the rat. *45th European Brain and Behaviour Society Meeting*, 6-9 septembre 2013, Munich, ALLEMAGNE.
- Boisselier, L.,** Ferry, B., and Gervais, R. (2013). Selective involvement of the NMDA receptors in the lateral entorhinal cortex in the acquisition of cross modal associations in the rat. *Congrès LabEx Cortex*, 3-5 juin 2013, Lyon, FRANCE.
- Ferry, B., **Boisselier, L.,** Sauvajon, M., Humblot, P. and Gervais, R. (2013). Differential role of lateral entorhinal cortex and dorsal hippocampus in acquisition and flexibility of cross modal association in the rat. *Colloque de la Société Française des Neurosciences*, 22-25 mai 2013, Lyon, FRANCE.

ABREVIATIONS

AMPA = α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

aPC = Cortex Piriforme antérieur

BO = Bulbe Olfactif

CE = Cortex Entorhinal

CEL = Cortex Entorhinal Latéral

CEM = Cortex Entorhinal Médian

COF = Cortex Orbitofrontal

dAPV = d-Acide 2-amino-5-phosphonovalérique

dCA1 = région CA1 de l'hippocampe dorsal

DG = Gyrus Denté

DH = Hippocampe Dorsal

LCR = Liquide Céphalo-Rachidien

LFP = Local Field Potentials / Potentiels de Champs Locaux

LTP = Long-Term Depression / Dépression à Long-Terme

LTP = Long-Term Potentiation / Potentialisation à Long-Terme

NMDA = N-Methyl-D-Aspartate

OT = Olfacto-Tactile

pPC = Cortex Piriforme postérieur

PPSE = Potentiel Post-Synaptique Excitateur

PPSI = Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur

PVC = Polychlorure de vinyle

S1 = Cortex somesthésique primaire

S2 = Cortex somesthésique secondaire

S1BC = Barrel cortex

S.E.M. = Standard Error of the Mean

VH = Hippocampe Ventral

VPM = Ventro-Postéro-Médian

TRADUCTION

Dans ce manuscrit, quelques termes anglo-saxons sont utilisés.

Barrel cortex = Cortex à tonneaux composant une partie du cortex somesthésique S1.

Digging = Action de creuser (exemple : creuser dans un pot rempli de sciure).

Extra-maze cues = Indices le plus souvent visuels présents à l'extérieur d'une enceinte.

Intra-maze cues = Indices le plus souvent visuels présents à l'intérieur d'une enceinte.

Nose poke = Echantillonnage d'un stimulus (souvent olfactif ou tactile) par insertion volontaire du museau de l'animal dans une ouverture de faible diamètre (port). Suite à un nose poke, l'animal reçoit généralement un renforcement hydrique.

Probe test = Essai ponctuel et aléatoire au cours duquel le pot correct n'est pas pourvu d'un renforcement alimentaire accessible.

Reversal = Apprentissage inversé.

Sniffing = Processus d'échantillonnage d'un stimulus olfactif par flairage.

Top-down = Modulation du traitement d'une information dans une structure donnée par les projections en provenance de structures dites de « plus haut niveau ».

Whisking = Processus d'échantillonnage d'un stimulus tactile par agitation rapide des vibrisses.

LEXIQUE

Dans ce manuscrit, plusieurs concepts (désignés par * dans le texte) sont utilisés et une définition spécifique à ce travail de thèse est proposée dans ce lexique.**

APPRENTISSAGE : ACQUISITION versus RECOMBINAISON versus REVERSAL

Acquisition : Apprentissage d'une association entre un ou plusieurs stimuli et un renforcement :

- L'acquisition unimodale olfactive correspond à l'apprentissage d'une association entre un stimulus olfactif et un renforcement.

- L'acquisition unimodale tactile correspond à l'apprentissage d'une association entre un stimulus tactile et un renforcement.

- L'acquisition bimodale olfacto-tactile correspond à l'apprentissage d'une association entre un stimulus olfactif, un stimulus tactile et un renforcement.

Recombinaison : Apprentissage d'une réassociation de stimuli familiers (présentés lors des acquisitions bimodales olfacto-tactiles préalables) sous forme de combinaisons OT inédites.

Reversal : Apprentissage d'une association entre un stimulus olfactif ou un stimulus tactile non renforcé lors de l'acquisition unimodale effectuée au préalable, avec un renforcement (inversion de la valence hédonique).

ASSOCIATION SIMPLE versus ASSOCIATION RELATIONNELLE

Association simple : Formation d'une association entre un stimulus spécifique et un renforcement positif ou négatif (exemple : le stimulus A est renforcé, mais le stimulus B ne l'est pas).

Association relationnelle : Formation d'une association entre une combinaison de plusieurs stimuli (minimum deux) et un renforcement positif ou négatif (exemple : les paires de stimuli AB et DC sont renforcées, mais les paires AC et DB ne le sont pas).

ELEMENTS RECOUVRANTS versus INTERFERENCES

Éléments recouvrants : Stimulus présenté sur différents objets au cours de l'apprentissage d'une même tâche olfacto-tactile (exemple : dans la tâche OT1, l'odeur O1 est présentée dans deux pots distincts).

Interférence : Stimulus renforcé lors de l'apprentissage d'une première tâche olfacto-tactile, qui ne l'est plus lors de l'apprentissage d'une seconde tâche olfacto-tactile (exemple : l'odeur O1 est renforcée lors de l'acquisition, mais cette même odeur n'est plus renforcée lors de la recombinaison).

INTRA-MODAL versus CROSS-MODAL

Intra-modal : Association entre plusieurs stimuli (minimum deux) de même modalité sensorielle.

Cross-modal : Association entre plusieurs stimuli (minimum deux) de modalité sensorielle différente.

REACQUISITION versus RAPPEL

Réacquisition : Session durant laquelle les stimuli utilisés lors de l'acquisition sont présentés après un délai variable à l'animal. Session en tout point similaire à l'acquisition.

Rappel : Session durant laquelle les stimuli utilisés lors de l'acquisition sont présentés après un délai variable à l'animal. Session typiquement caractérisée par des essais effectués en l'absence de renforcement accessible, pour empêcher une éventuelle réacquisition de la tâche.

UNIMODAL versus BIMODAL versus MULTISENSORIEL

Unimodal : Nombre de stimuli = 1

Bimodal : Nombre de stimuli = 2

Multisensoriel : Nombre de stimuli > 2

ORGANISATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit est divisé en cinq parties :

L'introduction présente le contexte scientifique dans lequel s'inscrit ce travail de thèse, ainsi que les différentes questions abordées. Dans cette partie, la première section présente la formation hippocampique dans son ensemble, et tout particulièrement l'hippocampe dorsal et le cortex entorhinal latéral, ainsi que leurs interactions anatomiques et fonctionnelles connues. La seconde section se focalise sur les différents types d'apprentissages associatifs relationnels pour lesquels le rôle de l'hippocampe et/ou du cortex entorhinal a été identifié. Enfin, la troisième section décrit l'état actuel des connaissances au sujet de la neurophysiologie sensorielle unimodale et multisensorielle, avec un intérêt tout particulier pour les modalités olfactive et tactile. Cette introduction s'achève par l'énoncé des objectifs, ainsi que des hypothèses détaillées.

Les trois chapitres suivants présentent les données expérimentales obtenues par trois études complémentaires : comportementale, pharmacologique et électrophysiologique. Chaque chapitre comporte une présentation des matériels et des méthodes employés, une description des résultats obtenus, et une discussion des données recueillies, en confrontation avec la littérature et les hypothèses développées dans les objectifs de ce travail de thèse.

Enfin, la dernière section de ce manuscrit présente une synthèse globale des résultats obtenus dans les différentes études, donnant lieu à la construction d'un modèle de travail entre le cortex entorhinal latéral et l'hippocampe dorsal, et plus généralement entre la région parahippocampique et l'hippocampe. Ces données sont également mises en perspective en vue de futurs travaux pour compléter le modèle issu de ce travail de thèse.

TABLES DES MATIERES

AVANT-PROPOS

Originalité de ce travail dans le contexte bibliographique.....	20
Concept général sur le thème de la mémoire.....	20
Définition de la mémoire associative.....	23
Mécanismes de la plasticité synaptique.....	23

INTRODUCTION

I.	Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la formation hippocampique.....	26
A.	Anatomie et fonctions de l'hippocampe et du cortex entorhinal.....	27
1.	L'hippocampe : une structure très étudiée.....	27
a.	Anatomie caractérisée depuis plus d'un siècle.....	27
b.	Rôle critique dans de nombreux apprentissages associatifs.....	28
2.	Le cortex entorhinal : une structure longtemps ignorée par la littérature...	29
a.	Dissociation anatomique.....	31
b.	Dissociation fonctionnelle.....	31
B.	Anatomie et interactions fonctionnelles entre l'hippocampe dorsal et le cortex entorhinal	32
1.	Deux structures étroitement connectées.....	32
2.	Peu de connaissances sur l'implication conjointe de ces deux structures dans un même apprentissage associatif.....	34
3.	Caractérisation des activités oscillatoires de ces deux structures.....	34
C.	Modulation cholinergique exercée sur la formation hippocampique.....	36
II.	Implication de l'hippocampe et du cortex entorhinal dans la formation des associations relationnelles bimodales.....	38
A.	Acquisition des représentations relationnelles bimodales.....	38
B.	Flexibilité des représentations relationnelles bimodales.....	39
C.	Remarques sur la littérature s'intéressant aux apprentissages associatifs relationnels bimodaux.....	40
III.	Neurophysiologie sensorielle unimodale et multisensorielle.....	42
A.	Intégration multisensorielle.....	42
1.	Concept général.....	42
2.	Etudes essentiellement centrées sur les modalités auditive et visuelle chez le primate humain et non-humain.....	43
3.	Brève revue des études portant sur les autres modalités sensorielles chez différentes espèces.....	43
4.	Etudes axées sur la perception et non sur la mémoire.....	44
B.	Olfaction et toucher : des modalités sensorielles majeures chez le rat.....	45
1.	Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la modalité olfactive...	45
a.	Organisation anatomique.....	45
b.	Capacités perceptives et mnésiques bien connues.....	46
c.	Activités oscillatoires.....	47
2.	Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la modalité tactile.....	48
a.	Organisation anatomique.....	49
b.	Capacités perceptives bien connues, mais capacités mnésiques méconnues.....	50
c.	Activités oscillatoires.....	52

C. Mécanismes sous-tendant la formation des associations olfacto-tactiles.....	52
1. Des modalités fonctionnellement associées... ..	52
2. ... mais paradoxalement sous-tendues par des cortex anatomiquement éloignés.....	53
3. Une question peu étudiée : les bases neuronales de la mémoire olfacto-tactile.....	54
<u>OBJECTIF</u>	56

CHAPITRE 1 : ETUDE COMPORTEMENTALE

Caractéristiques de la tâche olfacto-tactile et stratégies utilisées par l'animal

I. MATERIEL ET METHODES	60
II. RESULTATS	68
A. Caractéristiques de l'apprentissage d'une tâche bimodale olfacto-tactile.....	68
B. Caractéristiques de l'apprentissage d'une tâche unimodale olfactive et d'une tâche unimodale tactile.....	78
C. Comparaison des performances observées entre les tâches unimodales et bimodale.....	81
D. Contrôle des biais expérimentaux.....	82
III. DISCUSSION	84
A. Caractéristiques générales des apprentissages développés.....	84
B. Limitations de notre test comportemental et développements possibles.....	92
C. Avantages de notre test comportemental.....	92
Conclusion.....	93

CHAPITRE 2 : ETUDE PHARMACOLOGIQUE

Cortex entorhinal et hippocampe dorsal : Mécanismes de l'apprentissage olfacto-tactile

I. MATERIEL ET METHODES	96
II. RESULTATS	104
A. Rôle du cortex entorhinal latéral (CEL) dans l'apprentissage olfacto-tactile.....	104
B. Rôle de l'hippocampe dorsal (DH) dans l'apprentissage olfacto-tactile.....	116
C. Contrôle histologique des sites d'injection.....	126
III. DISCUSSION	127
A. Critique de la technique utilisée.....	127
B. Récapitulatif des effets obtenus dans l'ensemble de l'étude pharmacologique..	128
C. Acquisition d'une tâche olfacto-tactile : Rôle du cortex entorhinal latéral et de l'hippocampe dorsal.....	130
D. Recombinaison d'une tâche olfacto-tactile : Rôle du cortex entorhinal latéral et de l'hippocampe dorsal.....	137
E. Rappel d'une tâche olfacto-tactile : Rôle du cortex entorhinal latéral.....	145
F. Spécificité et limites des résultats présentés.....	146
G. Un modèle à compléter.....	148
Conclusion.....	150

CHAPITRE 3 : ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

Signatures oscillatoires de l'apprentissage olfacto-tactile

I. MATERIEL ET METHODES	154
II. RESULTATS	163
A. Résultats comportementaux.....	164
B. Exemple de signaux bruts de potentiels de champ locaux.....	165
C. Activités oscillatoires en réponse à l'échantillonnage d'un stimulus olfactif, tactile ou bimodal olfacto-tactile.....	166
D. Comparaison des réponses bêta à un stimulus olfactif, tactile ou olfacto-tactile.....	174
E. Comparaison des réponses à un stimulus olfacto-tactile entre l'acquisition et la recombinaison.....	176
III. DISCUSSION	190
A. Qu'est-ce qu'un potentiel de champ local ?	190
B. Les oscillations bêta comme corrélat électrophysiologique de l'apprentissage olfactif.....	190
C. Les oscillations thêta comme corrélat électrophysiologique de l'apprentissage tactile ?	192
D. L'acquisition olfacto-tactile : quel(s) corrélat(s) électrophysiologique(s) ?	193
E. Comparaison des réponses à un stimulus olfactif, tactile et bimodal olfacto-tactile : oscillations bêta dans l'aPC et le CEL.....	195
F. La recombinaison olfacto-tactile : quel(s) corrélat(s) électrophysiologique(s) ?	197
Conclusion.....	201
 CONCLUSION	
Modèle de travail et intégration de nos données dans la littérature.....	204
Perspectives.....	208
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	213
 ARTICLES PUBLIES	
Article 1	230
Article 2	247

AVANT-PROPOS

Originalité de ce travail dans le contexte bibliographique

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier le rôle respectif de deux structures de la formation hippocampique, le cortex entorhinal latéral et l'hippocampe dorsal, dans les processus sous-tendant la formation et la flexibilité des associations bimodales chez le rongeur.

Les connexions anatomiques étroites et réciproques entre ces deux structures sont finement caractérisées chez ce modèle animal. Fonctionnellement, de nombreuses études ont été menées dans le but de comprendre le rôle de l'hippocampe dorsal dans les processus sous-tendant les apprentissages associatifs, et un nombre plus restreint concerne la région latérale du cortex entorhinal. Sachant que ces deux structures jouent un rôle important dans les processus associatifs, une tâche relationnelle dont la résolution met en jeu des associations multisensorielles a été développée et proposée à des rats, dans le but d'aborder le rôle respectif de l'hippocampe dorsal et du cortex entorhinal latéral dans les processus sous-tendant cet apprentissage. Le paradigme développé ici consiste à construire des associations bimodales composées de stimuli sensoriels olfactifs et tactiles. Ces deux modalités ont été choisies car le rat est un animal nocturne qui utilise préférentiellement son odorat et son sens du toucher pour explorer son environnement et identifier les objets le composant. L'objectif initial de ce travail de thèse est de caractériser avec précision la stratégie mise en place par l'animal dans ce type d'apprentissage bimodal, pour ensuite mettre en évidence l'implication respective du cortex entorhinal latéral et de l'hippocampe dorsal dans les processus sous-tendant cette stratégie. L'originalité de ce travail est d'utiliser une tâche dans laquelle les animaux ne disposent d'aucun indice spatial ou contextuel pour sa résolution, afin de s'affranchir du rôle connu des structures de la formation hippocampique dans ce type d'apprentissage.

Cet avant-propos a pour but de présenter un bref historique des concepts qui apparaissent en toile de fond de ce travail de thèse.

Concept général sur le thème de la mémoire

La mémoire est une fonction biologique permettant d'enregistrer des informations, de les conserver et de les restituer ultérieurement. Depuis plus d'un siècle, des études portant sur la neurobiologie de la mémoire ont pour but de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes d'acquisition, de consolidation et de rappel des informations qui sous-tendent les apprentissages. Par ailleurs, bien que la mémoire ait longtemps été considérée comme une fonction unitaire, les recherches ont progressivement conduit à la reconsidérer comme un processus cognitif polymorphe au cours duquel interviennent différents réseaux de structures fonctionnellement distincts, au niveau desquelles l'information est codée sous forme de motifs spatio-temporels d'activité.

L'étude de cas cliniques traumatiques et pathologiques a permis de fournir des informations majeures quant au substrat neurobiologique de la mémoire, notamment l'étude du célèbre patient H.M. dans les années 1950. Souffrant d'épilepsie et ayant subi une

ablation bilatérale du lobe temporal médian dans le but d'éliminer le foyer épileptique, ce patient présentait des pertes de mémoire bien identifiées suite à cette chirurgie. En effet, il était dans l'incapacité de restituer des souvenirs récents de l'ordre de quelques minutes jusqu'à plusieurs années précédant l'intervention (amnésie rétrograde), ainsi que de former de nouveaux souvenirs (amnésie antérograde). Toutefois, sa mémoire sémantique (connaissances générales : exemple, Rome est la capitale de l'Italie) et sa mémoire procédurale (habiletés motrices et savoir-faire : exemple, lacer ses chaussures) n'étaient pas affectées (*Scoville et Milner, 1957*). Ainsi, cette observation a permis de montrer que la mémoire des événements et celle des habiletés sensorimotrices sont sous-tendues par des circuits nerveux différents dans le cerveau. Cette étude initiale a contribué à mettre en évidence deux caractéristiques critiques des processus mnésiques :

- 1) Il existe une dissociation systémique et anatomique entre la mémoire à court-terme et la mémoire à long-terme, et ces deux processus sont séparés par le mécanisme de consolidation, selon le modèle développé par Atkinson et Shiffrin en 1968 ;
- 2) Il existe une dissociation systémique et anatomique entre plusieurs types de mémoire lesquels sont sous-tendus par des régions cérébrales distinctes (*Squire et Knowlton, 1995 ; Figure 1*).

Cette taxonomie des différents systèmes de mémoire met notamment en évidence l'importance critique des structures limbiques du lobe temporal médian, particulièrement la formation hippocampique, dans la mise en mémoire des événements. Au cours des dernières décennies, différents apprentissages ont été utilisés comme modèles d'étude de la mémoire, et de nombreux travaux ont permis de montrer que la mise en mémoire d'une information est notamment sous-tendue par deux opérations cognitives distinctes, dont une partie au moins est assurée par la formation hippocampique (pour revue, *Suzuki et Eichenbaum, 2000*) :

- 1) L'acquisition, processus cognitif reposant sur la formation d'associations entre un ou plusieurs stimuli pertinents et un renforcement ;
- 2) La flexibilité, processus cognitif permettant d'adapter la réponse comportementale aux changements de l'environnement.

Depuis le milieu de XXème siècle, l'utilisation de modèles animaux dont l'organisation et le fonctionnement du système limbique sont similaires à celui de l'Homme permet de mettre à l'épreuve les hypothèses formulées par l'étude des cas cliniques, et d'accéder aux multiples mécanismes sous-tendant ces différents processus.

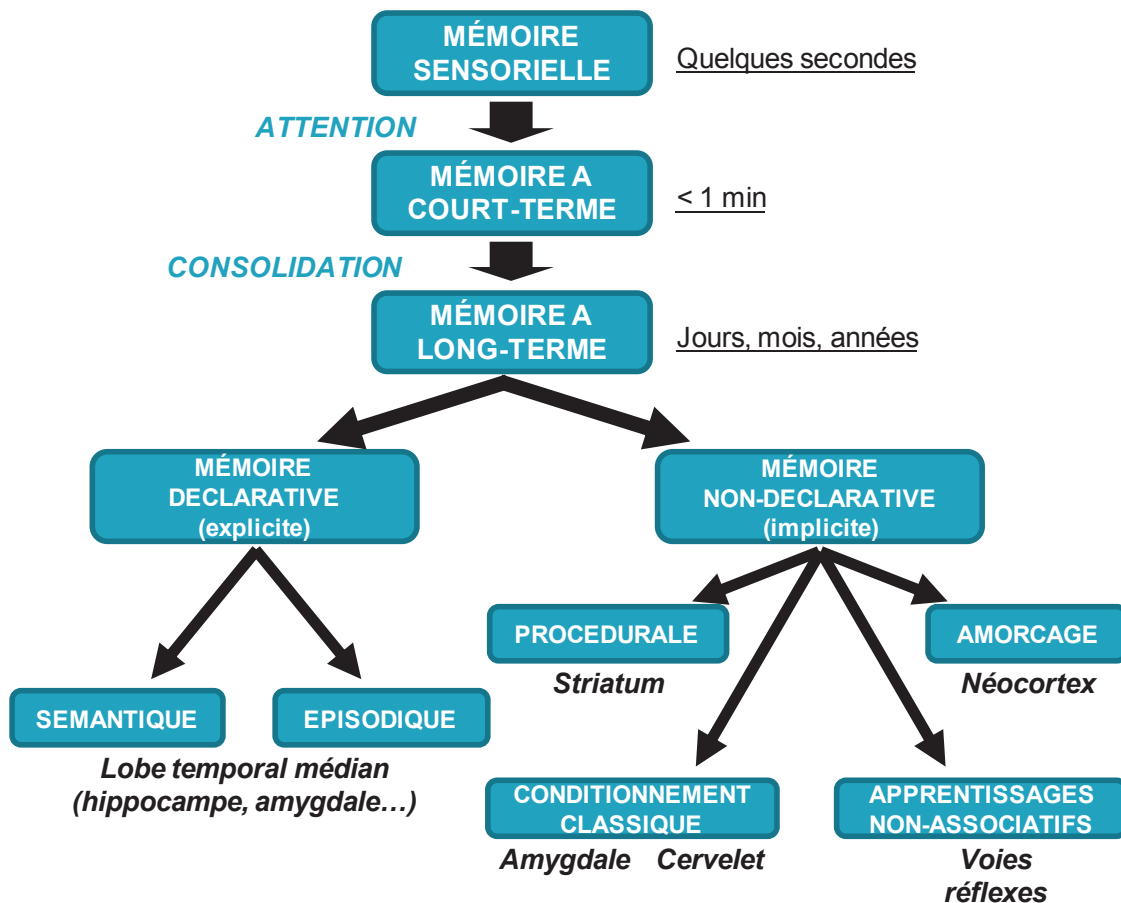


Figure 1 : Taxonomie des différents systèmes de mémoire. La mémoire sensorielle est très courte et sous-tend les informations en provenance des organes sensoriels (durée inférieure à une minute). Leur mise en mémoire à court-terme est sous-tendue par des processus attentionnels. Les informations peuvent ensuite être consolidées en mémoire à long-terme (pendant des jours, des mois, des années). Celle-ci est subdivisée en mémoire déclarative reposant globalement sur le fonctionnement du lobe temporal médian, et en mémoire non-déclarative dépendant du fonctionnement de structures telles que le striatum, l'amygdale et le néocortex par exemple. Adapté des théories d'Atkinson et Shiffrin, 1968 et de Squire et Knowlton, 1995.

Définition de la mémoire associative

En principe, un apprentissage dit « associatif » repose sur la construction d'un lien entre un ou plusieurs stimuli et un renforcement. Classiquement, deux types d'apprentissages associatifs sont décrits dans la littérature : l'apprentissage associatif simple^{***1} et l'apprentissage associatif relationnel^{***1} (pour revue, *Pickens et Holland, 2004*).

L'apprentissage simple repose sur la formation d'une association entre un stimulus et un renforcement positif ou négatif (pour revue, *Pickens et Holland, 2004*). Ce principe est notamment issu des travaux de conditionnement conduits par Ivan Pavlov au début du XXème siècle. Dans ces derniers, un chien apprenait à associer le son d'une cloche à l'arrivée de sa nourriture. Après plusieurs appariements, le son de la cloche, prédisant l'arrivée de la nourriture, déclenchait une réponse conditionnée de salivation. Ce paradigme a été adapté à d'autres modèles animaux, et notamment au rongeur (association entre un son et un choc par exemple). La tâche de « Go-NoGo » repose également sur un apprentissage associatif simple. Dans celle-ci, l'animal doit par exemple choisir le stimulus A, qui est renforcé (noté +) et éviter le stimulus B (noté -), qui ne l'est pas (A+ ; B-).

L'apprentissage relationnel consiste quant à lui à former une association entre plusieurs stimuli (minimum deux) et un renforcement positif ou négatif, et repose sur la construction de représentations complexes (pour revue, *Sutherland et Rudy, 1989* ; pour revue, *Rudy et Sutherland, 1995*). En effet, pour résoudre ce type de tâche, l'animal doit prendre en compte la relation entre les différents stimuli. Par exemple, les paires de stimuli AB et DC sont renforcées, mais les paires AC et DB ne le sont pas (AB+ ; AC- ; DB- ; DC+).

Historiquement, la formation hippocampique est un élément clé sous-tendant l'apprentissage relationnel (pour revue, *Sutherland et Rudy, 1989* ; pour revue, *Rudy et Sutherland, 1995*), contrairement à l'apprentissage simple (*Philips et LeDoux, 1992* ; *Driscoll et al., 2004*).

Mécanismes de la plasticité synaptique

Un apprentissage repose en principe sur la plasticité des circuits du cerveau, c'est-à-dire sur la capacité des neurones à modifier de façon durable l'efficacité de leur transmission synaptique. Les informations relatives à un nouvel apprentissage sont stockées au niveau de réseaux neuronaux, et ces informations peuvent être restituées par activation de ces mêmes réseaux. Cette théorie repose notamment sur les travaux fondateurs de Donald Hebb publiés en 1949, selon lesquels l'activité synchrone de deux neurones renforce leur(s) synapse(s) commune(s). Dès lors, si la construction de nouvelles associations entre un ou plusieurs stimuli et un renforcement est sous-tendue par une potentialisation synaptique de type hebbien, la co-activation des inputs relatifs aux stimuli d'intérêt sur les mêmes neurones, associée à l'influence de neuromodulateurs tels que l'acétylcholine (*Leung et al., 2003*), la dopamine (pour revue, *Wise, 2004*) et la noradrénaline (*Kemp et Manahan-Vaughan, 2008*), conduirait à la potentialisation de l'effet de chacun des inputs (**Figure 2**).

Au niveau synaptique, ce postulat d'interaction entre neurones pré- et post-synaptiques a été confirmé dans les années 1970 par la découverte d'une forme durable de plasticité synaptique, connue sous le nom de « long-term potentiation » (LTP ; *Bliss et Lomo,*

¹ *** : voir LEXIQUE (page 13)

1973). Selon ce mécanisme, l'arrivée d'un train de potentiels d'action au niveau pré-synaptique induit une augmentation de l'amplitude de la réponse post-synaptique. En effet, la libération de glutamate au niveau pré-synaptique induit une entrée de sodium par les récepteurs glutamatergiques de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) localisés au niveau du neurone post-synaptique. Ceci permet de suffisamment dépolariiser la membrane du neurone post-synaptique pour évacuer les ions magnésium (Mg^{2+}) bloquant le canal des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (N-méthyl-D-aspartate), ce qui autorise alors l'entrée de calcium (Ca^{2+}) dans la dendrite. Ces ions Ca^{2+} agissent à leur tour en activant de nombreuses cascades de signalisations intracellulaires par des kinases (calmoduline kinase II, tyrosine kinase, Mitogen Activated Proteins kinase...) et par des interactions protéines-protéines qui permettent la conversion du signal d'activation synaptique en changements fonctionnels au niveau des connexions neuronales, c'est-à-dire à la formation de traces synaptiques (Bliss et Collingridge, 1993).

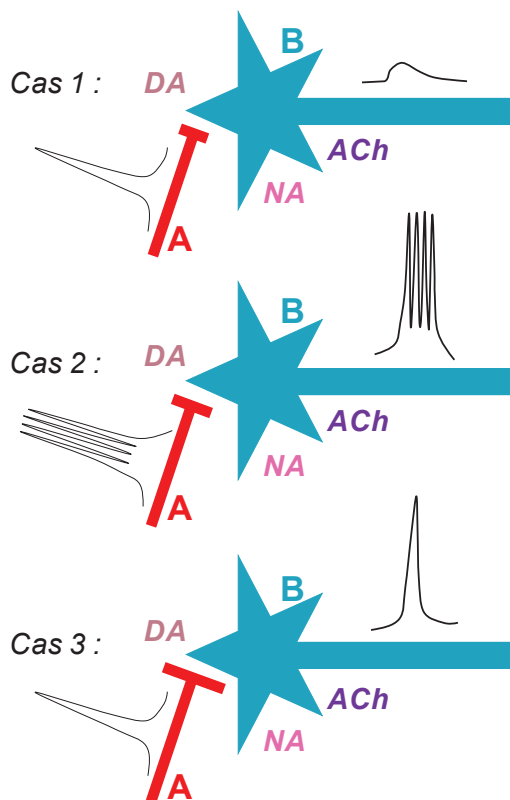


Figure 2 : Schéma illustrant le postulat de Hebb (1949) selon lequel « cells that fire together, wire together ». Le cas 1 illustre la situation dans laquelle la synapse n'est pas assez efficace pour induire un potentiel d'action. Le cas 2 indique qu'une forte activité répétée au niveau du neurone A induit une forte activité quasiment simultanée dans le neurone B. Le cas 3 représente la situation dans laquelle l'activation simultanée et répétée des neurones A et B illustrée dans le cas 2, a permis de renforcer suffisamment la synapse pour que le potentiel d'action émis au niveau du neurone A soit immédiatement reproduit par le neurone B. Les neurotransmetteurs cholinergiques (ACh), dopaminergiques (DA) et noradrénergiques (NA) favorisent l'induction de la potentialisation entre les neurones A et B.

Au niveau de la formation hippocampique, le lien entre les récepteurs NMDA et l'induction de la LTP a été mis en évidence depuis de nombreuses années (Yun *et al.*, 2000b ; pour revue, Morris, 2013). Ainsi, les mécanismes de LTP pourraient constituer le substrat des processus mnésiques sous-tendant les apprentissages. En effet, bien que le débat anime toujours la littérature (Barnes, 1995 ; Stevens, 1998), trois arguments majeurs sont en faveur de cette hypothèse (Laroche, 2010 ; pour revue, Morris, 2013) :

- L'apprentissage d'une tâche est corrélé avec les processus d'induction de la LTP ;
- Les mécanismes cellulaires et moléculaires sont similaires entre la LTP et ceux observés au cours et suite à un apprentissage ;
- La LTP a été montrée comme nécessaire et suffisante pour la mise en mémoire d'un apprentissage.

INTRODUCTION

I. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la formation hippocampique

La formation hippocampique est constituée par un groupe de plusieurs structures : l'hippocampe et la région parahippocampique, qui est connectée à l'hippocampe et qui inclut le cortex périrhinal, le cortex entorhinal et le cortex parahippocampique (cortex postrhinal chez le rat ; *Furtak et al., 2007* ; **Figure 3**).

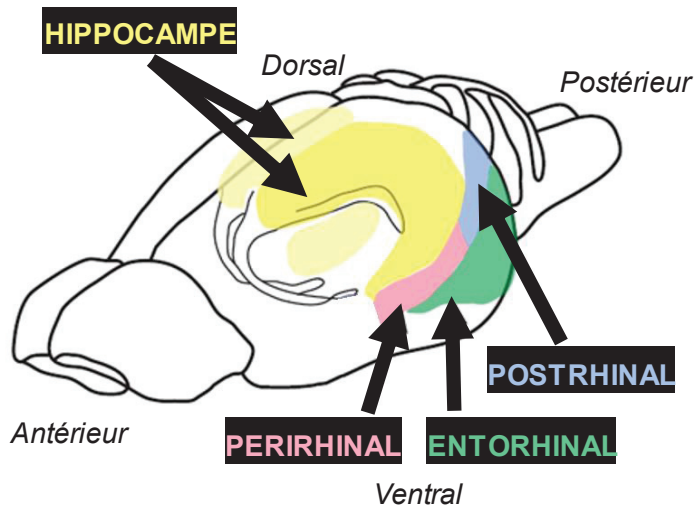


Figure 3 : Schéma de l'anatomie de la formation hippocampique du rongeur. L'hippocampe est une structure bilatérale volumineuse (en jaune). Les cortex périrhinal (en rose), entorhinal (en vert) et postrhinal (en bleu) forment la région parahippocampique (structures bilatérales non représentées). L'ensemble de ces quatre structures compose la formation hippocampique. Adapté de Furtak et al., 2007.

La région parahippocampique représente la plus importante entrée d'informations de l'hippocampe (*Burwell, 2000* ; *Agster et Burwell, 2013*). En effet, cette vaste région est réciproquement et étroitement connectée avec plusieurs cortex associatifs impliqués dans le traitement des différentes modalités sensorielles (visuelle, auditive, somesthésique, gustative et olfactive ; *Burwell et Amaral, 1998* ; *Agster et Burwell, 2009*). Sur le plan anatomo-fonctionnel, l'ensemble des connexions cortico-hippocampiques détermine un réseau de traitement parallèle de l'information. En effet, en provenance des structures sensorielles néocorticales (cortex auditifs et visuels notamment), une voie permet le transit des informations concernant les caractéristiques sensorielles des objets ou « what » par le cortex périrhinal et le cortex entorhinal latéral. L'autre voie passant par le cortex postrhinal et le cortex entorhinal médian véhicule les informations principalement liées au contexte et à la position des objets dans l'espace ou « where » (*Furtak et al., 2007* ; *Kerr et al., 2007*). Recevant ces deux types d'informations, l'hippocampe est alors impliqué dans la construction d'une représentation complète et cohérente de l'objet, dans l'espace et dans son contexte. L'ensemble de ces structures est étroitement et réciproquement connecté, et ces connexions sont le support de mécanismes de plasticité permettant l'encodage rapide de ces associations (pour revue, *Eichenbaum et al., 2007* ; **Figure 4**).

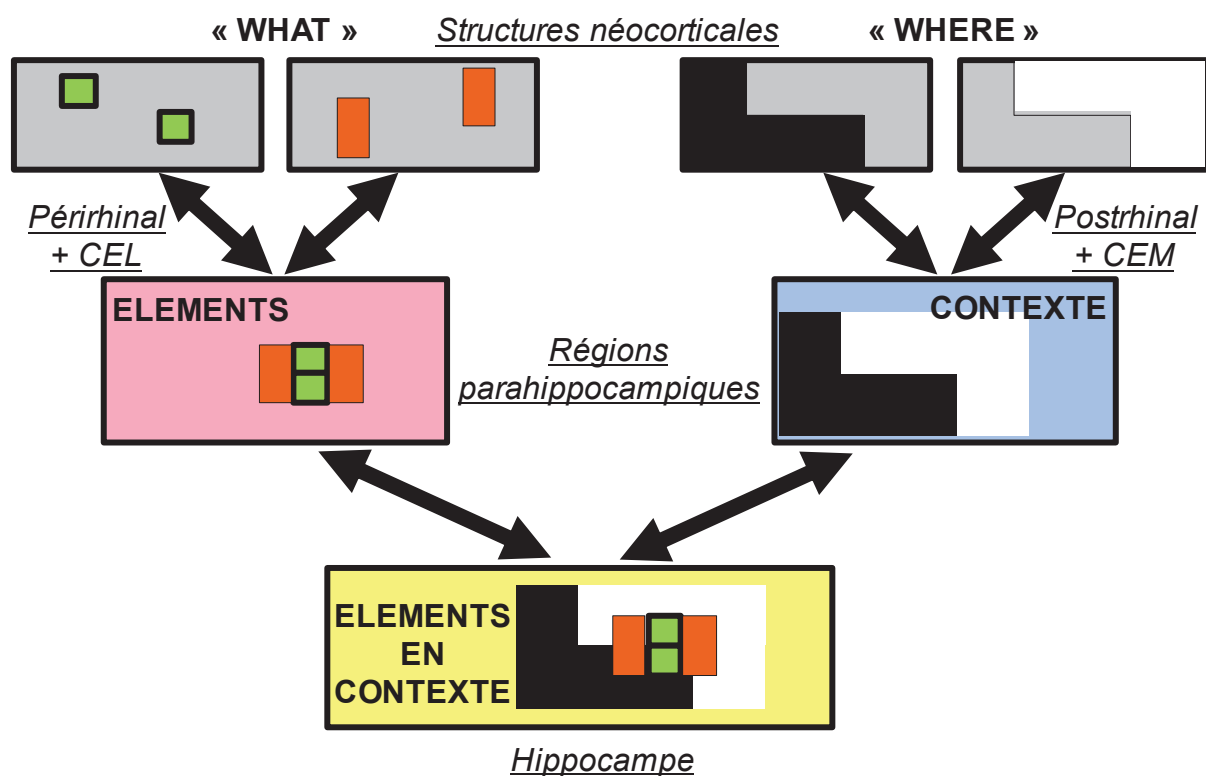


Figure 4 : Organisation fonctionnelle de la formation hippocampique. Issues des structures néocorticales, les informations relatives à l'identité de l'objet ou « what » convergent sur le cortex périorhinal, puis sur le cortex entorhinal latéral (CEL). Les détails relatifs au contexte et à la localisation de l'objet ou « where » convergent quant à eux sur le cortex postrhinal, puis sur le cortex entorhinal médian (CEM). Ces deux types d'informations fusionnent au niveau de l'hippocampe, ce qui permet de créer une représentation complète de l'identité de l'objet dans l'espace et dans son contexte. Ces structures sont étroitement et réciproquement connectées. D'après le modèle proposé par Howard Eichenbaum (2007).

A. Anatomie et fonctions de l'hippocampe et du cortex entorhinal

1. L'hippocampe : une structure très étudiée

a. Anatomie caractérisée depuis plus d'un siècle

L'hippocampe est une structure limbique bilatérale située au niveau du lobe temporal médian et qui inclut le gyrus denté, les cornes d'Ammon 1, 2 et 3 (respectivement appelées régions CA1, CA2 et CA3) et le subiculum (Amaral et Witter, 1989). Facilement accessible et très volumineuse chez le rongeur (environ 10% du volume total du cerveau), la région dorsale de l'hippocampe (ou DH pour « dorsal hippocampus ») a fait l'objet de multiples études, par des approches notamment lésionnelles, pharmacologiques et électrophysiologiques.

L'anatomie de l'hippocampe est particulièrement bien caractérisée depuis plus d'un siècle, avec les travaux histologiques pionniers menés et publiés par Ramón y Cajal en 1905 (Figure 5). Les informations sensorielles issues du cortex entorhinal convergent par la voie perforante (Steward, 1976) sur les cellules granulaires du gyrus denté (Deller et al., 1996), puis sur les cellules pyramidales de la région CA3 par l'intermédiaire des fibres moussues. Une voie directe entre le cortex entorhinal et la région CA3 a également été mise en évidence. Au niveau de la région CA3, des fibres contralatérales permettent son auto-

activation, ce qui favorise la formation d'associations entre les différentes informations, lesquelles sont ensuite transférées à la région CA1 par les fibres collatérales de Schaeffer. Enfin, les informations sont envoyées en retour au cortex entorhinal, avec un relai ou non au niveau du subiculum, structure étroitement connectée avec la région CA1.

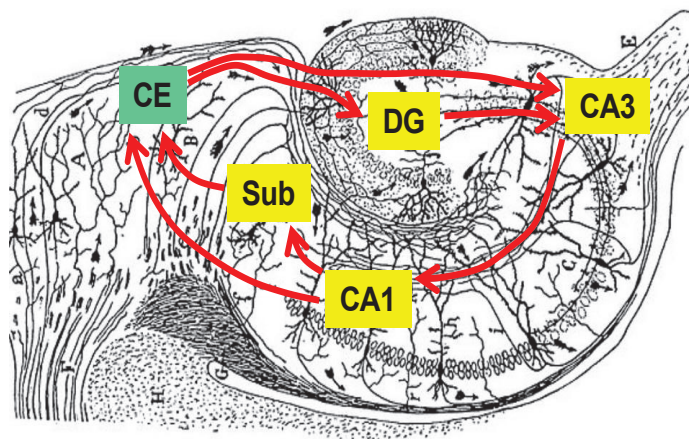


Figure 5 : Schéma de l'organisation neuroanatomique de l'hippocampe. Les informations issues du cortex entorhinal (CE) convergent sur le gyrus denté (DG), puis sont transmises à la région CA3 par les fibres moussues. Une voie de projection directe a également été caractérisée du CE à la région CA3. Les informations sont ensuite transférées à la région CA1 par les fibres collatérales de Schaeffer, puis rejoignent le CE directement ou après un relai au niveau du subiculum. A partir d'une représentation de Ramón y Cajal, 1905.

b. Rôle critique dans de nombreux apprentissages associatifs

Ce paragraphe n'a pas pour objectif de cataloguer les multiples fonctions reposant sur le DH, mais plutôt de présenter succinctement les principaux apprentissages associatifs dans lesquels il intervient.

L'observation du cas H.M. a mis en évidence le rôle de l'hippocampe dans la mémoire déclarative, et tout particulièrement dans la mémoire épisodique, dont les mécanismes sont hautement conservés entre les espèces, de l'Homme au rongeur (pour revue, *Manns et Eichenbaum, 2006*). En effet, l'apprentissage d'un épisode de vie, c'est-à-dire la représentation complète d'un événement dans l'espace et dans son contexte, repose sur le fonctionnement de l'hippocampe chez l'Homme (*Davachi et Wagner, 2002*), comme chez le rongeur (*Ergorul et Eichenbaum, 2004 ; Easton et al., 2012b ; Veyrac et al., 2015*). Egalement classée en tant que mémoire déclarative, la mémoire spatiale désigne les processus de mise en relation entre un objet et sa localisation dans l'environnement, et repose de façon critique sur le fonctionnement de l'hippocampe. En effet, l'utilisation du labyrinthe aquatique proposé par Richard Morris dans les années 1980 a permis d'étudier en détail les substrats neuronaux sous-tendant les apprentissages spatiaux (*Morris et al., 1982*). Cette implication de l'hippocampe dans ce type d'apprentissage repose notamment sur l'activation des cellules de lieu, neurones découverts dans l'hippocampe dorsal par l'équipe de John O'Keefe au début des années 1970 (*O'Keefe et Dobrosky, 1971*). En effet, ces cellules s'activent de manière à former des profils d'activation spécifiques en fonction de la position de l'animal lorsqu'il évolue dans son environnement. Ces profils forment alors une représentation spatiale des environnements connus, correspondant à une carte cognitive (pour revue, *Moser et al., 2015*). Le DH est également sollicité lors du traitement des informations contextuelles associées à la présentation d'un stimulus : par exemple, la lésion de l'hippocampe induit un déficit de l'apprentissage du contexte dans lequel le choc a été

délivré, sans perturber la formation de l'association « son-choc » elle-même (*Philips et LeDoux, 1992 ; Maren et Holt, 2000 ; Matus-Amat et al., 2004*). Le contexte étant défini par l'ensemble des informations sensorielles perçues par l'animal relatives à l'environnement dans lequel il se trouve, ces travaux suggèrent que l'hippocampe joue un rôle dans la mise en relation des informations issues de différentes modalités sensorielles (visuelles, auditives, tactiles, olfactives...).

Ainsi, chez le rat, le DH est mobilisé au cours de différents apprentissages associatifs, incluant notamment des apprentissages épisodiques, spatiaux et contextuels multisensoriels. Ces travaux contribuent à mettre en évidence le rôle de cette structure dans la construction de représentations d'informations de nature différente, dans l'espace et dans le temps. Plus spécifiquement, des travaux ont montré que les différentes régions du DH sous-tendent des mécanismes distincts. Ainsi, des études lésionnelles ont mis en évidence l'implication du gyrus denté et de la région CA3 dans des apprentissages spatiaux (*Gilbert et al., 2001 ; Gilbert et Kesner, 2003*), tandis que la région CA1 est plutôt sollicitée dans des conditionnements de trace, c'est-à-dire lorsque les stimuli à associer sont séparés par un court délai de l'ordre de quelques secondes (*Kesner et al., 2005*). En accord avec ces travaux, il a été montré que la région CA3 s'active davantage en réponse à des stimuli spatiaux qu'à des stimuli non-spatiaux tels qu'une odeur ou un objet, tandis que la région CA1 répond de façon similaire à ces deux types de stimuli (*Beer et al., 2013*). Ces travaux indiquent donc que les différentes parties du DH sont impliquées dans le traitement d'informations différentes et complémentaires.

Toutefois, bien que les études sur la mémoire aient longtemps attribué un rôle fondamental quasi exclusif à l'hippocampe, il est aujourd'hui connu que la mémoire est un processus plurifonctionnel reposant sur l'activation d'un réseau complexe de structures possédant des caractéristiques particulières et complémentaires, telles que celles formant la région parahippocampique (*Eichenbaum et al., 1996 ; pour revue, Eichenbaum, 2000*).

Classiquement considéré comme la structure responsable de l'arrivée principale des informations sensorielles dans l'hippocampe, le cortex entorhinal est une structure pour laquelle l'intérêt a sensiblement crû au cours des dernières années.

2. Le cortex entorhinal : une structure longtemps ignorée par la littérature

Structure relativement peu étudiée jusqu'aux années 1990, le regard et l'intérêt porté au cortex entorhinal (CE) ont largement évolué depuis. En effet, dans certains articles publiés dans les années 1980, le CE était fréquemment considéré comme une simple sous-partie de l'hippocampe, tandis que l'ensemble des régions parahippocampiques constituait uniquement un relai entre l'hippocampe et le lobe frontal. Ainsi, les effets de la lésion de ce cortex sur l'apprentissage d'une tâche olfactive ont par exemple été interprétés comme résultants du dysfonctionnement de l'hippocampe, alors privé d'informations provenant du CE (*Staubli et al., 1984*). Toutefois, depuis quelques années, avec l'utilisation de techniques beaucoup plus précises, l'implication du CE dans différents types d'apprentissages associatifs apparaît plus importante et fait l'objet de nombreuses publications.

Parmi les structures sollicitées pour l'intégration des informations multisensorielles, le CE est un élément clé dans une hiérarchie structurale bien déterminée. Selon le modèle développé par Lavenex et Amaral en 2000, le cortex périrhinal constitue le premier niveau de traitement des informations visuelles, auditives, et dans une moindre mesure, tactiles. Le CE représente ensuite le second niveau d'intégration, à un degré de complexité plus élevé, puisqu'il reçoit non seulement les informations sensorielles traitées par le cortex périrhinal, mais également des informations olfactives en provenance directe des structures de traitement primaire (bulbe olfactif et cortex piriforme). Selon cette étude, l'hippocampe représente le niveau ultime de l'intégration des informations unimodales et multisensorielles préalablement intégrées dans les deux niveaux inférieurs. Enfin, le traitement optimal de ces informations est favorisé par les multiples connexions qui existent entre les différents éléments de cette hiérarchie.

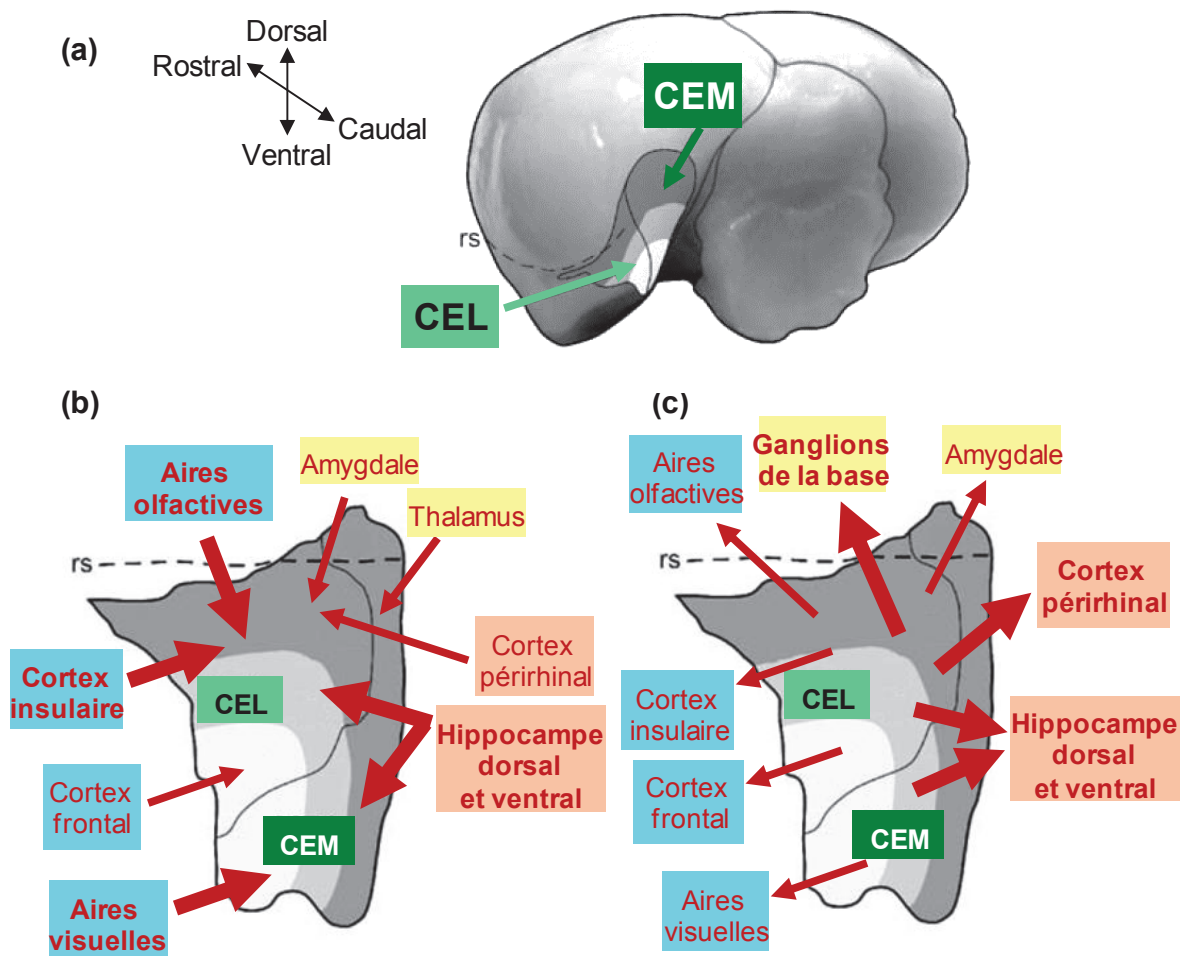


Figure 6 : Résumé des afférences et efférences du cortex entorhinal latéral (CEL) et du cortex entorhinal médian (CEM) chez le rat. (a) Localisation du cortex entorhinal en vue arrière, sans le cervelet. (b) Afférences et (c) Efférences principales (en flèches épaisses) et secondaires (en flèches fines) avec des structures corticales (en bleu), sous-corticales (en jaune) et la formation hippocampique (en orange). rs = sillon rhinal. Adapté de Kerr et al., 2007.

a. Dissociation anatomique

Le CE est une large structure localisée au niveau ventro-latéral chez le rongeur (**Figure 6.a**) et subdivisée en deux parties interconnectées (pour revue, *Canto et al., 2008*) : le cortex entorhinal latéral (CEL) et le cortex entorhinal médian (CEM). Cette divergence anatomique a été identifiée au niveau des projections du CE vers l'hippocampe par la mise en évidence d'une voie perforante latérale et médiane (*Hargreaves et al., 2005*). De plus, le CEL et le CEM présentent des caractéristiques morphologiques ainsi que des voies afférentes et efférentes différentes, aussi bien au niveau cortical que sous-cortical. Le CEL interagit de manière étroite et réciproque avec le cortex périrhinal, par l'intermédiaire duquel il reçoit des informations visuelles, auditives et tactiles, ainsi qu'avec le cortex piriforme et les structures olfactives en général. Le CEL est également connecté avec l'insula, l'amygdale et le cortex frontal (notamment la région orbitofrontale). Le CEM relie quant à lui le cortex postrhinal et les structures visuelles. L'ensemble des afférences et efférences corticales, sous-corticales et hippocampiques du CEL et du CEM est respectivement résumé sur les **figures 6.b et 6.c** (*Schwerdtfeger et al., 1990* ; *Kerr et al., 2007* ; *Agster et Burwell, 2009, 2013*).

b. Dissociation fonctionnelle

Longtemps considéré comme un simple relai d'informations sensorielles vers l'hippocampe, le CE est en réalité impliqué dans de multiples apprentissages associatifs, notamment spatiaux, contextuels ou encore temporaux, c'est-à-dire lorsqu'un délai sépare les deux stimuli à combiner (pour revue, *Coutureau et Di Scala, 2009* ; pour revue, *Morrissey et Takehara-Nishiuchi, 2014*). Toutefois, il fournit un traitement des informations différent de celui effectué par l'hippocampe, puisque la lésion sélective de ces deux structures n'induit pas nécessairement les mêmes déficits comportementaux. Ce cortex est également impliqué dans certaines tâches de reconnaissance d'objets lorsque la position et/ou le contexte de l'objet doivent être pris en compte (pour revue, *Suzuki et Eichenbaum, 2000* ; *Wilson et al., 2013a* ; *Wilson et al., 2013b* ; pour revue, *Morrissey et Takehara-Nishiuchi, 2014*). Ces résultats rejoignent des travaux portant sur les structures impliquées dans les processus sous-tendant la mémoire épisodique. En effet, une lésion de la connexion entre le CE et le cortex préfrontal médian induit un déficit de la mise en mémoire d'un évènement, sans pour autant impacter l'apprentissage de la représentation individuelle de l'objet, du contexte ou de sa position dans l'espace (*Chao et al., 2016*). D'autre part, le CE est impliqué dans l'apprentissage de tâches au cours desquelles un délai sépare les essais, notamment dans des paradigmes utilisant la modalité olfactive chez le rongeur (*Staubli et al., 1984*) et la modalité visuelle chez le primate (*Meunier et al., 1993*).

Comme décrit d'un point de vue anatomique, le CE présente également une dissociation fonctionnelle entre sa région latérale (CEL) et sa région médiane (CEM), chez l'Homme (*Schultz et al., 2012*), comme chez le rongeur (*Deshmukh et Knierim, 2012*). Ainsi, le CEL est plutôt impliqué dans la discrimination d'objets, c'est-à-dire dans des processus essentiellement sensoriels et limbiques, tandis que le CEM est sollicité dans des processus visuo-spatiaux sous-tendant notamment la reconnaissance spatiale (*Hargreaves et al., 2005*). Ces données ont été confirmées par la découverte des cellules de grille dans le CEM

par l'équipe de May-Britt et Edvard Moser en 2005. En effet, leurs travaux ont montré que ces cellules s'activent selon le trajet parcouru par l'animal dans l'espace, ce pattern dessinant alors une grille en fonction des repères externes, mais aussi des informations internes générées par les mouvements de l'animal lui-même et de la distance parcourue lors de ses déplacements. L'organisation de ces neurones et leur activation permet alors à l'animal de coder sa trajectoire dans l'environnement (*Hafting et al., 2005* ; pour revue, *Moser et al., 2015*). Toutefois, cette stricte dissociation fonctionnelle entre le CEL et le CEM a récemment été nuancée. En effet, il s'avère que le CEL est également sollicité dans les processus sous-tendant la formation d'associations entre les caractéristiques sensorielles d'un objet et son environnement proximal, tandis que le CEM est plus précisément impliqué dans la construction d'associations entre un objet et son environnement distal, c'est-à-dire sa position globale dans l'espace (pour revue, *Knierim et al., 2014*). Ces données sont cohérentes avec des études électrophysiologiques ayant montré que le CEL présente une activité similaire en réponse à des informations spatiales ou non-spatiales, telles qu'un objet ou une odeur (*Beer et al., 2013* ; *Van Cauter et al., 2013*).

L'ensemble de ces études permet de reconsidérer la dissociation fonctionnelle couramment évoquée au sujet du cortex entorhinal entre discrimination des caractéristiques sensorielles d'un objet au niveau de sa région latérale, et encodage des informations spatiales au niveau de sa région médiane. Cela ne contredit pas le modèle selon lequel le cortex périrhinal et le CEL fournissent des informations non-spatiales, tandis que le cortex postrhinal et le CEM pourvoient des informations spatiales à l'hippocampe (pour revue, *Knierim et al., 2006*), mais incite à considérer que cette dissociation n'est pas aussi nette.

Le paradigme développé dans notre travail de thèse ayant volontairement exclu toute dimension spatiale pertinente, seule la littérature relative à la région latérale du CE est présentée ci-après.

B. Anatomie et interactions fonctionnelles entre l'hippocampe dorsal et le cortex entorhinal

1. Deux structures étroitement connectées

L'anatomie du complexe « entorhinal-hippocampe » a brièvement été présentée au début de cette introduction. Plus précisément, deux voies afférentes distinctes permettent le transfert d'informations du CE vers le DH. A partir de la couche II du CE, des projections sont émises en direction du gyrus denté et de la région CA3, à partir de laquelle les informations sont transmises à la région CA1. Ce circuit trisynaptique forme la voie perforante. L'autre voie connecte directement la couche III du CE à la région CA1 et au subiculum. C'est la voie temporoammonique monosynaptique. Les connexions entre le CE et le DH sont réciproques, puisque les informations efférentes à la région CA1 sont transmises au niveau de la couche profonde V du CE, avec un relai (ou non) au niveau du subiculum (*Naber et al., 2001*). Ainsi, l'ensemble de ces connexions constitue une boucle entre le CE et le DH (**Figure 7**), et plus généralement entre les régions parahippocampiques et l'hippocampe (pour revue, *van Strien et al., 2009* ; **Figure 8**).

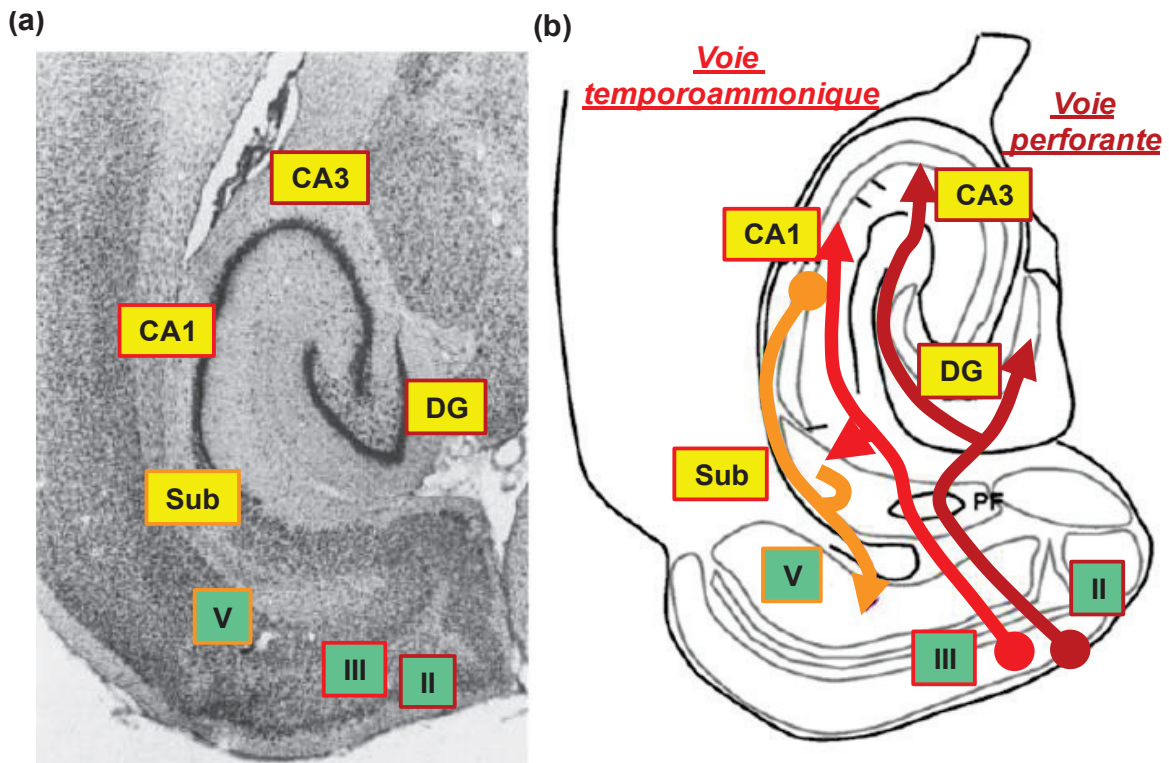


Figure 7 : Schéma de la connectivité du complexe « entorhinal-hippocampe ». (a) Coupe histologique horizontale de la formation hippocampique. Les régions formant l'hippocampe sont indiquées en jaune (DG = gyrus denté ; Sub = subiculum) et les couches formant le cortex entorhinal (CE) sont indiquées en vert (couches superficielles II et III ; couche profonde V). (b) Les neurones de la couche II du CE se projettent sur le DG et la région CA3 (flèches rouge foncé), et forment la voie perforante, tandis que les neurones de la couche III se projettent directement sur la région CA1 et le subiculum (flèches rouge vif), et constituent la voie temporoammonique. Les neurones de la région CA1 et du subiculum se projettent en retour sur la couche V du CE (flèches orange). L'ensemble de ce circuit forme une boucle de fonctionnement dynamique. Adapté de Coutureau et Di Scala, 2009.

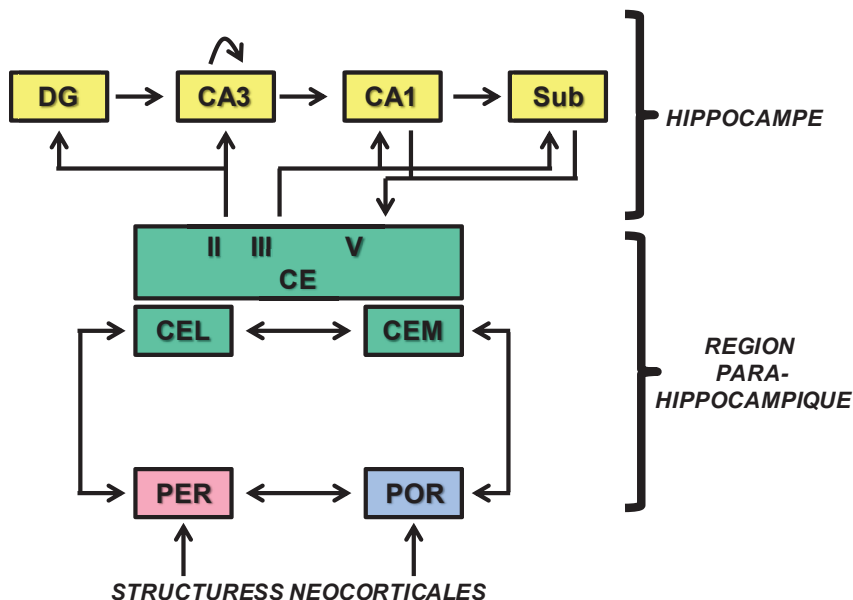


Figure 8 : Représentation globale classique de la boucle de fonctionnement de la formation hippocampique. La région parahippocampique reçoit des informations sensorielles en provenance des structures néocorticales. Traitées par le cortex périrhinal (PER) et le cortex postrhinal (POR), les informations sont respectivement transmises au cortex entorhinal (CE) latéral (CEL) et médian (CEM), par des connexions réciproques. La voie

perforante permet le transfert des informations depuis la couche II du CE jusqu'au gyrus denté (DG) et à la région CA3, de même que la voie temporoammonique entre la couche III du CE et la région CA1, et le subiculum (Sub). Au niveau de l'hippocampe, les informations sont successivement transmises du DG à la région CA3, à la région CA1, puis au subiculum. Enfin, les informations sont transmises en retour au niveau de la couche V du CE à partir de la région CA1 et du subiculum. Adapté de van Strien et al., 2009.

2. Peu de connaissances sur l'implication conjointe de ces deux structures dans un même apprentissage associatif

La grande majorité des travaux ayant étudié les fonctions du DH et du CE repose sur des études se focalisant sur une seule de ces deux structures. Il s'agit par exemple d'études de lésions du DH (*Morris et al., 1982 ; Philips et LeDoux, 1992 ; Ergorul et Eichenbaum, 2004*) ou du CE (pour revue, *Morrissey et Takehara-Nishiuchi, 2014*). Dès lors, la synthèse des résultats est délicate car chaque étude repose le plus souvent sur des protocoles ou des tests comportementaux différents. Ainsi, très peu d'articles publiés abordent le rôle différentiel du DH et de la région latérale du CE au cours de l'apprentissage d'une même tâche. Ces quelques études présentent des résultats obtenus avec l'utilisation de paradigmes associatifs reposant sur la formation d'associations entre des stimuli sensoriels auditifs (*Takehara-Nishiuchi et al., 2012*) ou olfactifs (*Igarashi et al., 2014*), et renseignent quant aux dynamiques oscillatoires caractérisant ces deux structures (*Dickson et al., 2000 ; pour revue, Igarashi, 2015*). D'autre part, une tâche de reconnaissance d'objets a été le support d'une analyse fine des structures activées au cours des différentes étapes de cet apprentissage par une expérience de cartographie fonctionnelle de marquage de la protéine cFos. Ainsi, l'introduction d'objets nouveaux recrute en priorité la voie perforante connectant la couche II du CEL au DG, puis aux régions CA3 et CA1, tandis que la présentation d'objets familiers active la voie directe entre la couche III du CEL et la région CA1 (*Kinnevene et al., 2014*). En revanche, les interactions entre le DH et la région médiane du CE sont fréquemment étudiées, notamment grâce à l'utilisation d'apprentissages spatiaux, comme la mise en mémoire d'un trajet dans un environnement virtuel (*Samu et al., 2009*) ou dans un labyrinthe (*Yamamoto et al., 2014*), ces deux structures présentant des activités unitaires liées à l'environnement de l'animal, respectivement les cellules de lieu et les cellules de grille (pour revue, *Moser et al., 2015*).

3. Caractérisation des activités oscillatoires de ces deux structures

Les potentiels de champs locaux (LFP pour « local field potentials »), c'est-à-dire les champs de courants détectés à proximité des synapses, principalement au niveau des dendrites, reflètent plusieurs processus. En effet, chaque région cérébrale est non seulement modulée par les inputs externes reçus, mais aussi par le traitement local de ces informations, par l'activation de boucles excitatrices et inhibitrices, et de connexions fonctionnelles et dynamiques avec les autres structures du réseau. Trois rythmes cérébraux distincts ont notamment été caractérisés chez le rat : le rythme thêta (rythme lent entre 5 et 12 Hz), le rythme bêta (rythme intermédiaire entre 15 et 40 Hz) et le rythme gamma (rythme rapide entre 50 et 100 Hz), chacun étant associé à des processus mnésiques complémentaires.

Des travaux de Michael Hasselmo ont notamment montré que la dynamique du rythme thêta favorise tantôt l'encodage des informations par le processus de LTP, tantôt leur rappel par le processus de « long-term depression » (LTD ; **Figure 9**). Or, au niveau de la formation hippocampique, le rythme oscillatoire thêta est très ample, aussi bien au niveau de l'hippocampe (pour revue, *Buzsaki, 2002*) que du CE (*Deshmukh et al., 2010*).

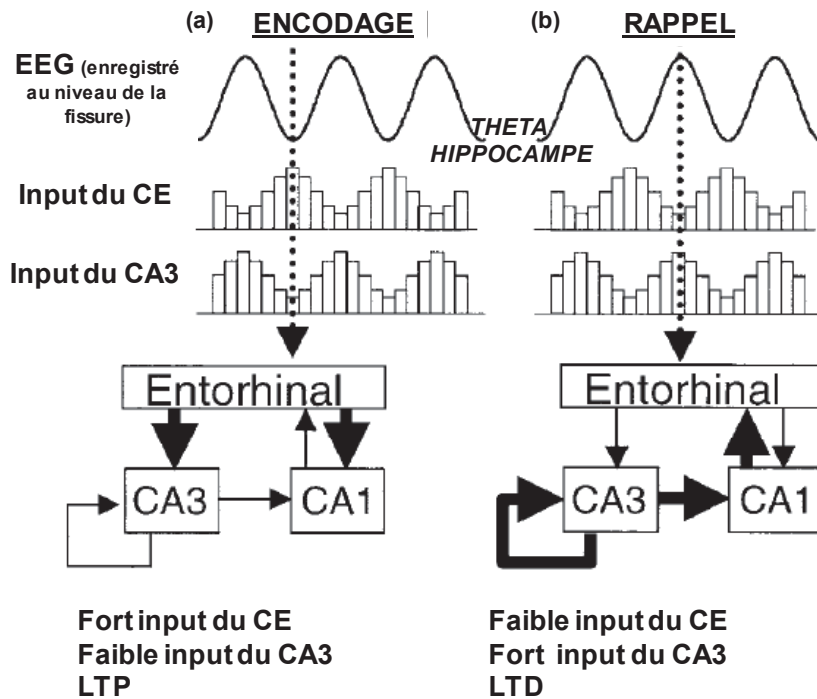


Figure 9 : Représentation schématique des modifications de la transmission synaptique liées à la dynamique des oscillations thêta dans l'hippocampe. (a) Pendant le creux du rythme thêta hippocampique, la transmission synaptique en provenance du cortex entorhinal (CE) est forte, tandis que celle en provenance de la région CA3 est faible. Cette dynamique est favorable à l'encodage des informations issues du CE par le mécanisme de LTP, sans que les informations issues de la région CA3 n'interfèrent avec l'apprentissage en cours. (b) Pendant le pic du rythme thêta hippocampique, la transmission synaptique en provenance du CE est faible, tandis que celle en provenance de la région CA3 est forte. Cette dynamique est favorable au rappel des informations précédemment encodées, via un mécanisme de LTD qui empêche l'encodage interférant des informations issues du CE et autorise l'oubli des informations erronées restituées. Issu de Hasselmo et al., 2002.

Généré notamment au niveau du septum médian, le rythme thêta est entretenu par de multiples oscillateurs, dans le DH (gyrus denté, régions CA3 et CA1) et dans le CE (Buzsaki, 2002 ; Colgin et Moser, 2009a ; Goutagny et al., 2009 ; Pignatelli et al., 2012). Fonctionnellement, une augmentation de la coordination entre les activités oscillatoires du CEL et celles du cortex préfrontal dans la bande de fréquence thêta, ont été mis en évidence en parallèle d'une diminution de cette synchronisation entre le CEL et le DH au cours des phases d'acquisition et de consolidation de l'association entre un son et un renforcement négatif (Takehara-Nishiuchi et al., 2012). De plus, l'amplitude des oscillations thêta est associée aux performances comportementales lors de l'encodage et lors du rappel d'une tâche épisodique au niveau de l'hippocampe et du CE (pour revue, Hasselmo et Stern, 2013). Ces données suggèrent que la synchronisation entre les activités oscillatoires lentes du CE et celles du DH joue un rôle important pour l'acquisition et le rappel d'informations. D'autre part, les oscillations thêta sont associées à l'activité motrice de l'animal (pour revue, Colgin, 2013).

Le rythme bêta a notamment été identifié comme la signature de la coordination d'un large réseau de structures associées à l'apprentissage, par exemple dans le cadre d'une tâche olfactive de Go-NoGo (*Ravel et al., 2003 ; Martin et al., 2004b ; Martin et al., 2007*). Or, ce rythme est également caractérisé au niveau de la formation hippocampique. En effet, une coordination de l'activité oscillatoire entre le CEL et la région CA1 du DH a été mise en évidence dans cette bande de fréquence lors d'un apprentissage associatif entre un stimulus olfactif et sa localisation (*Igarashi et al., 2014*). Selon ces auteurs, l'émergence de ce rythme et une meilleure synchronisation entre les activités oscillatoires de ces deux structures sont associées à l'amélioration des performances.

Enfin, le rythme gamma est couramment considéré comme un indice de couplage fonctionnel entre les différentes structures principalement néocorticales d'un réseau exprimant cette activité rapide, lors du traitement d'une information donnée (*Colgin et al., 2009b*). L'intérêt récent pour ce rythme dans le complexe « entorhinal-hippocampe » est probablement lié au fait qu'il ne représente qu'un faible pourcentage de l'amplitude du signal dans ces structures, largement dominées par le rythme thêta. Une étude a toutefois enregistré de façon simultanée l'activité de la région CA1 du DH et de la région médiane du CE dans une tâche au cours de laquelle l'animal doit maintenir en mémoire une information sensorielle en vue d'une prise de décision entre deux directions opposées (*Yamamoto et al., 2014*). Ces travaux montrent l'émergence de ce rythme rapide dans ces deux structures, lors des périodes de rétention de l'information et lorsque l'animal effectue un choix correct.

En résumé, l'ensemble de ces travaux met en évidence des interactions fonctionnelles différentielles dans le complexe « entorhinal-hippocampe » en fonction des processus mnésiques mis en jeu et dans différentes bandes de fréquence.

C. Modulation cholinergique exercée sur la formation hippocampique

Le fonctionnement d'un complexe tel que celui formé par le CE et le DH requiert vraisemblablement un chef d'orchestre externe, qui module et synchronise les différentes activités du réseau. Or, le septum médian pourrait jouer ce rôle. En effet, ce noyau du télencéphale basal renferme une forte densité de neurones cholinergiques et GABAergiques, qui se projettent sur le complexe « entorhinal-hippocampe » (*Gaykema et al., 1990*).

Deux types de récepteurs cholinergiques ont été caractérisés : les récepteurs muscariniques et les récepteurs nicotiniques. Globalement, l'acétylcholine intervient dans de multiples fonctions cognitives, telles que l'attention (pour revue, *Sarter et al., 2005*), l'apprentissage du principe d'une tâche (*Hasselmo et Barkai, 1995*), la consolidation d'un apprentissage (*Power et al., 2003*) et la détection de la nouveauté de stimuli sensoriels (*Inglis et Fibiger, 1995*) et spatiaux (*Barry et al., 2012*).

Ce neurotransmetteur est également en lien critique avec les oscillations thêta, celles-ci étant notamment liées aux processus de mise en mémoire des informations, comme précédemment décrit (*Bennett et Nunn, 1971 ; Lee et al., 1994 ; Masuoka et al., 2006 ; Zhang et al., 2010 ; Barry et al., 2012 ; Newman et al., 2013*). Toutefois, bien que la relation « acétylcholine – rythme thêta » soit fortement établie, des études contradictoires montrent que la modulation cholinergique peut induire une réduction de l'amplitude du rythme thêta (*Bennett et Nunn, 1971 ; Lee et al., 1994 ; Zhang et al., 2010 ; Newman et al., 2013*), alors

que d'autres travaux montrent une augmentation de l'amplitude de ce rythme lent dans la formation hippocampique (*Masuoka et al., 2006 ; Barry et al., 2012*). D'autre part, le rythme thêta est classiquement divisé en deux sous-rythmes : l'un autour de 5 à 6 Hz, fortement dépendant de la modulation cholinergique muscarinique et associé à l'exploration immobile de l'animal, l'autre entre 8 et 10 Hz peu dépendant de la modulation cholinergique et associé à l'activité motrice de l'animal explorant son environnement (pour revue, *Colgin, 2013*). Enfin, par l'intermédiaire du rythme thêta, il a été montré que l'acétylcholine joue un rôle dans la synchronisation des informations entre les différentes régions cérébrales impliquées dans l'apprentissage d'une tâche donnée (pour revue, *Colgin, 2013*).

Le rôle de l'acétylcholine a également été directement mis en évidence dans les processus de mise en mémoire d'informations, notamment au niveau de l'hippocampe (*Bennett et Nunn, 1971*) et dans le bulbe olfactif, lors de l'apprentissage d'une tâche olfactive d'appariement différé (*Ravel et al., 1992 ; Ravel et al., 1994*). Ce neurotransmetteur est également impliqué dans les processus sous-tendant la gestion des interférences liées à la présence d'éléments communs entre différents événements (pour revue, *Hasselmo, 2006a ; Easton et al., 2012a*). L'acétylcholine joue aussi un rôle dans les processus de plasticité synaptique (*Ruivo et Mellor, 2013*), en favorisant l'induction de la LTP (*Leung et al., 2003*).

Dès lors, l'ensemble de ces études suggère que l'acétylcholine pourrait être un synchronisateur externe des activités du CE et du DH, puisque ce neurotransmetteur est impliqué dans divers processus cognitifs associés à la mise en mémoire d'une information, et est en étroite interaction avec le rythme thêta caractérisant tout particulièrement la formation hippocampique. Cette modulation est susceptible de s'exercer lorsque l'animal exprime un haut niveau d'attention, explore son environnement et/ou détecte des stimuli (pour revue, *Hasselmo et Stern, 2006b*).

En conclusion, la formation hippocampique est un ensemble de structures limbiques étroitement et réciproquement connectées, auquel appartiennent notamment le CEL et le DH. Très étudiées séparément, surtout le DH, ces deux structures sont massivement innervées de façon commune par le système cholinergique du télencéphale basal et sont impliquées dans de multiples apprentissages associatifs relationnels. Toutefois, très peu d'études se sont attachées à tester l'implication fonctionnelle et la dynamique oscillatoire respective de ces deux structures au cours de l'apprentissage d'une même tâche.

II. Implication de l'hippocampe et du cortex entorhinal dans la formation d'associations relationnelles bimodales

Les premières études ayant cherché à identifier les structures cérébrales impliquées dans la mémoire se sont essentiellement intéressées au rôle de l'hippocampe, en utilisant des paradigmes spatiaux par association entre un ou plusieurs stimuli et une place. Ce n'est que depuis les années 1990 que des apprentissages non-spatiaux ont été développés. Ceci a permis de préciser les fonctions de l'hippocampe, mais aussi d'étudier le rôle des structures du système parahippocampique, comme le cortex entorhinal par exemple. Ces apprentissages associatifs non spatiaux reposent uniquement sur la formation d'une association entre plusieurs stimuli non contextuels et un renforcement. C'est notamment le cas de paradigmes utilisant la modalité olfactive qui ont tout d'abord été développés dans l'équipe d'Howard Eichenbaum (pour revue, *Eichenbaum, 2008*). Ce type d'apprentissage a ensuite été adapté aux autres modalités sensorielles.

Les études de neuroanatomie montrent que les afférences du cortex entorhinal et de l'hippocampe véhiculent les informations sensorielles de toutes les modalités (voir la [section 1 de l'introduction, page 26](#)). Ces deux structures sont donc particulièrement adaptées pour la formation d'associations multisensorielles.

La suite de cette section présente quelques apprentissages associatifs relationnels bimodaux pour lesquels l'implication de l'hippocampe et/ou du cortex entorhinal a été testée. Les signes + et – désignent respectivement les stimuli ou paires de stimuli renforcés et non-renforcés.

A. Acquisition des représentations relationnelles bimodales

Le processus d'acquisition d'une tâche associative relationnelle repose sur la formation d'associations entre plusieurs stimuli pertinents (minimum deux) et un renforcement.

Or, l'implication de l'hippocampe a été testée dans l'acquisition de diverses tâches associatives bimodales. Il a été montré que cette structure est critique pour l'acquisition de tâches telles que le « negative patterning » et le « positive patterning » lorsque des stimuli auditifs et visuels sont utilisés (pour revue, *Sutherland et Rudy, 1989 ; Gisquet-Verrier et El Massioui, 1997 ; McDonald et al., 1997*). Concrètement, dans la tâche de negative patterning, l'animal doit apprendre à éviter les stimuli A et B quand ils sont présentés seuls, mais à les sélectionner quand ils sont associés (A- ; B- ; AB+). Tâche en miroir du negative patterning, la tâche de positive patterning consiste pour l'animal à apprendre à sélectionner les stimuli A et B quand ils sont présentés individuellement, mais à les éviter quand ils sont associés (A+ ; B+ ; AB-).

En revanche, l'hippocampe n'est généralement pas impliqué dans la tâche de « biconditional discrimination » dans laquelle l'animal doit apprendre que deux paires de stimuli parmi quatre sont renforcées, chaque stimulus étant présenté dans deux paires distinctes : l'une renforcée, l'autre non-renforcée (AB+ ; AC- ; DB- ; DC+). L'implication de l'hippocampe dans ce type de tâche a été testée dans plusieurs paradigmes utilisant des stimuli issus de la même modalité sensorielle et il a été montré que cette structure n'est pas

nécessaire pour la formation d'associations entre des objets (*Cho et Kesner, 1995*) ou d'associations visuo-visuelles (*Sanderson et al., 2006*). Le même résultat a été obtenu lorsque des stimuli issus de modalités sensorielles différentes sont utilisés, que ce soit des associations audiovisuelles (*McDonald et al., 1997*) ou visuo-tactiles (*Albasser et al., 2013*). En revanche, l'hippocampe jouerait un rôle dans la formation d'associations entre une odeur et une texture (*Whishaw et Tomie, 1991*). En effet, les animaux ayant subi une lésion de l'hippocampe requièrent davantage d'essais que leurs homologues témoins pour apprendre la tâche, mais ils y parviennent néanmoins au fil des jours d'entraînement.

Concernant le CE, si peu d'études se sont intéressées à son rôle dans les processus de mise en mémoire d'associations entre stimuli non-spatiaux, il a toutefois été montré que la lésion conjointe des cortex entorhinal et périrhinal induit un déficit de la mise en mémoire de l'association entre deux odeurs (*Bunsey et Eichenbaum, 1993*).

B. Flexibilité des représentations relationnelles bimodales

Le processus de flexibilité d'une tâche associative relationnelle précédemment apprise fait référence aux opérations cognitives polymorphes permettant d'adapter la réponse comportementale aux changements de l'environnement. Plus précisément, elle permet la création de nouvelles associations, en fonction des expériences passées.

Or, l'implication de l'hippocampe a été testée dans différentes tâches reposant sur ce principe. Parmi elles, la tâche de « transverse patterning » est un exemple d'apprentissage qui repose sur des processus de flexibilité. Elle s'acquiert en deux étapes : dans un premier temps, l'animal apprend successivement deux paires de stimuli dans lesquelles un stimulus est renforcé et l'autre ne l'est pas (A+B- ; B+C-). Ces deux paires présentent donc un stimulus commun (B), qui n'est pas renforcé dans la première paire, mais le devient dans la seconde. Dans un deuxième temps, une troisième paire de stimuli composée des stimuli des deux premières paires est présentée (C+A-). Pour résoudre cette tâche, l'animal doit donc faire preuve de flexibilité pour déduire le stimulus renforcé et celui qui ne l'est pas : les deux premiers apprentissages permettent ainsi de prédire le troisième. Des résultats contradictoires ont été observés quant à l'implication de l'hippocampe dans ce type d'apprentissage. En effet, utilisant des stimuli visuels, il a tantôt été montré que cette structure est nécessaire (*Alvarado et Rudy, 1995*), tantôt qu'elle ne l'est pas (*Sanderson et al., 2006*). En revanche, cet apprentissage repose sur le fonctionnement de l'hippocampe lorsque des stimuli olfactifs sont utilisés (*Bunsey et Eichenbaum, 1996 ; Dusek et Eichenbaum, 1998 ; Rondi-Reig et al., 2001*).

Reposant également sur un principe de transition, la tâche de « sequential learning » se déroule en deux étapes distinctes : l'animal est tout d'abord confronté à cinq stimuli (A, B, C, D, E) présentés successivement avec un délai de quelques minutes entre chaque stimulus. Ceci incite l'animal à former une représentation séquentielle des stimuli présentés selon l'ordre suivant : A > B > C > D > E. Dans un deuxième temps, deux des stimuli précédemment proposés sont présentés simultanément à l'animal, lequel doit sélectionner le plus ancien des deux. Par exemple, quand il est confronté aux stimuli A et E, il doit choisir le stimulus A ; entre les stimuli B et D, il doit choisir le B... La plupart de ces apprentissages ont été réalisés avec des stimuli olfactifs, pour lesquels le rôle critique de l'hippocampe a été mis

en évidence chez le rongeur (*Fortin et al., 2002 ; DeVito et al., 2010a*), en particulier quand l'animal est confronté à deux odeurs temporellement proches lors de la présentation initiale successive des stimuli (par exemple, B versus D). Ces études mettent ainsi en évidence le rôle de l'hippocampe dans les processus sous-tendant la capacité de l'animal à former des représentations distinctes de séquences d'évènements, dans le but de discriminer ultérieurement ces évènements de façon séparée. Ces résultats sont en accord avec les modèles de fonctionnement de l'hippocampe qui stipulent que cette structure est impliquée de façon critique dans les processus cognitifs de flexibilité (*Frank et al., 2003 ; Van Elzaker et al., 2003*). Toutefois, l'hippocampe ne semble pas nécessaire pour ce type d'apprentissage lorsque des stimuli visuels sont utilisés (*Van der Jeugd et al., 2009*).

Concernant la région parahippocampique, il a été montré que le CE et le cortex périrhinal jouent un rôle important lors des tâches de transverse patterning et de sequential learning par l'utilisation de stimuli olfactifs (*Dusek et Eichenbaum, 1997 ; 1998*).

C. Remarques sur la littérature s'intéressant aux apprentissages associatifs relationnels bimodaux

Certains travaux ont montré que l'hippocampe est sollicité dans les processus sous-tendant l'acquisition de certaines tâches associatives relationnelles telles que le negative patterning et le positive patterning, mais pas la tâche de biconditional discrimination. En revanche, très peu d'études se sont intéressées à l'implication du CE dans l'acquisition de ce type de tâche.

Concernant les apprentissages reposant sur un comportement de flexibilité, la littérature s'accorde sur le fait que l'hippocampe joue un rôle critique. D'une façon générale, l'ensemble des tâches testées dans lesquelles l'animal doit apprendre à associer plusieurs stimuli olfactifs repose sur le fonctionnement de l'hippocampe (*Bunsey et Eichenbaum, 1996 ; Dusek et Eichenbaum, 1998 ; Fortin et al., 2002 ; DeVito et al., 2010a*) et/ou de la région parahippocampique (*Bunsey et Eichenbaum, 1993 ; Dusek et Eichenbaum, 1997 ; 1998*). En revanche, la formation d'associations utilisant des stimuli visuels ne dépend pas de l'hippocampe (*Sanderson et al., 2006 ; Van der Jeugd et al., 2009*).

Il est important de noter que la plupart des tâches citées reposent soit sur la formation d'associations intra-modales, c'est-à-dire sur l'association de deux stimuli issus de la même modalité sensorielle (par exemple, deux odeurs), soit sur des associations dans lesquelles les stimuli sont peu contrôlés (par exemple, deux objets). De plus, la grande majorité des études présentées dans cette section a été réalisée suite à une approche lésionnelle plus ou moins sélective de la région d'intérêt. Or, ce type d'approche autorise non seulement la mise en place de mécanismes de compensation pendant la durée de récupération post-opératoire, mais ne fournit surtout aucune indication quant aux mécanismes intra-structures sous-tendant le processus cognitif d'intérêt. Enfin, l'interprétation des résultats issus d'une approche lésionnelle est toujours délicate. Par exemple, si la lésion du CE induit un déficit comportemental, celui-ci résulte-t-il de l'abolition du traitement de l'information dont ce cortex est responsable, ou du déficit de computation neuronale de l'hippocampe, alors privé d'informations à traiter ?

Fondé sur ces observations, l'un des objectifs de ce travail de thèse consiste à mettre au point une nouvelle tâche comportementale chez le rongeur, reposant sur le principe d'apprentissage associatif relationnel entre deux stimuli. Comme montré dans la littérature, les processus d'acquisition et de flexibilité de telles associations sont potentiellement soutenus par des opérations cognitives pouvant dépendre de l'activité de l'hippocampe et/ou du CE. Toutefois, contrairement à la majorité des tâches présentées dans cette section, la tâche développée ici utilise des stimuli explicites, strictement contrôlés par l'expérimentateur et issus de modalités sensorielles différentes. De plus, la résolution de la tâche exclut la prise en compte d'indices spatiaux et/ou contextuels. Enfin, l'utilisation de la technique d'inactivation transitoire et réversible par microinjection locale de drogues permet de tester l'implication sélective de la région latérale du cortex entorhinal (CEL) et de la région dorsale de l'hippocampe (DH) dans les processus sous-tendant l'acquisition et la flexibilité de notre tâche bimodale.

III. Neurophysiologie sensorielle unimodale et multisensorielle

Bien que la neurobiologie de la perception et de la mémoire s'intéresse traditionnellement à une seule modalité sensorielle à la fois, la perception du monde réel repose sur l'intégration d'informations provenant de sources sensorielles multiples. Deux types d'intégrations perceptives et mnésiques coexistent : entre des informations sensorielles provenant d'une même modalité (intra-modal^{***2}) et entre des informations provenant de différentes modalités (cross-modal^{***2}). Par exemple, la mise en mémoire d'un visage est sous-tendue par le liage perceptif intra-modal de l'ensemble des formes qui le définissent, tandis que l'identification d'une pomme peut impliquer des informations olfactives, gustatives, tactiles et visuelles, c'est-à-dire reposer sur un processus de liage perceptif cross-modal.

L'intégration neuronale des informations sensorielles provenant des différentes voies de traitement implique qu'elles convergent vers des structures cérébrales qui jouent chacune un rôle spécifique. Cette convergence est le support probable de la perception cohérente d'un objet donné et cette fonction cognitive est désignée sous le terme d'intégration multisensorielle (pour revue, *Mesulam, 1998* ; pour revue, *Calvert, 2001*).

A. Intégration multisensorielle

1. Concept général

Concrètement, le processus d'intégration multisensorielle est mobilisé pour de multiples tâches de la vie quotidienne : discrimination et identification d'objets, localisation spatiale..., justifiant la capacité du cerveau à combiner certaines caractéristiques sensorielles avec d'autres. Pour revenir à l'exemple de la pomme, ce fruit peut être caractérisé par sa forme, son odeur, sa couleur ou encore son goût. Ce mécanisme doit donc être hautement flexible, un trait donné étant très souvent commun à de multiples objets, notamment la forme ou la couleur. Ainsi, tout ce qui est rond et vert n'est pas forcément une pomme, et n'est donc pas automatiquement identifié comme telle. Par ailleurs, l'apprentissage associatif multisensoriel permet de reconnaître un objet à partir d'une seule de ses caractéristiques. Par exemple, l'odeur de la pomme permet à elle seule d'évoquer tous les autres attributs de ce fruit.

L'intégration multisensorielle est un processus d'association entre plusieurs éléments qui repose sur deux mécanismes non exclusifs. En effet, une telle association peut être formée par la convergence de projections issues des structures de traitement unimodal sur une structure associative et/ou par l'intermédiaire d'une interaction entre ces structures de traitement unimodal. Ceci permet alors de construire une représentation complète et cohérente de l'ensemble des caractéristiques d'un objet (pour revue, *Ernst et Bühlhoff, 2004*).

De nombreux neurones répondent à plusieurs stimuli de modalités sensorielles différentes dans des structures de traitement primaire (*Kayser et Logothetis, 2007*), tout comme dans des structures associatives. Par exemple, l'amygdale basolatérale, le cortex orbitofrontal, le CEL ou encore l'hippocampe dorsal sont des sites de convergence des informations multisensorielles, mais leur rôle concret dans l'intégration fonctionnelle de ces informations reste peu étudié.

^{2 ***} : voir LEXIQUE (page 14)

2. Etudes essentiellement centrées sur les modalités auditive et visuelle chez le primate humain et non-humain

L'une des questions fondamentales en neurosciences est de comprendre comment et dans quelle(s) structure(s) le cerveau intègre les différents éléments définissant un objet. Chez les mammifères, la plupart des travaux s'intéressent à l'intégration audiovisuelle. Ces derniers ont montré que ce type d'intégration peut avoir lieu dans une structure associative comme le colliculus supérieur chez le chat (*Meredith et Stein, 1983 ; 1986*), ainsi que le thalamus (pour revue, *Driver et Noesselt, 2008* ; pour revue, *Cappe et al., 2009*) et plusieurs régions néocorticales chez le primate humain et non-humain, comme le sillon temporal supérieur (*Beauchamp et al., 2004*), le lobe pariétal supérieur (*Molholm et Foxe, 2006*), le sillon intrapariétal latéral et ventral, le cortex frontal et préfrontal (*Fuster et al., 2000* ; pour revue, *Ghazanfar et Schroeder, 2006*) ...

L'intégration multisensorielle serait également sous-tendue par des interactions directes entre les cortex sensoriels primaires (pour revue, *Cappe et al., 2009*). En effet, au niveau anatomique, il a été montré que les cortex auditif, visuel et somesthésique sont directement et réciproquement connectés (pour revue, *Ghazanfar et Schroeder, 2006*), et chacun d'eux reçoit des projections « top-down » en provenance des structures associatives (pour revue, *Driver et Spence, 2000* ; *Bushara et al., 2002* ; pour revue, *Schroeder et Foxe, 2005* ; pour revue, *Driver et Noesselt, 2008*). De plus, la présentation de stimuli auditif et visuel induit une activation conjointe des cortex auditif et visuel chez l'Homme (*Raij et al., 2010*), tandis qu'une synchronisation de l'activité de ces deux cortex a lieu lors d'une tâche audiovisuelle (*von Stein et al., 1999*).

3. Brève revue des études portant sur les autres modalités sensorielles chez différentes espèces

Chez l'Homme, quelques travaux ont également porté intérêt aux modalités telles que le toucher et l'olfaction. En effet, des études ont mis en évidence l'activation du gyrus temporal supérieur, un cortex classiquement associé au traitement des informations auditives, en réponse à une association audio-tactile (*Bolognini et al., 2010*). Ce résultat appuie donc l'hypothèse selon laquelle l'intégration multisensorielle est en partie sous-tendue par les structures de traitement unimodal. D'un point de vue comportemental, il a été montré que le toucher peut favorablement moduler la perception d'une information visuelle (*Ernst et al., 2000*), tandis que les capacités de discrimination olfactive peuvent être améliorées suite à la stimulation magnétique transcrânienne du cortex visuel (*Jadauji et al., 2012*).

Chez le rat, le cortex pariéto-temporal répond avec une amplitude plus forte à une stimulation bimodale audio-tactile, qu'à une stimulation unimodale auditive ou tactile (*Brett-Green et al., 2003*). D'autres données ont montré qu'une partie des neurones du cortex olfactif (tubercule olfactif et cortex piriforme) présente une activité en réponse à une stimulation auditive (*Varga et Wesson, 2012*), tandis que l'intégration des informations audio-olfactives dépend également en partie de l'activité du cortex auditif (*Cohen et al., 2011*).

L'ensemble des structures associatives impliquées dans l'intégration multisensorielle est résumé sur la **figure 10**.

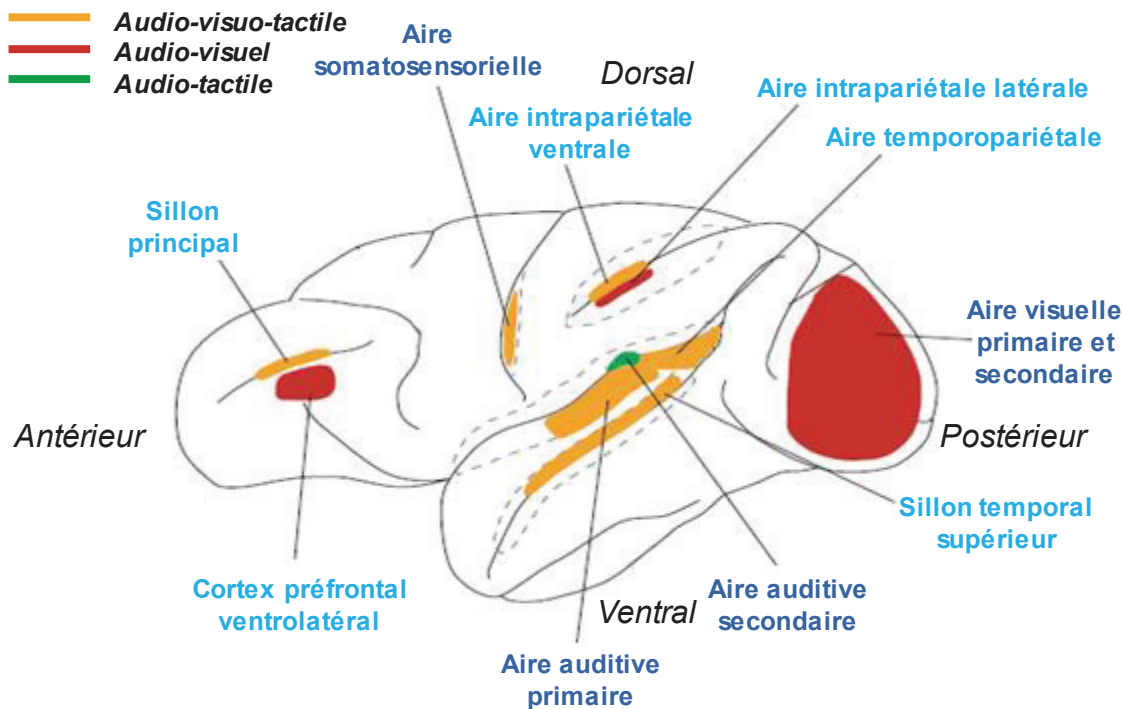


Figure 10 : Schéma d'un cerveau de primate récapitulant une partie des structures identifiées comme impliquées dans la perception des associations multisensorielles. Les structures dites associatives sont indiquées en bleu clair et les structures classiquement considérées comme unimodales sont indiquées en bleu foncé. Les couleurs orange, rouge et vert désignent respectivement les structures impliquées dans les associations audio-visuo-tactiles, audio-visuelles et audio-tactiles. Adapté de Ghazanfar et Schroeder, 2006.

4. Etudes axées sur la perception et non sur la mémoire

Toutefois, majoritairement fondées sur des approches électrophysiologiques (enregistrement de l'activité unitaire en réponse à différentes stimulations sensorielles) et de neuroimagerie (enregistrement comparé de l'activité globale du cerveau lors de l'apprentissage de tâches unimodales et bimodales), deux points importants caractérisent les études précitées. En effet, elles s'intéressent : 1) à la perception, mais peu aux processus mnésiques d'acquisition et de flexibilité des représentations multisensorielles ; 2) aux structures néocorticales, classiquement impliquées dans la perception des informations sensorielles, et non aux structures limbiques, potentiellement sollicitées dans les processus de mise en mémoire de ces associations. En effet, bien que les structures limbiques soient le point de convergence anatomique des informations de plusieurs modalités sensorielles, leur rôle dans l'acquisition et la flexibilité des associations multisensorielles est peu connu car seuls de rares travaux se sont attachés à s'interroger sur le lien existant entre les performances obtenues dans l'apprentissage d'une tâche multisensorielle et les structures neuronales sollicitées lors de cet apprentissage. Ainsi, s'il a été montré que le DH est impliqué dans la mémoire contextuelle (*Philips et LeDoux, 1992 ; Matus-Amat et al., 2004*), laquelle met en jeu l'ensemble des informations sensorielles disponibles pour l'animal, la part respective des différents types de stimuli (visuels, auditifs, proprioceptifs...) dans la mémorisation du contexte n'est pas explicitement identifiée dans ces études.

B. Olfaction et toucher : des modalités sensorielles majeures chez le rat

La vision et l'audition ne sont pas les deux sens prédominants pour toutes les espèces animales. Ainsi, en tant qu'animal nocturne, le rat est doté de capacités olfactives et tactiles finement développées. Indispensables pour explorer son environnement et s'orienter dans l'espace, ainsi que pour identifier les objets le caractérisant, cet animal échantillonne son environnement par le flairage (phénomène de « sniffing ») des informations olfactives (*Astur et al., 2004*), et par des mouvements rapides des vibrisses (phénomène de « whisking ») pour recueillir les informations tactiles (*Albasser et al., 2010*).

1. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la modalité olfactive

Les rongeurs sont des mammifères macrosmates qui utilisent principalement leur odorat pour évoluer dans leur écosystème. On dit aussi qu'ils sont capables de « penser avec leur nez », et qu'ils disposent de capacités de discrimination olfactive aussi fines que celles que possèdent les primates avec leurs doigts (pour revue, *Slotnick, 2001*). Chez cet animal, la représentation précise de son environnement se construit donc avec les odeurs qui le composent et la proportion que prend le volume du bulbe olfactif (BO) par rapport à celui de l'encéphale traduit l'importance fonctionnelle de son sens olfactif, notamment en comparaison avec celui de l'Homme. Ce volume est d'autant plus important lorsque l'ensemble des structures impliquées dans le traitement des odeurs, notamment le cortex piriforme, est pris en compte. Ainsi, les odeurs jouent un rôle déterminant dans les comportements vitaux et sociaux tels que la recherche d'aliments, la reproduction, la construction du nid, la reconnaissance des congénères et de l'odeur du prédateur, et conditionnent la capacité d'adaptation du comportement selon la situation (pour revue, *Doty, 1986*). Ceci met en évidence l'importance critique de la modalité olfactive, notamment lorsque l'animal ne peut pas utiliser sa vue, déjà réduite de par son statut d'animal nocturne. Par ailleurs, deux des avantages de la modalité olfactive reposent sur son couplage étroit avec la respiration et la possibilité de communiquer à distance avec les congénères.

a. Organisation anatomique

Les voies de traitement des informations olfactives sont bien connues chez le rat et sont relativement conservées entre les espèces (pour revue, *Davis, 2004*). Les molécules odorantes sont tout d'abord captées par les neurorécepteurs de l'épithélium olfactif tapissant le fond de la cavité nasale, puis les axones de ces neurorécepteurs se regroupent pour former le nerf olfactif, lequel converge sur la couche glomérulaire du BO. A ce niveau, des synapses sont formées avec les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache, premier relai de la transmission olfactive et premier site d'intégration de ce type d'information (pour revue, *Mori et al., 1999*). Les axones des cellules mitrales forment ensuite le tractus olfactif latéral, qui se projette principalement sur trois structures : le cortex piriforme, le CE et le cortex amygdalien (*Santiago et Shammah-Lagnado, 2004*). L'ensemble des structures dédiées au traitement de l'information olfactive forme un réseau interconnecté : en effet, une étude a montré que la stimulation électrique du CE entraîne une modulation de la réponse aux odeurs au niveau du cortex piriforme et de l'amygdale (*Mouly et Di Scala, 2006*). Les informations convergent ensuite du CE au gyrus denté et à l'ensemble de l'hippocampe

(Schwerdtfeger et al., 1990 ; pour revue, Witter, 1993). Ainsi, l'accès aux structures limbiques est très rapide, seuls trois relais (le BO, le cortex piriforme et le CE) séparent les récepteurs olfactifs de la cavité nasale, de l'hippocampe. L'ensemble des structures impliquées dans le traitement de l'information olfactive est résumé sur la **figure 11**.

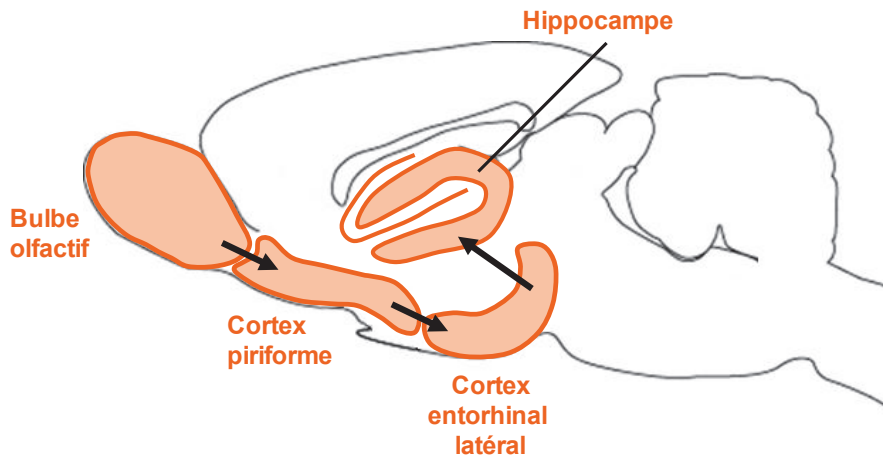


Figure 11 : Schéma des voies olfactives chez le rongeur. Les molécules odorantes sont captées par l'épithélium olfactif, et l'information olfactive est ensuite transmise successivement au bulbe olfactif, au cortex piriforme, puis au cortex entorhinal latéral, et à l'hippocampe.

b. Capacités perceptives et mnésiques bien connues

D'un point de vue perceptif, les capacités olfactives des rongeurs sont extrêmement développées. Ainsi, il a été montré qu'ils sont en mesure de détecter et de discriminer des odeurs à très faible concentration (Bodyak et Slotnick, 1999 ; pour revue, Slotnick, 2001). Cette capacité repose notamment sur le réseau de structures étroitement interconnectées et impliquées dans le traitement des informations olfactives, ainsi que le très grand nombre de glomérules (près de 2000) que comporte le BO (pour revue, Mori et al., 1999). D'autre part, le cortex piriforme joue un rôle critique dans les processus de séparation et de complétion de pattern sous-tendant la reconnaissance des mélanges d'odorants et la formation de leur représentation (pour revue, Wilson et Sullivan, 2011 ; Chapuis et Wilson, 2013a).

Par ailleurs, si la perception olfactive du rat est remarquable, sa mémoire l'est tout autant (Otto et al., 1991 ; Otto et Eichenbaum, 1992 ; Bodyak et Slotnick, 1999 ; Tronel et Sara, 2002 ; Bouret et Sara, 2004). En effet, les apprentissages « odeur-renforcement » sont très rapidement maîtrisés, en quelques essais seulement (Tronel et Sara, 2002), et le rongeur peut en apprendre un grand nombre (pour revue, Slotnick, 2001). Les performances de rappel sont également excellentes, même après un long délai post-acquisition, allant de quelques jours à plusieurs semaines (Bodyak et Slotnick, 1999). Enfin, la mémoire associative du rongeur est résistante, puisque l'association entre une odeur et un renforcement est maintenue, même suite à plusieurs autres apprentissages (Bodyak et Slotnick, 1999). Les apprentissages olfactifs constituent donc un outil idéal pour l'étude du substrat neurobiologique de la mémoire associative.

Justifiées par les données anatomiques en tant que structure de traitement des informations notamment olfactives, plusieurs études se sont intéressées au lien entre le CE et les processus de discrimination et de mise en mémoire d'un stimulus olfactif. En effet, cette structure est nécessaire pour les processus de discrimination fine, lorsque des odeurs complexes telles que des mélanges sont utilisées, par l'intermédiaire de la modulation top-down qu'exerce la région latérale du CE sur le cortex piriforme (Chapuis et al., 2013b).

Concernant la mise en mémoire d'informations olfactives, il a été établi que la lésion du CE facilite l'acquisition d'une tâche simple de Go-NoGo car les animaux lésés apprennent la tâche plus rapidement que leurs homologues témoins (*Otto et al., 1991*). Globalement, l'implication du CE dans les processus sous-tendant la rétention d'une information olfactive a depuis longtemps été mise en évidence (*Staubli et al., 1984 ; Otto et Eichenbaum, 1992*). En effet, il a été montré que le CE est impliqué dans les processus de mise en mémoire d'une odeur au cours d'une tâche de reconnaissance olfactive (*Wirth et al., 1998*), ainsi que dans le paradigme d'aversion olfactive conditionnée (*Ferry et al., 1996 ; 2006*).

c. Activités oscillatoires

Les régions limbiques et les structures olfactives telles que le BO et le cortex piriforme présentent une activité oscillatoire particulièrement marquée, aussi bien spontanément que lors de l'échantillonnage d'odeurs. Ceci est notamment lié à l'activité rythmique imposée par la respiration de l'animal : de l'ordre de 1 à 2 Hz au repos, et de 6 à 10 Hz lors du sniffing, soit la bande de fréquence thêta (*Buonviso et al., 2006*). Ainsi, la discrimination des stimuli olfactifs est couplée avec le rythme thêta dans le BO, le CEL et le DH notamment (*Kay, 2005*). D'autre part, les réponses oscillatoires induites par l'odeur sont fortement modulées par l'apprentissage d'une tâche olfactive (pour revue, *Kay et al., 2009*).

L'émergence du rythme bêta, entre 15 et 40 Hz, ainsi que la dynamique du rythme gamma, entre 60 et 90 Hz, ont été décrits en détail dans une revue s'intéressant au réseau impliqué lors de l'apprentissage de différentes tâches olfactives (pour revue, *Martin et Ravel, 2014*). Avant l'échantillonnage de l'odeur, le BO et le cortex piriforme présentent des oscillations gamma prononcées et synchronisées sur le rythme respiratoire. Au début de l'apprentissage, l'échantillonnage de l'odeur induit une légère diminution des oscillations gamma, et au fil des jours où l'apprentissage se met en place, de fortes oscillations apparaissent dans la bande de fréquence bêta, en lien avec l'amélioration des performances des animaux (*Ravel et al., 2003*). Cette dynamique liée au niveau d'expertise des animaux est observée selon un gradient non seulement temporel, mais aussi spatial au niveau du BO, avec une émergence précoce et plus forte dans la partie postéro-ventrale que dans la partie antéro-dorsale. Ceci suggère que l'émergence du rythme bêta révèle la formation d'assemblées neuronales au cours de cet apprentissage (*Martin et al., 2004a*). Ce rythme est non seulement détecté dans le BO, mais aussi dans d'autres structures impliquées dans le traitement de ce type de stimuli, telles que le cortex piriforme antérieur et postérieur, et le CEL. D'autre part, l'apprentissage d'une tâche d'aversion olfactive conditionnée est non seulement à l'origine d'oscillations bêta dans des structures olfactives telles que le BO et le cortex piriforme, mais aussi dans des structures frontales comme les cortex orbitofrontal et infralimbique, ainsi que dans l'amygdale basolatérale et le cortex insulaire (*Chapuis et al., 2009*).

Par ailleurs, l'émergence du rythme bêta est asymétrique. En effet, l'enregistrement des LFP au niveau des cortex piriforme gauche et droit a montré que le rythme bêta est plus précoce et plus ample dans l'hémisphère gauche. Cette même étude met également en évidence une réduction de la cohérence de l'activité oscillatoire entre les deux structures bilatérales au cours de l'apprentissage, avant un retour à la valeur initiale quand l'animal

atteint le critère de réussite (*Cohen et al., 2015*). Ceci suggère que les structures bilatérales n'opèrent pas nécessairement la même fonction dans les deux hémisphères et que leur coopération favorise des processus cognitifs précis.

Par ailleurs, une augmentation de cohérence entre les activités oscillatoires du BO et celles du gyrus denté est détectée dans la bande thêta 6-12 Hz, spécifiquement pendant le sniffing, au cours d'une tâche de discrimination olfactive. Il a d'ailleurs été précisé que l'amélioration des scores va de pair avec une réduction de la cohérence entre les activités du BO et celles du CEL, et entre le CEL et le gyrus denté (pour revue, *Kay et al., 2009*). La relation entre le sniffing et les structures limbiques dans la bande thêta a également fait l'objet d'une étude dans un paradigme de « reversal ***³ » olfactif. Il a ainsi été montré que cet apprentissage inversé se caractérise par une réduction de la cohérence entre les activités du BO et celles de l'hippocampe (*Macrides et al., 1982*). Des interactions entre les structures olfactives et limbiques ont également été mises en évidence dans la bande bêta, entre le BO et l'hippocampe dorsal et ventral pendant l'acquisition et le reversal d'une tâche olfactive. En effet, une valeur élevée de cohérence est détectée entre le BO d'une part, et les deux parties de l'hippocampe d'autre part, ainsi qu'entre l'hippocampe dorsal et ventral, et cette valeur augmente en lien avec l'expertise (*Martin et al., 2007*).

Enfin, l'importance des fibres centrifuges qui se projettent sur le BO par l'intermédiaire de la région médiane du pédoncule olfactif a été mise en évidence dans la genèse des rythmes oscillatoires bêta et gamma. En effet, en cas d'inactivation de ces fibres, une augmentation de l'amplitude du rythme gamma spontané est observée, tandis que la réponse du rythme bêta induite par l'échantillonnage de l'odeur disparaît (*Martin et al., 2004b ; Martin et al., 2006*). Ces résultats suggèrent alors que le rythme gamma est généré au niveau du BO par une boucle entre les neurones relais excitateurs et les interneurons inhibiteurs, et que les fibres centrifuges ont pour action de réduire l'activité de cette boucle. En revanche, le rythme bêta serait le reflet de l'activation d'une large boucle incluant le BO, le cortex piriforme et le CEL, via leurs connexions excitatrices réciproques qui en permettraient l'émergence. En somme, la dynamique oscillatoire dans le système olfacto- limbique reflète la reconfiguration du réseau impliqué dans un apprentissage, lequel repose sur une coordination régulée entre les cortex sensoriels et les structures limbiques telles que le CEL et l'hippocampe dorsal, afin de sous-tendre une réponse comportementale adaptée.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence un large réseau de structures impliquées dans la mise en mémoire d'un stimulus olfactif à la fois dans des structures olfactives (BO, cortex piriforme et CEL), frontales (cortex orbitofrontal et infralimbique) et limbiques (amygdale basolatérale, hippocampe dorsal et ventral).

2. Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles de la modalité tactile

Afin d'identifier les objets de son environnement le rat utilise non seulement ses pattes, mais aussi et surtout ses vibrisses. En effet, cet animal est pourvu d'une trentaine d'appendices semi-rigides composés de kératine et régulièrement répartis de part et d'autre du museau. Le mouvement des vibrisses permet au rongeur de discriminer les objets qui l'entourent de manière très précise. En effet, la finesse du sens tactile déployé par les

³ *** : voir LEXIQUE (page 13)

rongeurs a été expérimentalement testée à l'aide d'une tâche de discrimination de textures (lisse versus rugueuse) et il s'avère que les rats sont capables de faire la différence entre des papiers de verre de rugosité très proche (*Guic-Robles et al., 1989 ; Carvell et Simons, 1990*). Ceci montre qu'ils sont capables de discriminer leur environnement tactile avec une grande précision, avoisinant celles des primates avec leurs doigts (*Carvell et Simons, 1990*). Ces capacités dépendent toutefois de facteurs tels que l'environnement, l'âge et le sexe de l'animal (pour revue, *Roohbakhsh et al., 2016*).

a. Organisation anatomique

Les vibrisses sont ancrées à la peau via une structure folliculaire animée par un muscle contrôlé par le nerf facial. Sous contrôle du cortex moteur, l'activation du muscle induit un mouvement de balayage des vibrisses d'avant en arrière permettant à l'animal d'échantillonner les objets qui sont situés à proximité de sa tête à une fréquence comprise entre 5 et 12 Hz (*Sreenivasan et al., 2015*). Lors du contact avec une surface, la déflexion du mouvement appliquée par le muscle (whisking) est convertie en trains de potentiels d'action par un mécanorécepteur également situé dans le follicule. Le sens du toucher sous-tendu par le système des vibrisses repose donc sur une intégration sensorimotrice active (pour revue, *Diamond et al., 2004 ; pour revue, Diamond et al., 2008*). Les mécanorécepteurs sont situés à l'extrémité d'une fibre du nerf trijumeau dont le corps cellulaire est localisé dans le ganglion trigéminal. L'ensemble de ces afférences converge sur le noyau trigéminal, situé au niveau du tronc cérébral, qui est étroitement connecté avec le noyau ventro-postéro-médian (VPM) du thalamus. Les informations sont ensuite relayées vers la couche IV du cortex somesthésique primaire (S1 ; *Pereira et al., 2007*). Au niveau d'une partie de ce cortex dédiée spécifiquement au traitement des informations tactiles issues des vibrisses, les neurones du S1 sont organisés en petites unités anatomiques bien caractérisées, portant le nom de tonneaux ou « barrel », justifiant l'appellation de cortex à tonneaux ou « barrel cortex » fréquemment utilisée pour désigner cette région du cortex S1. Au niveau de cette carte somatotopique, chaque vibrisse est individuellement représentée par une unité anatomique définie, ce qui autorise une délimitation précise de l'organisation fonctionnelle de ce cortex (pour revue, *Petersen, 2008 ; Figure 12*), et cet agencement est critique pour la discrimination des textures (*Guic-Robles et al., 1992*).

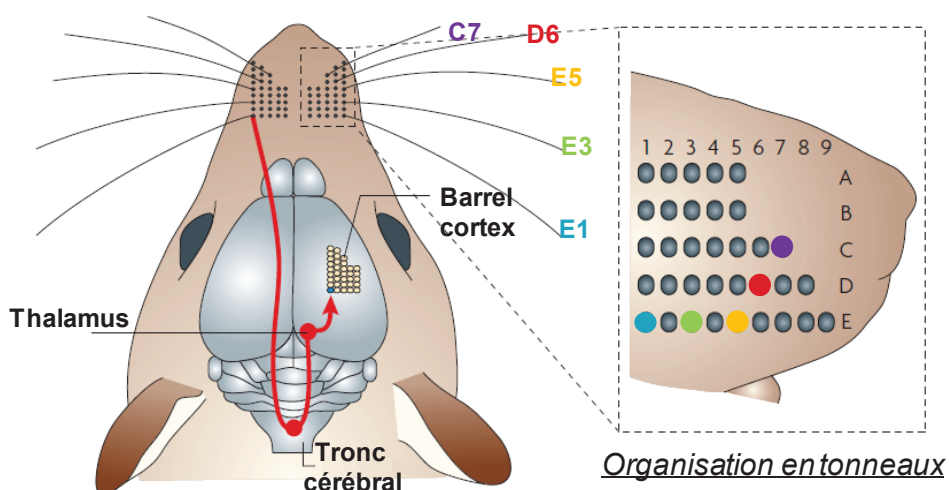


Figure 12 :
Organisation somatotopique du système des vibrisses. La disposition des vibrisses est similaire à celle du barrel cortex : chaque vibrisse active une colonne précise du barrel cortex. Adapté de *Diamond et al., 2008*.

Cette organisation est non seulement identifiée au niveau du barrel cortex, mais également dans les structures situées en amont telles que le noyau thalamique VPM (*Pierret et al., 2000*). Les neurones du barrel cortex se projettent ensuite principalement sur le cortex somesthésique secondaire (S2), lui-même connecté au système limbique, notamment à l'hippocampe (*Pereira et al., 2007*). Toutefois, les voies anatomiques conduisant cette information vers les structures parahippocampiques ne sont pas strictement identifiées. Des connexions directes entre le cortex S1 et le CEL ont toutefois été caractérisées en faible proportion (*Swanson et Köhler, 1986 ; Insausti et al., 1997*), ainsi qu'entre le cortex S1 et le cortex pérorhinal en plus forte proportion (*Burwell, 2000*), structure avec laquelle le CEL est connecté (*Kerr et al., 2007*). Ainsi, le CEL reçoit des informations tactiles, mais vraisemblablement en majorité par l'intermédiaire du cortex pérorhinal. L'ensemble des structures impliquées dans le traitement de l'information tactile est résumé sur la **figure 13**.

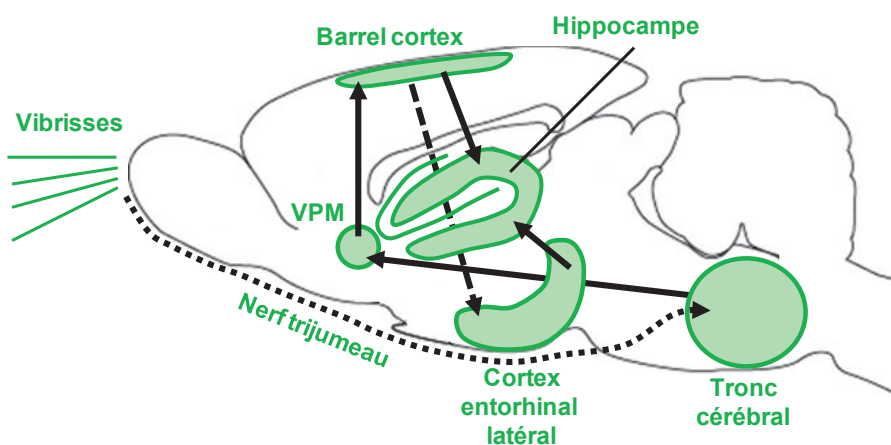


Figure 13 : Schéma des voies tactiles chez le rongeur. Les informations tactiles traitées par les vibrisses sont transmises par le nerf trijumeau (V) jusqu'au tronc cérébral, puis successivement au noyau ventro-postéro-médian (VPM) du thalamus, au barrel cortex, puis par des connexions majoritairement indirectes, jusqu'au cortex entorhinal latéral, et à l'hippocampe.

b. Capacités perceptives bien connues, mais capacités mnésiques méconnues

De nombreuses études se sont attachées à caractériser les mécanismes liés à la perception d'un stimulus tactile depuis les vibrisses jusqu'au codage neuronal au niveau du barrel cortex (pour revue, *Roohbakhsh et al., 2016*). En effet, les possibilités d'études sont multiples, sur animal anesthésié ou contraint, grâce au contrôle précis du stimulus utilisé (fréquence de stimulation et sélection de la vibrisse d'intérêt notamment) et à l'organisation très précise du barrel cortex. Ceci autorise des approches fines permettant de corrélérer la stimulation d'une vibrisse donnée à l'activation d'une portion identifiée du barrel cortex. Cette voie de traitement fournit donc un système bien connu pour explorer le lien entre les circuits synaptiques et le comportement du rongeur (pour revue, *Petersen, 2008*).

Plusieurs études se sont interrogées sur la fonctionnalité de la répartition des vibrisses. Présentant une orientation dorso-ventrale spécifique, deux types de vibrisses aux fonctions complémentaires sont distinguées : les macrovibrisses (> 10 millimètres et situées à l'arrière du museau) et les microvibrisses (< 7 millimètres et situées à l'avant du museau ; **Figure 14**). Les macrovibrisses fonctionnent comme des décodeurs à distance et sont spécialisées dans le repérage spatial de l'environnement, la discrimination d'objets situés à une distance supérieure à quelques millimètres et l'estimation du diamètre d'une ouverture

(Krupa et al., 2004). En revanche, les microvibrisses sont surtout sollicitées pour la discrimination d'objets proches, situés à une distance inférieure à quelques millimètres (Brecht et al., 1997 ; Morita et al., 2011). L'exploration des objets met donc en jeu les deux types de vibrisses, mais leur rôle respectif exact demande encore à être précisé.

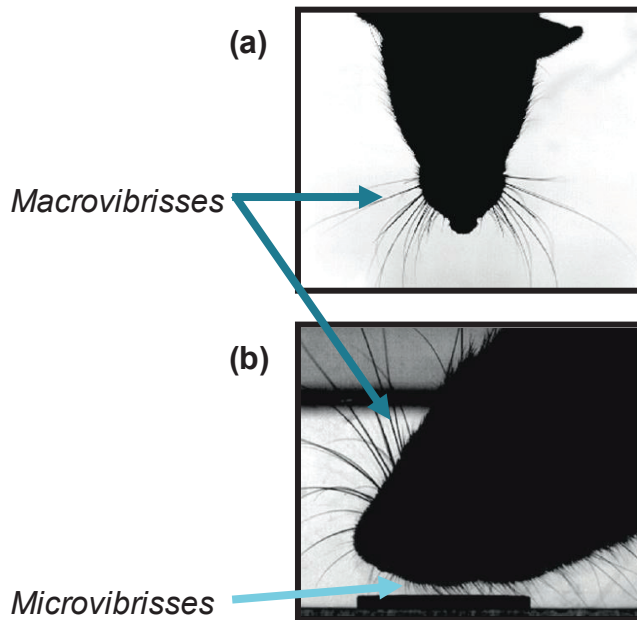


Figure 14 : Distinction morphologique et fonctionnelle entre les macrovibrisses et les microvibrisses. (a) L'animal échantillonne l'espace en utilisant majoritairement ses macrovibrisses. (b) L'animal utilise préférentiellement ses microvibrisses pour échantillonner un objet proche. Photos issues de Deschênes et al., 2012.

Par ailleurs, une étude a montré qu'il existe une corrélation entre la dynamique du whisking et les performances d'échantillonnage pour la reconnaissance d'un type de texture : les animaux les plus performants sont ceux qui échantillonnent le plus longuement les textures (McDonald et al., 2014). De plus, l'enregistrement unitaire des neurones du barrel cortex montre que les 75 dernières millisecondes de la période d'échantillonnage sont les plus informatives pour la prise de décision (von Heimendahl et al., 2007). D'autre part, les discriminations actives et passives d'un stimulus tactile se traduisent par une activation spécifique de la couche IV du barrel cortex, mais cette activation est plus importante lors d'une discrimination active. Toutefois, les capacités fines de discrimination des animaux, comme par exemple distinguer deux papiers de verre de rugosité proche, ne sont pas identifiées par des activités de décharge différentes au niveau du barrel cortex lors de l'échantillonnage de l'une ou l'autre des textures (Prigg et al., 2002). De plus, si les discriminations simples sont codées d'un point de vue temporel (fréquence de décharge), les discriminations plus complexes reposent également sur un codage spatial dynamique (recrutement de plusieurs tonneaux ; Carvell et Simons, 1995). Enfin, le traitement de l'information dans le barrel cortex résulte également de modulations top-down par le cortex associatif S2 et/ou par le barrel cortex controlatéral (Krupa et al., 2004).

La section partielle des vibrisses induit une augmentation de l'activité excitatrice au niveau des cellules pyramidales du barrel cortex, couplée à une réduction de l'activité inhibitrice des interneurons de cette structure (Zhang et al., 2013). Cette augmentation permet d'éviter la perte totale des fonctions de discrimination des stimuli tactiles. En effet, ceci favorise un niveau d'excitabilité restant suffisant pour transmettre un signal pertinent. Ce mécanisme facilite également la formation de nouvelles connexions avec d'autres structures de traitement sensoriel, suggérant la mise en place de mécanismes de plasticité cross-modale.

Ces données montrent donc que les propriétés fonctionnelles du barrel cortex sont modulées par l'expérience et l'apprentissage (pour revue, *Feldman et Brecht, 2005*). Toutefois, si de nombreuses études se sont attachées à caractériser les mécanismes qui sous-tendent la perception d'un stimulus tactile, peu de données font état des bases neuronales de la mémoire tactile.

c. Activité oscillatoire

L'étude de la dynamique oscillatoire associée à la discrimination des stimuli tactiles a fait l'objet de plusieurs travaux. Contrairement au système olfactif pour lequel le rythme bêta est la signature du traitement de l'information, il semblerait que ce soit davantage le rythme thêta qui soit un marqueur de discrimination concernant la modalité tactile.

Ainsi, le rythme de whisking des rongeurs oscille entre 5 et 12 Hz, c'est-à-dire à des fréquences similaires à celles caractérisant le rythme thêta hippocampique (*Kleinfeld et al., 2016*). Cependant, le rythme thêta associé au whisking et le rythme thêta hippocampique, notamment associé à l'activité motrice de l'animal et aux processus mnésiques, ne sont pas synchronisés lors d'un échantillonnage passif au cours duquel l'animal active ses vibrisses « dans le vide » (*Berg et al., 2006*). En revanche, quand l'animal échantillonne activement une texture, une synchronisation des oscillations thêta est détectée entre le barrel cortex et le DH, en corrélation avec l'amélioration des performances des animaux (*Grien et al., 2016*).

Concernant les oscillations dont la fréquence est comprise entre 25 et 45 Hz (qualifiées d'ondes bêta ou gamma selon les études), il a été établi qu'elles émergent spécifiquement quelques centaines de ms en amont et persistent jusqu'au début de l'échantillonnage tactile. Cette activité met en évidence des processus d'anticipation pour les stimuli à venir et pourrait favoriser le traitement rapide de l'information (*Hamada et al., 1999*).

C. Mécanismes sous-tendant la formation des associations olfacto-tactiles

1. Des modalités fonctionnellement associées...

Le rongeur est un animal nocturne qui évolue dans son environnement grâce à l'utilisation des stimuli olfactifs et tactiles qui le caractérisent. Dès lors, la formation flexible d'associations olfacto-tactiles (OT) est un processus à la fois naturel et essentiel pour cet animal afin d'identifier les objets de son environnement. En effet, il a été montré que les phénomènes de sniffing et de whisking sont couplés au niveau comportemental, puisque l'inhalation et le mouvement en avant des vibrisses sont synchronisés, de même que l'expiration et le mouvement en arrière de ces appendices. Cette forte coordination est due au fait que ces deux activités sont contrôlées par les muscles orofaciaux et caractérisées par des oscillations dans la bande thêta (pour revue, *Deschênes et al., 2012*). En effet, au cours de l'exploration active d'un environnement, une cohérence de phase a été mise en évidence entre les activités de sniffing et de whisking, suggérant la mise en place d'une coordination synchronisée entre l'olfaction et le toucher (*Ranade et al., 2013*). Ce résultat suggère que le flairage et les mouvements des vibrisses sont sous le contrôle d'un générateur commun, favorisant l'acquisition simultanée des stimuli olfactifs et tactiles (**Figure 15**).

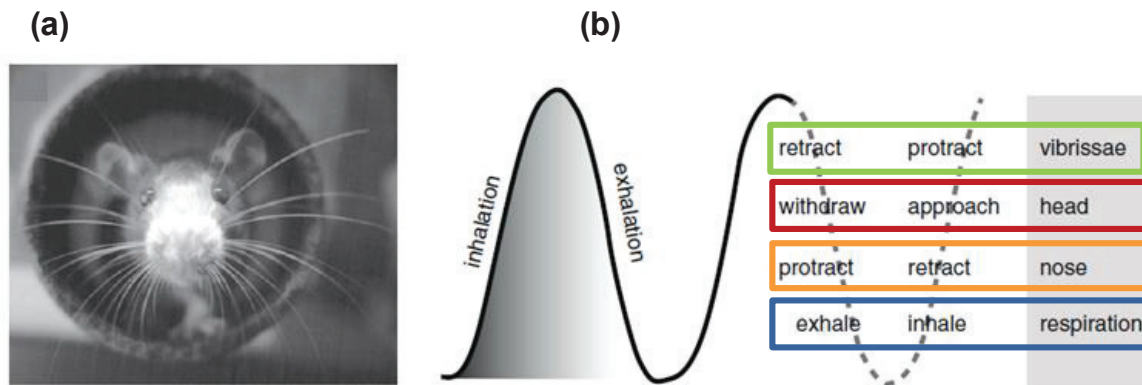


Figure 15 : Synchronisation des échantillonnages olfactifs (par sniffing) et tactiles (par whisking). (a) Photographie d'un rat qui circule dans un tunnel en échantillonnant son environnement. Ces vibrissae lui permettent notamment de détecter le diamètre de l'ouverture dans laquelle il se déplace. (b) Les cycles de sniffing et de whisking sont synchronisés avec les mouvements de la tête et du museau, ainsi qu'avec la respiration. Issu de Deschênes et al., 2012.

2. ... mais paradoxalement sous-tendues par des cortex anatomiquement éloignés

Contrairement aux cortex visuel et auditif qui sont physiquement proches et dont les interactions sont caractérisées (pour revue, *Cappe et al., 2009*), le cortex piriforme et le barrel cortex sont relativement éloignés, respectivement en position ventrale et dorsale, et peu de travaux ont mis en évidence des connexions directes entre ces deux régions. Ainsi, une étude a récemment montré que la stimulation électrique du cortex piriforme est à l'origine d'un potentiel évoqué monosynaptique dans le barrel cortex (*Ye et al., 2012*). De plus, l'apprentissage d'une association « odeur-texture » consistant à présenter de façon répétée une odeur simultanément à une stimulation mécanique des vibrissae chez l'animal éveillé en tête fixe influence la force de l'interaction entre ces deux structures. En effet, l'enregistrement unitaire du barrel cortex a montré que suite à ce conditionnement (dix sessions journalières), la proportion de cellules répondant à l'odeur seule et à une stimulation simultanée OT augmente respectivement de 22% et 54% (*Wang et al., 2015*). Ainsi le barrel cortex acquiert les caractéristiques d'une structure bimodale.

Toutefois, si quelques connexions ont été mises en évidence entre les structures impliquées dans le traitement des informations olfactives (cortex piriforme) et tactiles (barrel cortex) suite à un apprentissage, et pourraient sous-tendre la formation d'associations OT, plusieurs structures recevant des informations de ces deux modalités sensorielles pourraient également être sollicitées lors de cet apprentissage. Ces structures correspondent notamment à la partie postérieure du cortex piriforme (*Ye et al., 2012*), à l'amygdale basolatérale (*Uwano et al., 1995*) ou encore au cortex orbitofrontal (pour revue, *Rolls et al., 1996*). Enfin, le CEL reçoit directement des informations olfactives et indirectement des informations tactiles via le cortex périrhinal (*Kerr et al., 2007*). Classiquement considéré comme la principale source d'informations sensorielles de l'hippocampe (pour revue, *Witter, 1993*), le CEL est donc un carrefour clé entre la perception des stimuli et leur mise en mémoire avec les indices spatiaux et contextuels au niveau du DH. D'autre part, l'hippocampe répond à des stimuli olfactifs (*Igarashi et al., 2014*) et tactiles (*Pereira et al., 2007*).

3. Une question peu étudiée : les bases neuronales de la mémoire olfactive-tactile

Séparément, le traitement perceptif des informations sensorielles olfactives et tactiles est largement abordé dans la littérature. En revanche et en dépit de nombreux arguments anatomiques et électrophysiologiques suggérant que différentes structures telles que le CEL et/ou le DH pourraient représenter le substrat de l'apprentissage d'une tâche OT, peu de travaux ont mis en évidence l'implication fonctionnelle de ces structures pour la formation de telles associations.

D'un point de vue comportemental, il a été montré chez l'Homme que les performances obtenues lors de l'apprentissage d'une tâche tactile complexe sont facilitées si l'individu effectue cet apprentissage dans un environnement dans lequel une odeur plaisante est diffusée (Ho et Spence, 2005). En complément de ces travaux, il a été mis en évidence que la diffusion d'une odeur agréable module positivement le jugement hédonique des textures lors d'une tâche de discrimination tactile (Dematte et al., 2006).

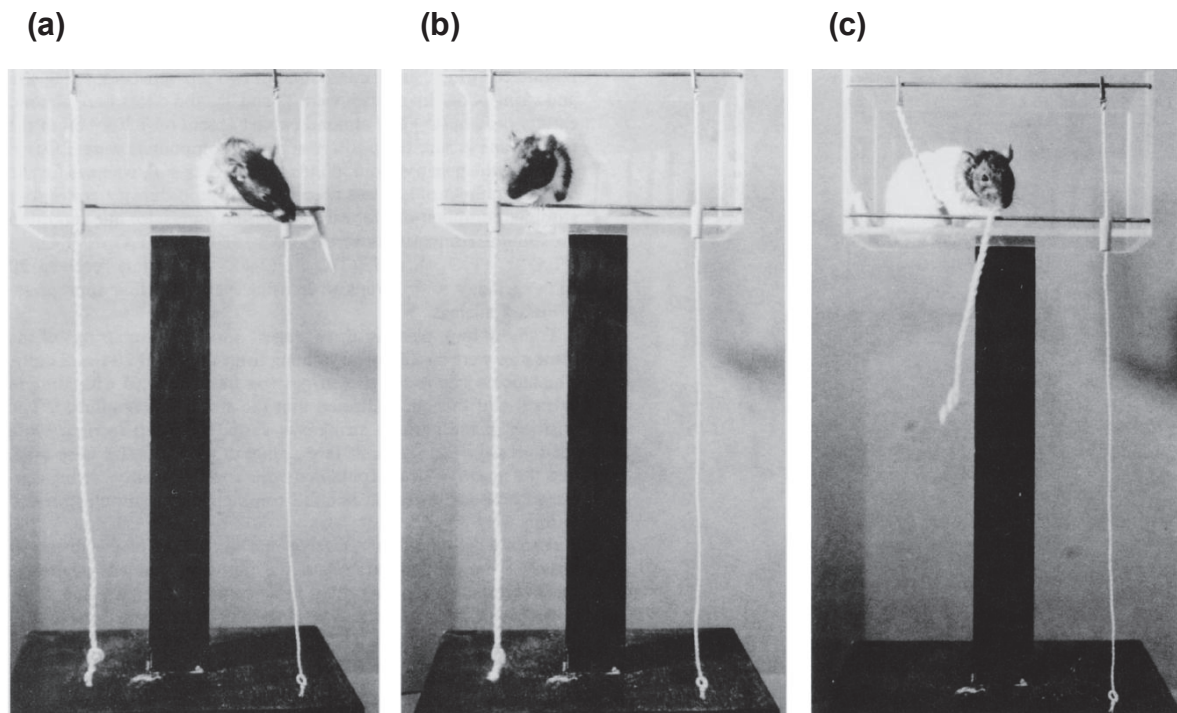


Figure 16 : Paradigme développé par Whishaw et Tomie au début des années 1990 pour l'étude des structures impliquées dans l'apprentissage des associations OT. L'animal est en présence de deux cordes identifiées par des caractéristiques olfactives et tactiles (diamètre de la corde) distinctes, seule l'une des deux combinaisons « odeur-diamètre » étant renforcée. (a) L'animal échantillonne les stimuli olfactif et tactile de la ficelle incorrecte. (b) L'animal échantillonne la ficelle correcte. (c) L'animal choisit la ficelle correcte et la hisse pour obtenir le renforcement alimentaire attaché à son extrémité. Photos issues de Whishaw et Tomie, 1991.

D'un point de vue fonctionnel, les premières études sur l'apprentissage d'une tâche OT ont été dirigées par l'équipe de Ian Whishaw dans les années 1990 chez le rongeur. Dans leur protocole, un rat positionné sur une plateforme doit choisir entre plusieurs cordes, chacune présentant une odeur spécifique, ainsi qu'un diamètre différent en tant que stimulus tactile, afin d'obtenir le renforcement alimentaire attaché à son extrémité (**Figure 16**).

Cependant, si le rat parvient à maîtriser cette tâche, la discrimination du stimulus tactile nécessite qu'il utilise ses pattes, alors que l'exploration des objets est naturellement effectuée par les vibrisses. D'autre part, l'apprentissage de cette tâche nécessite une cinquantaine de jours de conditionnement, soit environ 800 essais. Ainsi, les résultats obtenus dans ces études quant aux structures impliquées dans la formation et la rétention des associations OT sont à interpréter avec prudence (*Whishaw et Tomie, 1991 ; Whishaw et al., 1992*).

A la fin des années 2000, une étude a montré que le blocage du système cholinergique central par injection intrapéritonéale de scopolamine induit un déficit de la formation d'associations entre deux stimuli. Dans leur protocole, deux types d'essais sont proposés aux animaux : « cibles » et « distraction ». Afin d'obtenir un renforcement alimentaire lors des essais cibles, l'animal doit creuser dans un pot identifié par une combinaison « odeur-texture » spécifique et éviter le pot ne présentant aucun stimulus olfactif ou tactile. En revanche, lors des essais distraction, il doit éviter de creuser le pot caractérisé par une combinaison OT et creuser celui dépourvu de stimulus. Toutefois, ce paradigme ne repose que sur l'apprentissage d'une tâche unique, ce qui réduit considérablement les possibilités offertes à l'expérimentateur pour tester la flexibilité de la mémorisation de ces représentations bimodales. De plus, le blocage des récepteurs cholinergiques a été effectué par une injection intrapéritonéale de scopolamine, ce qui ne permet pas d'identifier les structures cérébrales sollicitées (*Botly et De Rosa, 2007 ; 2009*).

Ainsi, les différents paradigmes utilisés dans la littérature présentent certaines faiblesses telles que l'approche non-naturelle de la préparation de l'animal en tête fixe (*Wang et al., 2015*), la longue durée de l'apprentissage proposé ainsi que l'utilisation des pattes et non des vibrisses pour discriminer le stimulus tactile (*Whishaw et Tomie, 1991 ; Whishaw et al., 1992*), ainsi qu'une absence de possibilité de test de l'implication d'une structure donnée dans les processus sous-tendant la flexibilité des associations précédemment formées (*Botly et De Rosa, 2007 ; 2009*).

OBJECTIF

En référence aux données de la littérature de neuroanatomie et d'électrophysiologie, l'objectif de ce travail de thèse est de déterminer l'implication de structures limbiques telles que le cortex entorhinal latéral et l'hippocampe dorsal dans l'apprentissage d'une tâche associative relationnelle mettant en jeu des stimuli olfactifs et tactiles chez le rat.

Le premier volet de la thèse a consisté à mettre au point chez le rongeur une tâche associative relationnelle bimodale, écologiquement pertinente et pouvant être rapidement apprise. Pour cela, des stimuli olfactifs et tactiles finement contrôlés par l'expérimentateur et associés sous forme de paires OT présentant des éléments recouvrants^{***4} ont été présentés dans une arène dépourvue de tout indice spatial ou contextuel pouvant guider l'animal. L'apprentissage de la tâche consiste pour l'animal à associer une seule combinaison « odeur-texture » parmi les trois qui lui sont présentées, à un renforcement. La stratégie comportementale mise en place pour résoudre ce type de tâche a été caractérisée par la mesure de différentes variables, dans deux apprentissages distincts :

1. Une tâche OT, au cours de laquelle l'animal doit associer des stimuli olfactifs et tactiles sous forme de paires, dite **acquisition**^{***4} ;
2. Une tâche OT, au cours de laquelle l'animal doit faire preuve de flexibilité comportementale pour réassocier les stimuli olfactifs et tactiles familiers présentés en acquisition, sous forme de paires inédites, dite **recombinaison**^{***4}.

Le second volet de la thèse a consisté à mettre en évidence les effets d'une manipulation pharmacologique du CEL et du DH dans l'apprentissage bimodal OT. Pour cela, l'utilisation de la technique de microinjection nous a permis d'inactiver ces deux structures d'intérêt de manière sélective et transitoire. L'inactivation globale de chacune des structures par injection locale de lidocaïne a tout d'abord permis de tester leur implication respective dans les processus sous-tendant l'acquisition et la recombinaison d'une tâche OT. Dans un second temps, le rôle de certains systèmes de neurotransmission a été évalué au sein du CEL et du DH. Ainsi, l'effet du blocage sélectif du système glutamatergique de type NMDA et de la modulation cholinergique muscarinique a été testé par injection locale d'un antagoniste de ses récepteurs (dAPV et scopolamine, respectivement). La sélectivité des effets obtenus avec chaque traitement a été vérifiée par l'utilisation de tâches contrôles unimodales olfactives et tactiles.

La littérature et les connaissances actuelles de neuroanatomie proposent un modèle de hiérarchie fonctionnelle des régions cérébrales selon la complexité de l'opération cognitive à effectuer (pour revue, *Lavenex et Amaral, 2000*). Ces données permettent de formuler deux hypothèses majeures :

- Le CEL et le DH ont des rôles différents selon le type de tâche proposé (bimodal OT versus unimodal olfactif ou unimodal tactile) ;
- Le CEL est une structure clé pour former de nouvelles associations OT, alors que le DH est impliqué dans la flexibilité comportementale permettant à l'animal de recombinaison des associations OT précédemment apprises.

^{4 ***} : voir LEXIQUE (pages 13 et 14)

Le dernier volet de la thèse repose sur une approche d'enregistrement électrophysiologique chez l'animal vigile développée dans le but de définir les activités oscillatoires caractérisant l'apprentissage d'une tâche OT. Pour cela, des électrodes ont été implantées dans quatre structures : le CEL, la région CA1 du DH, ainsi que la région antérieure du cortex piriforme et le barrel cortex, ces deux structures étant respectivement sollicités dans le traitement des informations olfactives et tactiles. Les signaux ont été recueillis lors de différents apprentissages : acquisition et recombinaison d'une tâche bimodale OT, et acquisition d'une tâche unimodale olfactive ou tactile. L'évolution des signaux en fonction des performances a été suivie et a permis de :

- Décrire pour la première fois la dynamique neuronale de l'apprentissage d'une tâche OT ;
- Tester certaines des hypothèses issues de l'étude pharmacologique.

En effet, si le CEL est spécifiquement nécessaire pour l'acquisition de la tâche bimodale OT, et non pour l'acquisition des tâches unimodales olfactive ou tactile, la réponse électrophysiologique de cette structure devrait différer lors de l'échantillonnage des stimuli selon la tâche proposée. De plus, si le DH est effectivement indispensable pour permettre à l'animal de recombinaison les associations précédemment apprises, sans être impliqué dans leur acquisition initiale, la réponse oscillatoire de cette structure devrait différer entre ces deux apprentissages. Enfin, si la recombinaison repose sur une interaction forte entre le CEL et le DH, les activités oscillatoires de ces deux structures devraient être davantage synchronisées au cours de cet apprentissage complexe.

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse est présenté dans trois chapitres distincts :

Chapitre 1 : Etude comportementale

Caractérisation de la tâche olfacto-tactile et stratégies utilisées par l'animal

Chapitre 2 : Etude pharmacologique

Cortex entorhinal et hippocampe dorsal : Mécanismes de l'apprentissage olfacto-tactile

Chapitre 3 : Etude électrophysiologique

Signatures oscillatoires de l'apprentissage olfacto-tactile

Un modèle de travail construit à partir des données obtenues, ainsi que des perspectives clôturent ce manuscrit.

CHAPITRE 1 **ETUDE COMPORTEMENTALE**

***Caractérisation de la tâche olfacto-tactile
et stratégies utilisées par l'animal***

I. MATERIEL & METHODES

A. Animaux & Animalerie

177 rats mâles adultes de la souche Wistar (Charles Rivers) âgés de 7 à 8 semaines et pesant entre 230g et 270g à leur arrivée au laboratoire, sont utilisés. Cet effectif est divisé en deux groupes : 94 animaux font l'objet de l'étude sur l'apprentissage bimodal olfacto-tactile, et 83 animaux sur l'apprentissage unimodal olfactif ou tactile. Hébergés en animalerie standard ($21 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ et $55 \pm 10\%$ d'humidité) par cages de 4 ou 5 individus ($L=38\text{ cm} \times l=38\text{ cm} \times h=19\text{ cm}$), ils sont placés en cycle inversé (obscurité de 9h à 21h). Pendant les expériences, les animaux sont placés en restriction alimentaire, et chaque rat reçoit environ 10g de nourriture par jour (Harlan, Teklad Diets). Ce régime permet de maintenir les animaux à 90% de leur poids d'origine (mesuré quelques jours après leur arrivée au laboratoire) et d'assurer leur motivation pendant les tests. Les apprentissages sont effectués pendant la phase active nocturne de leur cycle, entre 9h et 14h.

L'ensemble de la procédure a été soumis et approuvé par le Comité d'Ethique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 et par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (C2EA-55, numéro d'autorisation : DR2014-30).

B. Principe de l'apprentissage

La procédure utilisée est inspirée de travaux précédemment réalisés par l'équipe, ainsi que de travaux antérieurs sur l'apprentissage chez le rongeur (*Bunsey et Eichenbaum, 1993 ; 1996 ; Dusek et Eichenbaum, 1997 ; 1998*). Celle-ci repose sur deux comportements naturellement observés chez le rat : creuser pour trouver de la nourriture et explorer spontanément les caractéristiques olfactives (sniffing) et tactiles (whisking) d'objets nouveaux dans un environnement familier. Concrètement, les animaux sont incités à fouiller trois pots remplis de sciure à la recherche d'un renforcement alimentaire caché au fond d'un seul d'entre eux, en fondant leur choix sur l'apprentissage d'une combinaison de stimuli « odeur-texture » spécifique présentée sur chaque pot. Les comportements ainsi sollicités permettent une maîtrise rapide des apprentissages proposés.

C. Dispositif expérimental

1. Cage expérimentale

Afin de minimiser la prise en compte d'éléments contextuels par l'animal, les tests ont lieu en lumière rouge, ce qui permet de réduire l'impact des indices visuels au sein de la cage (« intra-maze cues ») et en dehors de celle-ci (« extra-maze cues »). Les apprentissages se déroulent dans une arène dont les parois ($L=50\text{ cm} \times l=50\text{ cm} \times h=40\text{ cm}$) sont constituées par du polychlorure de vinyle (PVC) de couleur grise. La cage expérimentale est composée de deux parties séparées par une porte mobile manipulée par l'expérimentateur (**Figure 17**) : la partie principale (compartiment de test) dans laquelle sont disposés trois pots (**Figure 18**), support des stimuli olfactifs et/ou tactiles, et la partie secondaire abritant le rat entre deux essais (compartiment de départ).

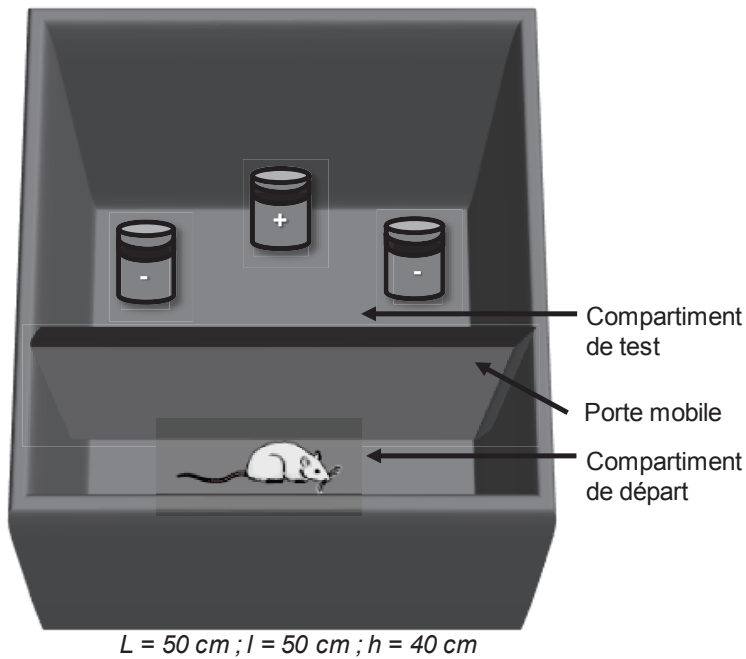


Figure 17 : Schéma du dispositif expérimental vu du dessus, composé d'une porte mobile séparant le compartiment de départ, du compartiment de test dans lequel sont placés trois pots à proximité de la paroi du fond. Le signe + symbolise la présence d'un renforcement alimentaire accessible dans le pot désigné, et le signe - symbolise l'absence d'un renforcement accessible dans les deux autres pots. La position des pots varie de façon pseudo-aléatoire d'un essai à l'autre, entre les trois positions prédéfinies.

Les pots utilisés comme support des stimuli sont des cylindres de PVC, de couleur grise ($h=9 \text{ cm}$ et $\text{Ø}=6 \text{ cm}$). Ils sont lestés de paraffine et de métal pour les stabiliser et éviter que l'animal ne puisse les déplacer au cours de son exploration. Une grille en métal est disposée au fond de chaque pot et est recouverte d'une épaisse couche de copeaux de bois inodores. Dans le pot renforcé, le renforcement alimentaire (un morceau de céréale Kellogg's Special K®) est placé entre la couche de sciure et la grille, donc accessible à l'animal. En revanche, les deux autres pots contiennent un morceau de céréale de taille similaire, mais placé sous la grille, donc inaccessible.

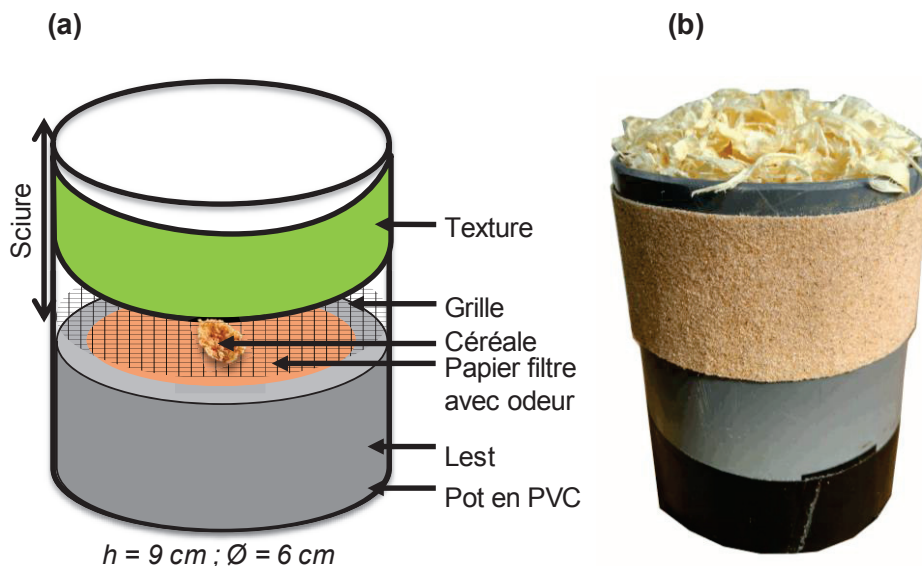


Figure 18 : Présentation d'un objet « olfacto-tactile » type. (a) Schéma d'un pot présentant une texture de rugosité variable sur le contour extérieur (stimulus tactile), et contenant de bas en haut un lest de paraffine et de métal, un filtre odorant (stimulus olfactif), une grille et un renforcement

alimentaire (céréale) déposé sur la grille dans le pot renforcé, et sous la grille dans les deux pots non-renforcés. L'ensemble est masqué par une épaisse couche de sciure. (b) Photographie d'un pot pourvu d'un papier de verre fin sur son contour extérieur en tant que stimulus tactile, et rempli de copeaux de bois inodores.

2. Stimulus olfactif et stimulus tactile

Chaque pot contient un filtre de papier imprégné d'une solution odorante distincte et placé sous la grille. Les odeurs sont représentées par 150 µL d'une solution odorante pure diluée au 10^{ème} dans de l'huile minérale (Sigma-Aldrich) et déposée sur un filtre. Cette quantité a été choisie de sorte que chaque odeur soit perçue avec une intensité modérée et similaire par trois expérimentateurs. Les odeurs utilisées sont qualitativement très différentes les unes des autres, du moins du point de vue des expérimentateurs, et sont les suivantes : anéthol (Fluka), limonène (-) (Fluka), géraniol (Aldrich) et peppermint (Aldrich). Chaque filtre odorant est changé après le passage de trois animaux et la senteur de chaque odeur utilisée est indiquée dans le **tableau 1**.

Nom de l'odeur	Senteur
Anéthol	Anis
Limonène (-)	Citron
Géraniol	Fleur
Peppermint	Menthe poivrée

Tableau 1 : Correspondance entre le nom de l'odeur utilisée et sa senteur.

Chaque pot présente un bandeau de texture de deux cm de largeur, de couleur similaire (de gris à ocre) mais de rugosité variable, disposé sur le contour extérieur, à hauteur des vibrisses du rat. Les textures utilisées sont facilement discriminables par les doigts de l'expérimentateur et sont les suivantes : papier de verre fin ou rugueux ; grille de métal souple ou rigide. Un espace d'un cm est laissé libre entre la texture et le rebord du pot pour éviter que les animaux creusent le pot et échantillonnent la texture avec leurs pattes en même temps.

Pour l'apprentissage de la **tâche bimodale olfacto-tactile**, les trois pots présentent une combinaison « odeur-texture » spécifique dont une seule est associée au renforcement. Pour l'apprentissage de la **tâche unimodale olfactive**, les trois pots contiennent chacun une odeur différente, l'une d'elle étant associée au renforcement, tandis que pour l'apprentissage de la **tâche unimodale tactile**, chacun des trois pots présente une texture distincte, dont l'une est associée au renforcement.

Un dispositif vidéo composé de trois caméras (Creative® HPD 1080p) est utilisé lors des différents apprentissages. L'une d'elles est fixée au-dessus de l'arène expérimentale, tandis que les deux autres sont fixées au niveau des coins supérieurs de la cage. Reliées à un ordinateur muni d'un logiciel développé au laboratoire (Volcan), cette installation permet l'enregistrement et l'analyse des images obtenues.

D. Protocole

1. Habituation

Cette étape permet de familiariser les animaux à leur environnement de travail et à les entraîner à creuser dans les pots pour y trouver parfois un renforcement alimentaire. Une semaine après l'arrivée à l'animalerie, l'habituation est effectuée pendant trois jours consécutifs. Le premier jour, un seul pot est placé dans la cage, et le renforcement alimentaire est placé devant le pot, sur le sol de l'arène. Après quelques essais, le renforcement est déposé sur la sciure. Le lendemain, le renforcement est progressivement enfoui dans les copeaux de bois, pour inciter un comportement de fouille. Le troisième et dernier jour, un second pot est ajouté, et seul l'un des deux pots est aléatoirement renforcé. En fin de session, un troisième pot est ajouté, et seul l'un des trois pots est aléatoirement renforcé. Lors de ces deux dernières étapes, les pots sont aléatoirement déplacés dans l'arène entre chaque essai. Au cours de chaque essai, l'animal est libre d'explorer la cage et son contenu pendant au maximum deux minutes. Dès qu'il a trouvé et librement consommé le renforcement, il est délicatement replacé derrière la porte, afin qu'il apprenne qu'à chaque essai, un seul renforcement est caché dans un seul pot. L'habituation s'achève lorsque l'animal est capable de choisir et de fouiller un pot parmi les trois en moins de 30 secondes, au cours de quatre essais parmi cinq consécutifs.

2. Principe général de la tâche associative

Après avoir placé l'animal derrière la porte, l'ouverture de celle-ci est associée à un bip sonore marquant le début de l'essai. Lorsque la porte est ouverte, le rat est libre de se déplacer dans l'arène et d'échantillonner les pots autant de fois qu'il le souhaite, avant de choisir d'en fouiller un. Pour cela, il dispose au maximum de deux minutes, et l'essai se termine dès qu'il fouille un pot de façon active, c'est-à-dire en utilisant ses pattes avant et/ou son museau. S'il s'agit du pot renforcé, le rat récupère le renforcement et le consomme, c'est un choix correct. S'il s'agit d'un pot non renforcé, c'est un choix incorrect et aucun renforcement n'est obtenu. Une fois que l'animal a fouillé un pot (renforcé ou non renforcé), un bip sonore signale la fin de l'essai, et l'animal est délicatement replacé derrière la porte.

Les trois pots sont disposés en triangle équilatéral sur des repères fixes identiques pour toute la durée de l'expérimentation (**Figure 17**). Leur position relative est changée entre chaque essai selon un ordre pseudo-aléatoire unique pour chaque session. Selon cette séquence, chaque pot occupe donc chacune des trois positions prédéfinies avec la même fréquence au cours d'une session donnée. L'animal ne peut donc pas prendre en compte la position des pots pour résoudre la tâche.

Lors de l'apprentissage de la première tâche (bimodale ou unimodale), une session quotidienne est réalisée pendant trois jours consécutifs. Chaque jour, les animaux effectuent la session dans un ordre de passage différent complètement aléatoire. Chaque session correspond à vingt essais et dure une vingtaine de minutes. Il est considéré que le rat a acquis la tâche lorsqu'il atteint le critère de réussite, à savoir neuf essais corrects parmi dix consécutifs.

a. Tâche bimodale olfacto-tactile (OT)

Dans l'étude bimodale, la première session d'acquisition d'une tâche OT se déroule le lendemain du dernier jour d'habituation et consiste en la présentation de trois pots, chacun présentant une combinaison OT spécifique. Seul l'un des trois pots est renforcé : ainsi, les animaux doivent apprendre à ne creuser que dans l'unique pot renforcé, indiqué par une combinaison OT spécifique, et à éviter les deux autres pots. En effet, l'animal doit combiner les deux stimuli pour obtenir le renforcement, car les deux combinaisons OT présentées sur les deux autres pots sont en partie constituées soit du même stimulus olfactif, soit du même stimulus tactile que la combinaison renforcée (élément recouvrant). Par exemple, si la combinaison renforcée est « anéthol – papier de verre fin », les deux autres pots sont pourvus pour l'un du stimulus olfactif « anéthol » et d'un autre stimulus tactile que celui renforcé, et pour l'autre pot, du stimulus tactile « papier de verre fin » et d'un autre stimulus olfactif que celui renforcé. Pour chaque rat, la même combinaison OT est systématiquement associée au renforcement au cours de chacune des trois sessions d'acquisition effectuées pendant trois jours consécutifs (**Tableau 2**).

Suite à cette première acquisition (OT1), chaque animal est soumis à plusieurs apprentissages OT distincts.

Pour un premier groupe d'animaux et après un délai de 10 jours, une séance de réacquisition^{***5} de la tâche OT1 est effectuée en une session unique de vingt essais. Ceci permet de tester si cette interruption altère les performances comportementales, et afin de spécifiquement tester les performances de rappel^{***5}, le premier essai de la session est effectué sans renforcement alimentaire.

Pour un second groupe d'animaux et à compter d'un délai post-OT1 variable (1, 3 ou 15 jours), l'acquisition d'une nouvelle tâche est effectuée selon le même principe (OT2). Cet apprentissage est réalisé en une session unique de vingt essais. Des stimuli entièrement différents sont utilisés lors des acquisitions OT1 et OT2. Deux jours après l'acquisition OT2, les stimuli précédemment présentés dans OT1 et OT2 sont réassociés dans le but de construire de nouvelles associations composées de stimuli désormais familiers. Les animaux sont soumis à deux apprentissages de ce type, dits « recombinaison », en une session unique de vingt essais (OT3 et OT4). Chaque recombinaison utilise un jeu de combinaisons différent, le choix du jeu étant contre-balancé entre les deux apprentissages (séparés par un délai de 24h). Enfin, consécutivement à ces quatre apprentissages (acquisitions OT1 et OT2, recombinaisons OT3 et OT4), une session de réacquisition de la tâche OT1 est effectuée en une session unique de vingt essais le lendemain de la recombinaison OT4. Cette séance se caractérise par l'utilisation du même jeu de combinaisons que lors de l'acquisition initiale OT1 et est proposée afin de tester si les apprentissages successifs OT2, OT3 et OT4 interfèrent avec la trace mnésique OT1 (**Tableau 2**).

⁵ *** : voir LEXIQUE (page 14)

b. Tâches unimodales olfactive (OLF) ou tactile (TACT)

Dans les études unimodales, la première session d'acquisition d'une tâche olfactive (OLF1) ou tactile (TACT1) se déroule le lendemain du dernier jour d'habituation, et consiste en la présentation de trois pots, chacun présentant un stimulus olfactif ou un stimulus tactile unique, selon la tâche considérée. Seul l'un des trois pots est renforcé : ainsi, les animaux doivent apprendre à associer sélectivement un stimulus au renforcement, et à éviter les deux autres. Pour un animal donné, le même stimulus est renforcé au cours des trois sessions d'acquisition effectuées pendant trois jours consécutifs, et le stimulus renforcé est contre-balancé entre les animaux (**Tableau 3**). Après un délai fixe de dix jours, une réacquisition de la tâche OLF1 ou TACT1 est effectuée en une session unique de vingt essais.

Dans l'étude bimodale dite « séquencée », l'acquisition de la tâche bimodale (OT1) se déroule en une session unique de vingt-cinq essais et fait suite à deux apprentissages unimodaux, l'un olfactif (OLF1), l'autre tactile (TACT1), d'une durée de trois jours chacun et effectués selon un ordre aléatoire.

3. Stimuli olfactifs et tactiles utilisés pour les tâches bimodales sous forme de combinaisons

		Tâches bimodales olfacto-tactiles	
		Stimulus olfactif	Stimulus tactile
OT1	Pot A	O1 : Anéthol	T1 : Papier de verre fin
	<i>Pot B</i>	O2 : Limonène (-)	T1 : Papier de verre fin
	<i>Pot C</i>	O1 : Anéthol	T2 : Grille souple
OT2	Pot A	O3 : Géraniol	T3 : Grille rigide
	<i>Pot B</i>	O4 : Peppermint	T3 : Grille rigide
	<i>Pot C</i>	O3 : Géraniol	T4 : Papier de verre rugueux
OT3 ou OT4	Pot A	O4 : Peppermint	T4 : Papier de verre rugueux
	<i>Pot B</i>	O1 : <i>Anéthol</i>	T4 : Papier de verre rugueux
	<i>Pot C</i>	O4 : Peppermint	T1 : <i>Papier de verre fin</i>
OT3 ou OT4	Pot A	O2 : Limonène (-)	T2 : Grille souple
	<i>Pot B</i>	O3 : <i>Géraniol</i>	T2 : Grille souple
	<i>Pot C</i>	O2 : Limonène (-)	T3 : <i>Grille rigide</i>

Tableau 2 : Présentation des combinaisons de stimuli OT utilisées dans les apprentissages bimodaux (acquisitions OT1 et OT2 ; recombinaisons OT3 et OT4). Pour tout apprentissage, c'est la combinaison du pot A (en gras) qui est renforcée. Les recombinaisons OT3 et OT4 sont effectuées chacune avec l'un des deux jeux de combinaisons présentés dans ce tableau et les stimuli en italique désignent les odeurs et les textures précédemment renforcées lors des acquisitions OT1 et OT2. L'acquisition et la réacquisition OT1 sont effectuées avec les mêmes stimuli.

4. Stimuli olfactifs et tactiles utilisés pour les tâches unimodales

	Tâche unimodale olfactive	Tâche unimodale tactile
Pot A	O1 : Géraniole	T1 : Papier de verre fin
Pot B	O2 : Limonène (-)	T2 : Papier de verre rugueux
Pot C	O3 : Anéthol	T3 : Grille souple

Tableau 3 : Présentation du jeu de stimuli olfactifs et tactiles respectivement utilisé dans l'apprentissage unimodal olfactif (colonne de gauche) et tactile (colonne de droite). Le pot renforcé varie aléatoirement et équitablement entre l'ensemble des animaux.

5. Contrôle des biais expérimentaux

Pour éviter que l'animal n'identifie le pot renforcé grâce à des indices visuels, les animaux participant à l'étude sont des rats albinos de la souche Wistar, donc dotés de capacités visuelles très réduites (Prusky et al., 2002). De plus, toutes les tâches sont réalisées en lumière rouge, et les pots sont visuellement identiques (textures de couleur similaire). Par ailleurs, afin d'éliminer la possibilité que les animaux repèrent le pot renforcé en utilisant des stimuli olfactifs non contrôlés par l'expérimentateur, chaque pot est régulièrement nettoyé à l'alcool 70° (entre chaque session et au cours d'une session si nécessaire). Afin d'éviter que les animaux ne suivent leur propre odeur déposée pendant l'échantillonnage et la fouille, les copeaux de bois remplissant chaque pot sont remplacés par des copeaux propres tous les trois essais au cours d'une session, ainsi qu'entre chaque session. Enfin, afin que le choix des animaux ne soit pas guidé par l'odeur du renforcement alimentaire, les deux pots non renforcés contiennent une céréale sous la grille. Dans le but de vérifier l'absence de prise en compte de l'odeur du renforcement, des essais contrôles (« probe test ») sont effectués ponctuellement et aléatoirement : au cours de ces essais, aucun renforcement n'est inséré dans le pot présentant la combinaison OT correcte, tandis que les deux pots présentant une combinaison OT incorrecte restent pourvus d'un renforcement inaccessible. En cas de choix correct, l'expérimentateur donne le renforcement alimentaire à l'animal à la fin de l'essai.

E. Variables comportementales mesurées

Pour chaque essai, plusieurs données sont relevées :

- le premier pot approché et le nombre de pots échantillonnés sont des données qui indiquent l'expression d'une préférence ou une aversion spontanée à certaines odeurs. Ces variables renseignent également sur la stratégie de l'animal (détection du pot renforcé à distance sans exploration proximale ou choix fondé au contraire sur l'échantillonnage du ou des stimuli proposés) ;

- la durée et le nombre d'échantillonnages par essai mettent en évidence l'évolution de la stratégie de l'animal au cours de l'apprentissage ;

- le pot choisi par l'animal (choix correct ou non) renseigne sur l'évolution des performances au cours des blocs et des sessions successives. Un choix correct est codé par

la valeur 1 et un choix erroné est codé par la valeur 0. Les performances sont graphiquement représentées sous forme de ratios de choix corrects par blocs de cinq essais consécutifs : par exemple, si l'animal a commis deux erreurs et effectué trois choix corrects au cours d'un bloc de cinq essais, son ratio de choix corrects pour le bloc considéré est de 0,60 ;

- le temps écoulé entre l'ouverture de la porte et la fouille du pot (temps de réponse comportementale ou latence), l'identité du premier pot creusé et le nombre d'essais non fouillés renseignent également sur l'évolution des performances et de la stratégie au cours des blocs et des sessions successives ;

- le pot choisi par l'animal selon le type d'essai (standard, changement de sciure ou probe test) permet de s'assurer de la fiabilité de l'apprentissage.

De plus, l'analyse des vidéos réalisées lors des tests permet l'observation détaillée du comportement de l'animal.

F. Analyses statistiques

Les données sont traitées avec le logiciel Systat 13.0®. Pour l'ensemble des animaux, le ratio de choix corrects, la latence, le nombre et la durée d'échantillonnage sont moyennés en quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4). Les données obtenues dans les différentes conditions sont traitées par des analyses de variance (ANOVA) à deux facteurs (« Jour » × « Bloc ») à mesures répétées sur le facteur Bloc, et à un facteur (Bloc), complétées si nécessaire de tests post-hoc de Bonferroni. Le score moyenné pour l'ensemble des essais de la session, le nombre de pots échantillonnés, le premier pot approché, le nombre d'essais pour atteindre le critère de réussite et le type d'essai font l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) à un facteur. La répartition des erreurs et la comparaison des scores par rapport au hasard sont traités par un test paramétrique indépendant ou apparié (test-t de Student) en cas de normalité des données (test de Shapiro-Wilk). Si les données ne sont pas normales, elles sont traitées par un test non-paramétrique indépendant (test de Mann-Whitney) ou apparié (test de Wilcoxon des rangs signés). Pour chaque test, le seuil de rejet de l'hypothèse nulle est de 5%.

II. RESULTATS

A. Caractéristiques de l'apprentissage d'une tâche bimodale olfacto-tactile

1. Acquisition d'une première tâche (OT1)

Parmi les 94 animaux ayant participé au protocole « apprentissage bimodal olfacto-tactile », trois animaux n'ont pas réussi la phase d'habituation et un animal n'est pas parvenu à apprendre la tâche. Ils ont donc été retirés de l'étude. Le groupe d'animaux ayant participé à l'acquisition d'une première tâche olfacto-tactile (OT1) comporte donc 90 animaux. Le hasard correspond à un ratio de choix corrects de 1/3, c'est-à-dire 0,33. Deux des trois pots contenant le stimulus olfactif renforcé et deux des trois pots présentant le stimulus tactile renforcé, une valeur de 0,50 représente un apprentissage conditionné au seul stimulus olfactif ou tactile.

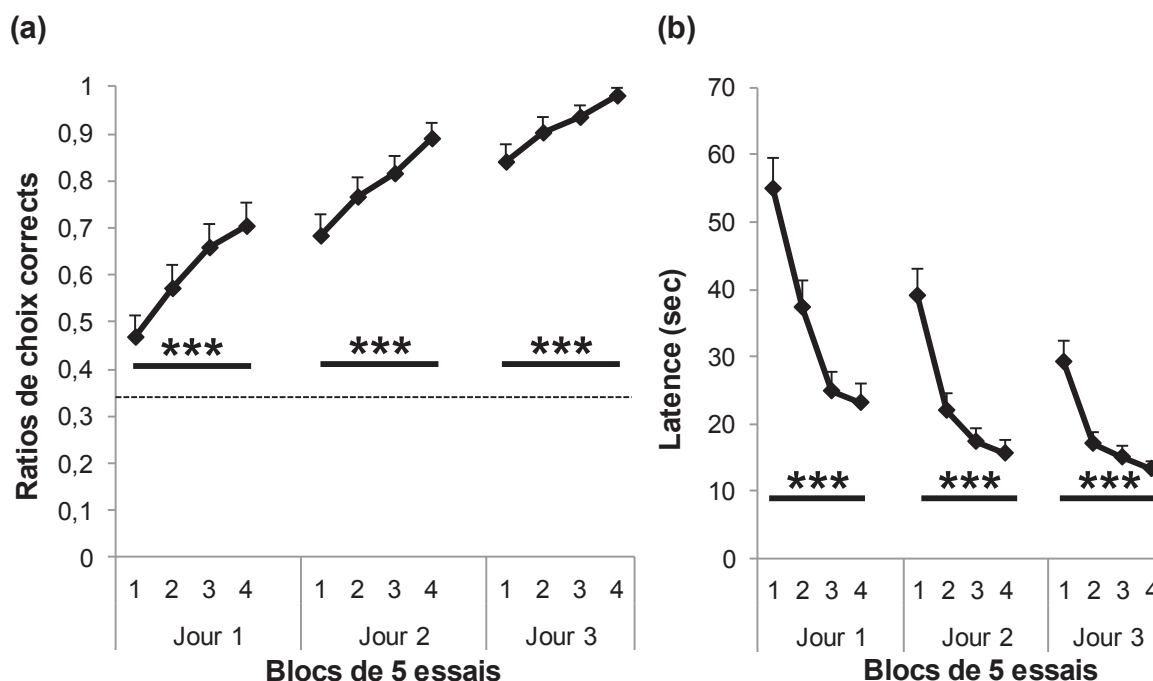


Figure 19 : Evolution rapide des performances lors de l'acquisition d'une première tâche bimodale olfacto-tactile (OT1). (a) Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. et (b) Moyenne des latences \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors des trois jours d'acquisition (Jour 1, Jour 2, Jour 3). Un ratio de 0,33 représente le hasard. $n=90$ rats. *** = $p < 0,001$ entre les blocs d'un jour donné.

La courbe d'acquisition OT1 est représentée sur la **figure 19** pour l'ensemble des animaux au cours des trois jours d'acquisition OT1 (J1, J2, J3). Comme l'indique la **figure 19.a**, le ratio de choix corrects moyen évolue entre les jours, et entre les blocs d'un même jour d'acquisition, avec des scores progressant de $0,47 \pm 0,05$ (au premier bloc de cinq essais de J1) à $0,98 \pm 0,01$ (au dernier bloc de J3). Une analyse statistique à deux facteurs (Jour \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Jour ($F_{2,266} = 282,53$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,798} = 94,62$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{6,798} = 2,89$; $p < 0,01$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc montre que les animaux progressent significativement au cours de chaque session ($F_{3,356} = 32,15$; $p < 0,001$ à J1 / $F_{3,356} = 27,29$; $p < 0,001$ à J2 /

$F_{3,356} = 25,48$; $p < 0,001$ à J3). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une progression du score entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 à J1, J2 et J3 ($p < 0,01$ à $p < 0,001$). De plus, le critère de réussite (neuf essais corrects parmi dix consécutifs) est atteint après 38 ± 9 essais, c'est-à-dire entre le milieu et la fin du deuxième jour d'acquisition.

Les courbes de latence sont représentées sur la **figure 19.b** et leur analyse montre que le temps de réponse diminue fortement entre les jours et au cours de chaque session d'acquisition, d'une cinquantaine de secondes au premier bloc de J1 à une quinzaine de secondes au dernier bloc de J3. Une analyse statistique à deux facteurs (Jour \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Jour ($F_{2,266} = 77,46$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,798} = 195,36$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{6,798} = 9,41$; $p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc montre que la latence varie significativement au cours de chaque session ($F_{3,356} = 60,71$; $p < 0,001$ à J1 / $F_{3,356} = 54,09$; $p < 0,001$ à J2 / $F_{3,356} = 46,05$; $p < 0,001$ à J3) et un test post-hoc (Bonferroni) montre une évolution significative de la latence entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 à J1, J2 et J3 ($p < 0,001$).

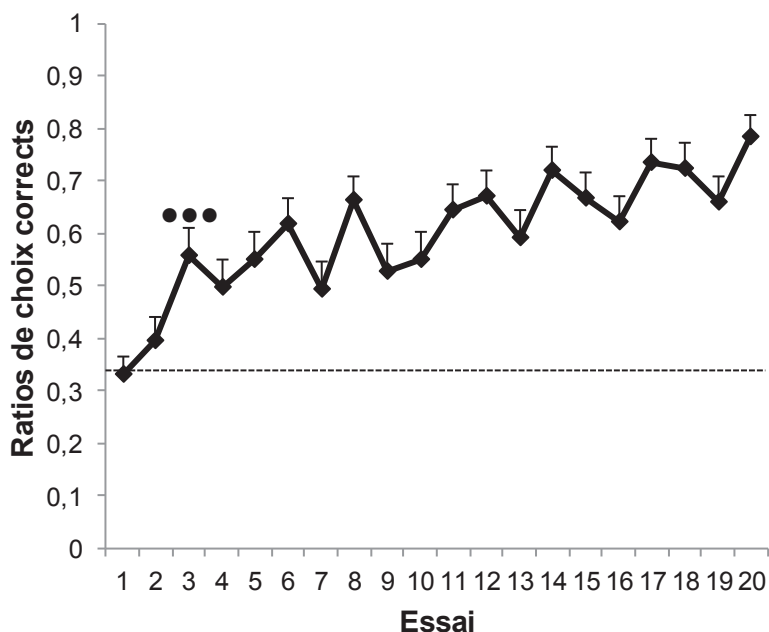


Figure 20 : Evolution rapide des performances lors du premier jour d'acquisition d'une première tâche bimodale olfacto-tactile (OT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. pour chacun des vingt essais du premier jour d'acquisition (Jour 1). Un ratio de 0,33 représente le hasard. $n=90$ rats. ••• = $p < 0,001$ comparé au hasard, à partir de l'essai indiqué.

La **figure 20** représente les résultats obtenus au cours de chaque essai du premier jour d'acquisition OT1 pour l'ensemble des animaux. Le ratio de choix corrects moyen atteint une valeur supérieure au hasard (ratio de 0,33) dès le troisième essai (test-t comparé à une valeur de référence, $p < 0,001$).

Parmi les trois pots, un seul est renforcé : le pot A. Comme l'indique la **figure 21**, les deux autres pots (B et C) ne présentent qu'un seul des stimuli renforcés. Or, l'analyse des erreurs montre que celles-ci consistent le plus souvent à choisir le pot C, contenant donc l'odeur associée au renforcement. En effet, pour l'ensemble des trois jours d'acquisition, 79% des erreurs sont commises par choix du pot C, contre seulement 21% par choix du pot B, présentant la texture associée au renforcement (total de 180 erreurs, test-t à mesures appariées entre les pots B et C, $p < 0,001$). Ce biais olfactif est observé dans les mêmes proportions dès le premier jour d'acquisition et même dès le tout premier bloc de cinq essais (données non représentées).

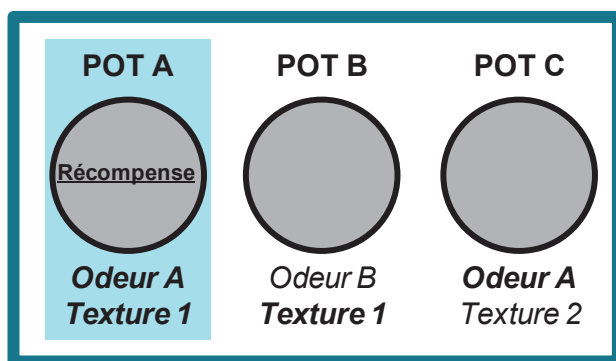


Figure 21 : Schéma illustrant les combinaisons utilisées lors de l'apprentissage bimodal olfacto-tactile. La combinaison renforcée est présentée au niveau du pot A (fond bleu). Les pots B et C sont pourvus d'éléments recouvrants, respectivement la texture et l'odeur associée au renforcement (en gras).

L'analyse vidéo du comportement des animaux montre qu'à chaque essai, les animaux échantillonnent en moyenne $5,3 \pm 1,4$ pots pendant une durée moyenne totale de 940 ± 2000 ms. De plus, ils échantillonnent la combinaison OT du pot qu'ils choisissent de creuser (correct ou incorrect) pendant 430 ± 440 ms. Ceci suggère que le temps nécessaire pour le traitement des deux stimuli de la combinaison donnant lieu à une réponse conditionnée (c'est-à-dire fouiller le pot) est plus long que le temps nécessaire pour rejeter les pots considérés comme incorrects par l'animal. En effet, l'animal échantillonne chacun des quatre pots rejetés pendant 125 ms en moyenne seulement. Ces valeurs sont toutefois moyennées pour l'ensemble des essais, indépendamment de leur réussite et du niveau d'expertise des animaux. Les analyses demanderaient donc à être affinées selon ces paramètres, pour formuler des interprétations plus rigoureuses.

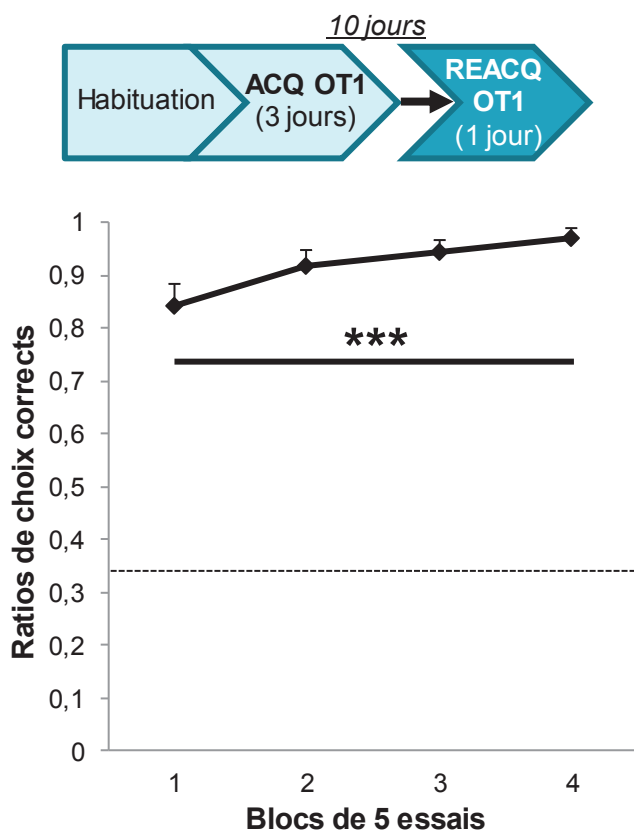
En résumé, les animaux progressent non seulement d'un jour à l'autre, mais aussi d'un bloc d'essais au suivant : l'acquisition de la tâche OT est donc progressive et rapide. De plus, dès la fin du premier jour, les animaux effectuent leur choix en une vingtaine de secondes seulement, signifiant que le principe de la tâche est très vite assimilé.

2. Effet d'un délai de dix jours sur le rappel et la réacquisition d'une tâche (OT1)

Après une période de repos de dix jours, un test de réacquisition de la tâche OT1 précédemment apprise est effectué en une session unique de vingt essais ($n=78$ parmi $n=90$ des animaux ayant appris OT1 : 4 sont décédés et 8 ont été inclus dans un protocole ne testant pas l'effet d'un délai de dix jours sur les performances de réacquisition de la tâche OT1).

La chronologie des phases expérimentales ainsi que la courbe de réacquisition OT1 sont représentées sur la **figure 22** pour l'ensemble des animaux. Lors du premier essai et afin de tester les performances de rappel, aucun renforcement n'a été placé dans le pot présentant la combinaison correcte et le choix du pot fouillé a été noté pour chaque animal. L'analyse des données montre que ce premier choix correspond au pot renforcé pour 86% des animaux (67/78). De manière intéressante, les onze animaux ayant commis une erreur ont choisi le pot C, donc le pot contenant l'odeur associée au renforcement. De plus, comme l'indique la figure, la réacquisition OT1 est caractérisée par un ratio de choix corrects moyen élevé qui progresse au cours de la session (de $0,84 \pm 0,04$ à $0,97 \pm 0,02$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc confirme cette observation et montre une progression

significative du score au cours de la session ($F_{3,308} = 22,42$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une progression du score entre le bloc 1 et les blocs 2, 3, et 4 ($p < 0,001$).



La forte proportion d'animaux ayant répondu correctement au premier essai non renforcé suggère que le rappel de l'apprentissage d'une tâche OT n'est pas perturbé par un délai de dix jours post-acquisition. Néanmoins, le fait que les animaux réapprennent la tâche OT1 indique que le délai de 10 jours affecte toutefois partiellement les performances à long-terme de l'apprentissage d'une tâche OT, et le type d'erreur commis par les animaux suggère que la diminution initiale relative des performances serait majoritairement due à des erreurs concernant le stimulus tactile.

Figure 22 : Effet d'un délai de dix jours sur les performances de réacquisition d'une tâche bimodale olfacto-tactile (OT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la réacquisition effectuée en une session unique de vingt essais, dix jours après la fin de l'acquisition. Un ratio de 0,33 représente le hasard. $n=78$ rats. *** = $p < 0,001$ entre les blocs.

3. Effet de l'apprentissage d'une première tâche (OT1) et du délai post-OT1 sur l'acquisition d'une seconde tâche (OT2)

Suite à l'acquisition de la tâche OT1 et après un délai variable d'un ($n=7$), trois ($n=8$) ou quinze jours ($n=18$), les animaux ont été soumis à l'acquisition d'une seconde tâche OT en une session unique de vingt essais (OT2). Dans cette tâche, de nouvelles odeurs et de nouvelles textures ont été utilisées, dans le but de former des combinaisons OT inédites.

La chronologie des phases expérimentales ainsi que les courbes d'acquisition OT2 sont représentées sur la **figure 23** pour les trois groupes expérimentaux. Comme l'indique la figure, le ratio de choix corrects moyen évolue entre les blocs pour les trois groupes expérimentaux (de $0,55 \pm 0,17$ à $0,68 \pm 0,17$ pour le groupe 1 jour ; de $0,54 \pm 0,17$ à $0,75 \pm 0,16$ pour le groupe 3 jours ; de $0,45 \pm 0,11$ à $0,88 \pm 0,08$ pour le groupe 15 jours). Ainsi, le ratio de choix corrects moyen semble plus élevé en fin de session pour le groupe 15 jours ($0,88 \pm 0,08$) que pour les groupes 1 et 3 jours ($0,68 \pm 0,17$ et $0,75 \pm 0,16$ respectivement). Une analyse statistique à deux facteurs (Délai \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 15,54$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Délai ($F_{2,30} = 3,78$; $p < 0,05$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{6,90} = 3,34$; $p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc montre que les scores sont significativement différents au cours des blocs pour le groupe 15 jours ($F_{3,68} =$

46,27 ; $p < 0,001$ pour le groupe 15 jours), mais pas pour les groupes 1 et 3 jours ($F_{3,24} = 2,11$; p n.s et $F_{3,28} = 1,67$; p n.s respectivement). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une progression significative du score entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 pour le groupe 15 jours ($p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Délai montre une différence significative des scores entre les groupes dans le bloc 3 ($F_{2,30} = 4,78$; $p < 0,05$) et dans le bloc 4 ($F_{2,30} = 7,15$; $p < 0,01$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des scores entre les groupes 1 et 3 jours, et le groupe 15 jours dans les blocs 3 et 4 ($p < 0,05$).

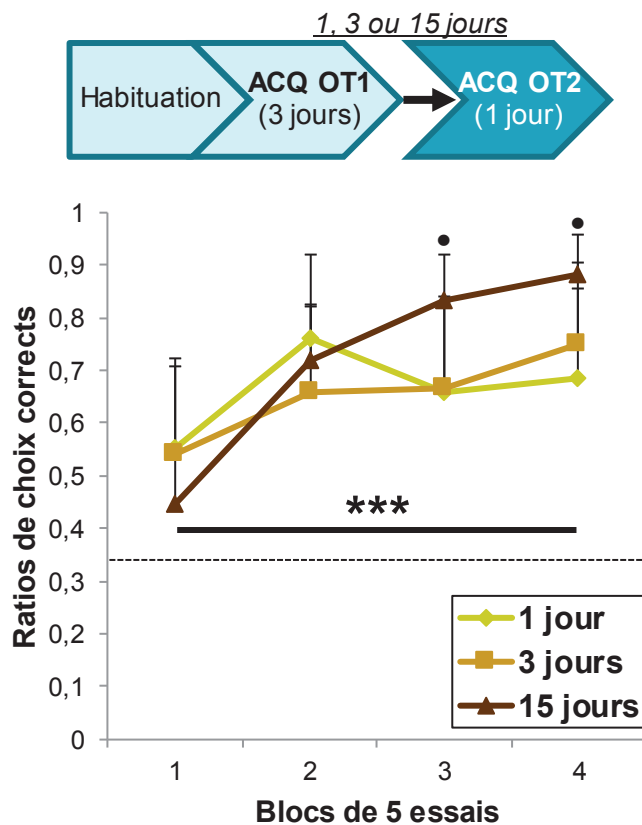


Figure 23 : Effet de l'apprentissage d'une première tâche olfacto-tactile (OT1) et du délai post-OT1 sur les performances d'acquisition d'une seconde tâche bimodale olfacto-tactile (OT2). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de l'acquisition d'une seconde tâche OT effectuée en une session unique de vingt essais après un délai post-OT1 variable (1 jour, en ocre, $n=7$ rats ; 3 jours, en brun clair, $n=8$ rats ; 15 jours, en brun foncé, $n=18$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard. *** = $p < 0,001$ entre les blocs pour le groupe 15 jours. • = $p < 0,05$ entre les différents groupes dans un bloc donné.

De plus, les performances sont meilleures au cours de la session unique OT2 qu'au cours du premier jour d'acquisition OT1, et ce que quel que soit le délai entre les deux tâches. En

effet, le score moyenné pour l'ensemble des essais de la session évolue de $0,49 \pm 0,05$ pour OT1 à $0,68 \pm 0,06$ pour OT2 pour le groupe 1 jour, de $0,49 \pm 0,13$ pour OT1 à $0,66 \pm 0,06$ pour OT2 pour le groupe 3 jours et de $0,60 \pm 0,11$ pour OT1 à $0,72 \pm 0,07$ pour OT2 pour le groupe 15 jours (test-t à mesures appariées entre OT1 et OT2, $p = 0,05$ à $p < 0,01$ pour chaque groupe expérimental – données non représentées).

Par ailleurs, comme pour l'acquisition OT1, les animaux commettent plus d'erreurs par choix du pot contenant l'odeur correcte, qu'en choisissant le pot présentant la texture correcte, et ce, dans les mêmes proportions, quel que soit le groupe expérimental (données non représentées).

Ces résultats indiquent que l'acquisition d'une première tâche OT facilite l'acquisition d'une seconde tâche OT et que le délai séparant les deux acquisitions affecte les performances de la seconde : un délai court (1 ou 3 jours) interfère de manière plus importante sur la qualité des performances qu'un délai long (15 jours).

4. Effet du délai entre les deux acquisitions (OT1 et OT2) sur les performances lors d'une première recombinaison (OT3)

Deux jours après l'acquisition OT2, les trois groupes expérimentaux (1 jour : n=7 ; 3 jours : n=8 ; 15 jours : n=16) ont été soumis à un apprentissage de recombinaison en une session unique de vingt essais (OT3). Les stimuli OT utilisés pour cette tâche correspondent à de nouvelles combinaisons construites à partir des stimuli olfactifs et tactiles préalablement utilisés lors des acquisitions OT1 et OT2. Deux jeux de combinaisons ont été construits et l'un des deux a été aléatoirement choisi pour chaque animal (**Tableau 2**, page 65).

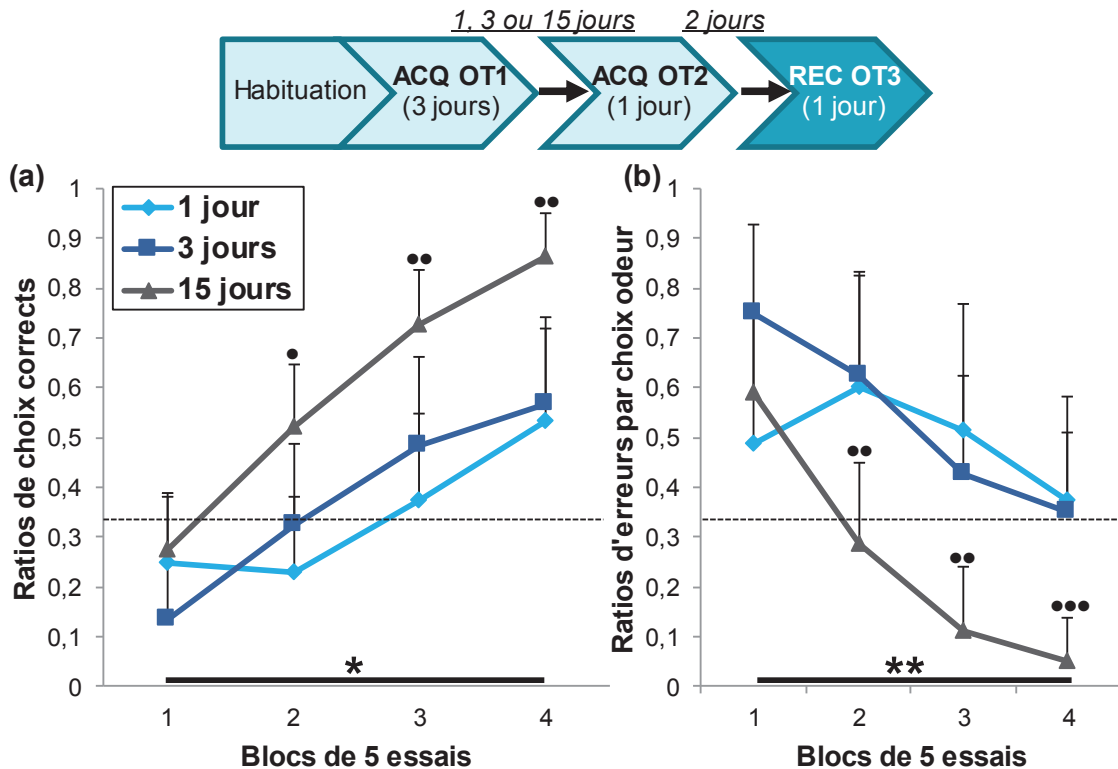


Figure 24 : Effet du délai entre les acquisitions (OT1 et OT2) sur les performances de recombinaison (OT3). (a) Moyenne des ratios de choix corrects ± S.E.M. et (b) Moyenne des ratios d'erreurs par choix de l'odeur précédemment renforcée dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la première recombinaison effectuée en une session unique de vingt essais après un délai variable entre OT1 et OT2 (1 jour, en bleu clair, n=7 rats ; 3 jours, en bleu foncé, n=8 rats ; 15 jours, en gris, n=16 rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard. (a) * = $p < 0,05$ entre les blocs d'un jour donné, quel que soit le groupe. (b) ** = $p < 0,01$ entre les blocs d'un jour donné, pour les groupes 3 jours et 15 jours. • = $p < 0,05$; •• = $p < 0,01$; ••• = $p < 0,001$ entre les différents groupes dans un bloc donné.

La chronologie des phases expérimentales ainsi que les courbes de recombinaison OT3 sont représentées sur la **figure 24** pour les trois groupes expérimentaux. Comme l'indique la **figure 24.a**, le ratio de choix corrects moyen progresse entre les blocs pour les trois groupes expérimentaux (de $0,25 \pm 0,14$ à $0,52 \pm 0,19$ pour le groupe 1 jour ; $0,13 \pm 0,11$ à $0,57 \pm 0,17$ pour le groupe 3 jours ; $0,28 \pm 0,11$ à $0,86 \pm 0,09$ pour le groupe 15 jours). Ainsi, le ratio de choix corrects moyen semble plus élevé en fin de session pour le groupe 15 jours ($0,86 \pm 0,09$), que pour le groupe 1 et 3 jours ($0,52 \pm 0,19$ et $0,57 \pm 0,17$ respectivement). Une analyse statistique à deux facteurs (Délai × Bloc) à mesures répétées confirme ces

observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,84} = 38,03$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Délai ($F_{2,28} = 29,75$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{6,84} = 2,29$; $p < 0,05$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc montre que les scores sont significativement différents au cours des blocs pour chaque groupe ($F_{3,24} = 4,71$; $p < 0,05$ pour le groupe 1 jour / $F_{3,28} = 8,83$; $p < 0,001$ pour le groupe 3 jours / $F_{3,60} = 46,13$; $p < 0,001$ pour le groupe 15 jours). Un test post-hoc (Bonferroni) montre que le score est significativement différent entre les blocs 1 et 4 pour le groupe 1 jour ($p < 0,05$), entre le bloc 1 et les blocs 3 et 4 pour le groupe 3 jours ($p < 0,01$ et $p < 0,001$ respectivement), et entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 pour le groupe 15 jours ($p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Délai montre une différence significative des scores entre les groupes dans le bloc 2 ($F_{2,28} = 8,34$; $p < 0,001$), dans le bloc 3 ($F_{2,28} = 13,52$; $p < 0,001$) et dans le bloc 4 ($F_{2,28} = 12,73$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre que les performances du groupe 15 jours sont significativement différentes de celles des groupes 1 et 3 jours, dans les blocs 2, 3 et 4 ($p < 0,05$ à $p < 0,01$). En revanche, l'utilisation de l'un ou l'autre des deux jeux de combinaisons n'influence pas les performances pour le groupe 15 jours ($n=16$, données non représentées). Cette analyse n'a pas été réalisée pour les groupes 1 et 3 jours, du fait de leur effectif restreint (respectivement $n=7$ et $n=8$).

L'une des caractéristiques de la recombinaison repose sur l'utilisation de stimuli familiers, et implique donc que l'animal apprenne à éteindre la persistance pour les stimuli précédemment renforcés pour résoudre la tâche : l'odeur et la texture renforcés dans OT1 ou OT2 sont respectivement présentés au niveau des pots B et C (**Tableau 2**, [page 65](#)). Une analyse de la répartition des erreurs indique que lors des premiers essais de la session, les animaux persistent à choisir l'odeur préalablement renforcée, quel que soit le délai entre OT1 et OT2, et le jeu de combinaisons choisi (donc indépendamment du fait que l'odeur ait été renforcée dans OT1 ou dans OT2). En effet, 87% (groupe 1 jour), 98% (groupe 3 jours) et 67% (groupe 15 jours) des erreurs sont commises par choix du pot B, contre seulement 13%, 2% et 33%, respectivement pour les trois groupes, par choix du pot C (total du nombre d'erreurs pour les B et C : groupe 1 jour = 96 ; groupe 3 jours = 88 ; groupe 15 jours = 122 – test-t à mesures appariées entre les pots B et C, $p < 0,001$ pour chaque groupe expérimental). Cependant, le ratio d'erreurs commises par choix du pot B semble plus important quand le délai entre OT1 et OT2 est de 1 ou 3 jours (87% et 98% respectivement), que quand il est de 15 jours (67%). Une analyse statistique à un facteur (Délai) confirme cette observation et montre une différence significative de ce ratio d'erreurs entre les trois groupes ($F_{2,28} = 30,51$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre que ce ratio d'erreurs du groupe 15 jours est significativement différent de celui des groupes 1 et 3 jours ($p < 0,001$).

Comme l'indique la **figure 24.b**, le ratio d'erreurs moyen montrant la proportion de choix du stimulus olfactif précédemment renforcé évolue progressivement au cours de la session, suggérant la mise en place progressive de l'apprentissage de recombinaison, par extinction de la persistance pour les stimuli (et particulièrement pour l'odeur) précédemment renforcés. En effet, ce ratio d'erreurs « odeur » évolue entre les blocs pour les trois groupes expérimentaux ($0,49 \pm 0,26$ à $0,37 \pm 0,14$ pour le groupe 1 jour ; de $0,75 \pm 0,18$ à $0,35 \pm 0,23$ pour le groupe 3 jours ; de $0,59 \pm 0,17$ à $0,05 \pm 0,09$ pour le groupe 15 jours). Ainsi, ce ratio

moyen semble diminuer davantage pour le groupe 15 jours ($0,05 \pm 0,09$) que pour les groupes 1 et 3 jours ($0,37 \pm 0,14$ et $0,35 \pm 0,23$ respectivement). Une analyse statistique à deux facteurs (Délai \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,84} = 25,34$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Délai ($F_{2,28} = 21,60$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{6,84} = 4,85$; $p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc montre une évolution significative du ratio d'erreurs « odeur » pour les groupes 3 jours ($F_{3,28} = 6,53$; $p < 0,01$) et 15 jours ($F_{3,60} = 46,66$; $p < 0,001$), mais pas pour le groupe 1 jour ($F_{3,24} = 1,24$; p n.s.). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative du ratio d'erreurs entre le bloc 1 et les blocs 3 et 4 pour le groupe 3 jours ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement), et entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 pour le groupe 15 jours ($p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Délai montre une différence significative du ratio d'erreurs « odeur » entre les groupes dans le bloc 1 ($F_{2,28} = 3,65$; $p < 0,05$), dans le bloc 2 ($F_{2,28} = 11,63$; $p < 0,001$), dans le bloc 3 ($F_{2,28} = 15,55$; $p < 0,001$) et dans le bloc 4 ($F_{2,28} = 17,00$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative du ratio d'erreurs « odeur » moyen entre les groupes 1 et 3 jours dans le bloc 1 ($p < 0,05$), et entre le groupe 15 jours et les deux autres groupes dans les blocs 2, 3 et 4 ($p < 0,01$ à $p < 0,001$).

L'ensemble de ces résultats indique que la recombinaison d'une tâche OT peut être progressivement effectuée en une session unique de vingt essais. L'analyse du ratio d'erreurs moyen suggère que cet apprentissage repose sur une caractéristique de flexibilité comportementale consistant dans un premier temps à apprendre à éteindre la persistance pour les stimuli précédemment renforcés, et dans un second temps, à acquérir une nouvelle association entre la combinaison OT (composée de stimuli familiers qui n'étaient précédemment ni associés, ni renforcés) et le renforcement. Nos données montrent que le délai entre les deux acquisitions OT1 et OT2 influence les performances de recombinaison : des délais courts interfèrent plus fortement avec les performances qu'un long délai. En revanche, les animaux recombinaient aussi bien les stimuli présentés dans OT1 que dans OT2 (ratios de choix corrects et ratios d'erreurs par persistance sur l'odeur précédemment renforcée similaires), donc indépendamment du nombre de présentations des stimuli (60 essais pour OT1 et 20 essais pour OT2) et de l'intervalle de temps séparant les présentations de ces stimuli (entre 3 et 17 jours maximum par rapport à OT1 et deux jours par rapport à OT2).

5. Effet d'une première recombinaison (OT3) sur les performances d'une seconde recombinaison (OT4)

Vingt-quatre heures après la recombinaison OT3, deux des trois groupes expérimentaux initiaux (1 jour : n=7 ; 3 jours : n=7) ont été soumis à un nouvel apprentissage de recombinaison (OT4) selon le même principe qu'OT3, en une session unique de vingt essais, à partir du jeu de combinaisons non utilisé pour OT3 (**Tableau 2**, [page 65](#)).

Le ratio de choix corrects moyen évolue entre les blocs (de $0,08 \pm 0,08$ à $0,57 \pm 0,19$ pour le groupe 1 jour et de $0,09 \pm 0,09$ à $0,48 \pm 0,19$ pour le groupe 3 jours ; données non représentées). D'autre part, le ratio de choix corrects moyen semble similaire entre OT3 et OT4 pour ces deux groupes expérimentaux. Une analyse statistique à deux facteurs (Tâche \times Bloc) à mesures répétées confirme cette observation et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,36} = 7,52$; $p < 0,001$ et $F_{3,39} = 15,86$; $p < 0,001$ pour les groupes 1 et 3 jours respectivement), mais pas d'effet significatif du facteur Tâche ($F_{1,12} = 2,02$; p n.s et $F_{1,13} = 1,08$; p n.s pour les groupes 1 et 3 jours respectivement), ni interaction significative entre les facteurs ($F_{3,36} = 3,40$; p n.s et $F_{3,39} = 0,54$; p n.s pour les groupes 1 et 3 jours respectivement). Par ailleurs, comme précédemment décrit pour OT3, l'analyse de la répartition des erreurs indique que les animaux persistent tout particulièrement à choisir le pot contenant l'odeur précédemment renforcée, notamment lors des premiers essais de la session et ce, quel que soit le délai entre OT1 et OT2 (88 % et 86% pour les groupes 1 et 3 jours respectivement, contre 12% et 14% par choix de la texture précédemment renforcée).

Ces résultats indiquent que la recombinaison d'une seconde tâche OT semble être effectuée selon la même stratégie que la première, à savoir une persistance olfactive marquée en début de session, suivie d'une extinction de cette persistance et de la construction progressive de la nouvelle combinaison OT renforcée. Toutefois, malgré l'apprentissage préalable d'une première recombinaison, les animaux n'obtiennent pas de meilleures performances lorsque le même type d'exercice leur est proposé, ne semblant donc pas appliquer le principe de l'apprentissage de recombinaison développé pour résoudre OT3.

6. Effet de la succession des acquisitions et des recombinaisons sur la réacquisition de la première tâche (OT1)

Vingt-quatre heures après la recombinaison OT4, un test de réacquisition de la tâche OT1 a été effectué en une session unique de vingt essais par n=7 rats (issus du groupe dont le délai entre OT1 et OT2 est de 3 jours).

La chronologie des phases expérimentales ainsi que la courbe de réacquisition OT1 sont représentées sur la **figure 25** pour l'ensemble des animaux. Le premier essai (non renforcé) est correct pour 86% des animaux testés (6/7), et le seul animal ayant commis une erreur a choisi le pot contenant l'odeur correcte. D'autre part, comme l'indique la figure, la réacquisition OT est caractérisée par un ratio de choix corrects moyen supérieur au hasard dès le début de la session, et stable au cours des blocs (de $0,65 \pm 0,18$ à $0,74 \pm 0,17$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc confirme cette observation et ne montre pas d'évolution des scores au cours de la session ($F_{3,24} = 0,15$, p n.s).

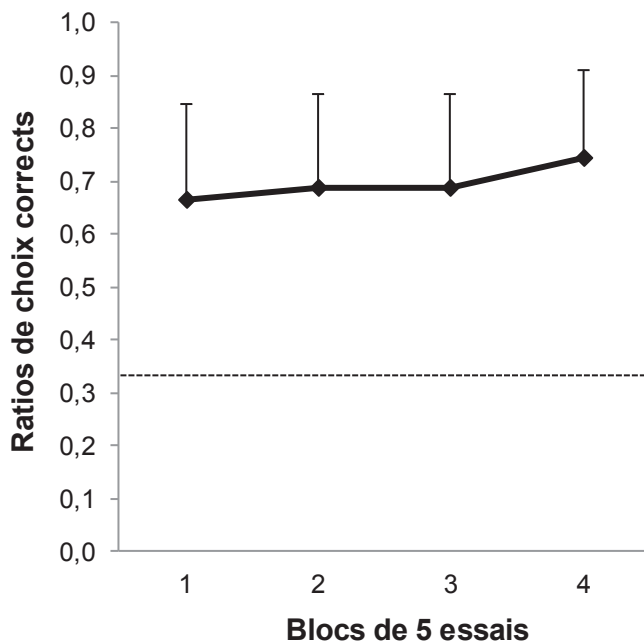
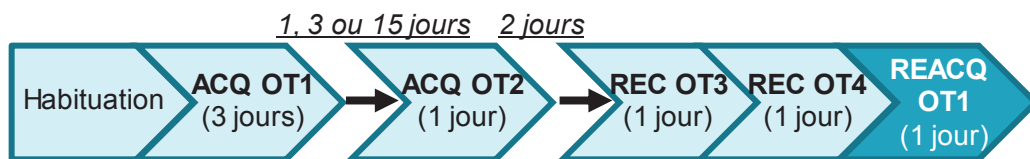


Figure 25 : Effet de la succession des acquisitions (OT1 et OT2) et des recombinaisons (OT3 et OT4) sur les performances de réacquisition de la première tâche bimodale olfacto-tactile (OT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la réacquisition effectuée en une session unique de vingt essais, après un délai fixe entre OT1 et OT2 (3 jours). Un ratio de 0,33 représente le hasard. n=7 rats.

Ces résultats montrent que la succession des deux acquisitions et des deux recombinaisons n'affecte pas le rappel de la combinaison OT renforcée dans la première tâche bimodale olfacto-tactile apprise. Cette donnée renseigne en partie sur la stratégie mise en place lors de la recombinaison. Utilisant des stimuli familiers issus des acquisitions OT1 et OT2, l'animal doit éteindre la persistance pour les stimuli précédemment renforcés (flexibilité comportementale). Or, les performances obtenues pour le premier choix lors de la session de réacquisition OT1 suggèrent que les animaux n'oublient pas les associations OT précédemment apprises. Ainsi, il est vraisemblable que ces associations soient plutôt mises en retrait de façon temporaire lors de la recombinaison.

En revanche, les données indiquent que la réacquisition OT1 est néanmoins perturbée, puisque les performances des animaux oscillent autour de 0,66 (c'est-à-dire 2 choix corrects parmi 3) tout au long de la session. L'analyse détaillée des données comportementales montre qu'à l'issue du premier essai, celui-ci étant non renforcé, certains animaux persistent à choisir la combinaison correcte, quand d'autres testent les autres combinaisons (notamment celle comprenant l'odeur renforcée). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat : la récence des recombinaisons OT3 et OT4, la faible réussite des animaux dans ces deux apprentissages complexes, la succession globale des différents apprentissages dans une courte période de temps...

B. Caractéristiques de l'apprentissage d'une tâche unimodale olfactive et d'une tâche unimodale tactile

1. Acquisition d'une tâche unimodale (OLF1 ou TACT1)

Parmi les 83 animaux ayant participé au protocole « apprentissage unimodal olfactif ou tactile », quatre animaux n'ont pas réussi la phase d'habituation. Ils ont donc été retirés de l'étude. Le groupe d'animaux ayant participé à l'acquisition d'une tâche unimodale olfactive (OLF1) et d'une tâche unimodale tactile (TACT1) est donc composé de 44 et 35 animaux, respectivement. Le hasard correspond à un ratio de choix corrects de 0,33.

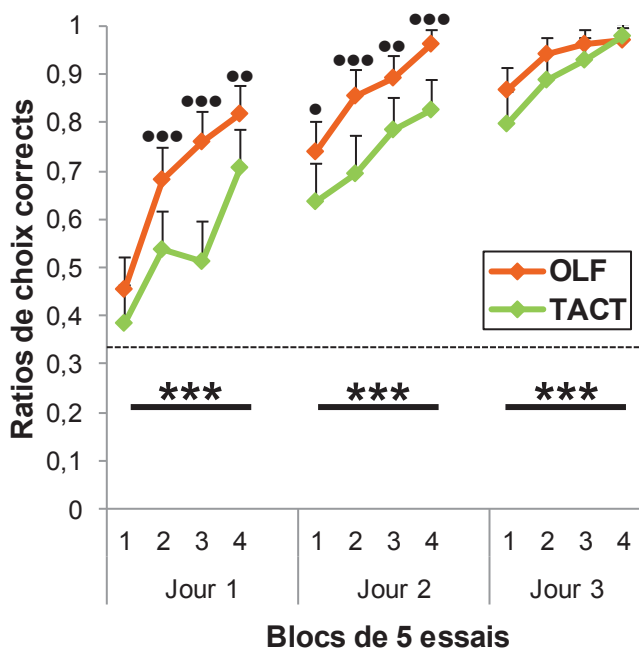


Figure 26 : Evolution rapide des performances lors de l'acquisition d'une tâche unimodale olfactive (OLF1) ou tactile (TACT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors des trois jours d'acquisition (Jour 1, Jour 2, Jour 3). Un ratio de 0,33 représente le hasard. $n=44$ rats pour OLF1 et $n=35$ rats pour TACT1. *** = $p < 0,001$ entre les blocs d'un jour donné pour OLF1 et TACT1. • = $p < 0,05$; •• = $p < 0,01$; ••• = $p < 0,001$ entre OLF1 et TACT1 dans un bloc donné.

Les courbes d'acquisition OLF1 et TACT1 sont représentées sur la **figure 26** pour l'ensemble des animaux au cours des trois jours d'acquisition. Comme l'indique la figure, le ratio de choix corrects moyen évolue entre les jours et entre les blocs d'un même jour d'acquisition avec des scores progressant de $0,45 \pm 0,07$ (au premier bloc de J1) à $0,97 \pm 0,02$ (au dernier bloc de J3) pour OLF1 et de $0,38 \pm 0,08$ (au premier bloc de J1) à $0,98 \pm 0,03$ (au dernier bloc de J3) pour TACT1. Pour OLF1, une analyse statistique à deux facteurs (Jour \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Jour ($F_{2,129} = 65,86$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,387} = 57,60$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{6,387} = 6,51$; $p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours de chaque session ($F_{3,172} = 25,62$; $p < 0,001$ à J1 / $F_{3,172} = 14,22$; $p < 0,001$ à J2 / $F_{3,172} = 6,48$; $p < 0,001$ à J3). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une progression du score entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 à J1 ($p < 0,001$), entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 à J2 ($p < 0,01$ à $p < 0,001$), et entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 à J3 ($p < 0,05$ à $p < 0,001$). Pour TACT1, une analyse statistique à deux facteurs (Jour \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Jour ($F_{2,102} = 140,27$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,306} = 47,84$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{6,306} = 3,21$; $p < 0,01$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours de chaque

session ($F_{3,136} = 21,60$; $p < 0,001$ à J1 / $F_{3,136} = 9,45$; $p < 0,001$ à J2 / $F_{3,136} = 14,62$; $p < 0,001$ à J3). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une progression du score des animaux entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 à J1 ($p < 0,05$ à $p < 0,001$), entre le bloc 1 et les blocs 3 et 4 à J2 ($p < 0,01$ et $p < 0,001$ respectivement), et entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 à J3 ($p < 0,05$ à $p < 0,001$). Par ailleurs, des test-t à mesures indépendantes montrent que les scores sont significativement différents entre OLF1 et TACT1 dans les blocs 2, 3 et 4 à J1 ($p < 0,01$ à $p < 0,001$) et dans les blocs 1, 2, 3 et 4 à J2 ($p < 0,05$ à $p < 0,001$).

Par ailleurs, la latence varie fortement entre les jours et entre les blocs d'un même jour d'acquisition pour OLF1 et pour TACT1, avec un profil similaire à celui observé lors de l'acquisition OT1 (données non représentées).

En résumé, les animaux progressent rapidement d'un jour à l'autre, mais aussi entre les blocs. Le critère de réussite est atteint après 27 ± 13 essais pour OLF1, c'est-à-dire au début du deuxième jour d'acquisition, et après 44 ± 10 essais pour TACT1, soit au début du troisième jour d'acquisition. Ces données montrent que même si l'acquisition des tâches unimodales olfactive et tactile est rapide, l'apprentissage de l'association entre une odeur et un renforcement positif s'établit plus rapidement qu'entre un stimulus tactile et un renforcement (test-t à mesures indépendantes, $p < 0,001$).

2. Effet d'un délai de dix jours sur le rappel d'une tâche unimodale (OLF1 ou TACT1)

Après une période de repos de dix jours, un test de réacquisition des tâches unimodales OLF1 ($n=26$) et TACT1 ($n=26$) précédemment apprises est effectué en une session unique de vingt essais. L'analyse des données montre que le premier choix correspond au pot renforcé pour 96% des animaux lors de la réacquisition OLF1 (25/26) et pour 88% des animaux lors de la réacquisition TACT1 (23/26 ; données non représentées). Ces résultats montrent qu'un délai de 10 jours n'affecte pas les performances de rappel d'une tâche unimodale, suggérant que ces apprentissages sont robustes.

3. Effet de l'apprentissage préalable des tâches unimodales sur l'acquisition d'une tâche bimodale (OT1)

Parmi les animaux ayant participé à l'apprentissage unimodal olfactif ou tactile, 22 animaux ont non seulement appris une tâche unimodale (OLF1 ou TACT1) en trois sessions, mais ont ensuite appris l'autre tâche unimodale (OLF1 ou TACT1), également en trois sessions, puis la tâche bimodale OT1 en une session unique de vingt-cinq essais. Les deux tâches unimodales ont été apprises selon un ordre aléatoire (OLF1 puis TACT1 : O/T, $n=9$ et TACT1 puis OLF1 : T/O, $n=13$).

La chronologie des phases expérimentales ainsi que la courbe d'acquisition OT1 sont représentées sur la **figure 27** pour l'ensemble des animaux. Comme l'indique la figure, le ratio de choix corrects moyen progresse fortement au cours de la session (de $0,41 \pm 0,10$ à $0,89 \pm 0,07$). Une analyse statistique sur le facteur Bloc confirme cette observation et montre une progression significative des scores au cours de la session ($F_{4,105} = 25,61$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre que les scores sont significativement différents entre le bloc 1 et les blocs 2, 3, 4 et 5 ($p < 0,001$). Toutefois, cette acquisition séquencée ne semble

pas plus rapide que l'acquisition « directe » (c'est-à-dire sans apprentissage unimodal préalable). Une analyse statistique à deux facteurs (Tâche × Bloc) à mesures répétées confirme cette observation et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,303} = 41,85$; $p < 0,001$) mais pas d'effet significatif du facteur Tâche ($F_{1,101} = 0,79$; p n.s.), et uniquement une tendance d'interaction significative entre les facteurs ($F_{3,303} = 2,22$; $p = 0,086$). D'autre part, la courbe de performances est similaire pour le groupe ayant appris les tâches unimodales O/T, et pour celui ayant appris les tâches unimodales T/O (données non représentées). Une analyse statistique à deux facteurs (Ordre × Bloc) à mesures répétées confirme cette observation et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{4,80} = 29,41$; $p < 0,001$), mais pas d'effet significatif du facteur Ordre ($F_{1,20} = 0,001$; p n.s.), ni d'interaction significative entre les facteurs ($F_{4,80} = 1,31$; p n.s.).

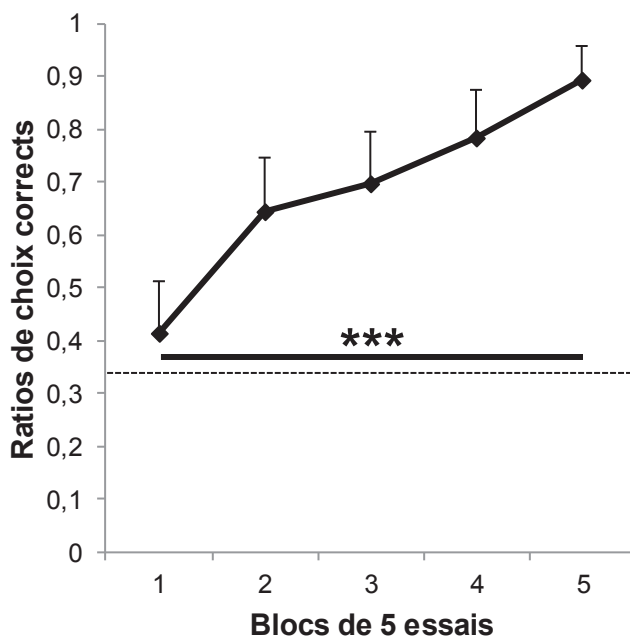


Figure 27 : Effet de l'apprentissage préalable des tâches unimodales olfactive et tactile sur les performances d'acquisition d'une tâche bimodale olfacto-tactile (OT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des cinq blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4, 5) lors de l'acquisition en une session unique de vingt-cinq essais effectuée après acquisition préalable d'une tâche olfactive et d'une tâche tactile selon un ordre aléatoire. Un ratio de 0,33 représente le hasard. $n=22$ rats. *** = $p < 0,001$ entre les blocs.

Parmi les trois pots, un seul est renforcé : le pot A, les deux autres pots (B et C) ne présentant qu'un seul des stimuli renforcés. Dans l'acquisition directe, l'analyse des erreurs montre que celles-ci consistent le plus souvent à choisir le pot C, contenant l'odeur associée au renforcement. Toutefois, les données obtenues dans l'acquisition séquentielle montrent que l'ordre d'acquisition des tâches unimodales olfactive et tactile impacte la répartition des erreurs. En effet, les animaux ayant appris les tâches O/T commettent 67% des erreurs avec le pot C, contre seulement 33 % avec le pot B, présentant la texture associée au renforcement (total de 64 erreurs, test-t à mesures appariées entre les pots B et C, $p < 0,05$). En revanche, les animaux ayant appris les tâches T/O commettent seulement 44% des erreurs avec le pot C, contre 56% avec le pot B (total de 96 erreurs, test-t à mesures appariées entre B et C, $p = 0,27$).

Ces résultats montrent que l'acquisition des tâches unimodales olfactive et tactile en amont de la tâche bimodale OT ne facilite pas son apprentissage. En revanche, l'ordre d'acquisition des tâches unimodales influence la stratégie d'apprentissage des animaux, puisque le biais olfactif observé lors de l'acquisition directe est uniquement observé chez les animaux ayant appris les tâches O/T, et non chez ceux ayant été confrontés aux tâches T/O.

C. Comparaison des performances observées entre les tâches unimodales et bimodale

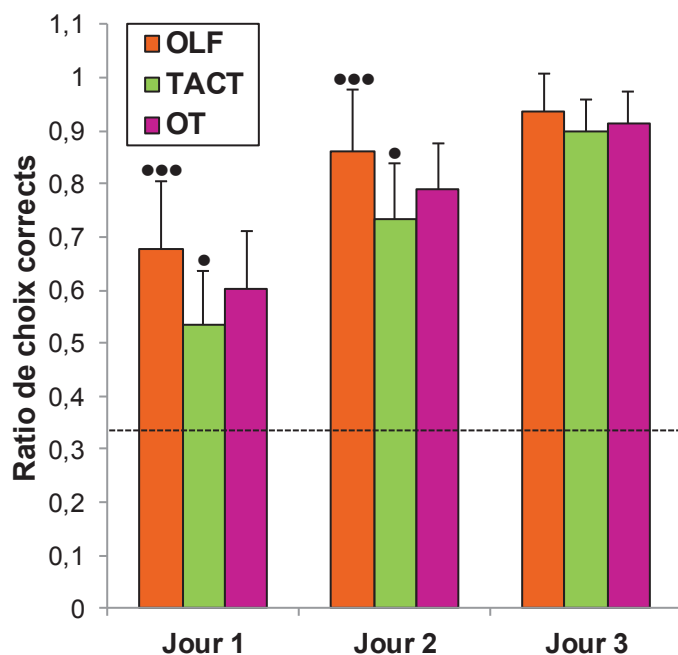


Figure 28 : Comparaison des performances entre l'acquisition des tâches unimodale olfactive (OLF1, en orange), unimodale tactile (TACT1, en vert) et bimodale olfacto-tactile (OT1 en violet). Moyenne du score ±S.E.M. de chaque session lors des trois jours d'acquisition (Jour 1, Jour 2, Jour 3). Un ratio de 0,33 représente le hasard. n=44 rats pour OLF1, n=35 rats pour TACT1 et n=90 rats pour OT1. • = p<0,05 ; •• = p<0,01 ; ••• = p<0,001 comparé à OT1 pour un jour donné.

La **figure 28** représente les scores moyens obtenus lors de l'acquisition des tâches OLF1, TACT1 et OT1 pour l'ensemble des groupes expérimentaux (OLF1 : n=44 ; TACT1 : n=35 ; OT1 : n=90) au cours des trois jours d'apprentissage (J1, J2, J3). L'analyse des histogrammes montre que le ratio de choix corrects moyenné pour l'ensemble des essais de la session évolue à chaque session et pour chaque tâche. Toutefois, les données montrent que cette progression varie en fonction du type de tâche avec un ratio moyen de 0,68 ± 0,13 à J1 à 0,94 ± 0,07 à J3 pour OLF1 ; de 0,53 ± 0,10 à J1 à 0,90 ± 0,06 à J3 pour TACT1 ; 0,60 ± 0,11 à J1 à 0,91 ± 0,06 à J3 pour OT1. Une analyse statistique à deux facteurs (Jour × Tâche) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Jour ($F_{2,330} = 662,48 ; p < 0,001$), un effet significatif du facteur Tâche ($F_{2,165} = 19,63 ; p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{4,330} = 6,20 ; p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Tâche montre une différence significative des scores entre les tâches à J1 ($F_{2,166} = 16,20 ; p < 0,001$), à J2 ($F_{2,166} = 16,58 ; p < 0,001$) et à J3 ($F_{2,166} = 3,31 ; p < 0,05$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre que les trois groupes présentent des scores statistiquement différents les uns des autres entre OT1 et OLF1 ($p < 0,001$), entre OT1 et TACT1 ($p < 0,05$) et entre OLF1 et TACT1 ($p < 0,001$) à J1 et à J2, ainsi qu'entre OLF1 et TACT1 ($p < 0,05$) à J3.

D'autre part, le nombre d'essais nécessaires pour atteindre le critère varie selon la tâche : après 27 ± 13 essais pour OLF1, après 44 ± 10 essais pour TACT1 et après 38 ± 9 essais pour OT1. Une analyse statistique sur le facteur Tâche confirme cette observation et montre une différence significative du nombre d'essais nécessaires pour atteindre le critère entre les trois tâches ($F_{2,166} = 29,34 ; p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative de cette variable entre OT1 et OLF1 ($p < 0,001$), entre OT1 et TACT1 ($p < 0,05$) et entre OLF1 et TACT1 ($p < 0,001$). En revanche, la latence ne diffère pas selon la tâche considérée (données non représentées).

En résumé, nos données montrent que l'acquisition des tâches utilisant des stimuli olfactifs est plus rapide que l'acquisition de la tâche unimodale tactile, et que l'acquisition unimodale olfactive est plus rapide que l'acquisition bimodale OT. Néanmoins, le critère de réussite est toujours atteint au plus tard au cours du troisième jour d'acquisition. L'ensemble de ces données montre que le paradigme développé est adapté pour l'étude du substrat neurobiologique sous-tendant les processus d'association entre un stimulus olfactif et/ou un stimulus tactile, et un renforcement alimentaire.

D. Contrôle des biais expérimentaux

Il est crucial de s'assurer que les performances obtenues par les animaux au cours des sessions d'apprentissage ne sont pas biaisées par l'utilisation d'autres stimuli que ceux proposés dans les procédures. Les différents biais peuvent être les suivants :

- *Préférence ou aversion spontanée pour les odeurs utilisées* : Afin de s'assurer que l'animal ne présente aucune préférence ou aversion pour certaines odeurs, la variable « nature de l'odeur du premier pot approché par l'animal » a fait l'objet d'une analyse statistique à un facteur dans l'apprentissage de chaque tâche OT et de chaque tâche olfactive. Aucun effet significatif de ce facteur n'a été montré, quelle que soit la tâche considérée (données non représentées). Ceci suggère que les odeurs choisies ne présentent pas de valence hédonique suffisamment différente pour influencer le choix des animaux.

- *Marquage olfactif des pots* : Le nombre de pots échantillonnés est également comptabilisé. Dans chacune des trois tâches, l'animal échantillonne en moyenne $2,2 \pm 0,2$ des trois pots présentés, c'est-à-dire qu'à chaque essai, l'animal échantillonne au moins deux pots différents avant de faire son choix. Ces données suggèrent que le choix des animaux est fondé sur l'exploration des stimuli proposés par l'expérimentateur. Afin de vérifier que ce choix n'est pas guidé par un marquage de la sciure contenue dans les pots par leur propre odeur, les performances des animaux conditionnés (Jour 3 uniquement) ont été comparées pour l'acquisition des trois tâches entre les essais où la sciure n'est pas changée d'un essai à l'autre ($n=1736$) et ceux où elle l'est ($n=916$). Une analyse statistique n'a montré aucun effet significatif entre les performances obtenues dans ces deux conditions (ratio de choix corrects moyen : $0,90 \pm 0,29$ et $0,91 \pm 0,27$ respectivement, test-t à mesures indépendantes, $p = 0,38$). Ceci suggère que le choix des animaux n'est pas guidé par le marquage olfactif de la sciure d'un essai à l'autre.

- *Détection de l'odeur de la céréale* : Dans le but de s'assurer que l'animal ne fonde pas son choix sur l'odeur de la céréale enfouie au fond du pot renforcé, les performances ont été comparées entre les essais où le renforcement est présent ($n=1736$), et ceux où le pot correct ne contient pas de renforcement accessible (probe test, $n=704$) chez des animaux conditionnés (Jour 3 uniquement). Ces données ont fait l'objet d'une analyse statistique qui n'a montré aucune différence significative entre les performances obtenues dans ces deux conditions (ratio de choix corrects moyen : $0,90 \pm 0,29$ et $0,94 \pm 0,23$ respectivement, test-t à mesures indépendantes, $p = 0,11$). Ceci est d'autant plus intéressant que lors des probe tests, une céréale inaccessible est néanmoins présente dans les deux autres pots. Ceci suggère que les animaux ne choisissent pas le pot renforcé en fonction de l'odeur du renforcement.

Enfin, d'une façon générale, à chaque fois que de nouveaux stimuli sont introduits, le comportement des animaux change radicalement : la latence augmente d'une quinzaine de secondes en moyenne jusqu'à parfois deux minutes, et ils explorent de nombreuses fois chaque pot avant de faire leur choix. Ceci suggère que les stimuli manipulés par l'expérimentateur sont fortement pris en compte par l'animal.

III. **DISCUSSION**

A. **Caractéristiques générales des apprentissages développés**

1. **Justification du modèle rongeur**

Le rongeur offre de multiples avantages : il est facilement manipulable au niveau comportemental et est peu coûteux. De plus, son conditionnement à des tâches utilisant des stimuli naturels tels que des odeurs et des textures (comme ceux présentés dans ce manuscrit) est rapide, ce qui permet de tester plusieurs hypothèses sur une courte période de temps, et ce, sur un même animal, en accord avec les conseils éthiques concernant la réduction du nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale. D'autre part, la neuroanatomie du rongeur est très bien connue, ce qui autorise l'utilisation d'approches invasives multiples et précises (mises à jour fréquentes de l'atlas de référence Paxinos & Watson), tandis que l'organisation et le fonctionnement de ses structures hippocampiques et parahippocampiques sont comparables à celles décrites chez l'Homme. Cet animal constitue donc un modèle d'étude idéal des processus cognitifs à la base des apprentissages complexes chez l'Homme.

2. **Apprentissage bimodal et unimodal**

a. **Acquisition de la tâche olfacto-tactile**

Observations comportementales

L'analyse des données obtenues montre que l'apprentissage de la tâche OT est rapide (**Figures 19 et 20**, pages 68 et 69). En effet, le score des animaux est supérieur au hasard dès le troisième essai et le critère de réussite (neuf essais corrects parmi dix consécutifs) est atteint après 38 ± 9 essais, soit à la fin du deuxième jour d'acquisition.

Toutefois, bien que les sessions d'apprentissage soient réalisées dans la même arène expérimentale que celle utilisée pour l'habituation, les premiers essais de la tâche OT sont souvent caractérisés par un comportement de néophobie pour les stimuli olfactifs, ce qui se traduit par un faible niveau d'activité. Cependant, cette néophobie s'éteint rapidement et l'exploration des stimuli olfactifs et tactiles proposés, suivie de la fouille d'un premier pot est observée après en moyenne un ou deux essais de relative immobilité (soit après deux à quatre minutes environ).

L'analyse des scores obtenus au cours de la première session d'acquisition indique que si les deux premiers choix sont effectués au hasard (ratio de 0,33) avec une latence élevée (une soixantaine de secondes en moyenne), le ratio de choix corrects augmente rapidement, de 0,45 à 0,70. Lors de la deuxième session, les performances s'améliorent et la majorité des animaux atteint en fin de session un ratio de choix corrects de 0,90. Enfin, la troisième et dernière session permet aux individus n'ayant pas totalement acquis la tâche d'accroître leurs scores pour finalement atteindre le critère de réussite, tandis que les autres animaux confirment l'apprentissage précédemment acquis. Par ailleurs, le temps de réponse chute et se stabilise rapidement autour de 15 secondes environ au cours de chaque session.

D'autre part, les données obtenues indiquent que l'apprentissage d'une première tâche (OT1) facilite l'acquisition d'une seconde (OT2) utilisant la même procédure (**Figure 23, page 72**). En effet, les scores obtenus lors de l'acquisition OT2 montrent que les animaux ont transféré le principe de la tâche appris lors de l'acquisition OT1 à un apprentissage utilisant de nouveaux stimuli, mais reposant sur le même principe. Cette transposition favorise l'acquisition puisque les animaux acquièrent cette nouvelle tâche en une seule session de vingt essais. Les résultats montrent toutefois que ce transfert des règles du jeu est sensible au délai séparant les deux sessions d'acquisition, avec un rapport inversement proportionnel. En effet, un court délai entre OT1 et OT2 (1 ou 3 jours) interfère avec une acquisition efficace de la nouvelle tâche, tandis qu'un délai long (15 jours) facilite au contraire la nouvelle acquisition.

Description de la stratégie développée

La résolution de la tâche bimodale OT nécessite que l'animal apprenne à construire une association « odeur-texture » spécifique parmi trois combinaisons comportant des éléments recouvrants : O1T1 + ; O2T1 – ; O1T2 – (+ indiquant la combinaison renforcée et – indiquant les deux combinaisons non renforcées). Or, l'animal peut développer deux stratégies différentes non exclusives pour résoudre ce type de tâche :

- Soit il associe les éléments O1 et T1 avec le renforcement ;
- Soit il procède par élimination respective des éléments O2 et T2.

L'analyse détaillée de nos données montre qu'au cours des trois jours d'acquisition, les animaux commettent davantage d'erreurs par choix du pot contenant l'odeur associée au renforcement (~80%) que par sélection de celui présentant la texture associée au renforcement (~20%). Cette proportion est observée pour chaque jour d'acquisition, et se manifeste même dès les tout premiers essais de la première session. Ces observations suggèrent que l'apprentissage de la tâche OT résulte de la succession de deux associations complémentaires. Les scores autour de 0,50 obtenus dès le début de l'apprentissage et la répartition des erreurs suggèrent que l'association « odeur-renforcement » est formée en premier : en effet, l'odeur renforcée étant présentée dans une proportion de deux pots sur trois, la formation de l'association « odeur-renforcement » rehausse à 0,50 le hasard d'obtenir le renforcement pour les animaux. Dans un second temps, la texture est combinée avec la paire « odeur-renforcement » précédemment formée, de manière à former l'association « (odeur-renforcement) – texture ».

L'observation du comportement d'échantillonnage semble confirmer cette stratégie en deux temps. En effet, lorsque l'animal est dans l'arène et se rapproche des pots, il échantillonne dans un premier temps de manière passive le stimulus olfactif faiblement concentré. Toutefois, il n'a accès aux textures que lorsqu'il est en contact direct avec le pot, tandis qu'il perçoit en continu le stimulus olfactif avec une concentration croissante. En revanche, lorsque l'animal échantillonne le stimulus olfactif en se plaçant au-dessus de la sciure du pot, il n'a plus accès au stimulus tactile. Ainsi, il doit conserver l'information tactile en mémoire à court-terme (durée variable au cours du conditionnement : de l'ordre de

quelques centaines de ms à une centaine de ms), jusqu'au moment où il prend la décision de creuser ou non le pot échantillonné (**Figure 29**).

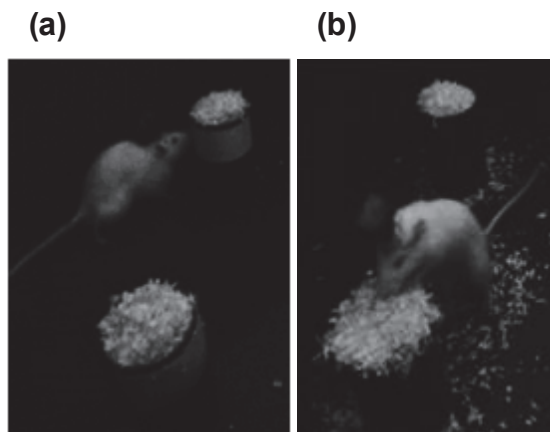


Figure 29 : Echantillonnage olfacto-tactile en deux temps. (a) Echantillonnage par whisking du stimulus tactile situé sur le contour extérieur du pot. (b) Echantillonnage par sniffing du stimulus olfactif qui diffuse à travers l'épaisse couche de sciure, suivi du choix de l'animal exprimé par le comportement de fouille ou d'évitement du pot visité. La faible résolution de l'image est liée aux conditions expérimentales (enregistrement en lumière rouge).

Les données de l'expérience d'acquisition OT séquentielle montrent que cette stratégie peut être influencée par l'acquisition préalable de tâches unimodales, en fonction de l'ordre d'acquisition de ces deux tâches. En effet, quand les animaux sont d'abord soumis à l'acquisition d'une tâche olfactive, puis d'une tâche tactile, l'acquisition de la tâche OT se caractérise par la même stratégie que celle observée en absence d'apprentissage unimodal préalable : l'observation des erreurs (une plus forte proportion par choix du pot contenant l'odeur correcte que par choix de celui présentant la texture correcte) montre que la formation de la paire « odeur-renforcement » précède son association avec le stimulus tactile au cours de la tâche bimodale OT.

En revanche, lorsque les animaux sont d'abord soumis à l'acquisition d'une tâche tactile, puis d'une tâche olfactive, l'acquisition de la tâche OT se définit par une répartition égale de la proportion d'erreurs entre les deux pots non renforcés. Ces données suggèrent que l'animal forme alors directement l'association bimodale sous la forme « (odeur-texture) – renforcement ». De plus, de manière intéressante, ces animaux ont tendance à échantillonner avec persistance le contour extérieur du pot lors de l'acquisition de la tâche olfactive, précisément là où les textures sont situées lors de l'acquisition de la tâche tactile, suggérant que les textures sont effectivement prises en compte par l'animal lorsqu'il doit faire un choix en utilisant ce type d'indice.

L'ensemble de ces données indique que l'acquisition initiale d'un type d'association (« odeur-renforcement » ou « texture-renforcement ») module la stratégie employée par l'animal pour résoudre une tâche bimodale OT, en influençant l'ordre de prise en compte des stimuli olfactifs et tactiles.

Apprentissage bimodal sans décomposition préalable

Il est intéressant de noter que contrairement à certaines données de la littérature, l'apprentissage préalable des tâches unimodales ne facilite pas l'acquisition de la tâche bimodale, puisque les performances sont similaires à celles obtenues sans apprentissage préalable (**Figure 27**, page 80). En effet, il a été montré que certains apprentissages bimodaux sont impossibles à acquérir directement et nécessitent une décomposition préalable des modalités composant la tâche bimodale. C'est notamment le cas de

l'apprentissage olfacto-visuel (*Jeffery, 2007*), pour lequel l'acquisition successive d'une tâche visuelle, puis d'une tâche olfactive, est indispensable pour la réussite de la formation des associations bimodales olfacto-visuelles. D'autre part, il a été montré que si les animaux sont capables d'associer directement un stimulus visuel à un stimulus tactile dans un paradigme visuo-tactile, une pré-exposition aux stimuli utilisés dans la tâche bimodale 24h avant celle-ci améliore les performances de rappel quand le délai de rétention de l'association augmente (*Reid et al., 2012*), suggérant ainsi une facilitation du maintien en mémoire de la représentation bimodale de l'objet. Contrairement à ces travaux, nos données montrent que l'acquisition préalable d'une tâche unimodale olfactive et d'une tâche unimodale tactile n'influence pas l'acquisition d'une tâche bimodale OT effectuée à la suite. Toutefois, des stimuli différents ont volontairement été utilisés entre nos acquisitions unimodales et bimodales, et l'enchaînement des différentes tâches semble entraîner une certaine lassitude de la part de l'animal.

Ainsi, contrairement au paradigme de Whishaw et Tomie (voir la [section 3 de l'introduction, page 52](#)), les procédures mises au point au cours de notre travail de thèse donnent lieu à un apprentissage bimodal olfacto-tactile rapidement acquis, ce qui se traduit par de fortes améliorations des performances au cours d'une seule session de vingt essais.

b. Acquisitions de la tâche olfactive ou tactile

L'apprentissage unimodal olfactif ou tactile est relativement simple : l'animal doit apprendre à associer un stimulus parmi les trois présentés, à un renforcement alimentaire.

Apprentissage olfactif

L'acquisition de la tâche olfactive est rapide. En effet, le critère de réussite est atteint après 27 ± 13 essais, soit dès la première moitié du deuxième jour d'acquisition. De plus, le ratio de choix corrects est supérieur au hasard dès le deuxième essai et les animaux atteignent un score de 0,68 pour l'ensemble de la première session d'acquisition. Ce score s'améliore au cours des deux sessions suivantes, avec des performances s'élevant à un score de 0,95 au troisième jour d'acquisition.

Apprentissage tactile

L'acquisition de la tâche tactile est relativement rapide. En effet, le critère de réussite est atteint après 44 ± 10 essais, soit dans la première moitié du troisième jour d'acquisition. Par ailleurs, le ratio de choix corrects est supérieur au hasard à partir du sixième essai, et le score atteint pour l'ensemble de la première session d'acquisition est de 0,53. Les performances s'améliorent toutefois rapidement au cours des deux sessions suivantes, pour atteindre un score de 0,90 au troisième jour d'acquisition.

Comparaison entre apprentissage olfactif et tactile

Comme les données obtenues lors de l'apprentissage de la tâche OT le suggèrent, le stimulus olfactif est plus facilement associé au renforcement que le stimulus tactile (**Figure 26, page 78**). En effet, le critère de réussite est atteint après 27 ± 13 essais dans la tâche olfactive, et après 44 ± 10 essais dans la tâche tactile.

Cette différence de rapidité pour acquérir ces deux tâches a été mise en évidence dans plusieurs études. En effet, l'acquisition d'une association « odeur-renforcement » peut s'effectuer rapidement, voire très rapidement : en quarante essais pour atteindre un critère de réussite fixé à dix essais consécutifs corrects (choix parmi deux odeurs : *Ragozzino et Rozman, 2007*), en trente essais pour atteindre un ratio de choix corrects de 0,75 (choix parmi deux odeurs : *Bouret et Sara, 2004*) et même en trois à cinq essais seulement (choix parmi trois odeurs : *Sara et al., 1999 ; Tronel et Sara, 2002*). L'ensemble de ces résultats a été obtenu à partir de protocoles similaires au nôtre (choix par fouille).

En revanche, l'apprentissage de l'association « texture-renforcement » est plus long à acquérir. En effet, il a été montré que l'apprentissage d'une tâche au cours de laquelle l'animal doit échantillonner avec ses vibrisses les textures recouvrant deux plateformes devant lesquelles il est placé, dans le but de sélectionner celle qui est renforcée, requiert plusieurs semaines pour atteindre le critère de réussite (ratio de choix corrects de 0,85), soit près de 500 essais à raison de vingt essais par jour (*Guic-Robles et al., 1989 ; Carvell et Simons, 1990*). Dans une autre étude, il a été montré que l'acquisition d'une tâche de discrimination de textures en condition « tête fixe » nécessite trois à six semaines de conditionnement pour obtenir un ratio de choix corrects de 0,80 à raison de 100 à 150 essais par jour (*Prigg et al., 2002*).

Cette différence entre l'apprentissage de ces deux tâches peut s'expliquer de plusieurs façons :

- D'un point de vue fonctionnel, la discrimination des stimuli nécessaires à la réussite de l'apprentissage de la tâche olfactive est effectuée par le phénomène de sniffing. Cet échantillonnage permet une discrimination efficace des odeurs après un unique flairage (environ 200 ms à une fréquence de 10 Hz). Ainsi, une représentation sensorielle olfactive complète peut être construite à partir d'un unique cycle thêta, suggérant que chaque flairage renseigne instantanément sur l'environnement de l'animal (*Uchida et Mainen, 2003*). De plus, une odeur est naturellement perçue à distance via la respiration : c'est donc une discrimination distale passive. En revanche, l'échantillonnage des stimuli tactiles repose sur le phénomène de whisking (*Guic-Robles et al., 1989*) : c'est une discrimination active, qui ne peut être effectuée que par contact direct avec la texture.
- D'un point de vue associatif, la formation du couple « odeur-renforcement » est plus naturelle et spontanée que celle du couple « texture-renforcement » car les animaux utilisent préférentiellement leur sens olfactif pour trouver de la nourriture (pour revue, *Doty, 1986*). De plus, la distance et le délai sont plus importants entre la texture (sur le contour extérieur du pot) et le renforcement (quelques centaines de ms), qu'entre l'odeur (diffusion en continu à partir du fond du pot) et le renforcement (pas de délai).

- D'un point de vue procédural, la présentation du stimulus tactile autour d'un pot pourrait être mal adaptée pour l'étude des processus sous-tendant l'apprentissage d'une association entre une texture et un renforcement. En effet, une étude a montré que l'acquisition de l'association « texture-renforcement » est plus rapide que celle de l'association « odeur-renforcement » (Iversen, 2008). Ces résultats ont été obtenus dans une tâche automatisée au cours de laquelle l'animal doit insérer son museau dans un port (« nose poke ») pour percevoir le stimulus olfactif ou tactile. Néanmoins, nécessitant un comportement peu naturel de la part de l'animal, l'apprentissage de ce type de tâche requiert également de très nombreux jours de conditionnement, soit davantage que dans la tâche présentée dans ce travail de thèse.

c. Acquisitions unimodales versus bimodale

Etonnamment, l'animal n'a pas plus de difficultés à apprendre la tâche OT que la tâche tactile seule. Au contraire, les données indiquent que l'apprentissage bimodal OT est plus facile à acquérir que l'apprentissage unimodal tactile, puisque le critère de réussite de la tâche OT est atteint avant celui de la tâche tactile. De plus, les scores obtenus au premier et au deuxième jour d'acquisition sont meilleurs dans la tâche OT que dans la tâche tactile (**Figure 28**, page 81). Toutefois, la comparaison stricte des performances entre les apprentissages unimodaux et bimodal est délicate car les stimuli renforcés ne sont pas présentés avec la même fréquence : une texture renforcée parmi trois pour l'apprentissage unimodal tactile soit un ratio de 0,33 contre une texture renforcée (mais présentée en deux exemplaires) parmi trois pour l'apprentissage bimodal, soit un ratio de 0,66.

d. Recombinaison d'une tâche olfacto-tactile

Observations comportementales

L'analyse comportementale montre que les premiers essais de la recombinaison sont caractérisés par une augmentation du nombre d'essais non fouillés, au cours desquels les animaux échantillonnent longuement et à plusieurs reprises chacun des pots présentés, mais sans pour autant choisir d'en creuser un. Cette observation suggère que les animaux sont capables de détecter la nouveauté des combinaisons composées de stimuli familiers par rapport à celles mises en mémoire au cours des apprentissages précédents.

En début de session, les animaux commettent une majorité d'erreurs par choix du pot contenant l'odeur préalablement renforcée (**Figure 24.b**, page 73), ce qui se traduit par l'obtention d'un faible ratio de choix corrects dans le premier bloc de cinq essais (**Figure 24.a**, page 73). Cette persistance suggère que dans un environnement composé de stimuli olfactifs et tactiles familiers réassociés sous forme de combinaisons OT inédites, les animaux font preuve d'une remarquable plasticité comportementale et sont capables d'abandonner rapidement cette stratégie pour construire de nouvelles associations bimodales. En revanche, un très faible nombre d'essais est observé au cours desquels les animaux sélectionnent par erreur le pot présentant la texture préalablement renforcée. Par ailleurs, la latence montre que les animaux alternent entre les essais au cours desquels ils se précipitent et creusent le premier pot échantillonné, et ceux au cours desquels ils

échantillonnent à plusieurs reprises les trois pots présentés. Pour autant, que ce soit par précipitation ou par hésitation, le ratio d'erreurs « odeur » est élevé.

Après cinq à dix essais en moyenne, les animaux adaptent leur stratégie et le nombre d'erreurs commises par choix du pot contenant l'odeur précédemment renforcée diminue progressivement. Dans le même temps, le nombre de choix de la nouvelle combinaison renforcée augmente, suggérant que les animaux apprennent progressivement la nouvelle tâche. Enfin, cette persistance olfactive confirme l'hypothèse formulée quant à la stratégie employée par les animaux lors de l'acquisition OT initiale, à savoir un apprentissage en deux temps avec la formation de l'association « odeur-renforcement », puis la construction de l'association « (odeur-renforcement) – texture ».

La recombinaison utilise les stimuli présentés lors des acquisitions OT1 et OT2. Or, différents délais ont été observés entre ces deux acquisitions (1, 3 ou 15 jours), et les performances obtenues en recombinaison sont sensibles à ce délai, avec un rapport inversement proportionnel. En effet, un court délai entre OT1 et OT2 (1 ou 3 jours) interfère avec une recombinaison efficace, tandis qu'un long délai (15 jours) facilite au contraire cet apprentissage complexe.

Ainsi, le respect d'un délai d'une quinzaine de jours entre le tout premier apprentissage et les suivants favorise les performances lorsque l'animal doit éteindre la persistance pour les stimuli précédemment renforcés, et plus généralement, quel que soit le type d'apprentissage que l'animal doit effectuer (acquisition ou recombinaison). Une meilleure consolidation et/ou un oubli des associations formées lors de l'acquisition favoriserait alors la recombinaison.

D'autre part, deux jeux de combinaisons ont été construits à partir des stimuli présentés dans OT1 et OT2 (**Tableau 2**, [page 65](#)). Or, les performances des animaux (ratios de choix corrects et ratios d'erreurs par choix de l'odeur précédemment renforcée) ne sont significativement pas différentes selon qu'ils recombinent avec l'un ou l'autre jeu de combinaisons. Ceci suggère que les effets de primauté (OT1) et de récence (OT2) sont vraisemblablement contrebalancés par la durée respective des deux acquisitions (3 jours pour OT1 et 1 jour pour OT2). Toutefois, cette analyse n'a pu être effectuée que sur le groupe d'animaux ayant observé un délai de 15 jours entre OT1 et OT2, le nombre d'individus étant trop faible quand le délai est de 1 ou 3 jours.

Description de la stratégie développée

La flexibilité comportementale est un changement adaptatif en réponse aux modifications des contingences expérimentales. Ce processus cognitif reflète notamment la capacité d'acquisition d'un apprentissage inversé ou reversal, tâche qui implique par définition un changement de la stratégie précédemment apprise (*Bohn et al., 2003 ; Chudasama et Robbins, 2003 ; McAlonan et Brown, 2003 ; Schoenbaum et al., 2003*). Or, notre recombinaison comprend deux processus cognitifs distincts : tout d'abord un reversal, puisque l'animal doit éteindre la persistance pour les stimuli familiers précédemment renforcés en acquisition, puis la formation d'une nouvelle association entre les stimuli OT familiers précédemment ni renforcés, ni associés, et le renforcement. Le fait que les animaux

apprennent OT3 (recombinaison) plus lentement qu'OT2 (acquisition) confirme que cet apprentissage repose sur des processus cognitifs complexes.

Plusieurs stratégies sont envisageables pour réussir la recombinaison :

- Utilisant des stimuli familiers issus des précédentes acquisitions, l'une des possibilités serait que l'animal déconstruise les associations précédemment renforcées, pour ensuite en former des nouvelles, indépendamment de la précédente valence hédonique des stimuli utilisés. Cependant, nos données de rappel OT1 effectué à l'issue des deux acquisitions et des deux recombinaisons montrent que 86% des animaux choisissent la combinaison OT correcte, suggérant que cette hypothèse est peu probable ;
- Une autre possibilité est que la recombinaison repose sur la mise en retrait des associations précédemment apprises, sans pour autant les oublier, dans le but d'être capables d'apprendre plusieurs combinaisons utilisant des éléments recouvrants : pour revenir à l'exemple de la pomme introduit dans la section 3 de l'introduction (page 42), la couleur verte caractérise ce fruit mais également le sapin par exemple. Pour autant, l'apprentissage de l'une de ses représentations n'induit pas l'oubli de l'autre.

Trois profils différents ont été observés selon les performances obtenues en acquisition et en recombinaison :

- 1) Certains rats performants lors de l'acquisition persistent longtemps lors de la recombinaison à sélectionner le pot contenant l'odeur précédemment renforcée, faisant donc état de peu de flexibilité comportementale ;
- 2) En revanche, certains animaux performants lors de l'acquisition maîtrisent rapidement la recombinaison, avec une faible persistance pour l'odeur précédemment renforcée, faisant donc rapidement preuve de flexibilité comportementale ;
- 3) Enfin, quelques animaux peu performants lors de l'acquisition sont rapidement parvenus à maîtriser la recombinaison, puisque n'ayant pas suffisamment appris les associations précédentes, ils ne persistent pas à sélectionner l'odeur précédemment renforcée, et parviennent à apprendre la recombinaison comme si c'était une acquisition « classique ».

Les deux premiers profils ont été observés en proportion équivalente et auprès de la majorité des animaux, tandis que le dernier profil cité n'a été observé que sur quelques cas isolés, car comme précédemment évoqué, l'association « (odeur-renforcement) – texture » est rapidement formée en acquisition.

B. Limitations de notre test comportemental et développements possibles

1. Déséquilibre du nombre de présentation de chaque stimulus

Le paradigme développé requiert que l'animal compare trois combinaisons composées de stimuli olfactifs et tactiles recouvrants : O1T1 + ; O2T1 – ; O1T2 – (+ indiquant la combinaison renforcée, – indiquant les deux combinaisons non renforcées). Ainsi, dans une telle configuration, chaque stimulus n'est pas présenté de manière équivalente : la fréquence de présentation des stimuli O1 et T1 composant la combinaison renforcée est de 0,66 chacun, tandis que celle des stimuli non renforcés O2 et T2 n'est que de 0,33. En conséquence, les prochaines procédures devront être adaptées : l'utilisation de quatre combinaisons parmi lesquelles deux seront renforcées permettra de proposer des associations OT composées de stimuli présentés chacun avec la même fréquence (O1T1 + ; O2T1 – ; O1T2 – ; O2T2 +).

2. Test non automatisé

Le paradigme développé nécessite des interventions fréquentes de l'expérimentateur. En effet, durant l'intervalle inter-essai, l'animal doit être replacé dans le compartiment de départ, les pots doivent être déplacés et régulièrement nettoyés à l'alcool 70°, et la sciure doit être fréquemment changée. Ainsi, l'intervention répétée de l'expérimentateur constitue un biais involontaire de l'expérience, contrairement aux paradigmes automatisés dans lesquels celui-ci ne se manifeste qu'en début et en fin de session.

3. Manque de contrôle de certains paramètres

La tâche utilisée manque de contrôle sur certains paramètres. En effet, la concentration de l'odeur est très délicate à estimer, puisqu'une sphère de diffusion existe dans un périmètre indéterminé autour de chaque pot. De plus, la durée de l'échantillonnage des stimuli n'est pas régulée, contrairement aux tâches dans lesquelles la tête de l'animal est fixée ou à celles dans lesquelles l'animal doit insérer son museau dans un port à odeur (nose poke), ce qui permet d'évaluer de façon précise la durée de l'échantillonnage. Ainsi, il serait envisageable d'adapter notre protocole à un paradigme de nose poke, dans lequel le stimulus olfactif serait donc finement contrôlé en termes de concentration et de temps de présentation par un olfactomètre, tandis que le stimulus tactile pourrait être représenté par une collerette évasée entourant le port à odeur.

C. Avantages de notre test comportemental

1. Réponse comportementale naturelle

Nos travaux reposent sur l'apprentissage de tâches se rapprochant des conditions écologiques de l'espèce utilisée afin qu'elles soient rapidement maîtrisées. L'apprentissage de la tâche OT présentée ici exploite deux habiletés naturelles et spontanées du rat, à savoir utiliser les stimuli olfactifs et tactiles de son environnement pour détecter et identifier une source de nourriture, et fouiller son environnement pour obtenir sa nourriture. Ainsi, de nombreuses tâches reposant sur le comportement de fouille ont été développées (*Bunsey et Eichenbaum, 1993 ; 1996 ; Dusek et Eichenbaum, 1997 ; 1998*).

2. Apprentissage rapide, reproductible et robuste

En dépit de progressions variables en fonction de la tâche considérée, nos données confirment le caractère écologique des tâches développées, puisque le critère de réussite est atteint en trois sessions de vingt essais pour chacun des trois apprentissages proposés. Ces apprentissages sont également reproductibles, puisqu'à l'exception d'un animal qui n'a pas réussi à apprendre la tâche OT, tous les rongeurs auxquels une tâche unimodale et/ou bimodale a été proposée y sont parvenus. De plus, nos données montrent que les apprentissages proposés sont robustes puisque les performances de rappel ne sont pas affectées par une interruption de 10 jours suite à l'acquisition.

3. Fiabilité de l'apprentissage : contrôle des biais expérimentaux

Quatre types de biais expérimentaux potentiels ont été identifiés : visuels, olfactifs, spatiaux et séquentiels.

Pour éviter que l'animal ne se fie à des indices tels que la couleur des pots et/ou des textures, ils sont visuellement identiques, et l'étude est effectuée avec des rats albinos, et en lumière rouge, pour restreindre leurs faibles capacités de discrimination visuelle. Concernant les biais olfactifs, deux stimuli sont rigoureusement contrôlés : l'odeur que l'animal dépose quand il échantillonne et creuse les pots par un changement de sciure tous les trois essais, et l'odeur du renforcement alimentaire par l'utilisation aléatoire et fréquente de probe tests. D'autre part, il a été montré que les rongeurs sont capables de détecter le dernier objet touché par l'expérimentateur (*Mumby et al., 1995*). Ainsi, afin d'éviter que l'animal ne se fie à cette odeur, les trois pots et leur contenu en sciure sont manipulés pendant chaque intervalle inter-essai, toujours de la gauche vers la droite. D'autre part, pour écarter la possibilité que l'animal effectue un apprentissage spatial, les trois pots sont déplacés d'un essai à l'autre selon une séquence pseudo-aléatoire. Ainsi, chaque pot occupe chacun des trois emplacements prédéfinis selon une fréquence équivalente au cours d'une session. Enfin, pour éviter que l'animal n'apprenne cette séquence (notamment la position du pot renforcé dans les premiers et les derniers essais), elle diffère entre chaque session.

L'ensemble de ces mesures rassure donc quant aux possibles biais visuels, olfactifs, spatiaux et séquentiels que l'animal pourrait utiliser pour résoudre les apprentissages proposés et le maintien de performances élevées en dépit de ces différentes mesures suggère que les animaux utilisent effectivement les stimuli olfactifs et/ou tactiles explicitement présentés par l'expérimentateur.

Conclusion

L'obtention d'un critère de réussite strict à l'issue de trois sessions de vingt essais est une situation idéale pour l'étude du substrat neurobiologique impliqué dans l'apprentissage d'associations bimodales. En effet, les scores de 0,90 obtenus dès la fin de la troisième session d'acquisition représentent une référence claire qui permet de mettre en évidence des déficits suite à la perturbation de l'activité des structures d'intérêt.

CHAPITRE 2

ETUDE PHARMACOLOGIQUE

***Cortex entorhinal et hippocampe dorsal :
Mécanismes de l'apprentissage
olfacto-tactile***

I. MATERIEL & METHODES

A. Animaux & Animalerie

176 rats mâles adultes de la souche Wistar (Charles Rivers) âgés de 7 à 8 semaines et pesant entre 230g et 270g à leur arrivée au laboratoire, sont utilisés. Cet effectif est divisé en deux groupes : 83 animaux font l'objet de l'étude sur l'apprentissage bimodal olfacto-tactile, et 93 animaux sur l'apprentissage unimodal olfactif ou tactile. Les conditions d'hébergement et d'alimentation, ainsi que l'heure des tests expérimentaux sont décrits dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 60).

L'ensemble de la procédure a été soumis et approuvé par le Comité d'Ethique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 et par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (C2EA-55, numéro d'autorisation : DR2014-30).

B. Principe de l'apprentissage

Le principe de l'apprentissage est décrit dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 60).

C. Dispositif expérimental

L'arène expérimentale est décrite dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 60). Deux nouvelles odeurs sont utilisées en complément de celles déjà présentées : eugénol (Fluka) et carvone (-) (Aldrich). Leur senteur respective est le clou de girofle et la menthe verte. Deux nouvelles textures sont utilisées en complément de celles déjà présentées : papier lisse et grille de métal au maillage large.

D. Protocole

1. Habituation

La procédure d'habituation est décrite dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 63).

2. Principe général de la tâche associative

Le principe général de la tâche associative est décrit dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 63). Il est considéré que le rat a acquis la tâche lorsqu'il atteint le critère de réussite, à savoir quatre essais corrects parmi cinq consécutifs (ratio de 0,80).

a. Tâche bimodale olfacto-tactile (OT)

Suite à une première acquisition (OT1) en trois jours, chaque animal résout successivement plusieurs tâches OT. Le lendemain de la fin de l'acquisition OT1, les animaux sont implantés bilatéralement avec des canules-guide selon la procédure chirurgicale décrite ci-après. Après un délai de récupération post-opératoire de 10 jours, deux séances de réacquisition de la tâche OT1 sont effectuées, en une session unique de vingt essais chacune, et séparées par un intervalle de 24h, pour s'assurer que la procédure d'implantation chirurgicale et le repos post-opératoire n'altèrent pas les performances de rappel ou de transfert du principe de la tâche. Afin de spécifiquement tester le rappel, le premier essai de chaque session est effectué sans renforcement alimentaire. Deux jours

après la seconde réacquisition OT1, les animaux sont soumis à un nouvel apprentissage (OT2) en une session unique de vingt essais, avec des combinaisons de nouveaux stimuli. Deux jours après l'acquisition OT2, les animaux sont soumis à un apprentissage de recombinaison (OT3) au cours duquel les stimuli précédemment utilisés dans les acquisitions OT1 et OT2 sont réassociés pour former de nouvelles combinaisons. Cet apprentissage est effectué en une session unique de vingt essais et utilise deux jeux de combinaisons différents, le choix du jeu étant contrebalancé entre les animaux (**Tableau 4**).

b. Tâches unimodales olfactive (OLF) et tactile (TACT)

Dans la première étude unimodale, les animaux assignés au groupe « olfactif » réalisent l'ensemble des tâches olfactives décrites ci-après, tandis que les animaux assignés au groupe « tactile » réalisent l'ensemble des tâches tactiles décrites ci-après.

Suite à une première acquisition en trois jours (OLF1 ou TACT1), un premier groupe d'animaux est implanté bilatéralement avec des canules-guide selon la procédure chirurgicale décrite ci-après. Après un repos post-opératoire de dix jours, ce groupe est soumis à deux séances de réacquisition de la tâche OLF1 ou TACT1 en une session unique de vingt essais chacune, et séparées par un intervalle de 24h. Afin de spécifiquement tester les performances de rappel, le premier essai de chaque session est effectué sans renforcement alimentaire. Deux jours plus tard, les animaux sont soumis à l'acquisition d'une nouvelle tâche olfactive (OLF2) ou tactile (TACT2) en une session unique de vingt essais. Ces deux acquisitions olfactives (OLF1 et OLF2) et tactiles (TACT1 et TACT2) utilisent respectivement un jeu de stimuli différent, le choix du jeu étant contre-balancé entre les apprentissages (**Tableaux 5.a et 5.b**).

Avant tout apprentissage, le second groupe d'animaux est implanté bilatéralement avec des canules-guide selon la procédure chirurgicale décrite ci-après. Après un repos post-opératoire de dix jours, ce groupe est soumis à une première acquisition en trois jours (OLF1 ou TACT1). Le lendemain, les animaux effectuent un reversal de cet apprentissage en une session unique de vingt essais (rOLF1 ou rTACT1). Cet apprentissage utilise les mêmes stimuli que lors de l'acquisition, mais le stimulus précédemment renforcé ne l'est plus, tandis qu'un des deux stimuli précédemment non renforcé le devient. Le lendemain de ce premier reversal, les animaux sont soumis à l'acquisition en trois jours de l'autre tâche unimodale (OLF1 ou TACT1), et réalisent dès le lendemain de la fin de l'acquisition de cette tâche, un reversal de cet apprentissage, également en une session unique de vingt essais (rOLF1 ou rTACT1). Chaque animal apprend la tâche olfactive (OLF1) et la tâche tactile (TACT1) dans un ordre aléatoire et reverse ces deux apprentissages (rOLF1 et rTACT1). Ceci permet de s'assurer que l'ordre des apprentissages n'influence pas les résultats. Le stimulus renforcé est contre-balancé entre les animaux (**Tableaux 5.a et 5.b**).

3. Stimuli olfactifs et tactiles utilisés pour les tâches bimodales sous forme de combinaisons

		Tâches bimodales olfacto-tactiles	
		Stimulus olfactif	Stimulus tactile
OT1	Pot A	O1 : Anéthol	T1 : Papier de verre fin
	<i>Pot B</i>	O2 : Limonène (-)	T1 : Papier de verre fin
	<i>Pot C</i>	O1 : Anéthol	T2 : Grille souple
OT2	Pot A	O3 : Géraniol	T3 : Grille rigide
	<i>Pot B</i>	O4 : Peppermint	T3 : Grille rigide
	<i>Pot C</i>	O3 : Géraniol	T4 : Papier de verre rugueux
OT3	Pot A	O4 : Peppermint	T4 : Papier de verre rugueux
	<i>Pot B</i>	<i>O1 : Anéthol</i>	T4 : Papier de verre rugueux
	<i>Pot C</i>	O4 : Peppermint	<i>T1 : Papier de verre fin</i>
OT3	Pot A	O2 : Limonène (-)	T2 : Grille souple
	<i>Pot B</i>	<i>O3 : Géraniol</i>	T2 : Grille souple
	<i>Pot C</i>	O2 : Limonène (-)	<i>T3 : Grille rigide</i>

Tableau 4 : Présentation des jeux de combinaisons OT utilisés dans les apprentissages bimodaux (acquisitions OT1 et OT2 ; recombinaison OT3). Pour tout apprentissage, c'est la combinaison du pot A (en gras) qui est renforcée. La recombinaison est proposée aléatoirement avec l'un des deux jeux de combinaisons présentés et les éléments en italique indiquent les odeurs et les textures renforcées dans les précédentes acquisitions OT1 ou OT2.

4. Stimuli olfactifs et tactiles utilisés pour les tâches unimodales

		Tâches unimodales olfactives
OLF1 rOLF1	<i>Pot A</i>	O1 : Géraniol
	<i>Pot B</i>	O2 : Limonène (-)
	<i>Pot C</i>	O3 : Anéthol
OLF2	<i>Pot A</i>	O4 : Peppermint
	<i>Pot B</i>	O5 : Carvone (-)
	<i>Pot C</i>	O6 : Eugénol

Tableau 5.a : Présentation des jeux de stimuli olfactifs utilisés dans les apprentissages unimodaux olfactifs (acquisitions OLF1 et OLF2 ; reversal rOLF1). Le pot renforcé varie aléatoirement et équitablement entre l'ensemble des animaux.

Tâches unimodales tactiles		
TACT1	Pot A	T1 : Papier de verre fin
	Pot B	T2 : Papier de verre rugueux
rTACT1	Pot C	T3 : Grille souple
TACT2	Pot A	T4 : Grille rigide
	Pot B	T5 : Papier lisse
	Pot C	T6 : Grille au maillage lâche

Tableau 5.b : Présentation des jeux de stimuli tactiles utilisés dans les apprentissages unimodaux tactiles (acquisitions TACT1 et TACT2 ; reversal rTACT1). Le pot renforcé varie aléatoirement et équitablement entre l'ensemble des animaux.

5. Contrôle des biais expérimentaux

Les mesures utilisées pour éviter les biais expérimentaux sont décrites dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 66).

E. Chirurgie

117 et 59 animaux ont respectivement été implantés dans le cortex entorhinal latéral (CEL) et dans la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1). Ces coordonnées ont été déterminées selon un atlas (*Paxinos et Watson, 2005*), et à partir de la littérature et d'expériences préliminaires.

L'ensemble des procédures d'anesthésie, d'asepsie et d'analgésie suivies au cours de la chirurgie est conforme aux nouvelles directives européennes en matière d'éthique et de médecine vétérinaire (*Ferry et al., 2014*). Le lendemain de la fin de l'acquisition de la première tâche (bimodale ou unimodale), chaque animal est anesthésié avec une injection intrapéritonéale d'une solution composée d'un mélange « $\frac{3}{4}$ Kétamine, $\frac{1}{4}$ Rompun » injecté à une dose de 2 ml/kg (Centravet, Coopérative vétérinaire, Lalpasse). Lorsque le rat est profondément anesthésié, il est placé dans l'appareil stéréotaxique (Stoelting®) sur un tapis chauffant avec une sonde thermique rectale permettant de maintenir sa température corporelle à 37°C, et sa tête est maintenue à l'aide de barres d'oreille et d'une barre de dents. Après asepsie de la zone opératoire par application d'un antiseptique (Hexamidine®), puis incision sagittale de la peau du crâne, les repères stéréotaxiques sont dégagés en retirant délicatement les tissus conjonctifs. L'horizontalité de la position du crâne est ensuite vérifiée à partir des lignes de sutures des plaques osseuses indiquant les repères Bregma (au niveau antérieur) et Lambda (au niveau postérieur). Deux vis d'ancrage sont insérées dans le crâne, de chaque côté de la ligne de suture médiane, puis une fine couche de résine adhésive (Super Bond C&B®) est déposée sur le crâne de l'animal, pour créer une surface rugueuse permettant la fixation ultérieure de l'implant. Deux canules-guide ($\varnothing=0,57$ mm, 12 mm de long dans le CEL et 7 mm de long dans le dCA1, Cooper's needle works, USA) sont ensuite insérées bilatéralement à l'aide d'un micromanipulateur dans les structures cibles aux coordonnées indiquées dans le **tableau 6**. L'ensemble du dispositif est fixé à l'aide de ciment dentaire (Unifast® et solvant) pour former un bloc compact soudé au crâne. Un mandrin (12 ou 7 mm de long respectivement dans le CEL et dans le dCA1) est

ensuite placé à l'intérieur de chaque canule pour éviter qu'elles ne se bouchent. L'animal est ensuite retiré de l'appareil stéréotaxique et placé seul dans une cage de réveil dans une pièce chauffée pour le préserver des risques d'hypothermie. Quelques heures après leur réveil, les animaux sont remis par deux dans la pièce d'hébergement de l'animalerie avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Les animaux sont surveillés quotidiennement, leur poids est consigné et ils sont manipulés délicatement afin de vérifier leur état de santé ainsi que l'évolution de la cicatrisation. L'expérimentateur vérifie que les mandrins sont mobiles et les remplace au besoin.

Structure	CEL	dCA1
Antéro-Postérieur (AP)	-7,5 mm	-3,6 mm
Médio-Latéral (ML)	+/-5,5 mm	+/-2,5 mm
Dorso-Ventral (DV)	-6,5 mm	-2,2 mm

Tableau 6 : Coordonnées stéréotaxiques auxquelles sont insérées les canules-guide. Les coordonnées antéro-postérieures et médio-latérales sont indiquées par rapport au Bregma. Les coordonnées dorso-ventrales sont indiquées par rapport à l'os du crâne, de sorte que la canule-guide soit placée 1 mm au-dessus de la structure cible. CEL = cortex entorhinal latéral ; dCA1 = région CA1 de l'hippocampe dorsal.

F. Microinjections sur animal vigile

Avant le début de l'expérience, chaque animal est délicatement manipulé : les deux mandrins sont retirés et deux aiguilles d'injection ($\varnothing=0,25$ mm, R&S) reliées par un cathéter en polyéthylène à deux seringues (Hamilton) de 10 μ L sont insérées dans les deux canules-guide. La longueur de l'aiguille d'injection est de 13 mm pour le groupe implanté dans le cortex entorhinal latéral (groupe CEL), et de 8 mm pour le groupe implanté dans la région CA1 de l'hippocampe dorsal (groupe dCA1), soit 1 mm au-delà de la canule-guide. L'injection est délivrée par une pompe (Havard PHD 2000) pendant une période d'une minute. Les aiguilles sont maintenues en place pendant une minute après la fin de l'injection afin de favoriser la diffusion de la drogue dans la structure injectée. Chaque rat est aléatoirement attribué au groupe témoin ou à l'un des groupes expérimentaux. Les animaux du groupe CEL reçoivent une injection bilatérale d'un volume de 0,6 μ L et les animaux du groupe dCA1 reçoivent une injection bilatérale de 0,4 μ L. Les groupes témoins reçoivent une injection de liquide céphalorachidien artificiel (LCR, Harvard Apparatus) et les groupes expérimentaux reçoivent une injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine (Sigma). La **figure 30** représente les sites d'injection visés dans le CEL et dans le dCA1.

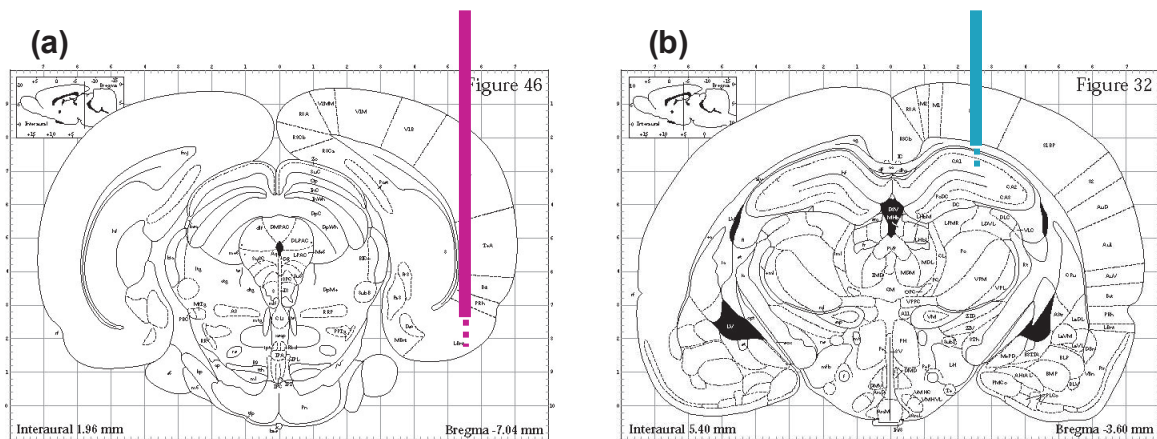


Figure 30 : Schéma représentant la localisation de la canule-guide et de la canule d'injection dans le CEL (a : AP = -7,5 mm ; ML = +/-5,5 mm ; DV = -6,5 mm) et dans la région CA1 de l'hippocampe dorsal (b : AP = -3,6 mm ; ML = +/-2,5 mm ; DV = -2,2 mm) (Paxinos et Watson, 2005). Canule-guide représentée en trait plein ; Canule d'injection représentée en pointillés (+1 mm par rapport à l'extrémité de la canule-guide).

La lidocaïne est une molécule liposoluble qui se fixe sur les canaux sodiques intracellulaires afin de bloquer la propagation des potentiels d'action. Le volume et la concentration de la drogue ont été déterminés à partir d'études précédentes (Packard et McGaugh, 1996 ; Bohbot et al., 2007 ; Chang et al., 2008). Le dAPV est un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type NMDA dont l'action consiste à bloquer l'induction de la LTP. Le volume et la concentration de la drogue ont été déterminés à partir d'études précédentes (Morris et al., 1986 ; Schenberg et al., 2005). La scopolamine est un antagoniste des récepteurs cholinergiques de type muscarinique. Le volume et la concentration de la drogue ont été déterminés à partir d'études précédentes (Khakpai et al., 2012 ; Piri et al., 2013). Les solutions sont préparées chaque jour et les caractéristiques des drogues injectées sont résumées dans le **tableau 7**.

Nom de la drogue	Lidocaïne monohydrate hydrochloride	d-Acide 2-amino-5-phosphonoalérique	Scopolamine hydrobromide
Concentration	40 µg/µL	5 µg/µL	7,5 µg/µL
CEL	24 µg	3 µg	4,5 µg
	Dissout dans 0,6 µL de LCR		
dCA1	16 µg	2 µg	3 µg
	Dissout dans 0,4 µL de LCR		
Formule	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O	C ₅ H ₁₂ NO ₅ P	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄
Poids moléculaire	288,81 g/mol	197,13 g/mol	438,31 g/mol
Masse moléculaire	270 Daltons	205 Daltons	303 Daltons

Tableau 7 : Récapitulatif des caractéristiques chimiques et des doses injectées dans le CEL et dans le dCA1.

Tests sous microinjection : Les animaux sont maintenus en restriction alimentaire pendant toute la période des tests (une dizaine de jours en moyenne), et bénéficient au minimum d'un jour de repos entre chaque session de microinjection. Les animaux des groupes CEL et dCA1 sont répartis en quatre sous-groupes selon le type de drogue injecté : groupe LIDO, groupe APV, groupe SCOPO et groupe témoin (LCR). La constitution des groupes expérimentaux pour chaque structure et pour chaque apprentissage est indiquée dans le **tableau 8**.

CEL		LIDO	APV	SCOPO	Témoin
<u>Bimodal</u>	Réacquisition OT1	<i>Sans injection</i>			
	Réacquisition OT1	N=8			N=8
	Acquisition OT2 <i>(nouveaux stimuli)</i>	N=8	N=9	N=9	N=9
	Recombinaison OT3 <i>(stimuli familiers)</i>	N=8	N=9	N=9	N=8
<u>Unimodal</u>	Acquisition OLF2	N=6			N=8
	Acquisition TACT2	N=6			N=9
	Reversal rOLF1	N=9			N=9
	Reversal rTACT1	N=9			N=9

dCA1		LIDO	APV	SCOPO	Témoin
<u>Bimodal</u>	Réacquisition OT1	<i>Sans injection</i>			
	Réacquisition OT1	N=8			N=10
	Acquisition OT2 <i>(nouveaux stimuli)</i>	N=8	N=8	N=8	N=10
	Recombinaison OT3 <i>(stimuli familiers)</i>	N=9	N=9	N=8	N=8
<u>Unimodal</u>	Reversal rOLF1	N=10			N=8
	Reversal rTACT1	N=8			N=9

Tableau 8 : Présentation des différents tests comportementaux faisant suite à la chirurgie dans le CEL (partie haute) et dans le dCA1 (partie basse). Les animaux bénéficient d'un jour de repos complet entre chaque microinjection, et chaque animal reçoit alternativement une injection de lidocaïne, de dAPV, de scopolamine ou de LCR dans l'étude sur l'apprentissage bimodal, et une injection de lidocaïne ou de LCR dans l'étude sur l'apprentissage unimodal, d'une microinjection à l'autre. Les cases noires représentent les cas de figures non testés.

G. Contrôle histologique

Deux semaines après la fin des tests, les animaux sont profondément anesthésiés avec une dose létale de pentobarbital sodique (100 mg/kg, Ceva Santé Animal). Une perfusion intracardiaque est ensuite réalisée avec 50 ml d'une solution de NaCl à 9‰, suivie par une perfusion de 50 ml de paraformaldéhyde à 4%. Le cerveau est ensuite prélevé et placé dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 3h à 4°C, puis transféré dans une solution de sucrose (20% dans une solution tamponnée PBS) pendant 72h à 4°C. Chaque cerveau est ensuite congelé dans une solution de méthylbutane à -40°C. Des coupes de 20 µm sont réalisées au cryostat à -20°C, puis déposées sur des lames et stockées dans une armoire sèche à 37°C pendant 48h, avant d'être déshydratées et colorées au violet de crésyl. Des photographies sont effectuées pour compléter l'observation des coupes sous microscope, dans le but de vérifier la position du point d'injection (selon l'atlas de *Paxinos et Watson, 2005*).

H. Variables comportementales mesurées

Ces variables sont décrites dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 66).

I. Analyses statistiques

Les données sont traitées avec le logiciel Systat 13.0®. Pour l'ensemble des animaux, le ratio de choix corrects, le ratio d'erreurs et la latence sont moyennés en quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4). Les données obtenues dans les différentes conditions sont traitées par des analyses de variance (ANOVA) à deux facteurs (Drogue × Bloc) à mesures répétées, à un facteur (Bloc) et à un facteur (Drogue), complétées si nécessaire par des tests post-hoc de Bonferroni. Le nombre d'essais non fouillés est traité par une analyse de variance à un facteur (Drogue). La répartition des erreurs entre les deux pots non-renforcés est traitée par un test paramétrique apparié (test-t de Student) en cas de normalité des données (test de Shapiro-Wilk). Si les données ne sont pas normales, elles sont traitées par un test non-paramétrique apparié (test de Wilcoxon des rangs signés). Pour chaque test, le seuil de rejet de l'hypothèse nulle est de 5%.

II. RESULTATS

L'ensemble des données présentées dans cette section a été publiée (*Boisselier et al., 2014 ; Boisselier et al., 2016*). Toutefois, les résultats obtenus ont volontairement été rassemblés dans ce manuscrit, afin de présenter une vue globale du rôle respectif du cortex entorhinal latéral et de l'hippocampe dorsal dans l'apprentissage de la tâche OT. Ainsi, les analyses statistiques sont légèrement différentes de celles présentées dans les articles, mais les résultats clés sont évidemment les mêmes.

A. Rôle du cortex entorhinal latéral (CEL) dans l'apprentissage olfacto-tactile

Parmi les 90 animaux ayant appris la tâche OT1 (voir la section résultats du chapitre 1, page 68), 37 animaux ont été bilatéralement implantés avec des canules-guide dans le CEL. Deux animaux sont décédés des suites de la chirurgie. Après une période de récupération post-opératoire de 10 jours, les 35 animaux implantés ont été soumis à une séance de réacquisition OT1 en une session unique de vingt essais. L'analyse du premier essai effectué sans renforcement montre que 83% des animaux (29/35) ont choisi la combinaison correcte (données non représentées).

1. Rôle du CEL dans le rappel et la réacquisition d'une tâche précédemment apprise (OT1)

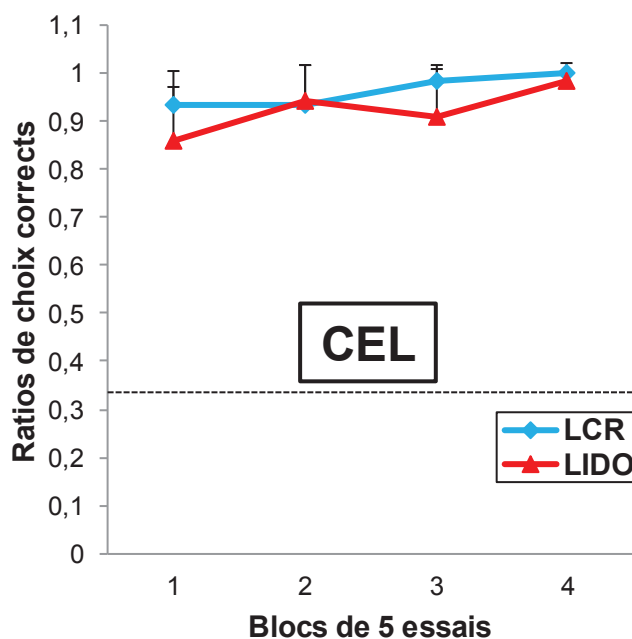
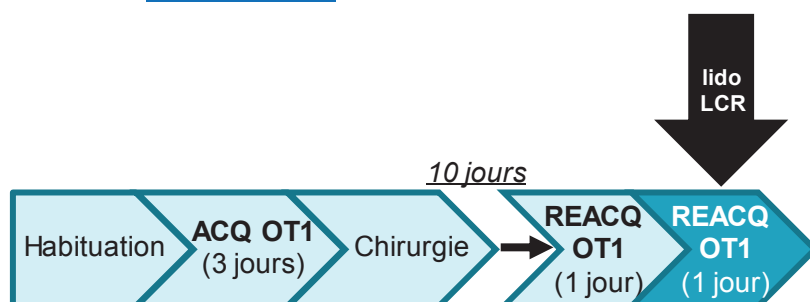


Figure 31 : Absence d'effet de l'injection de lidocaïne dans le CEL sur la réacquisition d'une tâche bimodale précédemment apprise (OT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la réacquisition OT1 pour les deux groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=8$ rats ; LIDO, en rouge, $n=9$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard.

Vingt-quatre heures après la première session de réacquisition OT1, l'effet de l'inactivation du CEL a été testé dans la réacquisition de la tâche OT1 précédemment apprise. Pour cela, deux groupes d'animaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO, n=8) ou de LCR (groupe témoin, n=9).

La chronologie des phases expérimentales ainsi que les courbes de réacquisition OT1 sont représentées sur la **figure 31** pour les deux groupes expérimentaux. L'analyse du premier essai effectué sans renforcement montre que 100% des animaux ont choisi la combinaison correcte (données non représentées). Comme l'indique la figure, les ratios de choix corrects sont similaires entre les deux groupes expérimentaux avec une valeur supérieure au critère de réussite dès le début de la session (de $0,93 \pm 0,07$ à 1 pour le groupe témoin et de $0,86 \pm 0,11$ à $0,98 \pm 0,04$ pour le groupe LIDO). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,45} = 4,36$; $p < 0,01$), mais pas d'effet significatif du facteur Drogue ($F_{1,15} = 3,55$; p n.s), ni d'interaction significative entre les facteurs ($F_{3,45} = 1,28$; p n.s). Par ailleurs, la latence diminue au cours des blocs pour les deux groupes expérimentaux (d'une quarantaine de secondes en début de session à une quinzaine de secondes en fin de session, données non représentées).

Les performances obtenues pour le premier essai par l'ensemble des animaux indiquent que l'activité du CEL n'est pas indispensable pour le rappel de la tâche bimodale apprise dix jours plus tôt. Ces résultats montrent également que l'inactivation du CEL ne perturbe pas la réacquisition d'une tâche OT précédemment apprise. Ainsi, l'injection de lidocaïne et/ou l'inactivation du CEL n'induit aucun déficit sensorimoteur, motivationnel ou de discrimination sensorielle des stimuli olfactifs ou tactiles.

2. Rôle du CEL dans l'acquisition d'une tâche (OT2)

a. Effet de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine

Deux jours après la réacquisition OT1, les effets de l'inactivation du CEL ont été testés dans l'acquisition d'une nouvelle tâche OT utilisant de nouvelles combinaisons (OT2). Pour cela, quatre groupes d'animaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO, n=8), de dAPV (groupe APV, n=9), de scopolamine (groupe SCOPO, n=9) ou de LCR (groupe témoin, n=8).

La chronologie des phases expérimentales ainsi que les courbes d'acquisition OT2 sont représentées sur la **figure 32** pour les quatre groupes expérimentaux. Comme l'indique la **figure 32.a**, les profils des courbes d'apprentissage diffèrent entre les groupes en fonction du type de drogue injecté. Le ratio de choix corrects évolue progressivement au cours de la session pour le groupe témoin pour atteindre et dépasser le critère de réussite au cours du troisième bloc (de $0,38 \pm 0,16$ à $0,88 \pm 0,11$). En revanche, les ratios de choix corrects ne montrent pas d'évolution et les scores se situent à des valeurs autour de 0,50 pour l'ensemble de la session pour les groupes LIDO et APV (de $0,44 \pm 0,15$ à $0,45 \pm 0,18$ et de $0,47 \pm 0,14$ à $0,58 \pm 0,16$ respectivement). Enfin, le ratio de choix corrects évolue en deux temps pour le groupe SCOPO : le score augmente progressivement durant les trois premiers blocs pour atteindre une valeur moyenne de 0,50 puis augmente très rapidement lors du dernier bloc pour atteindre une valeur proche du critère de réussite en fin de session (de

0,38 ±0,14 à 0,78 ±0,13). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue × Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 16,63$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 20,19$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 3,88$; $p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 31,75$; $p < 0,001$) et SCOPO ($F_{3,32} = 8,49$; $p < 0,001$) mais pas pour les groupes LIDO et APV ($F_{3,28} = 0,29$; p n.s et $F_{3,32} = 0,80$; p n.s respectivement). Un test post-hoc (Bonferroni) montre que les scores du groupe témoin diffèrent entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 ($p < 0,001$) et que les scores du groupe SCOPO diffèrent entre les blocs 1 et 4 uniquement ($p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Drogue montre une différence significative entre les scores des différents groupes dans le bloc 2 ($F_{3,30} = 8,98$; $p < 0,001$), dans le bloc 3 ($F_{3,30} = 9,56$; $p < 0,001$) et dans le bloc 4 ($F_{3,30} = 10,10$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des scores entre le groupe témoin, et les groupes LIDO et APV dans le bloc 2 ($p < 0,001$ et $p < 0,05$ respectivement), entre le groupe témoin et les trois autres groupes dans le bloc 3 ($p < 0,01$ à $p < 0,001$), entre le groupe témoin et les groupes LIDO et APV dans le bloc 4 ($p < 0,001$) et entre les groupes LIDO et SCOPO dans le bloc 4 ($p < 0,01$).

Par ailleurs, comme l'indique la **figure 32.b**, la latence diminue au cours de la session de manière similaire pour l'ensemble des groupes expérimentaux (d'une cinquantaine de secondes en début de session à une vingtaine de secondes en moyenne en fin de session). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue × Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 30,57$; $p < 0,001$), mais pas d'effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 1,36$; p n.s), ni d'interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 1,01$; p n.s). L'analyse sur le facteur Bloc montre une diminution significative de la latence au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 6,84$; $p < 0,01$), LIDO ($F_{3,28} = 11,12$; $p < 0,001$), APV ($F_{3,32} = 4,53$; $p < 0,01$) et SCOPO ($F_{3,32} = 4,38$; $p < 0,05$).

De plus, nos données indiquent qu'au cours des premiers essais, il est fréquent que l'animal ne fouille aucun pot pendant les deux minutes qui lui sont imparties. Le nombre d'essais au cours desquels ce comportement est observé est indépendant du type de drogue injecté (1,3 ±1,8 essais pour le groupe témoin ; 2,4 ±0,9 essais pour le groupe LIDO ; 2,9 ±2,6 essais pour le groupe APV et 2,7 ±2 essais pour le groupe SCOPO ; analyse sur le facteur Drogue : $F_{3,30} = 1,17$; p n.s). Ce comportement de néophobie suggère que l'ensemble des animaux a bien détecté l'introduction de stimuli nouveaux.

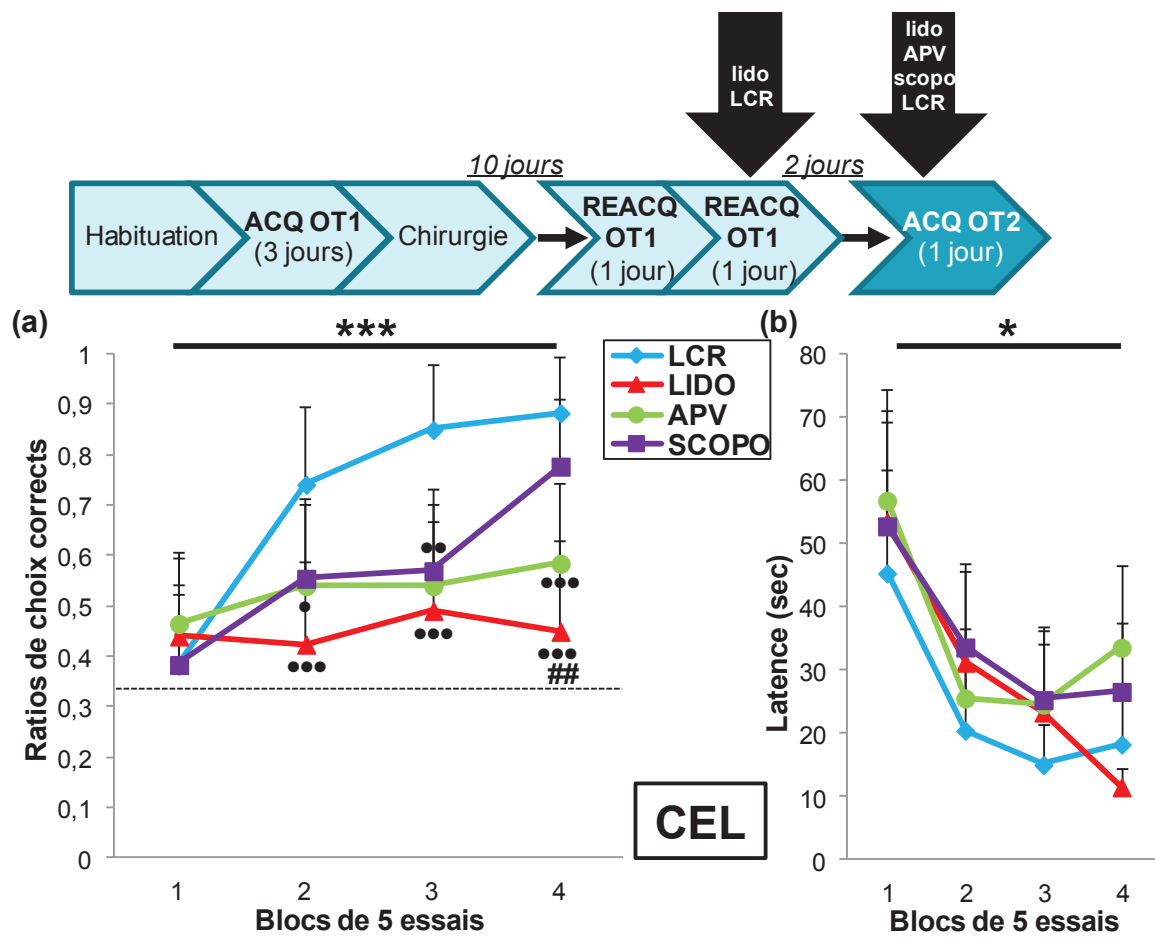


Figure 32 : Effet différentiel de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine dans le CEL sur l'acquisition d'une nouvelle tâche bimodale (OT2). (a) Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. et (b) Moyenne des latences \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de l'acquisition OT2 pour les quatre groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=8$ rats ; LIDO, en rouge, $n=8$ rats ; APV, en vert, $n=9$ rats ; SCOPO, en violet, $n=9$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard. *** = $p<0,001$ entre les blocs pour les groupes LCR et SCOPO (a) et * = $p<0,05$ pour chaque groupe expérimental (b). • = $p<0,05$; •• = $p<0,01$; ••• = $p<0,001$ dans un bloc donné comparé au groupe témoin. ## = $p<0,01$ dans un bloc donné entre les groupes LIDO et SCOPO.

L'analyse des erreurs montre qu'elles consistent le plus souvent à choisir le pot C, soit celui contenant l'odeur associée au renforcement (**Figure 21**, page 70) comme observé lors de l'acquisition OT1 (voir la section résultats du chapitre 1, page 69). En effet, pour l'ensemble de la session, 87% (groupe témoin), 82% (groupe LIDO), 64% (groupe APV) et 82% (groupe SCOPO) des erreurs sont commises par choix du pot C, contre seulement 13%, 18%, 36% et 18%, respectivement pour les quatre groupes, par choix du pot B, soit celui présentant la texture associée au renforcement (total du nombre d'erreurs pour les pots B et C : groupe témoin = 39 ; groupe LIDO = 74 ; groupe APV = 66 ; groupe SCOPO = 61). Des test-t à mesures appariées montrent que le nombre d'erreurs entre les pots B et C diffère significativement pour tous les groupes ($p < 0,05$ à $p < 0,001$).

En résumé, l'ensemble de ces données indique que l'inactivation du CEL, de même que l'inactivation des récepteurs NMDA de cette structure perturbe fortement l'acquisition d'une tâche OT utilisant de nouveaux stimuli, tandis que l'inactivation des récepteurs cholinergiques muscariniques induit uniquement un retard dans l'acquisition de cette tâche. Néanmoins, l'analyse des erreurs, ainsi que le fait que les animaux des groupes LIDO et APV atteignent un score de 0,50 suggèrent que ces animaux ont toutefois acquis l'association entre le stimulus olfactif et le renforcement (apprentissage unimodal). Ces données montrent donc que l'effet de la lidocaïne ou du dAPV sur l'acquisition OT ne résulte pas d'une incapacité à associer le stimulus olfactif au renforcement. Enfin, l'analyse des latences pour chacun des groupes expérimentaux indique que cette variable ne diffère pas selon la drogue injectée, ce qui exclut des effets de type sensorimoteurs ou motivationnels.

b. Effet réversible de la lidocaïne, de dAPV et de la scopolamine

Suite à l'acquisition OT2, l'ensemble des animaux a été soumis à une seconde session d'apprentissage de la tâche OT2, 96 heures après l'injection afin de tester la réversibilité de l'effet des drogues.

Les résultats montrent que les animaux ayant auparavant reçu une injection de LCR ou de scopolamine présentent des scores avoisinant le critère de réussite dès le début de la session (de $0,80 \pm 0,14$ à $0,98 \pm 0,06$ et de $0,75 \pm 0,14$ à $0,92 \pm 0,09$ respectivement). En revanche, les animaux ayant précédemment reçu une injection de lidocaïne ou de dAPV présentent des scores moyens en début de session, mais qui progressent pour atteindre et dépasser le critère de réussite en fin de session (de $0,52 \pm 0,16$ à $0,93 \pm 0,09$ et de $0,58 \pm 0,16$ à $0,90 \pm 0,09$ respectivement). Ainsi, l'ensemble des groupes atteint un ratio de choix corrects moyen minimum de 0,90 en fin de session (données non représentées).

Ces données montrent que les animaux ayant seulement acquis l'association unimodale « odeur-renforcement » lors de la première session d'acquisition OT2 (groupes LIDO et APV) sont capables d'associer le stimulus tactile à la paire unimodale précédemment formée pour construire l'association « (odeur-renforcement) – texture », au cours de la seconde session d'acquisition de cette tâche.

c. Sélectivité du rôle du CEL dans l'acquisition bimodale, et non unimodale

Parmi les 83 animaux ayant appris la tâche OLF1 ou TACT1 (voir la [section résultats du chapitre 1, page 78](#)), 30 animaux ont été bilatéralement implantés avec des canules-guide dans le CEL. Après une période de récupération post-opératoire de 10 jours, les animaux ont été soumis à une séance de réacquisition OLF1 ou TACT1 en une session unique de vingt essais. L'analyse du premier essai effectué sans renforcement montre que 100% et 94% des animaux ont respectivement choisi le stimulus olfactif et le stimulus tactile correct (données non représentées). Le lendemain, les animaux ont été soumis à une nouvelle séance de réacquisition OLF1 ou TACT1 en une session unique de vingt essais, suite à une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO : n=7 pour OLF1 et n=7 pour TACT1) ou de LCR (groupe témoin : n=8 pour OLF1 et n=8 pour TACT1). L'analyse du premier essai effectué sans renforcement montre que 100% des animaux des groupes témoin et LIDO ont

choisi le stimulus olfactif correct, tandis que 75% et 86% des animaux des groupes témoin et LIDO respectivement, ont choisi le stimulus tactile correct (données non représentées).

Les données de l'expérience ayant testé l'effet de l'inactivation du CEL sur l'acquisition OLF2 suggèrent que les effets induits par la lidocaïne et le dAPV pourraient être dus à un déficit de la formation de l'association entre le stimulus tactile et le renforcement, puisqu'ils ne parviennent pas à dépasser un ratio de choix corrects de 0,50. Or, couplée à l'analyse des erreurs, cette donnée traduit l'acquisition de l'association « odeur-renforcement ». Pour tester cette hypothèse, l'effet de l'inactivation du CEL a été testé sur l'acquisition d'une tâche unimodale olfactive (OLF2) ou tactile (TACT2). Pour cela, quatre groupes expérimentaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO : n=6 pour OLF2 et n=6 pour TACT2) ou de LCR (groupe témoin : n=9 pour OLF2 et n=9 pour TACT2).

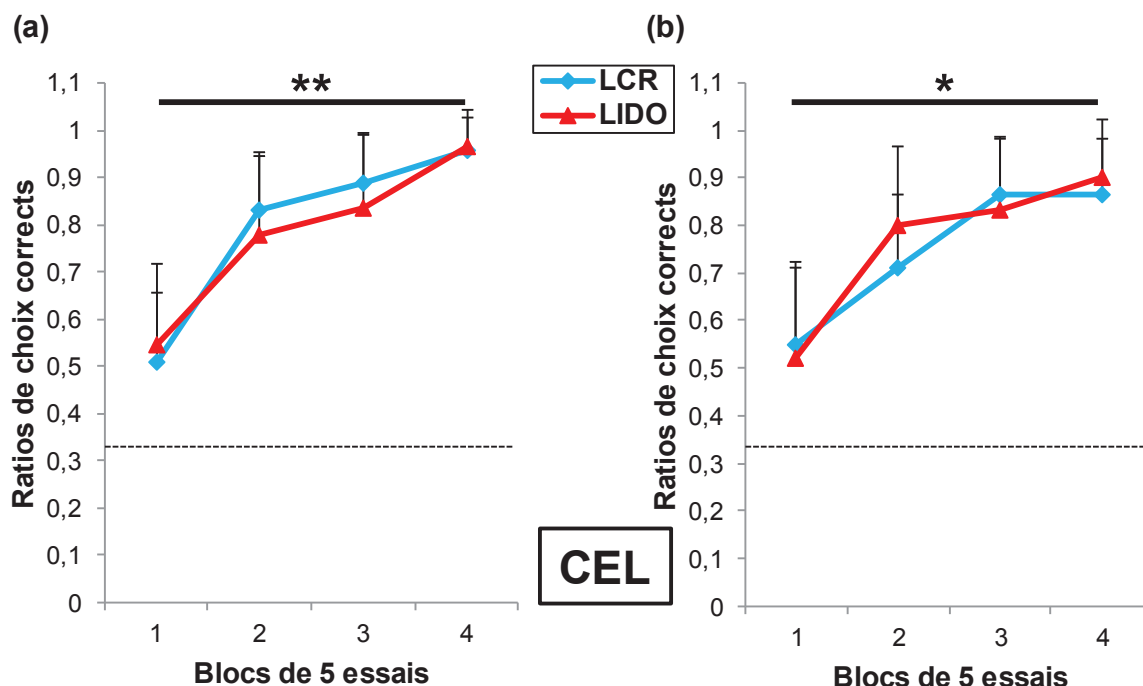


Figure 33 : Absence d'effet de l'injection de lidocaïne dans le CEL sur l'acquisition d'une tâche unimodale olfactive (a, OLF2) ou tactile (b, TACT2). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de l'acquisition OLF2 et TACT2 pour les deux groupes expérimentaux (LCR, en bleu, n=9 rats pour OLF2 et n=9 rats pour TACT2 ; LIDO, en rouge, n=6 rats pour OLF2 et n=6 rats pour TACT2). Un ratio de 0,33 représente le hasard. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ entre les blocs pour chaque groupe expérimental.

Les courbes d'acquisition OLF2 et TACT2 sont respectivement représentées sur les figures 33.a et 33.b pour les quatre groupes expérimentaux. Comme l'indiquent les figures, le ratio de choix corrects moyen évolue de manière similaire au cours des blocs pour les groupes témoin et LIDO lors de l'acquisition de ces deux tâches, avec des scores qui atteignent et dépassent le critère de réussite à la fin de la session OLF2 (de $0,51 \pm 0,15$ à $0,96 \pm 0,07$ pour le groupe témoin et de $0,54 \pm 0,18$ à $0,97 \pm 0,07$ pour le groupe LIDO) et TACT2 (de $0,55 \pm 0,16$ à $0,87 \pm 0,11$ pour le groupe témoin et de $0,52 \pm 0,20$ à $0,90 \pm 0,12$ pour le groupe LIDO). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc pour les

deux tâches ($F_{3,39} = 25,13$; $p < 0,001$ et $F_{3,39} = 15,95$; $p < 0,001$ pour OLF2 et TACT2 respectivement), mais pas d'effet significatif du facteur Drogue ($F_{1,13} = 0,18$; p n.s et $F_{1,13} = 0,05$; p n.s pour OLF2 et TACT2 respectivement), ni d'interaction significative entre les facteurs ($F_{3,39} = 0,36$; p n.s et $F_{3,39} = 0,53$; p n.s pour OLF2 et TACT2 respectivement). Une analyse sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,32} = 19,99$; $p < 0,001$) et LIDO ($F_{3,20} = 8,00$; $p < 0,01$) dans OLF2, et pour les groupes témoin ($F_{3,32} = 8,85$; $p < 0,001$) et LIDO ($F_{3,20} = 3,09$; $p < 0,05$) dans TACT2. Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des scores entre le bloc 1 et les blocs 3 et 4 pour les groupes témoins et LIDO ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement pour OLF2 et TACT2).

Ces données montrent que le blocage de l'activité du CEL n'affecte pas l'acquisition d'une tâche unimodale olfactive ou tactile. Ces données confirment les résultats obtenus dans le groupe LIDO lors de l'acquisition OT2 montrant que l'activité du CEL n'est pas indispensable pour l'établissement de l'association « odeur-renforcement ». Par ailleurs, les données du groupe LIDO obtenues lors de l'acquisition TACT2 montrent que l'activité du CEL n'est pas indispensable pour l'établissement d'une association « texture-renforcement ». Dès lors, si le déficit observé lors de l'acquisition OT2 suite à l'injection de lidocaïne dans le CEL ne résulte ni d'un déficit de la formation de l'association « odeur-renforcement », ni d'un déficit de la formation de l'association « texture-renforcement », alors il est vraisemblable que l'apprentissage de la tâche bimodale OT soit sous-tendu par la succession de deux processus associatifs : entre l'odeur et le renforcement (« odeur-renforcement ») dans un premier temps, et entre la paire « odeur-renforcement » et le stimulus tactile (« (odeur-renforcement) – texture ») dans un second temps, comme précédemment évoqué dans la section discussion du chapitre 1 (page 85). Selon cette hypothèse, l'effet obtenu dans l'acquisition OT2 résulterait donc d'un déficit de l'association « (odeur-renforcement) – texture ».

3. Rôle du CEL dans la recombinaison (OT3)

a. Effet de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine

Suite aux acquisitions successives OT1 et OT2, les effets de l'inactivation du CEL ont été testés dans un apprentissage de recombinaison bimodale (OT3). Pour cela, quatre groupes d'animaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO, $n=8$), de dAPV (groupe APV, $n=9$), de scopolamine (groupe SCOPO, $n=9$) ou de LCR (groupe témoin, $n=8$). Les animaux injectés avec une drogue donnée lors de l'acquisition OT2 ont été injectés avec une autre drogue lors de la recombinaison OT3. Par ailleurs, préalablement à OT3, les animaux des groupes LIDO et APV lors de l'acquisition OT2 ont été soumis à une troisième session d'acquisition de cette tâche, afin de placer ces groupes au même niveau de performances que les groupes témoin et SCOPO.

La chronologie des phases expérimentales ainsi que les courbes de recombinaison OT3 sont représentées sur la **figure 34** pour les quatre groupes expérimentaux. Comme l'indique la **figure 34.a**, les profils des courbes d'apprentissage diffèrent entre les groupes en fonction du type de drogue injecté. Le ratio de choix corrects progresse tout au long de la session pour le groupe témoin pour atteindre le critère de réussite au cours du quatrième

bloc (de $0,24 \pm 0,13$ à $0,85 \pm 0,13$). Les ratios de choix corrects progressent également pour les groupes LIDO et APV, mais de manière beaucoup plus faible puisque les scores atteignent des valeurs nettement moins élevées à la fin de la session (de $0,19 \pm 0,11$ à $0,40 \pm 0,17$ et de $0,35 \pm 0,15$ à $0,59 \pm 0,16$ respectivement). Enfin, de manière similaire à ce qui a été décrit pour l'acquisition OT2, le ratio de choix corrects du groupe SCOPO évolue en deux temps : le score augmente progressivement durant les trois premiers blocs pour atteindre une valeur moyenne de $0,36$ puis augmente très rapidement lors du dernier bloc pour atteindre une valeur proche du critère de réussite à l'issue de la session (de $0,19 \pm 0,11$ à $0,72 \pm 0,15$). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 43,26$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 17,53$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 3,78$; $p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 26,67$; $p < 0,001$), APV ($F_{3,32} = 6,03$; $p < 0,01$) et SCOPO ($F_{3,32} = 17,30$; $p < 0,001$), ainsi qu'une tendance pour le groupe LIDO ($F_{3,28} = 2,91$; $p = 0,052$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une progression significative des scores entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 pour les groupes témoin et SCOPO ($p < 0,05$ à $p < 0,001$), et entre les blocs 1 et 4 uniquement pour les groupes LIDO et APV ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement). Une analyse sur le facteur Drogue montre une différence significative des scores entre les groupes dans le bloc 2 ($F_{3,30} = 3,06$; $p < 0,05$), dans le bloc 3 ($F_{3,30} = 12,26$; $p < 0,001$) et dans le bloc 4 ($F_{3,30} = 13,97$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des scores entre le groupe témoin, et les trois autres dans le bloc 3 ($p < 0,01$ à $p < 0,001$), entre le groupe témoin et les groupes LIDO et APV dans le bloc 4 ($p < 0,001$ et $p < 0,01$ respectivement) et entre les groupes LIDO et SCOPO dans le bloc 4 ($p < 0,01$).

Par ailleurs, comme l'indique la **figure 34.b**, la latence diminue au cours de la session pour l'ensemble des groupes expérimentaux. Toutefois, alors que la latence du groupe témoin diminue pour atteindre une valeur proche de 10 secondes en fin de session, la latence du groupe LIDO reste élevée (autour de 30 secondes). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 40,53$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 3,52$; $p < 0,05$), mais pas d'interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 0,38$; p n.s). L'analyse sur le facteur Bloc montre une diminution significative de la latence au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 39,35$; $p < 0,001$), LIDO ($F_{3,28} = 4,53$; $p < 0,05$), APV ($F_{3,32} = 4,57$; $p < 0,01$) et SCOPO ($F_{3,32} = 9,20$; $p < 0,001$). Une analyse statistique sur le facteur Drogue ne montre toutefois aucune différence significative entre les groupes, quel que soit le bloc considéré.

De plus, nos données indiquent qu'au cours des premiers essais, il est fréquent que l'animal ne fouille aucun pot pendant les deux minutes qui lui sont imparties. Le nombre d'essais au cours desquels ce comportement est observé est indépendant du type de drogue injecté ($1,1 \pm 1,5$ essais pour le groupe témoin ; $3,0 \pm 2,6$ essais pour le groupe LIDO ; $1,5 \pm 2,6$ essais pour le groupe APV et $1,9 \pm 1,5$ essais pour le groupe SCOPO ; analyse sur le facteur Drogue : $F_{3,30} = 1,12$; p n.s). Ainsi, malgré l'utilisation de stimuli familiers, un comportement de néophobie est observé au cours des premiers essais.

Malgré l'absence de différence significative, l'observation détaillée des mesures de latence et du nombre d'essais non fouillés indiquent qu'en parallèle du déficit de l'apprentissage mis en évidence par l'analyse des ratios de choix corrects, la plupart des animaux du groupe LIDO nécessitent plus de temps pour effectuer leur choix et réalisent ainsi plus d'essais non fouillés que les animaux du groupe témoin. Ces données contribuent à justifier que la latence de ce groupe soit trois fois plus longue que celle du groupe témoin.

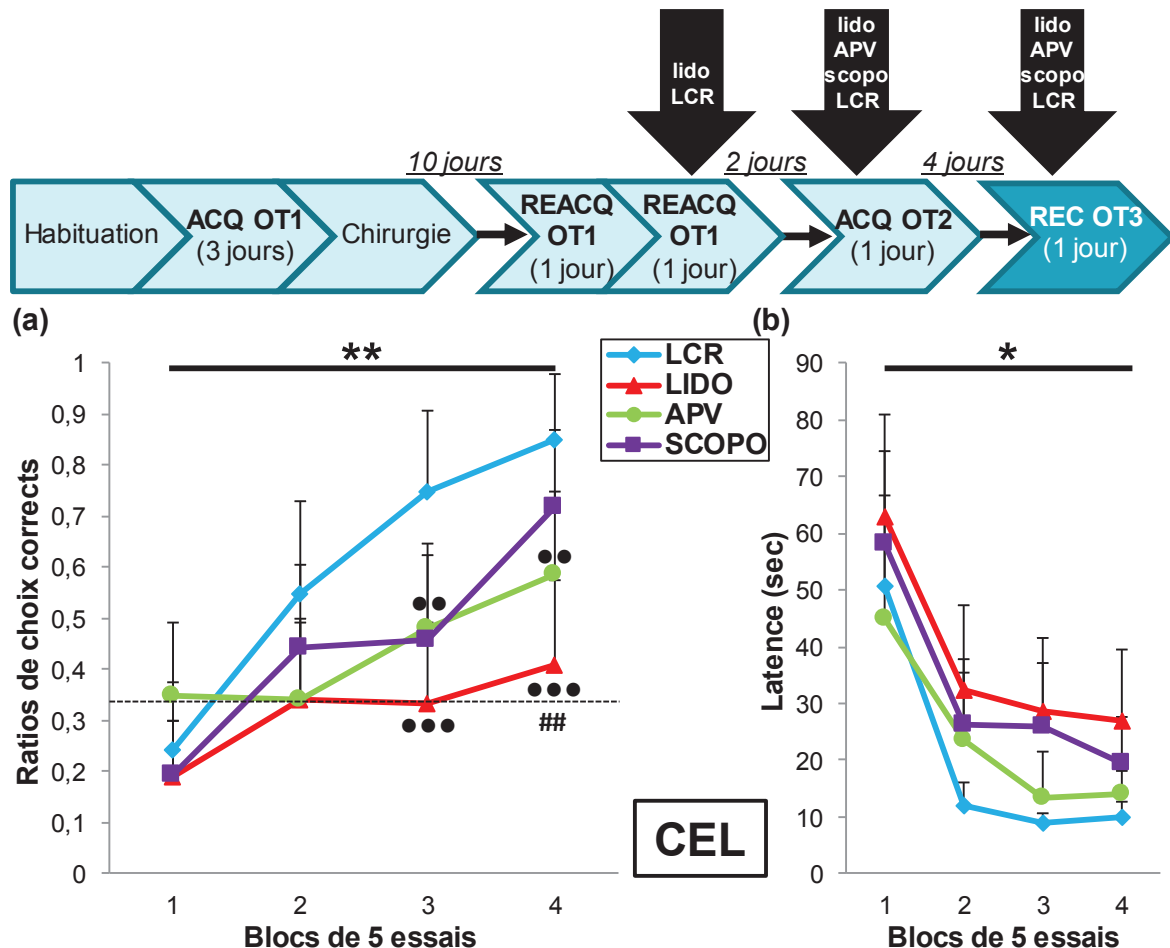


Figure 34 : Effet différentiel de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine dans le CEL sur la recombinaison d'une tâche bimodale (OT3). (a) Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. et (b) Moyenne des latences \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la recombinaison OT3 pour les quatre groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=8$ rats ; LIDO, en rouge, $n=8$ rats ; APV, en vert, $n=9$ rats ; SCOPO, en violet, $n=9$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard. * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$ entre les blocs pour les groupes LCR, APV et SCOPO (a) et pour chaque groupe expérimental (b). ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$ dans un bloc donné comparé au groupe témoin. ## = $p<0,01$ dans un bloc donné entre les groupes LIDO et SCOPO.

L'analyse des erreurs montre qu'elles consistent le plus souvent à choisir le pot B, soit celui contenant l'odeur associée au renforcement dans OT1 ou dans OT2 (**Figure 21**, page 70 et **Tableau 4**, page 98). En effet, pour l'ensemble de la session de recombinaison, 73% (groupe témoin), 87% (groupe LIDO), 67% (groupe APV) et 86% (groupe SCOPO) des erreurs sont commises par choix du pot B, contre seulement 27%, 13%, 33% et 14%, respectivement pour les quatre groupes, par choix du pot C, soit celui présentant la texture précédemment renforcée dans OT1 ou OT2 (total du nombre d'erreurs pour les pots B et C :

groupe témoin = 59 ; groupe LIDO = 93 ; groupe APV = 92 ; groupe SCOPO = 88). Des test-t à mesures appariées montrent que le nombre d'erreurs entre les pots B et C diffère significativement pour tous les groupes ($p < 0,01$).

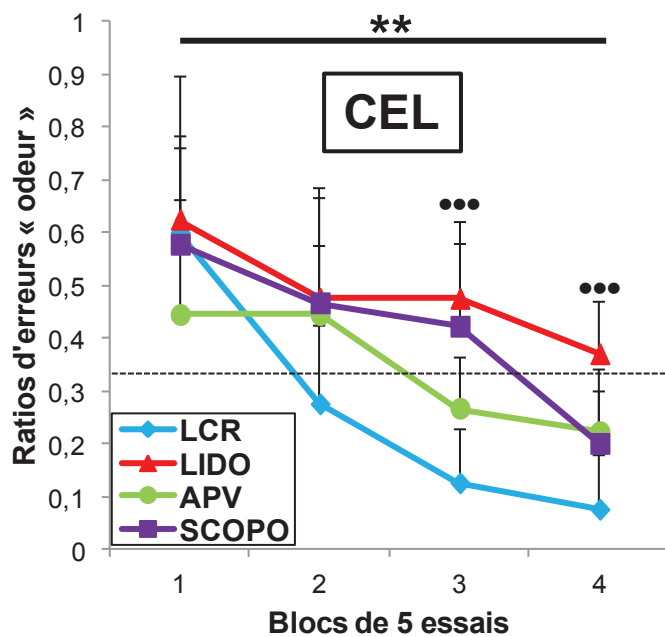


Figure 35 : Effet différentiel de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine dans le CEL sur la recombinaison d'une tâche bimodale (OT3). Moyenne des ratios d'erreurs \pm S.E.M. par choix de l'odeur précédemment renforcée dans l'une des acquisitions (OT1 ou OT2) dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la recombinaison OT3 pour les quatre groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=8$ rats ; LIDO, en rouge, $n=8$ rats ; APV, en vert, $n=9$ rats ; SCOPO, en violet, $n=9$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard. ** = $p < 0,01$ entre les blocs pour les groupes LCR, APV et SCOPO ($p=0,064$ pour le groupe LIDO). ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ dans un bloc donné comparé au groupe témoin.

D'autre part, lors du premier essai de la recombinaison OT3, 94% des animaux (32/34) ont choisi de fouiller le pot contenant l'odeur associée au renforcement dans l'une des deux précédentes acquisitions, et ce comportement de persistance se poursuit lors des essais suivants. La **figure 35** représente les ratios d'erreurs par choix de l'odeur précédemment renforcée lors de la session de recombinaison OT3 pour l'ensemble des groupes. Comme l'indique la figure, le ratio d'erreurs « odeur » évolue progressivement pour le groupe témoin pour atteindre des valeurs proches de 0 à l'issue de la session (de $0,60 \pm 0,19$ à $0,08 \pm 0,05$). Ce ratio d'erreurs évolue également au cours de la session pour les groupes APV et SCOPO (de $0,44 \pm 0,22$ à $0,22 \pm 0,12$ et de $0,58 \pm 0,19$ à $0,20 \pm 0,10$ respectivement). En revanche, ce ratio d'erreurs reste élevé durant la quasi intégralité de la session pour le groupe LIDO (de $0,63 \pm 0,27$ à $0,37 \pm 0,11$). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 28,59$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 7,36$; $p < 0,01$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 2,87$; $p < 0,01$). Une analyse sur le facteur Bloc montre une évolution significative des ratios d'erreurs « odeur » au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 23,01$; $p < 0,001$), APV ($F_{3,32} = 5,47$; $p < 0,01$) et SCOPO ($F_{3,32} = 8,31$; $p < 0,001$), ainsi qu'une tendance pour le groupe LIDO ($F_{3,28} = 2,71$; $p = 0,064$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des ratios d'erreurs « odeur » entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 pour le groupe témoin ($p < 0,001$), ainsi qu'entre les blocs 1 et 4 uniquement pour les groupes LIDO, APV et SCOPO ($p < 0,05$ à $p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Drogue montre une différence significative des ratios d'erreurs « odeur » entre les groupes dans le bloc 3 ($F_{3,30} = 12,18$; $p < 0,001$) et dans le bloc 4 ($F_{3,30} = 10,29$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre

une différence significative des ratios d'erreurs « odeur » entre le groupe témoin et les groupes LIDO et SCOPO dans le bloc 3 ($p < 0,001$), et entre les groupes témoin et LIDO ($p < 0,001$) dans le bloc 4.

L'ensemble de ces données indique que si les animaux témoins acquièrent la recombinaison OT progressivement au cours d'une session de vingt essais, l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine induit un déficit de l'apprentissage de cette tâche en provoquant des effets différents en fonction du type de drogue injecté. En effet, alors que les injections de lidocaïne et de dAPV induisent un déficit de la recombinaison pour l'ensemble de la session, elles ne semblent toutefois pas induire de déficit sur la formation de l'association « odeur-renforcement » puisque les ratios de choix corrects atteignent une valeur proche de 0,50 à l'issue du quatrième bloc. D'autre part, l'injection de scopolamine semble uniquement induire un déficit de l'apprentissage qui se traduit par un retard puisque les performances de ces animaux approchent du critère de réussite à la fin de la session. Par ailleurs, l'observation du type d'erreurs montre que la majorité correspond au choix de l'odeur précédemment associée au renforcement et ce, pour l'ensemble des groupes expérimentaux. Ceci montre d'une part que les différentes drogues n'ont pas induit de déficit du rappel de l'association « odeur-renforcement » acquise précédemment et d'autre part, que le choix des animaux est essentiellement guidé par l'odeur puisque le nombre d'erreurs commises par choix de la texture précédemment renforcée est beaucoup plus faible. L'analyse des courbes de ce ratio d'erreurs « odeur » montre que si les animaux du groupe témoin persistent à choisir l'odeur précédemment renforcée au cours du premier bloc d'essai, cette persistance s'éteint au cours du second bloc, puisque ce ratio atteint une valeur correspondant au hasard. Lors des deux derniers blocs, ce ratio d'erreurs atteint des valeurs proches de 0, ce qui traduit la mise en place de l'acquisition de la nouvelle association « odeur-renforcement ». En revanche, pour les groupes ayant reçu une injection de dAPV ou de scopolamine, l'extinction de cette persistance olfactive apparaît plus lentement, tandis que les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne tendent uniquement à éteindre cette persistance olfactive en fin de session. Dès lors le déficit observé dans OT3 suite à l'injection de lidocaïne ou de dAPV résulte probablement d'un déficit de la formation de l'association « (odeur-renforcement) – texture », tout en préservant la formation de l'association « odeur-renforcement », tandis que l'injection de scopolamine semble uniquement ralentir la formation de l'association OT.

b. Sélectivité du rôle du CEL dans la recombinaison bimodale, et non dans le reversal unimodal

Parmi les 83 animaux ayant participé à l'étude portant sur l'apprentissage unimodal olfactif ou tactile (voir la [section résultats du chapitre 1, page 78](#)), 18 animaux ont tout d'abord été bilatéralement implantés avec des canules-guide dans le CEL. Après une période de récupération post-opératoire de 10 jours, les animaux implantés ont été soumis à l'acquisition d'une première tâche unimodale OLF1 ou TACT1 en trois jours.

Les données de l'expérience ayant testé l'effet de l'inactivation du CEL sur la recombinaison OT3 suggèrent que les effets induits par la lidocaïne pourraient être dus à un déficit de l'extinction de la persistance pour le stimulus olfactif précédemment renforcé,

puisque seule une tendance d'extinction de la persistance pour l'odeur est mise en évidence en fin de session. Pour tester cette hypothèse, l'effet de l'inactivation du CEL a été testé sur le reversal d'une tâche unimodale olfactive (rOLF1) ou tactile (rTACT1). Pour cela, quatre groupes expérimentaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO : n=8 pour rOLF1 et n=9 pour rTACT1) ou de LCR (groupe témoin : n=9 pour rOLF1 et n=9 pour rTACT1).

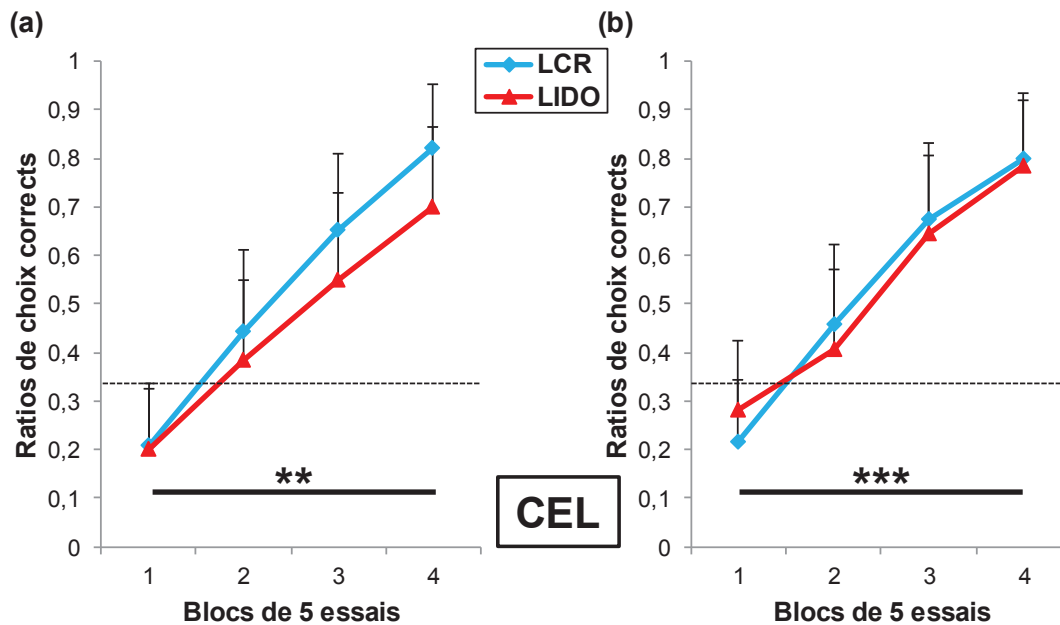


Figure 36 : Absence d'effet de l'injection de lidocaïne dans le CEL sur le reversal d'une tâche unimodale olfactive (a, rOLF1) ou tactile (b, rTACT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors du reversal rOLF1 et rTACT1 pour les deux groupes expérimentaux (LCR, en bleu, n=9 rats pour rOLF1 et n=9 rats pour rTACT1 ; LIDO, en rouge, n=8 rats pour rOLF1 et n=9 rats pour rTACT1). Un ratio de 0,33 représente le hasard. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ entre les blocs pour chaque groupe expérimental.

Les courbes de reversal rOLF1 et rTACT1 sont respectivement représentées sur les figures 36.a et 36.b pour les quatre groupes expérimentaux. Comme l'indiquent les figures, les ratios de choix corrects évoluent de façon similaire au cours des blocs pour les groupes témoin et LIDO lors du reversal de ces deux tâches, avec des scores qui avoisinent le critère de réussite à la fin de la session rOLF1 (de $0,21 \pm 0,13$ à $0,82 \pm 0,13$ pour le groupe témoin et de $0,20 \pm 0,13$ à $0,70 \pm 0,16$ pour le groupe LIDO) et rTACT1 (de $0,21 \pm 0,13$ à $0,80 \pm 0,13$ pour le groupe témoin et de $0,28 \pm 0,14$ à $0,79 \pm 0,14$ pour le groupe LIDO). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc pour les deux tâches ($F_{3,45} = 36,29$; $p < 0,001$ et $F_{3,48} = 24,52$; $p < 0,001$ pour rOLF1 et rTACT1 respectivement), mais pas d'effet significatif du facteur Drogue ($F_{1,15} = 1,00$; p n.s et $F_{1,16} = 0,01$; p n.s pour rOLF1 et rTACT1 respectivement), ni d'interaction significative entre les facteurs ($F_{3,45} = 0,40$; p n.s et $F_{3,48} = 0,84$; p n.s pour rOLF1 et rTACT1 respectivement). Une analyse sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,32} = 24,28$; $p < 0,001$) et LIDO ($F_{3,28} = 5,96$; $p < 0,01$) dans rOLF1, ainsi que pour les groupes témoin ($F_{3,32} = 10,06$; $p < 0,001$) et LIDO ($F_{3,32} = 10,10$; $p < 0,001$) dans rTACT1. Un test

post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des scores entre le bloc 1 et les blocs 3 et 4 pour les groupes témoins et LIDO dans les deux tâches ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement pour rOLF1 et rTACT1).

Ces données montrent que l'injection de lidocaïne ne perturbe pas le reversal unimodal olfactif ou tactile, ce qui suggère que l'inactivation du CEL n'affecte pas le processus d'extinction de la persistance olfactive. Dès lors, ces données confirment que les performances observées pour le groupe LIDO lors de la recombinaison OT3 ne seraient pas dues à un déficit de l'extinction de cette persistance, mais traduiraient plutôt un déficit dans la construction de l'association « (odeur-renforcement) – texture », tout en maintenant la formation de l'association unimodale « odeur-renforcement », comme observé pour l'acquisition OT2.

Dans une seconde partie, les mêmes traitements pharmacologiques ont été appliqués à l'hippocampe dorsal, dans le but de comparer les effets obtenus à ceux du groupe CEL.

B. Rôle de l'hippocampe dorsal (DH) dans l'apprentissage olfacto-tactile

Parmi les 90 animaux ayant appris la tâche OT1 (voir la section résultats du chapitre 1, page 68), 36 animaux ont été bilatéralement implantés avec des canules-guide dans la région CA1 de l'hippocampe dorsal (DH). Deux animaux sont décédés des suites de la chirurgie. Après une période de récupération post-opératoire de 10 jours, les 34 animaux implantés ont été soumis à une séance de réacquisition OT1 en une session unique de vingt essais. L'analyse du premier essai effectué sans renforcement montre que 91% des animaux (31/34) ont choisi la combinaison correcte (données non représentées).

1. Rôle du DH dans le rappel et la réacquisition d'une tâche précédemment apprise (OT1)

Vingt-quatre heures après la première session de réacquisition OT1, l'effet de l'inactivation du DH a été testé dans la réacquisition de la tâche OT1 précédemment apprise. Pour cela, deux groupes d'animaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO, $n=8$) ou de LCR (groupe témoin, $n=10$).

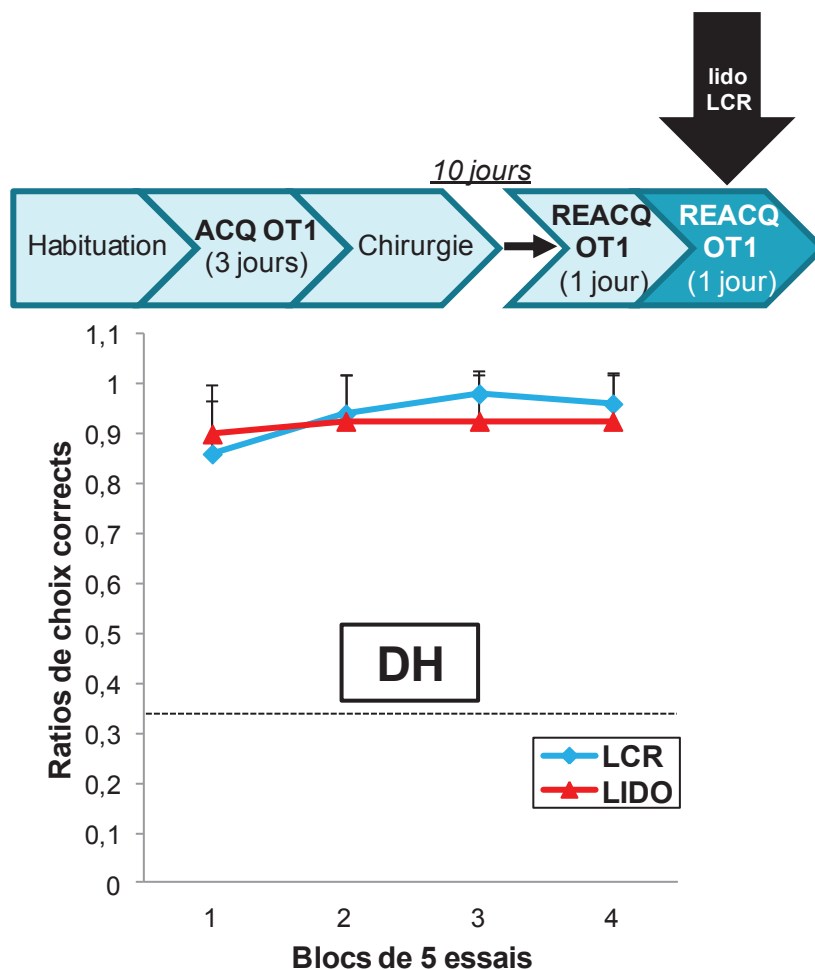


Figure 37 : Absence d'effet de l'injection de lidocaïne dans le DH sur la réacquisition d'une tâche bimodale précédemment apprise (OT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la réacquisition OT1 pour les deux groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=10$ rats ; LIDO, en rouge, $n=8$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard.

pas d'effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,48} = 1,77$; p n.s), pas d'effet significatif du facteur Drogue ($F_{1,16} = 1,13$; p n.s), et pas d'interaction significative entre les facteurs ($F_{3,48} = 0,70$; p n.s). Par ailleurs, la latence diminue au cours des blocs pour les deux groupes expérimentaux (d'une cinquantaine de secondes en début de session à une quinzaine de secondes en fin de session, données non représentées).

Les performances obtenues pour le premier essai par l'ensemble des animaux indiquent que l'activité du DH n'est pas indispensable pour le rappel de la tâche bimodale apprise dix jours plus tôt. Ainsi, l'injection de lidocaïne et/ou l'inactivation du DH n'induit aucun déficit sensorimoteur, motivationnel ou de discrimination sensorielle des stimuli olfactifs ou tactiles.

La chronologie des phases expérimentales ainsi que les courbes de réacquisition OT1 sont représentées sur la **figure 37** pour les deux groupes expérimentaux. L'analyse du premier essai effectué sans renforcement montre que 90% des animaux du groupe témoin et 100% des animaux du groupe LIDO ont choisi la combinaison correcte (données non représentées). Comme l'indique la figure, les ratios de choix corrects sont similaires entre les deux groupes expérimentaux avec une valeur supérieure au critère de réussite dès le début de la session (de $0,86 \pm 0,10$ à $0,96 \pm 0,06$ pour le groupe témoin et de $0,90 \pm 0,10$ à $0,93 \pm 0,09$ pour le groupe LIDO). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et ne montre

2. Rôle du DH dans l'acquisition d'une nouvelle tâche (OT2)

Deux jours après la réacquisition OT1, les effets de l'inactivation du DH ont été testés dans l'acquisition d'une nouvelle tâche OT utilisant de nouvelles combinaisons (OT2). Pour cela, quatre groupes d'animaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO, n=8), de dAPV (groupe APV, n=8), de scopolamine (groupe SCOPO, n=8) ou de LCR (groupe témoin, n=10).

La chronologie des phases expérimentales ainsi que les courbes d'acquisition OT2 sont représentées sur la **figure 38** pour les quatre groupes expérimentaux. Comme l'indique la **figure 38.a**, les profils des courbes d'apprentissages sont similaires entre les groupes, quel que soit le type de drogue injecté. Le ratio de choix corrects évolue progressivement au cours de la session pour les groupes témoin (de $0,50 \pm 0,15$ à $0,88 \pm 0,10$), LIDO (de $0,48 \pm 0,15$ à $0,93 \pm 0,09$), APV (de $0,49 \pm 0,15$ à $0,88 \pm 0,11$) et SCOPO (de $0,48 \pm 0,17$ à $0,93 \pm 0,09$) pour atteindre et dépasser le critère de réussite au cours du quatrième bloc. Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 72,53$; $p < 0,001$), mais pas d'effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 0,49$; p n.s), ni d'interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 0,55$; p n.s). Une analyse sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours des blocs pour les groupes témoins ($F_{3,36} = 19,30$; $p < 0,001$), LIDO ($F_{3,28} = 22,29$; $p < 0,001$), APV ($F_{3,28} = 13,12$; $p < 0,001$) et SCOPO ($F_{3,28} = 28,67$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des scores pour chaque groupe expérimental entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 ($p < 0,05$ à $p < 0,001$).

Par ailleurs, comme l'indique la **figure 38.b**, la latence diminue au cours de la session de manière similaire pour l'ensemble des groupes expérimentaux (d'une quarantaine de secondes en début de session à une quinzaine de secondes en moyenne en fin de session). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 60,00$; $p < 0,001$), mais pas d'effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 2,51$; p n.s), ni d'interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 0,65$; p n.s). Une analyse sur le facteur Bloc montre une diminution significative de la latence au cours des blocs pour les groupes témoins ($F_{3,36} = 14,52$; $p < 0,001$), LIDO ($F_{3,28} = 17,83$; $p < 0,001$), APV ($F_{3,28} = 14,94$; $p < 0,001$) et SCOPO ($F_{3,28} = 8,06$; $p < 0,001$).

De plus, nos données indiquent qu'au cours des premiers essais, il est fréquent que l'animal ne fouille aucun pot pendant les deux minutes qui lui sont imparties. Le nombre d'essais au cours desquels ce comportement est observé est indépendant du type de drogue injecté ($0,6 \pm 0,7$ essais pour le groupe témoin ; $0,8 \pm 0,7$ essais pour le groupe LIDO ; $0,9 \pm 0,8$ essais pour le groupe APV ; $1,3 \pm 1,2$ essais pour le groupe SCOPO ; analyse sur le facteur Drogue : $F_{3,30} = 0,89$; p n.s). Ce comportement de néophobie suggère que l'ensemble des animaux a bien détecté l'introduction de stimuli nouveaux.

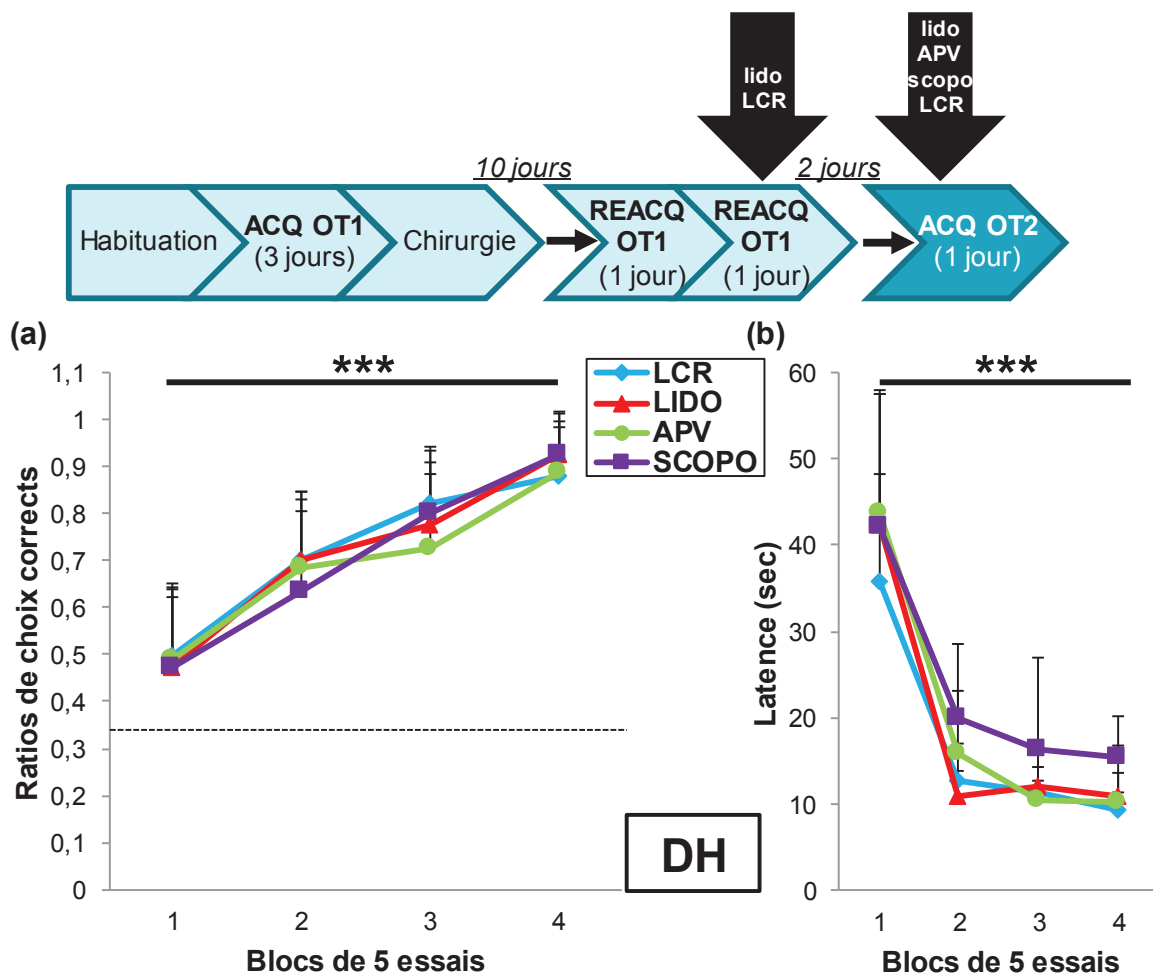


Figure 38 : Absence d'effet de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine dans le DH sur l'acquisition d'une nouvelle tâche bimodale (OT2). (a) Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. et (b) Moyenne des latences \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de l'acquisition OT2 pour les quatre groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=10$ rats ; LIDO, en rouge, $n=8$ rats ; APV, en vert, $n=8$ rats ; SCOPO, en violet, $n=8$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard. *** = $p < 0,001$ entre les blocs pour chaque groupe expérimental.

L'analyse des erreurs montre qu'elles consistent le plus souvent à choisir le pot C, soit celui contenant l'odeur associée au renforcement (**Figure 21**, page 70) comme observé lors de l'acquisition OT1 (voir la section résultats du chapitre 1, page 69). En effet, pour l'ensemble de la session, 78% (groupe témoin), 86% (groupe LIDO), 79% (groupe APV) et 78% (groupe SCOPO) des erreurs sont commises par choix du pot C, contre seulement 22%, 14%, 21 % et 22%, respectivement pour les quatre groupes, par choix du pot B, soit celui présentant la texture associée au renforcement (total du nombre d'erreurs pour les pots B et C : groupe témoin = 51 ; groupe LIDO = 43 ; groupe APV = 44 ; groupe SCOPO = 45). Des test-t à mesures appariées montrent que le nombre d'erreurs entre les pots B et C diffère significativement pour tous les groupes ($p < 0,01$).

En résumé, l'ensemble de ces données indique que l'inactivation du DH ne perturbe pas l'acquisition d'une tâche OT utilisant de nouveaux stimuli. De plus, l'analyse des courbes de latence pour chacun des groupes indique que cette variable ne diffère pas selon la drogue injectée, ce qui exclut des effets de type sensorimoteurs ou motivationnels.

3. Rôle du DH dans la recombinaison (OT3)

a. Effet de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine

Suite aux acquisitions successives OT1 et OT2, les effets de l'inactivation du DH ont été testés dans un apprentissage de recombinaison bimodale (OT3). Pour cela, quatre groupes d'animaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO, n=9), de dAPV (groupe APV, n=9), de scopolamine (groupe SCOPO, n=8) ou de LCR (groupe témoin, n=8). Les animaux injectés avec une drogue donnée lors de l'acquisition OT2 ont été injectés avec une autre drogue lors de la recombinaison OT3.

La chronologie des phases expérimentales ainsi que les courbes de recombinaison OT3 sont représentées sur la **figure 39** pour les quatre groupes expérimentaux. Comme l'indique la **figure 39.a**, les profils des courbes d'apprentissage diffèrent entre les groupes en fonction du type de drogue injecté. Le ratio de choix corrects progresse tout au long de la session pour les groupes témoin et APV pour atteindre le critère de réussite au cours du quatrième bloc (de $0,31 \pm 0,16$ à $0,88 \pm 0,12$ et de $0,28 \pm 0,14$ à $0,80 \pm 0,13$ respectivement). En revanche, les ratios de choix corrects des groupes LIDO et SCOPO ne montrent pas d'évolution et les scores se situent à des valeurs proches de 0,30 pour l'ensemble de la session (de $0,24 \pm 0,11$ à $0,31 \pm 0,15$ et de $0,21 \pm 0,12$ à $0,33 \pm 0,16$ respectivement). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 33,76$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 85,07$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 6,08$; $p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 19,08$; $p < 0,001$) et APV ($F_{3,32} = 33,22$; $p < 0,001$), mais pas pour les groupes LIDO ($F_{3,32} = 1,43$; p n.s) et SCOPO ($F_{3,28} = 2,12$; p n.s). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une progression significative des scores entre le bloc 1 et les blocs 3 et 4 pour les groupes témoin et APV ($p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Drogue montre une différence significative des scores entre les groupes dans le bloc 2 ($F_{3,30} = 3,98$; $p < 0,05$), dans le bloc 3 ($F_{3,30} = 22,32$; $p < 0,001$) et dans le bloc 4 ($F_{3,30} = 78,54$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre que les scores des groupes témoin et APV diffèrent significativement des scores des groupes LIDO et SCOPO dans les blocs 3 et 4 ($p < 0,001$).

Par ailleurs, comme l'indique la **figure 39.b**, la latence diminue au cours de la session pour l'ensemble des groupes expérimentaux. Toutefois, alors que la latence des groupes témoin et APV diminue pour atteindre une valeur proche de 10 secondes en fin de session, la latence des groupes LIDO et SCOPO reste élevée (autour de 25 secondes). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 40,20$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 7,59$; $p < 0,01$), mais pas d'interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 0,42$; p n.s). Une analyse sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 14,02$; $p < 0,001$), LIDO ($F_{3,32} = 9,21$; $p < 0,001$), APV ($F_{3,32} = 22,31$; $p < 0,001$) et SCOPO ($F_{3,28} = 9,46$; $p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Drogue montre une différence significative de la latence entre les groupes dans le bloc 3 ($F_{3,30} = 5,26$; $p < 0,05$) et dans le bloc 4 ($F_{3,30} = 7,07$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative de la latence entre le groupe

témoin, et les groupes LIDO et SCOPO dans le bloc 3 ($p < 0,05$), et entre les groupes témoin et SCOPO dans le bloc 4 ($p < 0,01$).

De plus, nos données indiquent qu'au cours des premiers essais, il est fréquent que l'animal ne fouille aucun pot pendant les deux minutes qui lui sont imparties. Cependant, si ce nombre d'essais non fouillés reste faible pour les groupes témoin ($0,4 \pm 0,5$) et APV ($1,0 \pm 0,9$), il est plus élevé pour les groupes LIDO ($3,3 \pm 1,9$) et SCOPO ($2,6 \pm 1,4$). Une analyse sur le facteur Drogue confirme cette observation et montre une différence significative du nombre d'essais non fouillés entre les groupes ($F_{3,30} = 7,25$; $p < 0,01$) et un test post-hoc (Bonferroni) montre que le nombre d'essais non fouillés des groupes témoin et APV est significativement différent de celui des groupes LIDO et SCOPO ($p < 0,05$).

Ces données suggèrent que la différence de latence entre les groupes dans les blocs 3 et 4 traduit un plus grand nombre d'essais non fouillés chez les groupes LIDO et SCOPO.

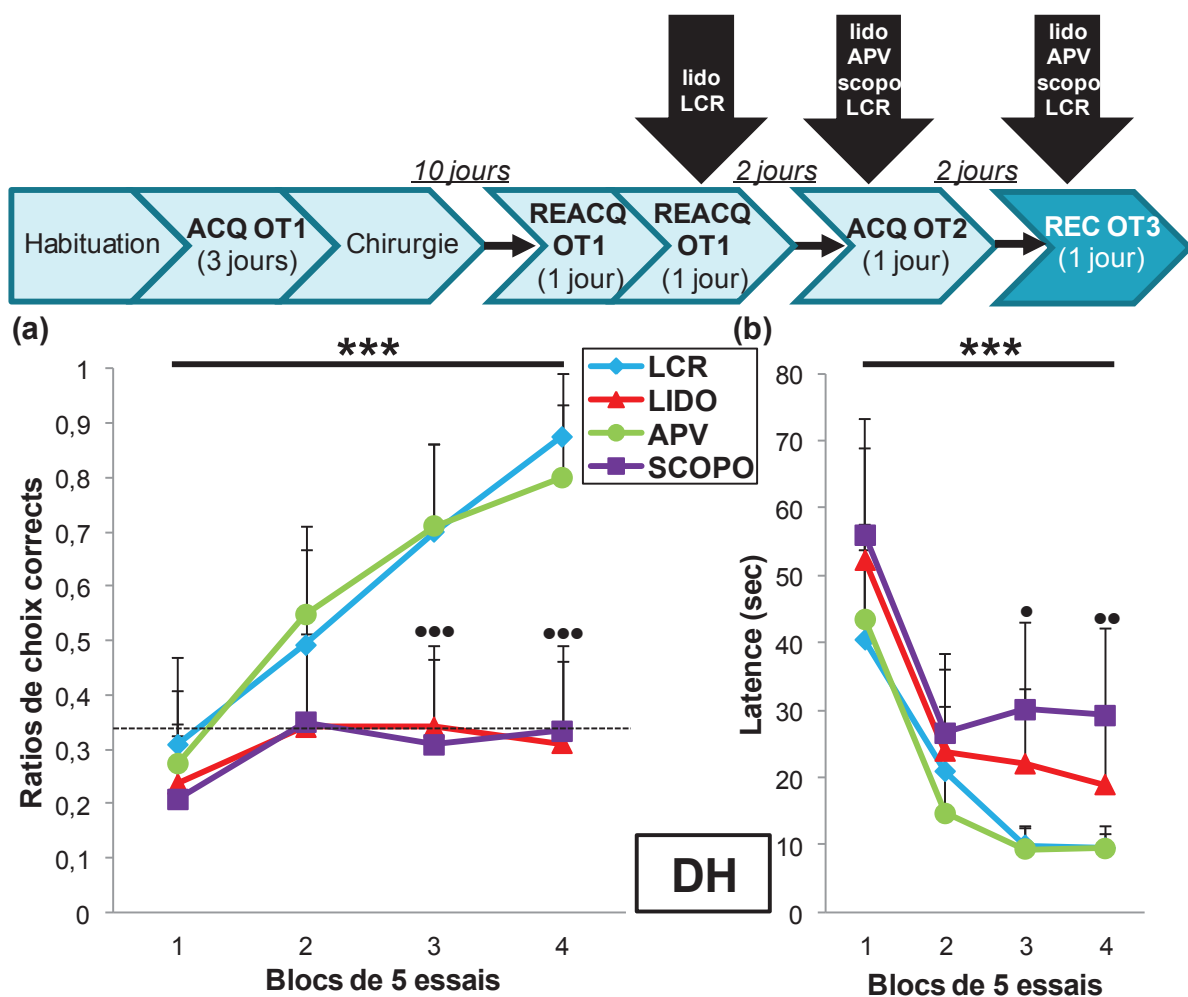


Figure 39 : Effet différentiel de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine dans le DH sur la recombinaison d'une tâche bimodale (OT3). (a) Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. et (b) Moyenne des latences \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la recombinaison OT3 pour les quatre groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=8$ rats ; LIDO, en rouge, $n=9$ rats ; APV, en vert, $n=9$ rats ; SCOPO, en violet, $n=8$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard. *** = $p < 0,001$ entre les blocs pour les groupes LCR et APV (a) et pour l'ensemble des groupes expérimentaux (b). • = $p < 0,05$; •• = $p < 0,01$; ••• = $p < 0,001$ dans un bloc donné comparé au groupe témoin.

L'analyse des erreurs montre qu'elles consistent le plus souvent à choisir le pot B, soit celui contenant l'odeur associée au renforcement dans OT1 ou dans OT2 (**Figure 21**, page 70 et **Tableau 4**, page 98). En effet, pour l'ensemble de la session de recombinaison, 62% (groupe témoin), 78% (groupe LIDO), 69% (groupe APV) et 82% (groupe SCOPO) des erreurs sont commises par choix du pot B, contre seulement 38%, 22%, 31% et 18%, respectivement pour les quatre groupes, par choix du pot C, soit celui présentant la texture précédemment renforcée dans OT1 ou OT2 (total du nombre d'erreurs pour les pots B et C : groupe témoin = 63 ; groupe LIDO = 108 ; groupe APV = 68 ; groupe SCOPO = 98). Des test-t à mesures appariées montrent que le nombre d'erreurs pour les pots B et C diffère significativement pour tous les groupes ($p < 0,05$ à $p < 0,01$).

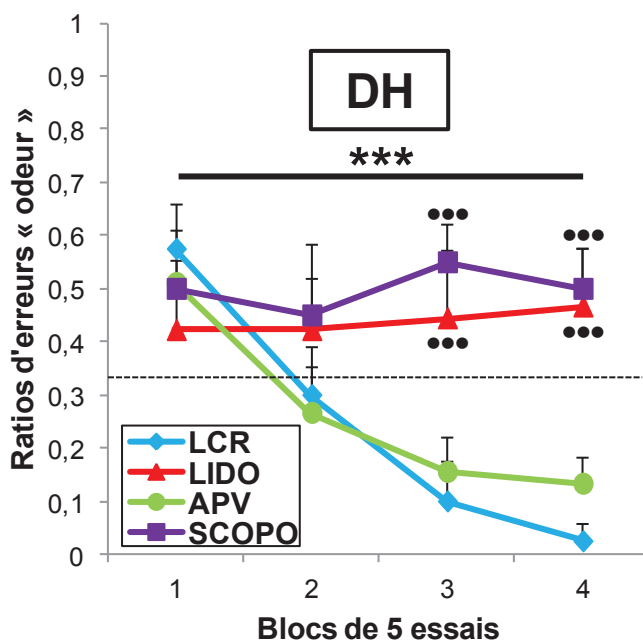


Figure 40 : Effet différentiel de l'injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine dans le DH sur la recombinaison d'une tâche bimodale (OT3). Moyenne des ratios d'erreurs \pm S.E.M. par choix de l'odeur précédemment renforcée dans l'une des acquisitions (OT1 ou OT2) dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors de la recombinaison OT3 pour les quatre groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=8$ rats ; LIDO, en rouge, $n=9$ rats ; APV, en vert, $n=9$ rats ; SCOPO, en violet, $n=8$ rats). Un ratio de 0,33 représente le hasard. *** = $p < 0,001$ entre les blocs pour les groupes LCR et APV. ••• = $p < 0,001$ dans un bloc donné comparé au groupe témoin.

D'autre part, lors du premier essai de la recombinaison OT3, 85% des animaux (29/34) ont choisi de fouiller le pot contenant l'odeur associée au renforcement dans l'une des deux précédentes acquisitions, et ce comportement de persistance se poursuit lors des essais suivants. La **figure 40** présente les ratios d'erreurs par choix de l'odeur précédemment renforcée lors de la session de recombinaison OT3 pour l'ensemble des groupes. Comme l'indique la figure, le ratio d'erreurs « odeur » évolue progressivement pour les groupes témoin et APV pour atteindre des valeurs proches de 0 à l'issue de la session (de $0,58 \pm 0,08$ à $0,03 \pm 0,04$ et de $0,51 \pm 0,10$ à $0,13 \pm 0,05$ respectivement). En revanche, ce ratio reste élevé pour l'ensemble de la session pour les groupes LIDO et SCOPO (de $0,42 \pm 0,08$ à $0,47 \pm 0,11$ et de $0,50 \pm 0,05$ à $0,50 \pm 0,08$ respectivement). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc ($F_{3,90} = 11,72$; $p < 0,001$), un effet significatif du facteur Drogue ($F_{3,30} = 10,80$; $p < 0,001$) et une interaction significative entre les facteurs ($F_{9,90} = 5,49$; $p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Bloc montre une évolution significative des ratios d'erreurs « odeur » au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 21,48$; $p < 0,001$) et APV ($F_{3,32} = 10,91$; $p < 0,001$), mais pas pour les groupes LIDO ($F_{3,32} = 0,07$; p

n.s) et SCOPO ($F_{3,28} = 0,72$; p n.s). Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des ratios d'erreurs « odeur » entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 pour les groupes témoin et APV ($p < 0,05$ à $p < 0,001$). Une analyse sur le facteur Drogue montre une différence significative des ratios d'erreurs « odeur » entre les groupes dans le bloc 3 ($F_{3,30} = 12,10$; $p < 0,001$) et dans le bloc 4 ($F_{3,30} = 20,95$; $p < 0,001$). Un test post-hoc (Bonferroni) montre que le ratio d'erreurs « odeur » des groupes témoin et APV diffère significativement de celui des groupes LIDO et SCOPO d'autre part dans les blocs 3 et 4 ($p < 0,001$).

L'ensemble de ces données indique que si les animaux des groupes témoin et APV apprennent la recombinaison OT progressivement au cours d'une session de vingt essais, l'injection de lidocaïne ou de scopolamine induit un déficit marqué de l'apprentissage de cette tâche. Par ailleurs, l'observation du type d'erreurs montre que la majorité correspond au choix de l'odeur précédemment associée au renforcement et ce, pour l'ensemble des groupes expérimentaux. Ceci montre d'une part que les différentes drogues n'ont pas induit de déficit du rappel de l'association « odeur-renforcement » acquise précédemment et d'autre part, que le choix des animaux est essentiellement guidé par l'odeur puisque le nombre d'erreurs commises par choix de la texture précédemment renforcée est beaucoup plus faible. L'analyse des courbes de ce ratio d'erreurs « odeur » montre que si les animaux des groupes témoin et APV persistent à choisir l'odeur précédemment renforcée au cours du premier bloc d'essai, cette persistance s'éteint au cours du second bloc puisque ce ratio atteint une valeur correspondant au hasard. Lors des deux derniers blocs, ce ratio d'erreurs atteint des valeurs proches de 0, ce qui traduit la mise en place de l'acquisition de la nouvelle association « odeur-renforcement ». En revanche, l'extinction de cette persistance olfactive n'apparaît pas pour les groupes ayant reçu une injection de lidocaïne ou de scopolamine dans le DH. La comparaison entre les courbes de ratios d'erreurs « odeur » et les courbes de ratios de choix corrects suggère que la lidocaïne et la scopolamine affectent le processus de persistance pour le stimulus olfactif précédemment renforcé. Dès lors le déficit observé dans OT3 résulte probablement d'un déficit du processus permettant l'extinction de cette persistance, laquelle est indispensable pour permettre la formation de l'association OT utilisant des stimuli familiers.

b. Effet réversible de la lidocaïne, de dAPV et de la scopolamine

Suite à la recombinaison OT3, l'ensemble des animaux a été soumis à une seconde session d'apprentissage de la tâche OT3, 96 heures après l'injection afin de tester la réversibilité de l'effet des drogues.

Les résultats montrent que les animaux ayant auparavant reçu une injection de LCR ou de dAPV présentent des scores relativement proches du critère de réussite dès le début de la session (de $0,73 \pm 0,15$ à $0,86 \pm 0,12$ et de $0,65 \pm 0,15$ à $0,89 \pm 0,11$ respectivement). En revanche, les animaux ayant précédemment reçu une injection de lidocaïne ou de scopolamine présentent des scores faibles en début de session, mais qui progressent pour atteindre et dépasser le critère de réussite en fin de session (de $0,32 \pm 0,14$ à $0,85 \pm 0,12$ et de $0,26 \pm 0,14$ à $0,80 \pm 0,14$ respectivement). Ainsi, l'ensemble des groupes atteint un ratio de choix corrects moyen minimum de 0,85 en fin de session (données non représentées).

Ces données montrent que les animaux n'ayant pas éteint la persistance pour l'odeur précédemment renforcée dans OT1 ou OT2 lors de la première session de recombinaison OT3 (groupes LIDO et SCOPO) sont capables d'éteindre cette persistance olfactive, puis de former l'association « odeur-renforcement », puis l'association « (odeur-renforcement) – texture » au cours de la seconde session de recombinaison de cette tâche.

c. Sélectivité du rôle du DH dans la recombinaison bimodale, et non dans le reversal unimodal

Parmi les 83 animaux ayant participé à l'étude portant sur l'apprentissage unimodal olfactif ou tactile (voir la section résultats du chapitre 1, page 78), 18 animaux ont tout d'abord été bilatéralement implantés avec des canules-guide dans le DH. Après une période de récupération post-opératoire de 10 jours, les animaux implantés ont été soumis à l'acquisition d'une première tâche unimodale OLF1 ou TACT1 en trois jours.

Les données de l'expérience ayant testé l'effet de l'inactivation du DH sur la recombinaison OT3 suggèrent que les effets induits par la lidocaïne et la scopolamine pourraient être dus à un déficit de l'extinction de la persistance pour le stimulus olfactif précédemment renforcé. Pour tester cette hypothèse, l'effet de l'inactivation du DH a été testé sur le reversal d'une tâche unimodale olfactive (rOLF1) ou tactile (rTACT1). Pour cela, quatre groupes expérimentaux ont reçu une injection locale de lidocaïne (groupe LIDO : n=10 pour rOLF1 et n=8 pour rTACT1) ou de LCR (groupe témoin : n=8 pour rOLF1 et n=9 pour rTACT1).

Les courbes de reversal rOLF1 et rTACT1 sont respectivement représentées sur les **figures 41.a et 41.b** pour les quatre groupes expérimentaux. Comme l'indiquent les figures, les ratios de choix corrects moyens évoluent de façon similaire au cours des blocs pour les groupes témoin et LIDO lors du reversal de ces deux tâches, avec des scores qui avoisinent le critère de réussite à la fin de la session rOLF1 (de $0,20 \pm 0,13$ à $0,75 \pm 0,16$ pour le groupe témoin et de $0,17 \pm 0,10$ à $0,73 \pm 0,14$ pour le groupe LIDO) et rTACT1 (de $0,25 \pm 0,09$ à $0,73 \pm 0,11$ pour le groupe témoin et de $0,17 \pm 0,10$ à $0,70 \pm 0,14$ pour le groupe LIDO). Une analyse statistique à deux facteurs (Drogue \times Bloc) à mesures répétées confirme ces observations et montre un effet significatif du facteur Bloc pour les deux tâches ($F_{3,48} = 33,69$; $p < 0,001$ et $F_{3,45} = 33,81$; $p < 0,001$ pour rOLF1 et rTACT1 respectivement), mais pas d'effet significatif du facteur Drogue ($F_{1,16} = 0,02$; p n.s et $F_{1,15} = 0,10$; p n.s pour rOLF1 et rTACT1 respectivement), ni d'interaction significative entre les facteurs ($F_{3,48} = 0,20$; p n.s et $F_{3,45} = 0,95$; p n.s pour rOLF1 et rTACT1 respectivement). Une analyse sur le facteur Bloc montre une progression significative des scores au cours des blocs pour les groupes témoin ($F_{3,28} = 17,16$; $p < 0,001$) et LIDO ($F_{3,28} = 12,90$; $p < 0,001$) dans rOLF1, ainsi que pour les groupes témoin ($F_{3,32} = 20,47$; $p < 0,001$) et LIDO ($F_{3,32} = 10,10$; $p < 0,001$) dans rTACT1. Un test post-hoc (Bonferroni) montre une différence significative des scores entre le bloc 1 et les blocs 2, 3 et 4 pour les groupes témoins et LIDO dans les deux tâches ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement pour rOLF1 et rTACT1).

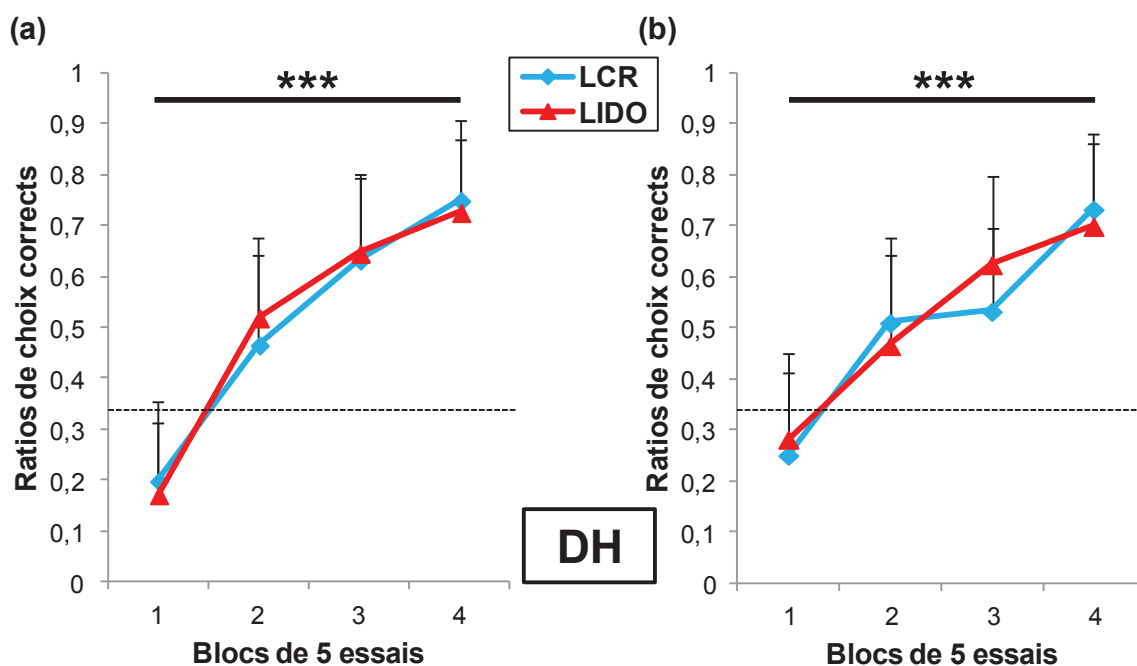


Figure 41 : Absence d'effet de l'injection de lidocaïne dans le DH sur le reversal d'une tâche unimodale olfactive (a, rOLF1) ou tactile (b, rTACT1). Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de cinq essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors du reversal rOLF1 et rTACT1 pour les deux groupes expérimentaux (LCR, en bleu, $n=8$ rats pour rOLF1 et $n=9$ rats pour rTACT1 ; LIDO, en rouge, $n=10$ rats pour rOLF1 et $n=8$ rats pour rTACT1). Un ratio de 0,33 représente le hasard. *** = $p<0,001$ entre les blocs pour chaque groupe expérimental.

Ces données montrent que l'injection de lidocaïne ne perturbe pas le reversal unimodal olfactif ou tactile, ce qui suggère que l'inactivation du DH n'affecte pas le processus d'extinction de la persistance olfactive. Dès lors, ces données indiquent que les performances observées pour les groupes LIDO et SCOPO lors de la recombinaison OT3 résultent d'un déficit du processus d'extinction de la persistance pour l'association « (odeur-renforcement) – texture » précédemment apprise. En effet, même si les animaux commettent très peu d'erreurs lors de la recombinaison OT3 par sélection du stimulus tactile associé au renforcement dans OT1 ou OT2, les stimuli olfactif et tactile précédemment renforcés sont présentés sur des pots différents (**Tableau 4**), et comme décrit dans la section discussion du chapitre 1 (page 88), les rongeurs semblent plus naturellement se fier aux stimuli olfactifs qu'aux stimuli tactiles, quand ils sont confrontés à un choix pour obtenir un renforcement de nature alimentaire. Ceci explique alors la persistance olfactive et non tactile observée lors de la recombinaison, et les résultats différentiels de l'inactivation du DH sur la persistance olfactive lors du reversal d'une tâche unimodale olfactive et lors de la recombinaison d'une tâche bimodale OT.

C. Contrôle histologique des sites d'injection

Parmi les 117 animaux implantés bilatéralement dans le CEL, les sites d'injection de quatre animaux ont été localisés dans la région médiane du cortex entorhinal. Tous les animaux (n=113) dont les sites d'injection ont été observés dans le CEL (**Figure 42**) ont été inclus dans les analyses statistiques.

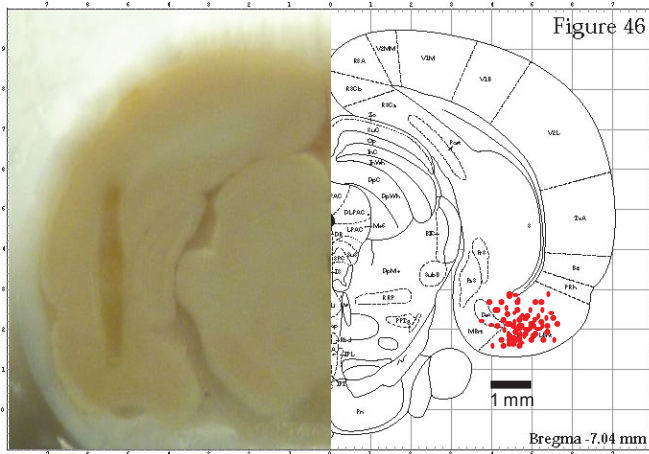


Figure 42 : Planche anatomique représentant la localisation des sites d'injection dans le CEL pour l'ensemble des groupes expérimentaux. Sur la partie gauche de la figure est représentée une photographie de l'hémisphère droit d'un animal lors de la coupe au cryostat. Sur cette photographie, la trace de la canule-guide est visible. La partie droite de la figure représente les sites d'injection de l'ensemble des animaux qui ont été observés sur les lames colorées, et placés sur la planche 46 de l'atlas de Paxinos et Watson (2005).

Parmi les 59 animaux implantés bilatéralement dans le DH, les sites d'injection de deux animaux ont été localisés dans le cortex somesthésique associé à la sensibilité du tronc. Tous les animaux (n=57) dont les sites d'injection ont été observés dans le DH (**Figure 43**) ont été inclus dans les analyses statistiques. Conformément aux coordonnées d'implantation choisies, la grande majorité des sites d'injection a été localisé dans la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1).

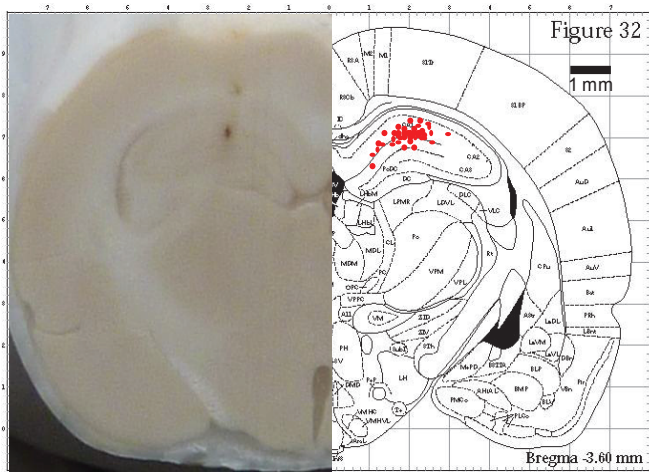


Figure 43 : Planche anatomique représentant la localisation des sites d'injection dans le DH pour l'ensemble des groupes expérimentaux. La grande majorité des animaux a reçu une injection dans la région CA1. Sur la partie gauche de la figure est représentée une photographie de l'hémisphère droit d'un animal lors de la coupe au cryostat. Sur cette photographie, le point d'injection est visible. La partie droite de la figure représente les sites d'injection de l'ensemble des animaux qui ont été observés sur les lames colorées, et placés sur la planche 32 de l'atlas de Paxinos et Watson (2005).

III. **DISCUSSION**

A. **Critique de la technique utilisée**

1. **Avantages de l'approche expérimentale choisie dans cette étude**

La technique de microinjection utilisée ici permet de manipuler localement l'activité d'une structure de manière réversible. Recevant des microinjections de LCR et d'une drogue (lidocaïne, dAPV ou scopolamine) au cours de deux sessions d'apprentissage successif, chaque animal peut ainsi constituer son propre contrôle. Ceci permet d'effectuer des comparaisons intra-groupes, et de diminuer le nombre d'animaux inclus dans l'expérience en accord avec la règle des trois « R » (Réduire, Raffiner, Remplacer), qui régit les réglementations en matière d'éthique et de bien-être animal. De plus, il est possible d'utiliser des drogues en faible volume et concentration, ce qui permet d'agir finement sur l'activité de la structure cible. Enfin, cette technique permet de tester le rôle de différents systèmes de neurotransmission, et ce, à plusieurs reprises au cours de différentes procédures expérimentales (à condition qu'un délai minimum de récupération de 48h soit respecté entre chaque injection).

2. **Efficacité des doses injectées**

Les doses utilisées dans nos travaux sont celles recommandées et utilisées dans la littérature, s'accordant sur leur efficacité pour bloquer l'activité globale par injection de lidocaïne (40 µg/µL – *Packard et McGaugh, 1996 ; Bohbot et al., 2007 ; Chang et al., 2008*), pour bloquer la transmission glutamatergique NMDA dépendante par injection de dAPV (5 µg/µL – *Morris et al., 1989 ; Schenberg et al., 2005*) et pour bloquer la transmission cholinergique muscarinique par injection de scopolamine (7,5 µg/µL – *Khakpai et al., 2012 ; Piri et al., 2013*) au niveau des structures cibles.

En accord avec cette littérature, nos résultats montrent que les doses de lidocaïne, de dAPV et de scopolamine injectées dans le CEL ou dans le dCA1 sont efficaces pour affecter les performances lors de l'apprentissage d'une tâche associative relationnelle bimodale. Ces données suggèrent donc que même si le CEL et le dCA1 sont des structures volumineuses d'une dizaine de mm³ chacune (*Paxinos et Watson, 2005*), les doses injectées en un seul site inactivent suffisamment de récepteurs pour bloquer son activité de manière efficace. Dès lors, l'absence d'effet observé suite à l'injection de dAPV dans le dCA1 lors de la recombinaison ne résulte pas de l'utilisation d'une dose insuffisante, mais plus vraisemblablement de la non-implication du système de neurotransmission visé dans la structure d'intérêt pour le processus cognitif étudié.

3. **Rapidité de l'apprentissage compatible avec l'approche pharmacologique**

La rapidité avec laquelle l'apprentissage de la tâche OT s'établit autorise l'utilisation de microinjections pour tester l'implication d'une structure dans un processus cognitif particulier. En effet, le transfert du principe de l'apprentissage d'une première tâche permet d'étudier les processus sous-tendant l'apprentissage des tâches suivantes, qui s'établissent rapidement, en une session unique de vingt essais. D'autre part, une session d'apprentissage comprend vingt essais et dure une vingtaine de minutes. Ceci permet

d'utiliser des drogues dont la durée d'action est de l'ordre d'une trentaine de minutes (durée variable selon le volume et la concentration ; *Packard et McGaugh, 1996*).

4. Effet non spécifique lié aux injections

Suite à la procédure de microinjection, quelques animaux ont présenté une crise d'épilepsie minime, indépendamment du type de structure visée et de la drogue injectée. Dans ce cas, les animaux ont été replacés dans leur cage d'habitation après la microinjection, et ont débuté la session d'apprentissage quelques minutes après la fin de la crise, de manière à ne pas affecter les temps de réponse.

B. Récapitulatif des effets obtenus dans l'ensemble de l'étude pharmacologique

CEL		Lidocaïne	dAPV	Scopolamine
Bimodal	Réacquisition OT1			
	Acquisition OT2	Déficit ++	Déficit ++	Déficit +
	Recombinaison OT3	Déficit ++	Déficit ++	Déficit +
Unimodal	Acquisition OLF			
	Acquisition TACT			
	Reversal OLF			
	Reversal TACT			

DH		Lidocaïne	dAPV	Scopolamine
Bimodal	Réacquisition OT1			
	Acquisition OT2			
	Recombinaison OT3	Déficit +++		Déficit +++
Unimodal	Reversal OLF			
	Reversal TACT			

Tableau 9 : Récapitulatif des effets obtenus dans l'ensemble de l'étude pharmacologique d'inactivation du cortex entorhinal latéral (CEL, partie haute) et de l'hippocampe dorsal (DH, partie basse) par injection de lidocaïne, de dAPV ou de scopolamine. La couleur verte symbolise une absence de déficit de l'injection effectuée et la couleur rouge symbolise un déficit d'importance variable : « Déficit + » indique une perturbation transitoire ; « Déficit ++ » indique une forte perturbation ; « Déficit +++ » indique une très forte perturbation. Les cases noires symbolisent les cas de figure non testés.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet de deux publications (*Boisselier et al., 2014 ; Boisselier et al., 2016*). Les arguments développés dans ces deux articles sont brièvement repris dans cette discussion, et complétés par des raisonnements et des modèles complémentaires.

1. Justification de l'étude par rapport à la littérature

La littérature s'intéressant à l'implication du cortex entorhinal (CE) dans les apprentissages multisensoriels est relativement mince (voir la section 1 de l'introduction, pages 38 et 39). Le rôle de la région parahippocampique (cortex périrhinal et CE) dans l'apprentissage de paires d'odeurs a toutefois été testé (*Bunsey et Eichenbaum, 1993*) et les auteurs de cette étude ont mis en évidence son rôle critique dans les processus sous-tendant la formation d'associations « odeur-odeur ». D'autre part, une étude s'est intéressée au rôle du CE dans l'acquisition d'une association entre un stimulus visuel et un stimulus auditif (*Chen et al., 2013*). Toutefois, cette association est créée artificiellement, par stimulation électrique du cortex auditif suite à l'émission d'un stimulus visuel dans l'environnement de l'animal. Les auteurs ont néanmoins montré que l'inactivation du CE empêche ce type d'apprentissage bimodal. D'autre part, l'hippocampe est impliqué dans certains apprentissages bimodaux (voir la section 1 de l'introduction, pages 38 et 39) et est étroitement connecté avec le CE.

Néanmoins, malgré l'abondance de données anatomiques illustrant le CE comme un centre de convergence des informations sensorielles (*Burwell, 2000 ; Kerr et al., 2007 ; Agster et Burwell, 2009*) étroitement connecté avec l'hippocampe (pour revue, *Witter, 1993*), peu d'études ont visé à sélectivement tester le rôle fonctionnel respectif de ces deux structures dans la formation d'associations entre différents stimuli non contextuels.

2. Rejet de plusieurs interprétations globales pouvant justifier les déficits obtenus

Les performances obtenues par l'ensemble des animaux lors de la réacquisition de la tâche OT1 montrent que l'inactivation du CEL (**Figure 31, page 104**) ou du DH (**Figure 37, page 117**) et/ou l'injection de lidocaïne dans ces structures n'induit pas de déficit du traitement sensoriel des odeurs et des textures. De plus, les différents déficits obtenus dans l'acquisition et dans la recombinaison ne sont pas issus d'un déficit du comportement moteur de l'animal, comme le montrent les mesures de latence lors de ces tâches, en opposition avec la littérature ayant montré que l'injection de dAPV peut perturber le comportement sensorimoteur des animaux testés lors d'un apprentissage spatial (*Morris, 1989 ; Cain et al., 1996*). D'autre part, ces déficits ne sont pas liés à un déficit de l'application du principe général de la tâche, ni d'un déficit dans les processus de prise de décision étant donné que les animaux continuent de creuser dans les pots. Enfin, il est peu vraisemblable que les déficits obtenus reposent sur un déficit attentionnel. En effet, même si les apprentissages bimodaux proposés nécessitent que l'animal fasse preuve d'une attention soutenue, les traitements pharmacologiques appliqués sont locaux.

C. Acquisition d'une tâche olfacto-tactile : Rôle du cortex entorhinal latéral et de l'hippocampe dorsal

1. Résumé des données obtenues

L'inactivation du CEL perturbe l'acquisition d'une tâche consistant à former des associations entre une odeur et une texture. En effet, si les animaux témoins commettent quelques erreurs, notamment au cours des dix premiers essais, ils progressent très vite et atteignent un ratio de choix corrects proche de 0,90 à l'issue de la session de vingt essais. En revanche, les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de dAPV dans le CEL présentent des performances avoisinant un ratio de choix corrects de 0,50 maximum seulement. L'inactivation du CEL ou des récepteurs NMDA de ce cortex induit donc un déficit de l'acquisition de la tâche OT, indiquant que la composante glutamatergique du CEL semble indispensable pour les processus sous-tendant la formation d'une association bimodale. D'autre part, les animaux ayant reçu une injection de scopolamine obtiennent des scores autour de 0,50 pendant les trois quarts de la session, avant de progresser au cours des derniers essais, pour atteindre des performances proches de celles observées dans le groupe témoin (**Figure 32**, page 107). Ainsi, l'injection de scopolamine induit uniquement un retard de l'apprentissage de l'association « (odeur-renforcement) – texture ». Structure de convergence des informations sensorielles, le CEL est donc fonctionnellement nécessaire pour former une association bimodale OT.

En revanche, l'inactivation du DH (globale par injection de lidocaïne, du système glutamatergique de type NMDA par injection de dAPV ou de la modulation cholinergique muscarinique par injection de scopolamine) ne perturbe pas l'acquisition d'une tâche consistant à former des associations entre une odeur et une texture. En effet, après quelques erreurs au cours de la première partie de la session, l'ensemble des animaux progresse rapidement et atteint un ratio de choix corrects autour de 0,90 à l'issue de la session (**Figure 38**, page 119). Ainsi, en dépit de la convergence des informations sensorielles du CE sur cette structure (pour revue, *Witter, 1993*), le DH n'est pas indispensable pour la construction d'associations bimodales OT.

2. Rejet de plusieurs interprétations pouvant expliquer le rôle du CEL dans l'acquisition d'une tâche olfacto-tactile

a. Formation de l'association unimodale « odeur-renforcement » ?

L'analyse des erreurs indique que la majorité est commise par choix du pot présentant l'odeur correcte (et la texture incorrecte), et ce, pour chaque groupe expérimental. Les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de dAPV dans le CEL commettent de nombreuses erreurs par choix de ce pot et ce, pendant toute la session : ces données suggèrent donc que ces animaux ont effectivement acquis l'association unimodale « odeur-renforcement », mais qu'ils ne parviennent pas à la combiner avec le stimulus tactile, pour former l'association « (odeur-renforcement) – texture », malgré un échantillonnage actif de la texture avec leurs vibrisses. Sachant que deux des trois pots contiennent l'odeur renforcée, l'obtention d'un ratio de choix corrects de 0,50 suggère que les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de dAPV dans le CEL choisissent au hasard entre ces deux pots. Une forte proportion d'erreurs par choix du pot contenant l'odeur

renforcée est également observée pour les animaux ayant reçu une injection de scopolamine dans le CEL, mais uniquement au cours des quinze premiers essais de la session. Ces données mettent en évidence la formation initiale de l'association unimodale « odeur-renforcement » (ratio de choix corrects de 0,50 obtenu par ces animaux lors des trois premiers blocs de la session d'acquisition).

Ces observations sont confirmées par l'absence d'effet de l'injection de lidocaïne dans le CEL sur les performances obtenues lors de l'acquisition de la tâche unimodale olfactive (**Figure 33.a, page 109**). L'ensemble de nos données indique donc que le CEL n'est pas nécessaire pour former une association unimodale « odeur-renforcement », en accord avec d'autres travaux (*Bunsey et Eichenbaum, 1993*). Des études suggèrent en effet que ce type d'apprentissage simple de type Go-NoGo impliquant la modalité olfactive est indépendant du fonctionnement de la formation hippocampique (*Eichenbaum et al., 1986*). Ce type d'apprentissage repose en revanche sur l'activité des cortex de traitement sensoriel primaire et secondaire, tels que le bulbe olfactif (*Gray et Freeman, 1986 ; Gervais et al., 1988*), le cortex piriforme (*Litaudon et al., 1997 ; pour revue, Wilson et Sullivan, 2011*) et le noyau thalamique médio-dorsal (*Lu et Slotnick, 1990 ; Slotnick et Risser, 1990*). D'autres structures comme l'amygdale (*Cousens et Otto, 1998 ; Hegoburu et al., 2014*) ou le cortex orbitofrontal (*Ramus et Eichenbaum, 2003 ; Schoenbaum et al., 2003 ; Roesch et al., 2006*) sont également sollicitées dans certaines formes d'apprentissage associatif simple impliquant la modalité olfactive. Ces résultats confirment l'implication du circuit cortico-cortical et thalamo-cortical, et non du circuit cortico-hippocampique dans l'apprentissage de l'association « odeur-renforcement ».

b. Formation de l'association unimodale « tactile-renforcement » ?

L'absence de déficit observé lors de l'acquisition de la tâche unimodale tactile suite à l'injection de lidocaïne dans le CEL montre que ce cortex n'est pas nécessaire pour la formation de l'association unimodale « texture-renforcement » (**Figure 33.b, page 109**). Toutefois, à notre connaissance, la littérature est très peu fournie au sujet des structures sous-tendant les apprentissages simples de type Go-NoGo impliquant la modalité tactile. Dès lors, seules des hypothèses peuvent être formulées quant aux structures effectivement sollicitées pour ce type d'apprentissage. De façon similaire aux études s'intéressant à l'apprentissage olfactif, il est donc vraisemblable que les cortex somesthésiques primaire et secondaire soient sollicités dans la formation d'associations utilisant un stimulus tactile, mais cette hypothèse demande à être vérifiée.

c. Effet transitoire de la scopolamine : un problème de diffusion ?

Les données montrent que les animaux ayant reçu une injection de scopolamine dans le CEL améliorent fortement leurs scores entre le troisième et le quatrième bloc d'essais de la session d'acquisition (**Figure 32, page 107**). Cette soudaine amélioration des performances pourrait être liée à la méthode utilisée. En effet, les processus de diffusion inhérents à une approche pharmacologique pourraient être responsables de cet effet, c'est-à-dire que l'amélioration des performances en fin de session pourrait simplement être liée au fait que la drogue n'agisse plus efficacement dans la structure ciblée, en raison de processus

de diffusion. Cependant, il a été montré que la durée d'action de la scopolamine injectée à une concentration similaire à la nôtre peut s'élever jusqu'à une heure (*Piri et al., 2013*). D'autre part, la durée totale de chaque session (depuis la microinjection jusqu'à la fin du dernier essai) a soigneusement été notée pour chaque animal : il s'avère qu'une importante variabilité a été observée, certains animaux terminant la session rapidement, soit en une quinzaine de minutes, d'autres nécessitant jusqu'à trente minutes. Or, malgré cette hétérogénéité intra-groupe concernant la durée nécessaire pour effectuer l'intégralité de la session, l'analyse des performances de chaque essai montre clairement que chaque animal progresse à partir du 14^{ème} ou du 15^{ème} essai de la session. Celui-ci étant effectué à des intervalles de temps variables à compter de l'injection, il est peu probable que l'amélioration des performances des animaux au cours des derniers essais résulte simplement de la fin d'efficacité de la drogue injectée.

Les déficits comportementaux mis en évidence lors de l'acquisition de la tâche bimodale olfacto-tactile suite aux différentes manipulations pharmacologiques de l'activité du CEL ne reposent donc pas sur un déficit de la formation de l'association unimodale « odeur-renforcement » ou « texture-renforcement », et l'amélioration tardive des performances des animaux ayant reçu une injection de scopolamine n'est pas liée à une diffusion de la drogue injectée.

L'ensemble des données obtenues lors de l'apprentissage de la tâche bimodale OT et des tâches unimodales olfactive et tactile permet de mieux caractériser la stratégie mise en place par l'animal pour résoudre la tâche olfacto-tactile (O1T1 + ; O2T1 – ; O1T2 –, + indiquant la combinaison renforcée et – indiquant les deux combinaisons non renforcées). Comme précédemment évoqué (voir la [section discussion du chapitre 1, page 85](#)), deux stratégies peuvent être employées par l'animal : associer les éléments O1 et T1 avec le renforcement, ou éliminer les éléments O2 et T2. Les données issues des apprentissages unimodaux indiquent que la capacité de former des associations « odeur-renforcement » et « texture-renforcement » est préservée suite à l'inactivation du CEL. Or, l'inactivation de cette structure induit un déficit de l'apprentissage de la tâche OT. Ces données appuient donc l'hypothèse selon laquelle les animaux acquièrent la tâche bimodale par association entre O1, T1 et le renforcement, et non par double apprentissage unimodal consistant à éviter les éléments O2 et T2.

3. Interprétations des déficits observés dans le CEL lors de l'acquisition de la tâche olfacto-tactile

Les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de dAPV dans le CEL présentent donc un déficit dans la formation de l'association entre la paire « odeur-renforcement » et le stimulus tactile, tandis que les animaux ayant reçu une injection de scopolamine ne présentent qu'un déficit qui se traduit par un retard de la construction de l'association bimodale « (odeur-renforcement) – texture ».

a. Déficit du maintien en mémoire à court-terme sensorielle ?

Des études ont montré que l'inactivation du CE ou l'inactivation des récepteurs cholinergiques muscariniques de ce cortex induit un déficit de la formation de l'association « son-choc » quand les deux stimuli sont séparés par un très bref délai (500 ms : *Tanninen et al., 2015*) ou par un court délai (30 secondes : *Esclassan et al., 2009*). En revanche, l'inactivation du CE n'induit aucun déficit quand les stimuli sont présentés simultanément (*Esclassan et al., 2009*).

Ces résultats suggèrent que le CE est impliqué dans le processus de maintien en mémoire sensorielle d'un stimulus A pendant l'intervalle de temps le séparant de la présentation du stimulus B avec lequel l'association doit être formée. Ce maintien en mémoire est sous-tendu par l'activité persistante des neurones de la couche III du CE (*Suh et al., 2011*) et cette activité est modulée par le système cholinergique (*McGaughy et al., 2005 ; Tahvildari et al., 2007*). De plus, les projections issues de cette couche superficielle (pour revue, *Witter, 1993*) induisent une activité persistante au niveau de la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1 ; *Kitamura et al., 2015*). Ainsi, le circuit « entorhinal-hippocampe » sous-tend la formation d'associations entre stimuli discontinus dans le temps, et donc plus généralement la mémoire associative temporelle. De plus, un nouveau type de cellules excitatrices a été découvert dans la couche II du CE : les island cells (*Kitamura et al., 2014*). Ces neurones se projettent sur le dCA1, à proximité de la région recevant des projections issues de la couche III du CE. Le rôle des island cells serait d'inhiber l'activité persistante induite par la couche III du CE au niveau du dCA1 pendant le maintien en mémoire à très court-terme du stimulus A, par l'activation d'un réseau d'interneurones (**Figure 44**). Cette inhibition interviendrait lorsque les deux stimuli A et B sont associés, afin de limiter les erreurs d'appariement entre les différentes associations à former.

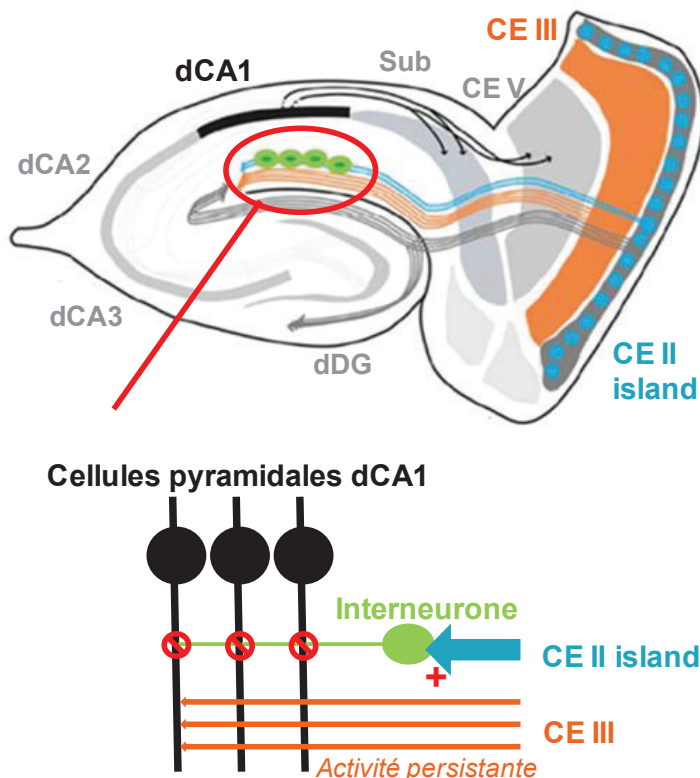


Figure 44 : Circuit « entorhinal-hippocampe » impliqué dans le maintien à court-terme d'une information sensorielle. La couche III du cortex entorhinal (CE III) induit une activité persistante au niveau des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1) pendant le maintien en mémoire du stimulus A. Une fois l'association formée entre les stimuli A et B, les island cells de la couche II du CE (CE II island) activent les interneurones du dCA1, ce qui permet d'inactiver les cellules pyramidales de cette région de l'hippocampe. Ce mécanisme permet de limiter les erreurs d'appariement entre les différentes associations. A partir de *Kitamura et al., 2015*.

Dès lors, notre paradigme OT étant caractérisé par un bref délai (quelques centaines de ms) entre l'échantillonnage du stimulus tactile et celui du stimulus olfactif, les effets persistants observés suite à l'injection de lidocaïne ou de dAPV, et les effets transitoires observés suite à l'injection de scopolamine dans le CEL pourraient être dus à un déficit du maintien en mémoire à court-terme du stimulus tactile (présenté sur le contour extérieur du pot), dans l'attente de la formation de l'association avec le stimulus olfactif (diffusant à travers la couche de sciure ; **Figure 29**, page 86). Cette hypothèse expliquerait pourquoi les animaux fondent uniquement leur choix sur le stimulus olfactif, dernier indice échantillonné avant la prise de décision (fouille ou non du pot), et parviennent néanmoins à former une association unimodale « odeur-renforcement » lors de l'acquisition de la tâche OT.

Toutefois, si l'activité persistante cholinergique dépendante des neurones de la couche III a été détectée dans la région latérale du CE, les island cells ont à notre connaissance été uniquement mises en évidence dans la région médiane de ce cortex. Dès lors, l'ensemble du circuit précédemment décrit entre le CE et la région CA1 de l'hippocampe dorsal reste hypothétique dans le CEL, et demanderait à être étudié. D'autre part, l'analyse vidéo du comportement des animaux au cours de l'apprentissage montre qu'au fil des jours de conditionnement, le délai entre l'échantillonnage successif du stimulus tactile, puis du stimulus olfactif se réduit (100 à 200 ms), suggérant que la perturbation des performances observée suite à l'inactivation du CEL ne repose pas uniquement sur un déficit du maintien en mémoire à court-terme de l'information tactile.

b. Déficit du processus de désambiguïsation des éléments recouvrants ?

Le paradigme utilisé repose sur la présentation de combinaisons utilisant des éléments recouvrants, puisque chaque paire de stimuli comprend un élément présent dans une autre combinaison (O1T1 + ; O2T1 - ; O1T2 - ; + indiquant la combinaison renforcée, - indiquant les deux combinaisons non renforcées). Dès lors, pour résoudre cette tâche et construire une représentation distincte de chaque combinaison, l'animal doit opérer un processus de désambiguïsation des éléments recouvrants. Si l'hippocampe a été montré comme impliqué dans ce processus cognitif (*Sohal et Hasselmo, 1998 ; Agster et al., 2002*), certaines études suggèrent que le CE joue également un rôle crucial dans la mise en relation et le maintien en mémoire des représentations permettant de distinguer des événements recouvrants et/ou des stimuli présentant des caractéristiques communes (*Lipton et al., 2007 ; Newmark et al., 2013*). Dès lors, les effets induits par l'inactivation du CEL pourraient résulter d'un déficit de la capacité des animaux à distinguer des objets présentant des éléments communs. Cette hypothèse est en accord avec les données obtenues suite à la lésion de la région parahippocampique (CE et cortex périrhinal) dans un paradigme d'associations « odeur-odeur » utilisant également des éléments recouvrants. En effet, dans cette tâche, les animaux doivent apprendre à sélectionner les deux paires d'odeurs renforcées (AB+ et DC+) et à éviter les deux paires non renforcées composées d'éléments recouvrants (AC- et DB- ; *Bunsey et Eichenbaum, 1993*).

Selon cette hypothèse, suite à l'inactivation du CEL, l'animal ne peut donc plus discriminer les deux pots contenant la même odeur, mais présentant une texture différente, et choisissent au hasard entre les deux pots contenant l'odeur renforcée, dernier indice

échantillonné avant la fouille du pot (**Figure 29**, page 86). Ce processus expliquerait le ratio de choix corrects de 0,50 obtenu tout au long de la session chez les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de dAPV, et pendant les trois premiers quarts de la session chez les animaux ayant reçu une injection de scopolamine dans le CEL.

c. Déficit de l'induction et de la facilitation de la LTP ?

La formation d'une association entre deux stimuli est vraisemblablement sous-tendue par un mécanisme de type LTP, lequel repose sur une cascade d'activation modulée par l'acétylcholine et implique notamment les récepteurs glutamatergiques de type NMDA (**Figure 45**).

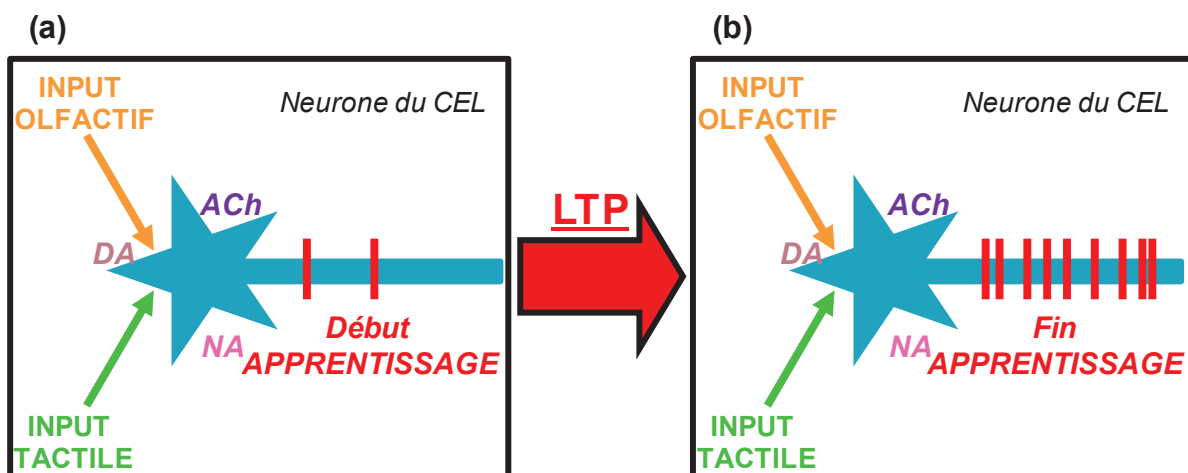


Figure 45 : Schéma illustrant le principe de la LTP lors d'un apprentissage associatif bimodal. (a) Au début de l'apprentissage, l'arrivée de l'information olfactive et de l'information tactile induit une réponse de faible amplitude au niveau des neurones du CEL. (b) Au cours de l'apprentissage et grâce au mécanisme de LTP, les mêmes inputs sensoriels déclenchent une forte réponse au niveau des neurones du CEL. Les neurotransmetteurs cholinergiques (ACh), dopaminergiques (DA) et noradrénergiques (NA) favorisent l'induction de la LTP.

Des études d'électrophysiologie sur tranche ont montré que les récepteurs NMDA sont indispensables pour l'induction de la LTP dans la couche superficielle III du CE (*Yun et al., 2000b*). Bloquer ces récepteurs induirait donc un déficit de la mise en place de ce mécanisme. D'autre part, de nombreux travaux ont montré que les processus de plasticité synaptique sont modulés par l'activité du système cholinergique au niveau de la formation hippocampique (voir la section 1 de l'introduction, page 36). En effet, il a été montré que l'injection d'un agoniste cholinergique muscarinique (carbachol) induit une potentialisation des récepteurs AMPA (également impliqués dans le mécanisme de LTP, voir l'avant-propos, page 23). Or, ces données ont été obtenues dans la couche III du CE (*Yun et al., 2000a*), couche superficielle à partir de laquelle sont émises des projections en direction de l'hippocampe (pour revue, *Witter, 1993*) et dans la couche V du CE (*Cheong et al., 2001*), couche profonde recevant des projections issues de l'hippocampe (pour revue, *Witter, 1993*).

Dès lors, inactiver les récepteurs cholinergiques muscariniques induirait une absence de facilitation de la LTP dans le CE, montrant que l'acétylcholine module la plasticité synaptique dans ce cortex, comme observé dans l'hippocampe. En effet, l'acétylcholine favorise l'activité des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, en augmentant l'excitabilité des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (*Dennis et al., 2016*). De plus, une étude consistant à co-injecter des antagonistes des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (dAPV) et cholinergiques muscariniques (scopolamine) dans la région dCA1 lors d'une tâche d'évitement passif a montré que le déficit des performances observé suite à l'injection de dAPV, est potentialisé par la co-injection de dAPV et de scopolamine (*Khakpai et al., 2012*).

Ces données renforcent l'idée selon laquelle les systèmes de neurotransmission glutamatergiques de type NMDA et cholinergiques muscariniques interagissent pour moduler les processus mnésiques sous-tendant l'encodage d'un apprentissage bimodal.

Enfin, le fait que le déficit de l'apprentissage des animaux ayant reçu une injection de scopolamine dans le CEL ne soit traduit que par un retard suggère une possible compensation par un autre neurotransmetteur, comme la noradréline par exemple, également impliquée dans la facilitation de la LTP (*Kemp et Manahan-Vaughan, 2008*) et/ou une compensation par d'autres structures recevant également des informations olfactives et tactiles, donc potentiellement également impliquées dans la formation des associations OT, comme le cortex orbitofrontal (*Rolls et al., 1996*) ou l'amygdale basolatérale (*Uwano et al., 1995*) par exemple.

Les déficits comportementaux mis en évidence lors de l'acquisition de la tâche bimodale olfacto-tactile suite aux différentes manipulations pharmacologiques de l'activité du CEL peuvent reposer sur deux processus non exclusifs : un déficit du maintien en mémoire à court-terme du stimulus tactile et/ou un déficit du processus de désambiguïsation des éléments recouvrants, déficits potentiellement sous-tendus par une absence d'induction et/ou de facilitation de la LTP pour la formation de l'association « (odeur-renforcement) – texture ».

4. Absence d'implication du DH pour l'acquisition de la tâche olfacto-tactile : un résultat cohérent avec la littérature

L'absence d'effet de la manipulation du DH dans l'acquisition de la tâche OT est cohérente avec certaines données de la littérature ayant montré que le DH est impliqué dans l'encodage d'associations entre des objets et leur localisation, mais pas entre des stimuli non-spatiaux (pour revue, *Langston et al., 2010*). Ainsi, si la lésion ou l'inactivation transitoire du DH perturbe l'apprentissage des associations « objet-place », « odeur-place » (*Gilbert et Kesner, 2002*), et « saveur-place » (*Bethus et al., 2010*), elle n'induit aucun déficit de la formation des associations cross-modales « odeur-objet » (*Gilbert et Kesner, 2002*), visuo-tactiles (*Reid et al., 2012*), audiovisuelles (*McDonald et al., 1997*), olfacto-visuelles (*Sutherland et McDonald, 1990*) ou des associations intra-modales « objet-objet » (*Cho et*

Kesner, 1995), olfacto-olfactives (*Bunsey et Eichenbaum, 1996*) et visuo-visuelles (*Sanderson et al., 2006*).

D'autre part, le DH et tout particulièrement la région dCA1 dans lequel la majorité des sites d'injection a été rapportée, est impliqué dans les processus de mémoire associative temporelle, en tant que module d'association entre des événements discontinus dans le temps (pour revue, *Langston et al., 2010*). En effet, suite aux travaux ayant mis en évidence la non-implication du DH dans la formation de l'association « odeur-objet » dans laquelle ces deux stimuli sont présentés simultanément (*Gilbert et Kesner, 2002*), l'implication de cette structure a été testée lorsqu'un délai de 10 secondes sépare la présentation de l'odeur de celle de l'objet. Un déficit de l'apprentissage a alors été mis en évidence suite à la lésion sélective du dCA1 (*Kesner et al., 2005*). Toutefois, la tâche OT présentée dans ce travail de thèse repose sur l'échantillonnage de deux stimuli séparés par quelques centaines de ms, et non par plusieurs secondes.

Dès lors, cette littérature suggère que le DH est spécifiquement impliqué dans des apprentissages associatifs utilisant des stimuli discontinus dans l'espace et/ou dans le temps (pour revue, *Wallenstein et al., 1998*). La non-implication de cette structure dans l'acquisition de notre tâche OT est donc essentiellement justifiée par l'absence d'indice spatial saillant et/ou l'absence de délai suffisamment long entre les deux stimuli à associer.

D. Recombinaison d'une tâche olfacto-tactile : Rôle du cortex entorhinal latéral et de l'hippocampe dorsal

1. Résumé des données obtenues

Comme observé lors de l'acquisition OT avec de nouveaux stimuli, l'apprentissage par recombinaison de stimuli précédemment rencontrés sous forme de combinaisons inédites est perturbé suite à l'inactivation globale du CEL ou des récepteurs glutamatergiques NMDA de ce cortex, tandis que seul un déficit transitoire est mis en évidence suite à l'inactivation des récepteurs cholinergiques muscariniques de cette structure. En effet, tandis que les animaux témoins atteignent un ratio de choix corrects proche de 0,90 en fin de session, les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de dAPV présentent un score maximum autour de 0,50. En revanche, les animaux ayant reçu une injection de scopolamine présentent uniquement un retard de cet apprentissage, avec un score autour de 0,50 pendant les trois quarts de la session, avant d'atteindre un ratio de choix corrects avoisinant celui des animaux témoins en fin de session (**Figure 34, page 112**). Ainsi, les déficits des performances observés en recombinaison suite aux différentes manipulations de l'activité du CEL sont similaires à ceux décrits lors de l'acquisition.

Contrairement aux observations recueillies lors de l'acquisition OT avec de nouveaux stimuli, l'apprentissage de recombinaison est fortement perturbé suite à l'inactivation globale ou à l'inactivation des récepteurs cholinergiques muscariniques du DH. En effet, si les performances des animaux témoins atteignent un ratio de choix corrects proche de 0,90 en fin de session, les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de scopolamine dans le DH présentent de faibles scores oscillant entre 0,20 et 0,30 et ce, tout au long de la session. En revanche, les performances des animaux ayant reçu une injection de dAPV dans le DH sont similaires à celles présentées par les animaux témoins avec un ratio de choix corrects

élevé en fin de session (**Figure 39**, [page 121](#)). L'inactivation du DH ou l'inactivation sélective de sa transmission cholinergique induit donc un déficit de l'apprentissage de recombinaison, tandis que l'inactivation du système glutamatergique NMDA n'affecte pas les performances. L'activité du DH, et notamment sa modulation cholinergique muscarinique semble donc critique pour l'apprentissage de recombinaison.

2. Principe de la recombinaison

Comme évoqué dans la [section discussion du chapitre 1 \(page 90\)](#), la recombinaison est un apprentissage complexe nécessitant que l'animal fasse preuve de flexibilité comportementale puisque les stimuli utilisés dans cet apprentissage sont familiers et réassociés sous forme de combinaisons inédites : l'animal doit donc gérer les interférences^{***6} produites par la construction de ces nouvelles combinaisons. Ainsi, la résolution de cette tâche repose sur deux processus distincts : tout d'abord l'extinction de la persistance pour les stimuli précédemment renforcés par un double processus de reversal unimodal olfactif et tactile, puis l'apprentissage de la nouvelle combinaison renforcée.

3. Rejet de plusieurs interprétations pouvant expliquer le rôle du CEL et du DH dans la recombinaison de la tâche olfacto-tactile

La stratégie de recombinaison est mise en évidence par l'analyse des erreurs commises au cours de cet apprentissage. En effet, le début de la session se caractérise par une majorité d'erreurs commises par choix du pot contenant l'odeur précédemment renforcée dans le groupe CEL (**Figure 35**, [page 113](#)) et dans le groupe DH (**Figure 40**, [page 122](#)). Cette persistance pour le stimulus olfactif préalablement renforcé s'éteint rapidement chez les animaux des groupes témoins, comme l'indiquent les ratios d'erreurs « odeur » qui atteignent un score proche de 0 dès le troisième bloc de la session, tandis qu'en parallèle, les animaux acquièrent la nouvelle association « (odeur-renforcement) – texture ».

En revanche, les animaux du groupe CEL ayant reçu une injection de scopolamine nécessitent davantage d'essais pour éteindre la persistance pour l'odeur précédemment renforcée. Ils y parviennent néanmoins en fin de session, en parallèle de la formation de l'association entre l'odeur et la texture renforcée, comme l'indique le ratio de choix corrects élevé obtenu en fin de session. De même, les animaux ayant reçu une injection de dAPV dans le CEL éteignent progressivement la persistance pour l'odeur précédemment renforcée, mais ne parviennent ensuite qu'à former l'association unimodale « odeur-renforcement », comme l'indique le ratio de choix corrects autour de 0,50 obtenu en fin de session. Enfin, les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne dans le CEL nécessitent davantage d'essais pour éteindre la persistance pour ce stimulus précédemment renforcé. En effet, ils ne tendent à y parvenir qu'en fin de session, et leurs performances ne dépassent pas un ratio de choix corrects de 0,40 indiquant néanmoins une tendance de progression des scores au cours de la session et la formation en cours de l'association unimodale « odeur-renforcement ». Une session avec davantage d'essais aurait peut-être permis d'observer une véritable amélioration des performances, tout du moins jusqu'au score de

^{6 ***} : voir LEXIQUE ([page 13](#))

0,50 qui couplé avec la répartition des erreurs, indique la formation effective de l'association « odeur-renforcement ».

Ces données indiquent donc que le déficit observé lors de la recombinaison pour les animaux ayant reçu une injection de dAPV ou de scopolamine dans le CEL n'est pas dû à un déficit de l'extinction de la persistance pour l'association unimodale « odeur-renforcement ». En revanche, les données suggèrent que le déficit observé suite à l'injection de lidocaïne dans le CEL pourrait être dû à un déficit d'extinction de la persistance pour l'odeur précédemment renforcée, puisque seule une tendance d'extinction de la persistance olfactive est mise en évidence en fin de session.

Ainsi, dans le but de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant la recombinaison, une étude complémentaire a donc testé l'effet de l'inactivation du CEL par injection de lidocaïne sur les performances de reversal d'une tâche unimodale olfactive ou tactile. Les données montrent que le processus d'extinction de la persistance pour le stimulus olfactif ou tactile précédemment renforcé n'est pas perturbé par le traitement pharmacologique appliqué dans le CEL (**Figure 36**, [page 115](#)). Ainsi, ce résultat montre que les déficits observés lors de la recombinaison suite à l'injection de lidocaïne dans le CEL ne sont pas dus à un déficit dans le processus d'extinction de la persistance olfactive.

Concernant les animaux du groupe DH, ce ratio d'erreurs « odeur » évolue selon deux dynamiques différentes en fonction de la drogue injectée. En effet, de la même manière que les animaux témoins, les animaux ayant reçu une injection de dAPV éteignent cette persistance olfactive après quelques essais, et apprennent la nouvelle combinaison renforcée, comme l'indique l'analyse croisée des courbes de ratios de choix corrects et de ratios d'erreurs « odeur ». En revanche, malgré la succession d'essais conclus par la fouille du pot contenant l'odeur précédemment renforcée et de la non-obtention d'un renforcement, les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de scopolamine dans le DH persistent à sélectionner le stimulus olfactif précédemment renforcé pendant toute la session.

Ainsi, les animaux dont le DH ou dont la modulation cholinergique muscarinique de cette structure a été inactivé ne parviennent pas à éteindre la persistance pour l'odeur précédemment renforcée, expliquant les faibles ratios de choix corrects obtenus par ces animaux tout au long de la session de recombinaison.

Dès lors, afin de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant la recombinaison, une étude complémentaire a donc testé l'effet de l'inactivation du DH par injection de lidocaïne sur les performances de reversal d'une tâche unimodale olfactive ou tactile. Les données montrent que le processus d'extinction de la persistance pour le stimulus olfactif ou tactile précédemment renforcé n'est pas perturbé par le traitement pharmacologique appliqué dans le DH (**Figure 41**, [page 125](#)). Ces données montrent donc que contrairement à l'interprétation formulée dans le paragraphe précédent, les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de scopolamine dans le DH ne présentent pas de déficit dans le processus d'extinction de la persistance olfactive, et ce résultat est en accord avec la littérature (*Staubli et al., 1984 ; Eichenbaum et al., 1986*).

Quelques études se sont employées à définir les substrats neurobiologiques impliqués dans le reversal olfactif, et certaines structures ont été identifiées, comme le thalamus médio-dorsal (*Slotnick et Risser, 1990*), le cortex piriforme postérieur (*Calu et al., 2007*) et l'amygdale basolatérale (*Eichenbaum et al., 1986 ; Schoenbaum et al., 2003*), tandis qu'à notre connaissance, la littérature est mince sinon inexistante concernant les substrats neurobiologiques sous-tendant le reversal tactile. Toutefois, d'une façon générale, plusieurs études suggèrent que le cortex orbitofrontal (*Schoenbaum et al., 2003 ; Kim et Ragozzino, 2005 ; Roesch et al., 2006*) et le cortex cingulaire antérieur (*Ragozzino et Rozman, 2007*) sont impliqués dans les apprentissages de type reversal, indépendamment de la modalité sensorielle d'intérêt. En revanche, si une facilitation du reversal a été obtenue suite à une lésion du CE dans un protocole utilisant des objets, vraisemblablement identifiés par leurs caractéristiques visuelles et/ou tactiles (*Yee et Rawlins, 1998*), une telle amélioration des performances n'a pas été observée ici.

Les déficits comportementaux mis en évidence lors de la recombinaison de la tâche bimodale olfacto-tactile suite à la perturbation de l'activité du CEL ou du DH ne reposent donc pas sur un déficit de l'extinction de la persistance pour le stimulus olfactif ou pour le stimulus tactile précédemment renforcé.

4. Interprétation des déficits observés dans le CEL lors de la recombinaison de la tâche olfacto-tactile

L'analyse croisée des ratios de choix corrects et des ratios d'erreurs par persistance pour l'odeur précédemment renforcée suggère que les déficits observés en recombinaison suite à l'injection de lidocaïne ou d'APV dans le CEL résultent d'un déficit de la formation de l'association entre la paire « odeur-renforcement » et le stimulus tactile, tandis que les animaux ayant reçu une injection de scopolamine ne présentent qu'un déficit qui se traduit par un retard de la construction de l'association bimodale « (odeur-renforcement) – texture ».

Le CEL et sa composante glutamatergique NMDA semblent donc indispensables pour la formation d'associations entre une odeur et une texture, que ce soit avec des stimuli nouveaux (acquisition) ou familiers (recombinaison), tandis que la composante cholinergique muscarinique du CEL s'avère nécessaire mais non indispensable pour ce type d'apprentissage.

Les déficits comportementaux mis en évidence lors de la recombinaison de la tâche bimodale olfacto-tactile suite aux différentes manipulations pharmacologiques de l'activité du CEL peuvent reposer sur deux processus non exclusifs : un déficit du maintien en mémoire à court-terme du stimulus tactile et/ou un déficit du processus de désambiguïsation des éléments recouvrants, déficits potentiellement sous-tendus par une absence d'induction et/ou de facilitation de la LTP pour la formation de l'association « (odeur-renforcement) – texture ».

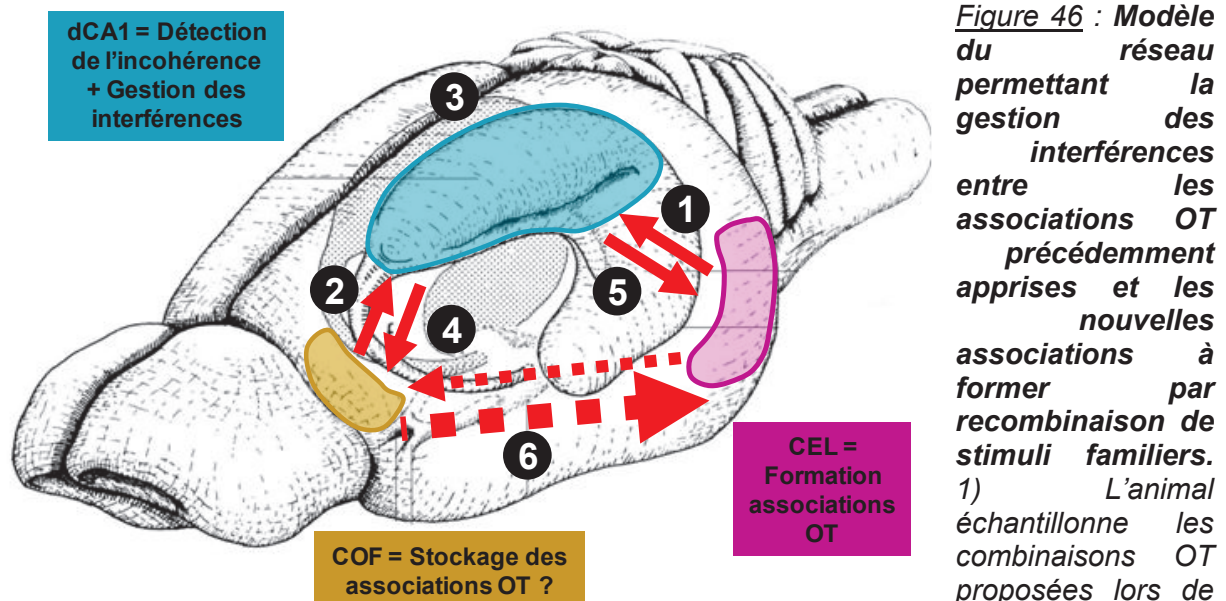
5. Interprétations des déficits observés suite à l'inactivation du DH ou des récepteurs cholinergiques muscariniques de cette structure lors de la recombinaison de la tâche olfacto-tactile

L'analyse croisée des ratios de choix corrects et des ratios d'erreurs par persistance pour l'odeur précédemment renforcée suggère que les déficits observés en recombinaison suite à l'injection de lidocaïne ou de scopolamine dans le DH résultent d'un déficit d'extinction pour l'association « (odeur-renforcement) – texture » précédemment apprise.

a. Non-détection de l'incohérence entre les associations OT précédemment apprises et celles à construire ?

Des modèles suggèrent que le DH, et tout particulièrement la région dCA1, est impliqué dans les processus sous-tendant la détection de l'inadéquation entre les informations recueillies pendant l'échantillonnage, et les prédictions liées aux précédentes associations apprises (*Lisman et Otmakhova, 2001* ; pour revue, *Langston et al., 2010*). Ainsi, lors de la recombinaison, le dCA1 agirait comme un comparateur entre les informations transmises par le CE lors de l'échantillonnage des combinaisons OT réassociées, et les informations transmises par la ou les structures impliquées dans la rétention des associations OT précédemment apprises. Cette hypothèse a donné lieu à la construction d'un modèle présenté sur la **figure 46**.

Selon notre modèle, lors de la recombinaison, le CEL transfère au dCA1 les informations relatives aux stimuli olfactifs et tactiles issus de l'échantillonnage des combinaisons réassociées. De plus, l'hippocampe reçoit hypothétiquement des informations en provenance d'une structure impliquée dans la rétention des associations OT comme le cortex orbitofrontal (COF) par exemple (*Whishaw et al., 1992* ; *Bontempi et al., 1999* ; pour revue, *Frankland et Bontempi, 2005*). Ainsi, le dCA1 reçoit deux informations contradictoires entre la nouvelle tâche en cours d'apprentissage (recombinaison) et les précédentes (acquisitions). Pour gérer cette situation d'interférences, le dCA1 favoriserait la mise en retrait des associations précédemment apprises au niveau de la ou les structures de rétention, de façon à permettre la formation de nouvelles associations au niveau du CE. Or, des modèles suggèrent que la transmission cholinergique joue un rôle crucial dans la gestion des interférences au niveau de l'hippocampe (*Hasselmo et Wyble, 1997* ; pour revue, *Hasselmo, 1999* ; *Hasselmo et McGaughy, 2004* ; pour revue, *Hasselmo et Stern, 2006b* ; pour revue, *Hasselmo et Sarter, 2011*). Ces résultats ont été confirmés avec l'apprentissage de tâches utilisant des éléments recouvrants, chez l'Homme avec des listes de mots (*Atri et al., 2004*) et chez le rongeur avec des séquences d'odeurs (*De Rosa et Hasselmo, 2000*). Dans ces tâches associatives, comme dans la recombinaison, le rôle de la modulation cholinergique serait de limiter les interférences liées aux précédents apprentissages, dans le but d'être en mesure de former de nouvelles associations, malgré l'utilisation d'éléments communs qui sollicitent probablement les mêmes réseaux neuronaux. Ces études montrent donc que l'inactivation des récepteurs cholinergiques du DH pourrait inhiber de façon transitoire la communication tripartite entre le CEL (formation des associations OT), la ou les structures de rétention des précédentes associations, et le dCA1 (gestion des interférences).



la recombinaison : ces associations sont formées de stimuli familiers rencontrés lors des acquisitions préalables. Les informations transitent depuis les cortex olfactif et tactile jusqu'au CEL, puis au dCA1. 2) Les informations relatives aux associations OT précédemment apprises seraient hypothétiquement mises en mémoire à long-terme au niveau du COF (cortex orbitofrontal – flèche en petits pointillés du CEL vers le COF). Ces informations transiteraient depuis le COF jusqu'au dCA1. 3) Le dCA1 détecte l'incohérence entre les informations sensorielles échantillonnées (réalité) et celles précédemment mises en mémoire (prédiction). 4) Le dCA1 favorise la mise en retrait des associations précédemment apprises au niveau de la structure de rétention. 5) Les interférences liées aux précédents apprentissages n'empêchent plus la recombinaison : le dCA1 autorise alors le CEL à former des associations utilisant des stimuli familiers. 6) En cas d'inactivation du dCA1, seules les interactions entre le COF et le CEL (en pointillés) seraient préservées, expliquant la persistance de l'animal à choisir les stimuli précédemment renforcés.

Toutefois, ce modèle est remis en question par des données récemment obtenues dans l'équipe, qui ont montré que le CEL est impliqué dans la rétention des associations OT, pendant un délai de trois jours à compter de l'acquisition, et qu'il est désengagé sept jours post-acquisition (voir la [section discussion de ce chapitre, page 145](#)). Or, la recombinaison implique que l'animal éteigne la persistance pour les stimuli précédemment renforcés et deux jeux de combinaisons différents ont été utilisés (**Tableau 4, page 98**). Dans l'un d'eux, l'animal doit éteindre la persistance pour les stimuli renforcés lors de la première acquisition (OT1, apprise une quinzaine de jours au préalable) ; dans l'autre, il doit éteindre la persistance pour les stimuli renforcés lors de la seconde acquisition (OT2, apprise seulement deux jours auparavant). Ainsi, le CEL serait impliqué dans la rétention des associations apprises dans OT2, tandis qu'une autre structure (hypothétiquement le COF) serait impliquée pour gérer les associations apprises dans OT1. Même si ce mécanisme serait surprenant puisque les performances des animaux ne diffèrent pas selon le jeu de combinaisons utilisé, il n'est pas exclu que le circuit de gestion des interférences diffère selon ce critère. Ainsi, le modèle présenté sur la **figure 46** serait simplifié : en cas de mise en retrait de l'association renforcée dans OT2, seuls le CEL et le dCA1 seraient impliqués, et le CEL serait à la fois la structure de formation de la nouvelle association, et de rétention des précédentes associations récemment acquises.

Globalement, selon le modèle présenté, la mise en retrait des associations précédemment formées serait donc perturbée, expliquant l'absence d'extinction de la persistance pour l'association « (odeur-renforcement) – texture » apprise en acquisition, pour les animaux ayant reçu une injection de lidocaïne ou de scopolamine dans le DH. Cette association bimodale n'existant plus physiquement au niveau des pots (**Tableau 4, page 98**), et le stimulus olfactif étant plus facilement associé au renforcement que le stimulus tactile (voir la section discussion du chapitre 1, page 89), les animaux choisissent de persister à sélectionner le pot contenant l'odeur précédemment renforcée et ne forment donc pas de nouvelles associations OT, malgré la fonctionnalité du CEL.

La gestion des interférences est donc vraisemblablement sous-tendue par un circuit entre le dCA1, le CEL et la ou les structures de rétention des associations précédemment mises en mémoire. Ainsi, l'inactivation du DH ou l'inactivation de la modulation cholinergique muscarinique de cette structure perturberait la détection des incohérences entre les associations formées en acquisition et celles à construire lors de la recombinaison, donc induirait un déficit d'adaptation comportementale, expliquant l'incapacité des animaux à faire preuve de flexibilité, et l'absence d'extinction de la persistance pour l'association « (odeur-renforcement) – texture ».

b. Perturbation de la synchronisation des inputs corticaux avec le rythme thêta hippocampique ?

Des études ont montré qu'un blocage de la transmission cholinergique induit une désynchronisation entre les potentiels d'action des différentes structures interconnectées avec l'hippocampe, et le rythme thêta de la région CA1 du DH (pour revue, *Hasselmo et al., 2002 ; Easton et al., 2012a ; Douchamps et al., 2013*). Selon la théorie développée par Michael Hasselmo, un fort input cholinergique favorise la synchronisation des potentiels d'action du CE avec le creux du rythme thêta, tandis que l'input de la région CA3 est faible, ce qui permet l'encodage de nouvelles associations. En revanche, quand l'input cholinergique est faible, les potentiels d'action de la région CA3 sont synchronisés avec le pic du rythme thêta, tandis que l'input du CE est faible, autorisant ainsi le rappel des associations précédemment apprises. Ce mécanisme permettrait alors de faire la distinction entre le mode « rappel des anciennes associations » et le mode « acquisition des nouvelles associations ». Dans le cas du paradigme proposé ici, le rappel de l'information serait plus vraisemblablement sous-tendu par la synchronisation du pic du rythme thêta hippocampique avec les potentiels d'action du COF, structure hypothétiquement impliquée dans la rétention à long-terme des associations OT précédemment apprises, et non par la région CA3 de l'hippocampe, mais cette hypothèse demande à être vérifiée (voir la section perspectives, page 208).

En revanche, en cas de blocage sélectif des récepteurs cholinergiques muscariniques du DH, la configuration présentée en cas de faible quantité d'acétylcholine serait hypothétiquement accentuée, et la forte synchronisation entre les inputs du COF et le pic du rythme thêta hippocampique favoriserait une restitution d'autant plus forte des associations précédemment apprises. Celles-ci ne seraient donc plus mises en retrait, créant ainsi de fortes interférences au niveau du CEL (structure connectée avec le COF), expliquant la persistance de l'animal à sélectionner l'odeur précédemment renforcée, malgré la fonctionnalité du CEL (**Figure 47**).

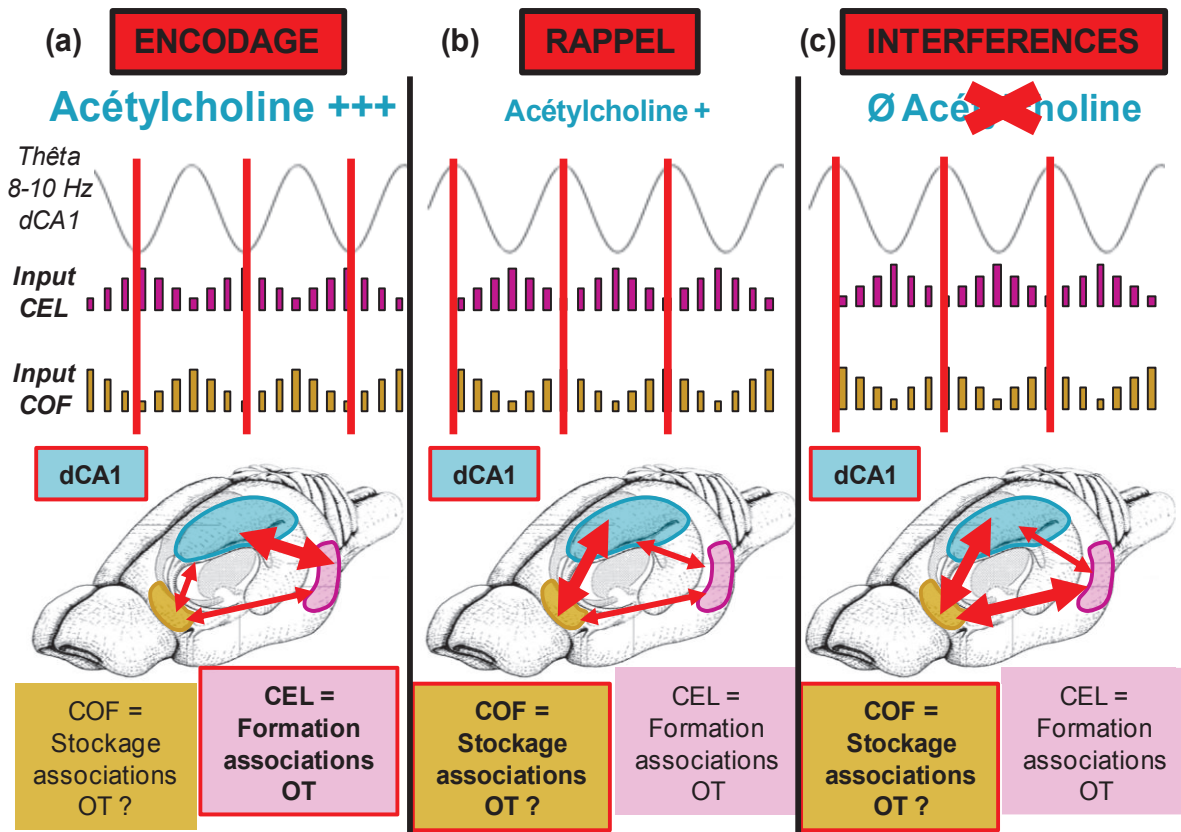


Figure 47 : Modèle de synchronisation des inputs du cortex entorhinal latéral (CEL, structure de formation des associations OT) et du cortex orbitofrontal (COF, structure hypothétiquement impliquée dans la rétention à long-terme des associations OT) avec le rythme thêta hippocampique, en fonction de la quantité d'acétylcholine libérée. (a) Lors de l'encodage, le fort input cholinergique favorise la synchronisation du fort input du CEL avec le creux des oscillations thêta hippocampiques, tandis que l'input du COF est faible : des associations peuvent être formées. (b) Lors du rappel, le faible input cholinergique favorise la synchronisation du fort input du COF avec le pic des oscillations thêta hippocampiques, tandis que l'input du CEL est faible : les associations peuvent être rappelées. (c) En cas de blocage de la modulation cholinergique de l'hippocampe, la configuration décrite en (b) serait hypothétiquement accentuée car le CEL serait uniquement en interaction avec le COF. Ceci empêcherait la mise en retrait des précédentes associations : ainsi, les fortes interférences caractérisant la recombinaison OT ne seraient plus gérées et le CEL ne pourrait donc pas encoder de nouvelles associations. Adapté du modèle proposé par Hasselmo et al., 2002.

Les déficits observés lors de la recombinaison de la tâche bimodale olfacto-tactile suite aux différentes manipulations pharmacologiques de l'activité du DH peuvent reposer sur deux processus non exclusifs : un déficit dans la détection de l'incohérence entre les associations anciennes et nouvelles, et une perturbation de la synchronisation des inputs du CEL (structure impliquée dans la formation des associations OT) et du COF (structure hypothétiquement impliquée dans la rétention des associations OT) avec le rythme thêta hippocampique. Ces deux déficits conduisent à une absence de gestion des interférences caractérisant l'apprentissage de recombinaison, par l'absence d'extinction de la persistance pour l'association « (odeur-renforcement) – texture » précédemment apprise.

6. Interprétation de l'absence de déficit suite à l'inactivation des récepteurs NMDA dans le DH

La composante glutamatergique NMDA du DH n'est pas nécessaire pour l'apprentissage d'une tâche OT par recombinaison de stimuli précédemment rencontrés. Dès lors, si les données issues de l'inactivation globale du DH indiquent que cette structure est fortement impliquée dans les processus sous-tendant la recombinaison, il semblerait que la computation neuronale effectuée par le DH ne repose pas sur un mécanisme de plasticité NMDA dépendant.

En accord avec le rôle du DH dans une tâche de conditionnement de trace (*Burman et Gewirtz, 2007*), ce résultat est toutefois surprenant compte-tenu de la littérature. En effet, la grande majorité des apprentissages ayant été montrés comme reposant sur le fonctionnement de l'hippocampe repose sur un processus de plasticité NMDA dépendant (pour revue, *Wang et al., 2006 ; McHugh et Tonegawa, 2009 ; pour revue, Morris, 2013*). De plus, il a été montré que l'inactivation des récepteurs NMDA de la région CA1 du DH affecte les processus de flexibilité sous-tendant l'apprentissage d'une tâche de transverse patterning (voir la section 2 de l'introduction, page 39) utilisant des stimuli olfactifs (*Rondi-Reig et al., 2001*). Dès lors, nos données suggèrent que la formation de l'association « (odeur-renforcement) – texture » repose sélectivement sur l'activité du système glutamatergique de type NMDA du CEL, situé en amont de l'hippocampe.

E. Rappel d'une tâche olfacto-tactile : Rôle du cortex entorhinal latéral

Le travail présenté dans cette thèse a pour objectif d'étudier les substrats neurobiologiques sous-tendant les processus d'apprentissage d'une tâche OT. Toutefois, une étude récente menée dans l'équipe s'est attachée à identifier le rôle du CEL dans les processus de mise en mémoire des associations OT. Un bref résumé des données obtenues est présenté dans ce paragraphe.

Suite à l'acquisition d'une tâche OT en une session de vingt essais, les animaux sont soumis à une session de rappel constituée de trois essais non renforcés pour éviter une réacquisition de la tâche. Cette session a été effectuée suite à l'inactivation transitoire du CEL par une injection de lidocaïne et à différents délais post-acquisition : 24h (court-terme), 72h (moyen-terme) ou 7 jours (long-terme). Les résultats montrent que l'inactivation du CEL perturbe le rappel à court et à moyen-terme, mais pas le rappel à long-terme. Ces données

suggèrent que l'activité du CEL est impliquée pendant une durée d'au moins 72 heures dans les processus de consolidation de l'apprentissage de la tâche bimodale OT, sans être indispensable pour le recouvrement de l'apprentissage à 7 jours.

Ces données sont en accord avec la théorie standard de la consolidation formulée à partir de travaux s'intéressant à l'apprentissage spatial, théorie selon laquelle l'encodage d'une information est sous-tendu par la formation hippocampique (ici le CEL), avant un transfert de la trace mnésique dans les structures préfrontales (*Bontempi et al., 1999* ; pour revue, *Frankland et Bontempi, 2005*). Ainsi, le CEL serait impliqué de manière transitoire dans la consolidation de l'association OT, et la consolidation à plus long terme ferait intervenir des structures telles que le cortex préfrontal ventrolatéral (*Whishaw et al., 1992*) et le cortex orbitofrontal, avec lesquelles le CEL est connecté (*Kerr et al., 2007*).

F. Spécificité et limites des résultats présentés

1. Processus de diffusion

Il n'est pas exclu que les déficits comportementaux observés lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche OT résultent au moins en partie du blocage de l'activité d'une structure adjacente dans laquelle les drogues injectées auraient diffusé. En effet, la sphère de diffusion d'une drogue peut varier selon sa concentration, son volume et son poids moléculaire (*Zador, 2008*), ainsi qu'en fonction de la répartition cellulaire en couches distinctes et l'organisation de la matrice extracellulaire de la structure cible (pour revue, *Wolak et Thorne, 2013*). Si les effets de diffusion de la lidocaïne dans le cortex ont été étudiés chez le rongeur (*Martin, 1991*), la sphère de diffusion de cette drogue et des autres molécules injectées dans notre étude n'a à notre connaissance pas encore été décrite concernant précisément nos deux structures cibles. Cependant, malgré la localisation relativement hétérogène des sites d'injection dans le CEL (**Figure 42, page 126**), et dans le dCA1 (**Figure 43, page 126**), les données comportementales ne mettent pas en évidence une corrélation entre le point d'injection et les performances obtenues.

Les injections ont été effectuées au niveau de la région latérale du CE, et la spécificité des résultats au regard des processus de diffusion et/ou d'interaction des drogues injectées dans les structures voisines de ce cortex a été discutée dans notre premier article (*Boisselier et al., 2014*). En résumé, trois structures pourraient être impliquées dans les processus d'intérêt, par diffusion à partir du CEL. Structure adjacente et en amont du CEL, le cortex piriforme postérieur pourrait jouer un rôle dans l'apprentissage de la tâche OT car il est impliqué dans l'encodage des odeurs (*Litaudon et al., 2003* ; *Kadohisa et Wilson, 2006*). Toutefois, en dépit d'injections localisées dans le CEL, nos données montrent que la capacité d'associer une odeur à un renforcement et/ou de sélectionner une odeur parmi trois est préservée, suggérant que les déficits observés ne sont pas liés à une diffusion dans le cortex piriforme postérieur. Réciproquement connecté avec le CEL (pour revue, *Cleland et Linster, 2005* ; *Agster et Burwell, 2009*), le cortex piriforme antérieur reçoit une modulation top-down importante en provenance du CEL, qui impacte le traitement des informations olfactives (*Xu et Wilson, 2012*). En effet, en cas de lésion du CEL, une augmentation de l'activité unitaire est observée dans cette structure, accompagnée d'un déficit de la

discrimination fine des odeurs (*Chapuis et al., 2013b*). Toutefois, des odeurs très différentes sont utilisées dans notre étude, suggérant que les déficits obtenus ne sont pas liés à l'interruption de la connectivité entre le CEL et le cortex piriforme antérieur. Enfin, le CEM reçoit des informations olfactives (*Biella et De Curtis, 2000*) et les deux régions du CE sont interconnectées (pour revue, *Canto et al., 2008*). De plus, le CEM est impliqué dans les processus de désambiguïsation des éléments recouvrants (*Lipton et al., 2007*), reçoit des informations spatio-visuelles et est étroitement connecté avec le dCA1 (*Burwell, 2000 ; Kerr et al., 2007*). Malgré le fait que notre tâche soit dépourvue de dimension spatiale pertinente, l'hypothétique rôle du CEM dans les déficits observés reste à être testé, puisque quelques sites d'injection ont été localisés à proximité de la limite histologique entre le CEL et le CEM. Ainsi, si les résultats obtenus peuvent résulter de diffusions et/ou d'interactions avec d'autres structures telles que le cortex piriforme ou le CEM, l'analyse détaillée des interprétations possibles suggère que les déficits observés suite aux diverses injections dans le CEL sont tout du moins spécifiquement du cortex entorhinal au sens large.

La grande majorité des injections a été effectuée dans la région CA1 du DH, dans la partie proche du subiculum, soit dans la partie directement et réciproquement connectée avec le CEL (*Naber et al., 2001*). Toutefois, deux régions du DH pourraient être impliquées dans les processus d'intérêt, par diffusion à partir du dCA1. Adjacents de la structure cible, le gyrus denté dorsal (dDG) et la région CA3 dorsale (dCA3) pourraient ainsi jouer un rôle dans l'apprentissage testé, la répartition cellulaire en couche des cellules de l'hippocampe suggérant plutôt une diffusion sagittale, soit vers le dCA3, que dorso-ventrale, soit en direction du dDG. Toutefois, ces deux structures sont particulièrement impliquées dans des apprentissages comprenant une composante spatiale (*Gilbert et al., 2001 ; Gilbert et Kesner, 2003*), alors que notre travail de thèse exclut toute dimension spatiale pertinente. Ainsi, si les résultats obtenus peuvent éventuellement résulter de diffusion au niveau du dDG ou du dCA3, et que l'implication de ces régions devra être spécifiquement testée, les déficits observés suite à l'injection du dCA1 sont tout du moins spécifiques du DH au sens large.

2. Protocole mis en place

L'effet de l'inactivation des structures d'intérêt a été testé non pas sur l'acquisition de la première tâche OT, mais sur la seconde tâche OT, et ce, pour des raisons pratiques. En effet, l'utilisation de la technique de microinjection est adaptée pour mettre en évidence l'implication d'une structure dans un processus ayant lieu à un moment précis : or l'acquisition d'une première tâche OT nécessite trois sessions de vingt essais. Toutefois, il a été montré qu'un premier apprentissage peut être dépendant de l'activité de l'hippocampe, sans que l'inactivation de cette structure induise un déficit des apprentissages suivants. C'est notamment le cas de paradigmes spatiaux (*Saucier et Cain, 1995*) et de peur conditionnée au contexte (*Wang et al., 2012*). Dès lors, il est possible que les données obtenues lors de l'acquisition OT montrent simplement que le DH n'est pas impliqué dans le transfert du principe de la tâche bimodale entre une première tâche et les suivantes (**Figure 38, page 119**). Néanmoins, il est peu probable que cette structure soit nécessaire pour la formation de l'association « odeur-texture », étant donnés les arguments développés précédemment (**page 136**).

G. Un modèle à compléter

1. Expériences complémentaires au niveau du CEL

La tâche bimodale OT utilisée dans notre étude présente l'avantage d'être apprise sans nécessiter de décomposition préalable par l'apprentissage d'une tâche unimodale olfactive et d'une tâche unimodale tactile. Cependant, il a été montré que le réseau sollicité lors d'un apprentissage visuo-tactile « direct » est différent de celui sollicité lorsqu'un apprentissage unimodal visuel, puis tactile, précède cet apprentissage bimodal. En effet, si l'association visuo-tactile « directe » repose sur l'activité du cortex pariétal postérieur, associé au traitement des informations tactiles, et du cortex périrhinal, associé notamment au traitement des informations visuelles et recevant des informations tactiles (*Winter et Reid, 2010*), il a été montré que la pré-exposition aux stimuli visuels et tactiles utilisés ultérieurement (24 heures plus tard) dans la tâche bimodale modifie le réseau sous-tendant la formation de cette association. Dès lors, il apparaît que seule l'activité du cortex périrhinal est nécessaire (*Jacklin et al., 2016*). Il est donc légitime de s'interroger si un apprentissage séquentiel tel que celui présenté dans les sections résultats et discussion du chapitre 1 (respectivement pages 79 et 86) avec un apprentissage unimodal olfactif et tactile effectué selon un ordre à randomiser en amont de l'apprentissage bimodal OT reposerait également sur le fonctionnement du CEL.

D'un point de vue anatomique, les informations olfactives convergent sur les couches superficielles du CEL (*Schwerdtfeger et al., 1990*), tandis que les informations tactiles sont très peu caractérisées au niveau de ce cortex. En effet, les données de la littérature ne définissent pas avec précision la localisation des projections issues du barrel cortex au niveau du CEL. Si deux études ont mis en évidence une connexion depuis les couches IV et V du CEL vers le cortex somesthésique (*Swanson et Köhler, 1986 ; Insausti et al., 1997*), des études par injection d'un marqueur rétrograde dans le barrel cortex seront nécessaires pour déterminer avec précision l'identité de la couche du CEL recevant des informations tactiles. Toutefois, le CEL reçoit indirectement des informations tactiles identifiées au niveau des couches superficielles par l'intermédiaire du cortex périrhinal. Ces données suggèrent que les associations OT sont construites dans les couches superficielles du CEL, dont l'implication dans les processus d'induction et d'expression de la LTP a été mise en évidence (*Yun et al., 2000b*). Si ces associations sont effectivement formées dans cette couche, elles sont ensuite directement transmises à la région CA1 du DH, puis renvoyées au niveau des couches profondes du CEL par l'intermédiaire éventuel du subiculum, couches étroitement connectées avec les couches superficielles du CEL (*Kloosterman et al., 2003 ; pour revue, Canto et al., 2008 ; Figure 48*).

D'un point de vue neuronal, il reste à déterminer la proportion de neurones « olfacto-tactiles » c'est-à-dire répondant à la fois aux stimuli olfactifs et tactiles, ainsi que leur localisation (vraisemblablement dans la couche III du CEL, selon l'hypothèse formulée dans le paragraphe précédent). La mise en évidence de ce type de neurone permettrait d'affiner le modèle de formation des associations OT dans le CEL, et pourrait par exemple être effectuée en comparant l'activité unitaire enregistrée dans le CEL en réponse à un stimulus olfactif, tactile, ou bimodal OT, sur un animal contraint en tête fixe.

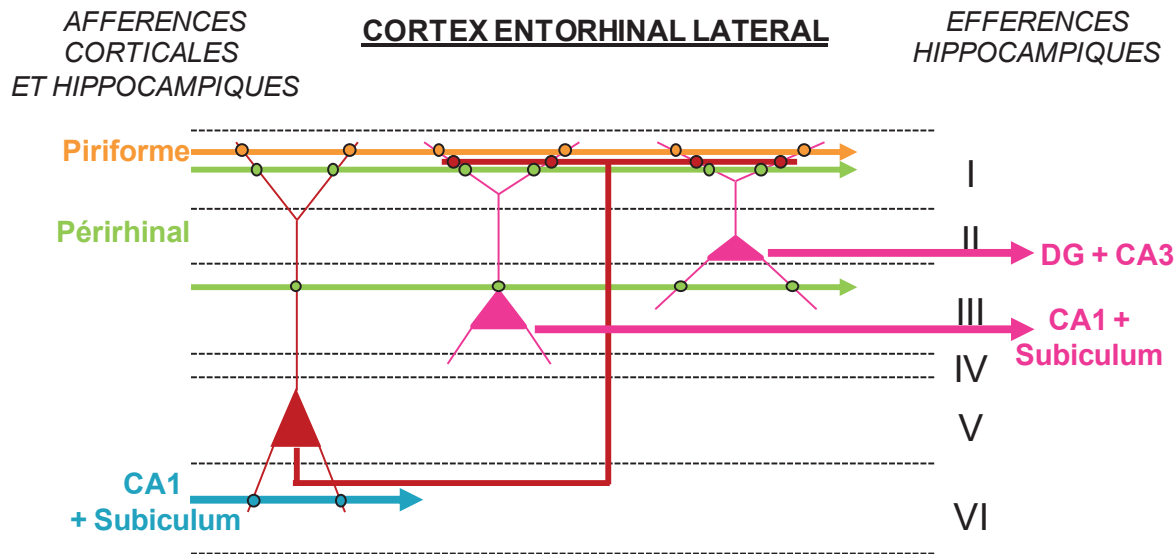


Figure 48 : Représentation schématique de la connectivité dans les différentes couches du cortex entorhinal latéral (CEL). Les lignes noires en pointillés délimitent les différentes couches du CEL (la couche IV est très fine voire inexistante dans certaines parties du CEL). L'input olfactif arrivant dans la couche I est symbolisé en orange et l'input du cortex périrhinal (comprenant notamment des informations tactiles) arrivant dans les couches I et III est représenté en vert. Les neurones symbolisés en rose dans les couches II et III intègrent les informations olfactives et tactiles et se projettent respectivement sur le gyrus denté et la région CA3, et la région CA1 et le subiculum de l'hippocampe. Le neurone symbolisé en rouge dans la couche V du CEL intègre les informations issues de la région CA1 et du subiculum, représenté en bleu clair. Il favorise également la communication entre les couches profondes et superficielles. Ce circuit suggère que la formation des associations « odeur-texture » est effectuée dans les couches superficielles. Adapté de Canto et al., 2008.

2. Expériences complémentaires au niveau du DH

Nos données montrent que l'interaction fonctionnelle entre l'hippocampe et le CEL est modulée par le système cholinergique muscarinique, et semble indispensable pour la gestion des interférences lors de la recombinaison d'une tâche bimodale OT. Toutefois, la nature de la communication entre ces deux structures ainsi que l'effet neuromodulateur de l'acétylcholine au niveau de l'activité du dCA1 reste à être caractérisé. Est-ce une activité inhibitrice par les interneurons, ou plutôt excitatrice au niveau des cellules pyramidales ? Des études plus poussées devront être menées pour affiner les résultats obtenus dans ce circuit fonctionnel.

Conclusion

Les résultats présentés mettent en évidence l'implication du CEL dans les apprentissages associatifs OT. Toutefois, les données obtenues n'indiquent pas si ce cortex est spécifiquement nécessaire pour la formation d'associations entre deux stimuli issus de modalités différentes (cross-modal) ou s'il est également indispensable pour la formation d'associations entre deux stimuli issus de la même modalité (intra-modal). Ainsi, en complément des apprentissages bimodaux et unimodaux testés, l'effet de l'inactivation du CEL sur l'apprentissage bimodal olfacto-olfactif et tacto-tactile aurait pu être testé. Toutefois, ces apprentissages n'ont volontairement pas été développés pour plusieurs raisons. Le premier argument repose sur la complexité de la tâche à mettre en place. Un apprentissage tacto-tactile avec deux bandes distinctes de texture que l'animal aurait échantillonné avec ses vibrisses aurait probablement requis un conditionnement plus long que les trois jours classiques. Quant à l'apprentissage olfacto-olfactif, il aurait fallu développer un protocole dans lequel des odeurs auraient été mélangées et la difficulté aurait notamment reposé sur le choix de ces odeurs. En effet, certains couples d'odeurs sont plus facilement discriminables que d'autres, et un mélange peut être identifié comme deux éléments distincts ou comme un élément unique. Il aurait donc fallu utiliser trois odeurs qui ne s'accordent pas deux à deux, et qui sont malgré tout facilement discriminables entre elles. Le second argument est lié à la littérature. Ainsi, utilisant un paradigme relativement proche du nôtre, l'implication de la région parahippocampique (CE et cortex périrhinal) a déjà été mise en évidence dans un apprentissage associatif olfacto-olfactif (*Bunsey et Eichenbaum, 1993*). En accord avec ces travaux et la connectivité du CEL (*Kerr et al., 2007*), il est donc vraisemblable que ce cortex soit sollicité pour la formation d'associations entre deux stimuli non-spatiaux, qu'ils soient issus de la même modalité sensorielle ou non, tout particulièrement lorsqu'un ou plusieurs stimuli olfactifs sont utilisés.

En revanche, l'implication du CEL dans ce type de tâche reste en partie surprenante, au regard d'une partie de la littérature. En effet, le CE a été montré comme impliqué dans des tâches de reconnaissance d'objets uniquement lorsque le contexte et/ou de la position de l'objet doivent être pris en compte (*Van Cauter et al., 2013 ; Wilson et al., 2013a*), la reconnaissance d'un objet seul reposant plutôt sur l'activité du cortex périrhinal (pour revue, *Buckley et Gaffan, 2006*). Or, notre protocole exclut volontairement la saillance d'indices contextuels ou spatiaux. Deux arguments peuvent toutefois expliquer cette apparente contradiction. Tout d'abord, les tâches de reconnaissance d'objets reposent principalement sur l'identification visuelle des éléments présentés, donc sur l'activité du cortex périrhinal (*Buckley et Gaffan, 1998 ; Agster et Burwell, 2009*). Or, dans notre étude, la reconnaissance d'objets repose explicitement sur des caractéristiques olfactives et tactiles, justifiant l'intérêt porté au CEL, structure étroitement connectée avec le cortex piriforme et impliquée dans le traitement des informations olfactives, même si cette connectivité est trop souvent ignorée dans les revues portant sur ce cortex (pour revue, *Knierim et al., 2014 ; Figure 49*). D'autre part, ces tâches utilisent volontairement des objets très différents les uns des autres, alors que notre protocole comprend des objets avec des éléments recouvrants, ce qui complexifie la discrimination à opérer. Ces différences entre les articles cités et notre tâche participent à expliquer l'apparente contradiction entre les résultats obtenus et la littérature.

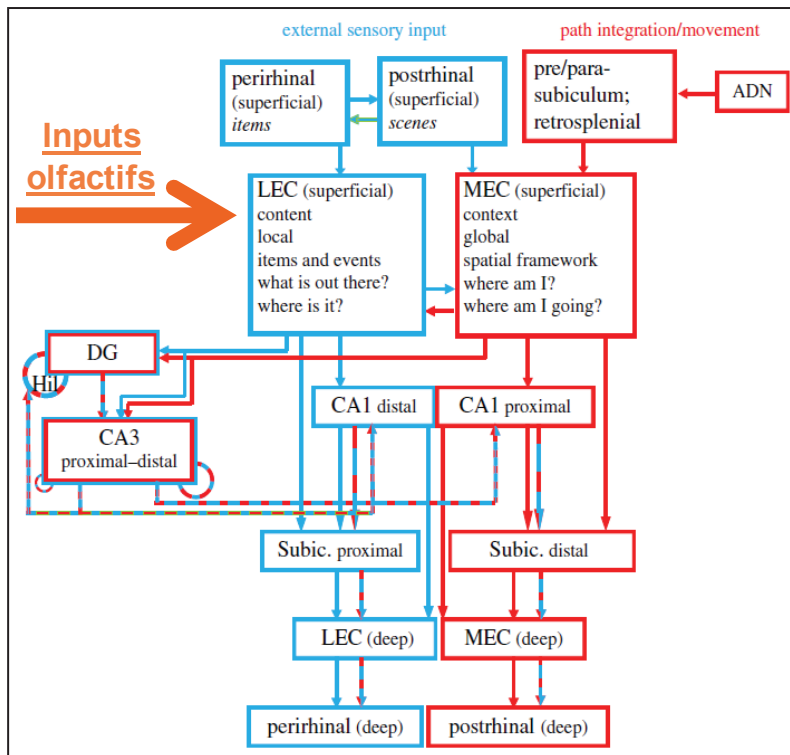


Figure 49 : Représentation classique, mais incomplète, de la connectivité dans la formation hippocampique. Si les inputs visuels convergeant sur le cortex périrhinal sont indirectement mis en évidence sur la figure d'origine au niveau du cortex périrhinal, ce n'est pas le cas des importants inputs olfactifs reçus par le CEL en provenance directe du BO et du cortex piriforme (flèche ajoutée en orange). A partir de Knierim et al., 2014.

Le gyrus denté dorsal est connu pour jouer un rôle critique dans les processus de séparation de pattern, c'est-à-dire la distinction d'évènements proches par gestion des interférences notamment contextuelles et spatiales, inhérentes aux épisodes présentant des éléments recouvrants (pour revue, *Kesner, 2013* ; pour revue, *Rolls, 2013* ; *Dees et Kesner, 2015*), tandis que la région CA3 du DH est impliquée dans les processus de complétion de pattern, processus permettant de restituer un souvenir complet, à partir d'un élément unique (pour revue, *Rolls, 2013*). La région CA1 du DH est quant à elle sollicitée dans les processus de séparation de pattern impliquant une dimension temporelle (*Gilbert et al., 2001*). Toutefois, les données présentées dans ce manuscrit suggèrent que le dCA1 sous-tend les processus de flexibilité de pattern bimodal cross-modal, selon un mécanisme cholinergique dépendant.

D'autre part, de récentes études s'intéressent de plus en plus à la région ventrale de l'hippocampe. En effet, longtemps ignorée, cette région fait désormais l'objet d'études utilisant notamment des paradigmes d'apprentissage olfactif. Ainsi, si l'hippocampe dorsal est plutôt sollicité dans les processus de séparation de pattern impliquant des objets, l'hippocampe ventral est plutôt impliqué lorsque des odeurs sont utilisées (pour revue, *Kesner, 2013* ; *Weeden et al., 2014*). Ces résultats sont donc en partie contradictoires avec nos données, lesquelles mettent en évidence l'implication du DH dans les processus sous-tendant la recombinaison des associations entre une odeur et une texture. Ce constat incite à porter prochainement attention au rôle de l'hippocampe ventral dans notre apprentissage.

Enfin, la persévérance dont font preuve les animaux dont le DH a été inactivé suggère l'importance de cette structure dans les processus d'inhibition. En effet, ils persistent à sélectionner le stimulus précédemment renforcé tout au long de la session, malgré l'absence de renforcement. Toutefois, cette absence d'extinction n'est pas observée lors des reversal unimodaux olfactif et tactile. Ainsi, le DH serait nécessaire pour inhiber des

comportements dans lesquels des associations complexes (bimodales) et non simples (unimodales) doivent être mises en retrait.

CHAPITRE 3
ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

*Signatures oscillatoires
de l'apprentissage olfacto-tactile*

I. MATERIEL & METHODES

A. Animaux & Animalerie

Douze rats mâles adultes de la souche Wistar (Charles Rivers) âgés de 7 à 8 semaines et pesant entre 270g et 280g à leur arrivée au laboratoire, sont utilisés. L'ensemble des animaux effectue des apprentissages bimodaux olfacto-tactiles et unimodaux olfactifs et tactiles selon un ordre pseudo-aléatoire. Ils sont divisés en deux groupes : cinq animaux sont d'abord soumis à l'apprentissage des tâches unimodales, puis des tâches bimodales ; sept animaux réalisent les mêmes procédures, mais dans l'ordre inverse. Hébergés en animalerie standard ($21 \pm 1,5^\circ\text{C}$ et $55 \pm 10\%$ d'humidité) en cage individuelle ($L=40\text{ cm} \times l=26\text{ cm} \times h=19\text{ cm}$), ils sont placés en cycle inversé (obscurité de 9h à 21h). Les conditions d'alimentation et l'heure des tests expérimentaux sont décrits dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 60).

L'ensemble de la procédure a été soumis et approuvé par le Comité d'Éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 et par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (C2EA-55, numéro d'autorisation : DR2014-30).

B. Principe de l'apprentissage

Le principe de l'apprentissage est décrit dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 60).

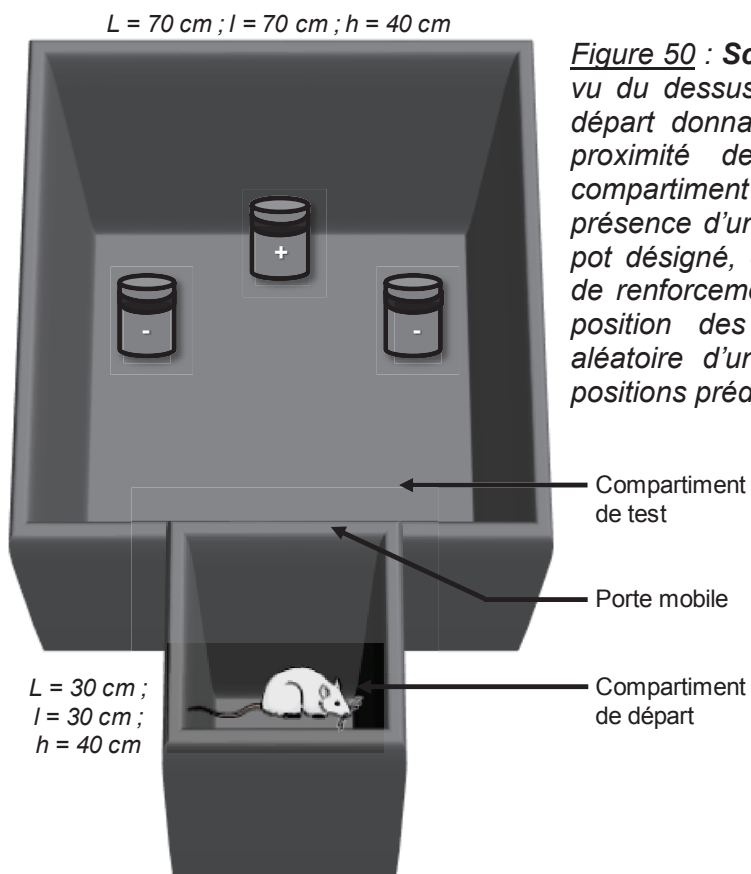


Figure 50 : Schéma du dispositif expérimental vu du dessus, composé d'un compartiment de départ donnant accès aux trois pots situés à proximité de la paroi du fond dans le compartiment de test. Le signe + symbolise la présence d'un renforcement alimentaire dans le pot désigné, et le signe - symbolise l'absence de renforcement dans les deux autres pots. La position des pots varie de façon pseudo-aléatoire d'un essai à l'autre, entre les trois positions prédéfinies.

C. Dispositif expérimental

Quelques aménagements ont été apportés à l'arène expérimentale précédemment utilisée. Elle a été agrandie (L=70 cm x l=70 cm x h=40 cm) pour espacer davantage les pots, et pourvue d'un compartiment de départ fixe (L=30 cm x l=30 cm x h=40 cm) pour limiter les interventions de l'expérimentateur (**Figure 50**). Les pots sont plus hauts et plus larges (h=10 cm x Ø=8 cm) pour éviter que le dispositif d'enregistrement électrophysiologique ne gêne l'exploration libre de l'animal.

Les autres caractéristiques du dispositif expérimental telles que l'éclairage, la composition de l'arène, le matériel vidéo, ainsi que le contenu des pots sont décrits dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 60).

Des odeurs supplémentaires non listées dans les sections Matériel & Méthodes des chapitres 1 et 2 (pages 62 et 96) sont utilisées ici : benzaldéhyde (Aldrich), ethyl caproate (E6) (Aldrich), isoamylacétate (Aldrich) et citronnellol (Fluka). La senteur des odeurs utilisées est indiquée dans le **tableau 10**.

Nom de l'odeur	Senteur
Benzaldéhyde	Amande amère
Ethyl caproate (E6)	Ananas
Isoamylacétate	Banane
Citronnellol	Citronnelle

Tableau 10 : Correspondance entre le nom de l'odeur utilisée et sa senteur.

De même, de nouvelles textures sont utilisées en complément de celles listées dans les sections Matériel & Méthodes des chapitres 1 et 2 (pages 62 et 96) : la face recto et la face verso de bandes velcro et des papiers peints avec différents motifs en relief (quadrillage, petits points, rayures verticales).

D. Protocole

1. Habituation

La procédure d'habituation est décrite dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 63).

2. Principe général de la tâche associative

Le principe général de la tâche associative utilisée est décrit dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 63). Toutefois, chaque session d'apprentissage contient vingt-quatre essais, et non vingt, tandis que le critère de réussite est restreint à cinq essais corrects parmi six consécutifs.

Le principe de la tâche bimodale et des tâches unimodales est décrit dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (pages 64 et 65). Les détails relatifs aux différentes tâches proposées (acquisition et recombinaison de la tâche OT, acquisition et reversal de la tâche olfactive, acquisition de la tâche tactile) sont présentés dans la section Matériel & Méthodes des chapitres 1 et 2 (pages 64, 65 et 97).

3. Stimuli olfactifs et tactiles utilisés pour les tâches bimodales sous forme de combinaisons

Les stimuli olfactifs et tactiles utilisés pour les tâches bimodales OT sont indiqués dans la section Matériel et Méthodes du chapitre 1 (Tableau 4, page 98).

4. Stimuli olfactifs et tactiles utilisés pour les tâches unimodales

Les stimuli olfactifs et tactiles utilisés dans les tâches unimodales olfactives et tactiles sont respectivement indiqués dans les **tableaux 11.a et 11.b**.

Tâches unimodales olfactives		
OLF1 rOLF1	Pot A	O1 : Eugénol
	Pot B	O2 : Benzaldéhyde
	Pot C	O3 : Carvone (-)
OLF2	Pot A	O4 : Ethyl caproate (E6)
	Pot B	O5 : Isoamylacétate
	Pot C	O6 : Citronnellol

Tableau 11.a : Présentation des jeux de stimuli olfactifs utilisés dans les apprentissages unimodaux olfactifs (acquisitions OLF1 et OLF2 ; reversal rOLF1). Le pot renforcé varie aléatoirement et équitablement entre l'ensemble des animaux.

Tâches unimodales tactiles		
TACT1	Pot A	T1 : Velcro recto
	Pot B	T2 : Velcro verso
	Pot C	T3 : Papier lisse
TACT2	Pot A	T4 : Papier peint quadrillage
	Pot B	T5 : Papier peint petits points
	Pot C	T6 : Papier peint rayures verticales

Tableau 11.b : Présentation des jeux de stimuli tactiles utilisés dans les apprentissages unimodaux tactiles (acquisitions TACT1 et TACT2). Le pot renforcé varie aléatoirement et équitablement entre l'ensemble des animaux.

5. Contrôle des biais expérimentaux

Les mesures utilisées pour éviter les biais expérimentaux sont décrites dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 66).

E. Fabrication des électrodes

Les électrodes d'enregistrement sont fabriquées au laboratoire. Ce sont des électrodes monopolaires constituées d'un assemblage entre un fil d'acier ($\varnothing=100 \mu\text{m}$) implanté dans le cerveau de l'animal, et soudé à un fil de cuivre ($\varnothing=400 \mu\text{m}$). Toutes les électrodes ont une impédance comprise entre 1 et 3 M Ω . Les interfaces de connexion sont également préparées au laboratoire (Ginder®).

F. Chirurgie

L'ensemble des procédures d'anesthésie, d'asepsie et d'analgésie suivies au cours de la chirurgie est conforme aux nouvelles directives européennes en matière d'éthique et de médecine vétérinaire (Ferry et al., 2014). Trois jours après leur arrivée au laboratoire, les animaux sont quotidiennement manipulés pendant quelques minutes pour les acclimater à l'expérimentateur. Dix jours après leur arrivée, chaque animal est anesthésié avec une injection intrapéritonéale de 3 ml/kg d'équithésine, un anesthésique composé d'un mélange de pentobarbital (29 mg/kg) et d'hydrate de chloral (142mg/kg). Tout au long de la procédure, la profondeur de l'anesthésie est régulièrement surveillée, en vérifiant l'absence de réflexe de retrait de la patte au pincement et la régularité du rythme respiratoire. En fonction de ces paramètres, les animaux sont régulièrement supplémentés avec 0,1 à 0,2 ml d'anesthésique toutes les 45 à 60 minutes en moyenne. Lorsque l'animal est profondément anesthésié, il reçoit une injection sous-cutanée d'un analgésique à durée d'action longue (0,05 ml de buprénorphine, 0,3 g/ml) à l'arrière de la tête. Il est ensuite placé dans l'appareil stéréotaxique (Stoelting®) sur un tapis chauffant avec une sonde thermique rectale permettant de maintenir sa température corporelle à 37°C, et sa tête est maintenue à l'aide de barres d'oreille et d'une barre de dents. Après asepsie de la zone opératoire par application d'un antiseptique (Hexamidine®), l'animal reçoit une injection traçante sous-cutanée de 0,1 ml de xylocaïne (21,33 mg/ml). Une incision sagittale de la peau du crâne est ensuite effectuée à l'aide d'un scalpel et les repères stéréotaxiques sont dégagés en retirant délicatement les tissus conjonctifs. L'os est soigneusement décapé à l'aide d'une rugine, puis la position horizontale du crâne est vérifiée à partir des coordonnées dorso-ventrales des repères stéréotaxiques Bregma (au niveau antérieur) et Lambda (au niveau postérieur). Les coordonnées antéro-postérieures et médio-latérales des structures cibles sont repérées sur le crâne de l'animal du côté de l'hémisphère gauche (**Tableau 12** et **Figure 51**). Ces coordonnées, ainsi que le choix d'implanter dans l'hémisphère gauche, ont été déterminées à partir de la littérature et d'expériences préliminaires (Paxinos et Watson, 2005 ; Cohen et al., 2015).

Structure	aPC	S1BC	dCA1	CEL
Antéro-Postérieur (AP)	+3,7 mm	-3,0 mm	-3,6 mm	-6,6 mm
Médio-Latéral (ML)	+2,5 mm	+5,5 mm	+2,5 mm	+6,0 mm
Dorso-Ventral (DV)	-6,0 mm	-2,5 mm	-2,5 mm	-7,5 mm

Tableau 12: Coordonnées stéréotaxiques de l'emplacement des électrodes. Les coordonnées antéro-postérieures et médio-latérales sont indiquées par rapport au Bregma. Les coordonnées dorso-ventrales sont indiquées par rapport à l'os du crâne. aPC = cortex piriforme antérieur ; S1BC = barrel cortex ; dCA1 = région CA1 de l'hippocampe dorsal ; CEL = cortex entorhinal latéral.

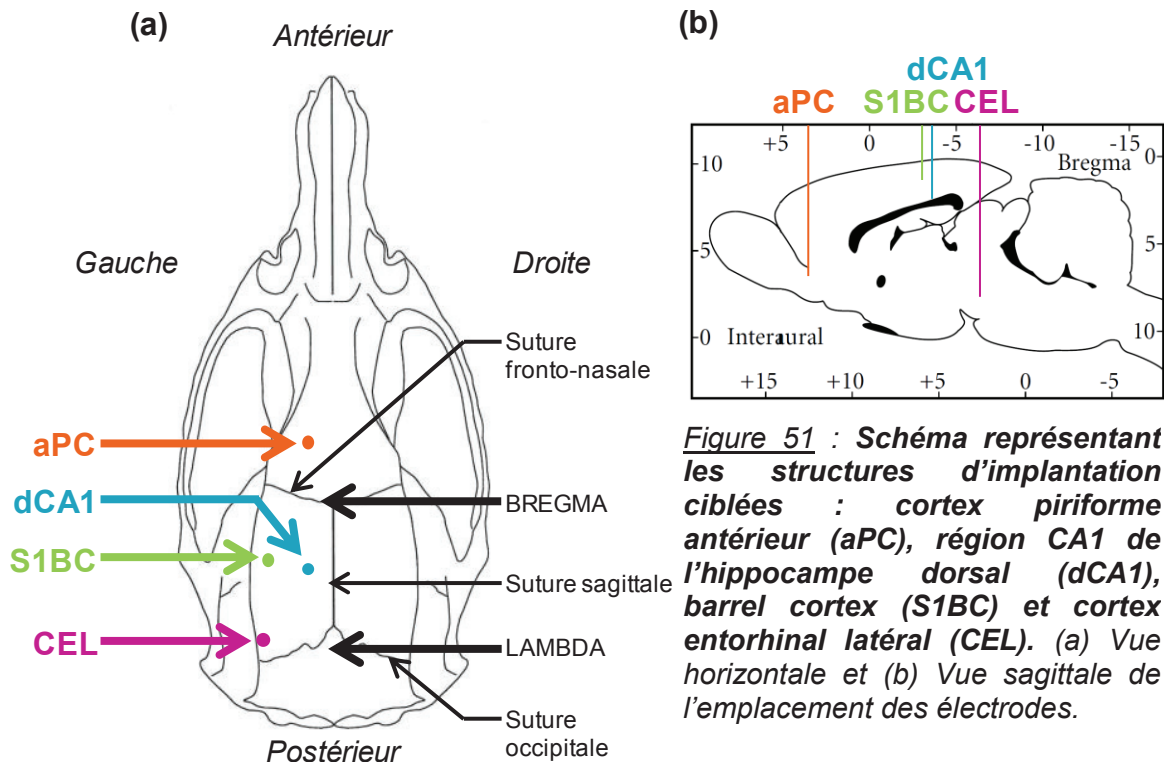


Figure 51 : Schéma représentant les structures d'implantation ciblées : cortex piriforme antérieur (aPC), région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1), barrel cortex (S1BC) et cortex entorhinal latéral (CEL). (a) Vue horizontale et (b) Vue sagittale de l'emplacement des électrodes.

Deux vis d'ancrage sont insérées dans l'os pariétal, en position contralatérale à celle des électrodes, ainsi qu'une vis de référence dans l'os occipital, au-dessus du cervelet. L'ensemble des vis est ensuite fixé avec une fine couche de résine (Super Bond C&B®) déposée sur le crâne de l'animal, ce qui permet de créer une surface rugueuse propice à la fixation ultérieure de l'implant. Après trépanation aux emplacements précédemment repérés, les électrodes sont délicatement insérées à l'aide d'un micromanipulateur dans les quatre structures cibles. La coordonnée dorso-ventrale finale est déterminée en fonction de la stéréotaxie et de l'amplitude du signal multi-unitaire enregistré tout au long de la descente dorso-ventrale de l'électrode. Une fois en place, chaque électrode est fixée au crâne par du ciment dentaire (Unifast® et solvant). Les quatre électrodes implantées sont ensuite soudées à un connecteur. L'ensemble de l'implant « électrodes-vis-connecteur » est ensuite solidarisé par du ciment dentaire et protégé par un capuchon, puis la peau est suturée au niveau rostral et caudal si besoin. A la fin de la procédure de chirurgie, l'animal est retiré de l'appareil stéréotaxique et reçoit une injection sous-cutanée de 0,05 ml d'un anti-inflammatoire non stéroïdien aux propriétés analgésiques (Carprofène, 5 mg/kg), ainsi qu'une injection intrapéritonéale de 1 ou 2 ml de sérum glucosé 5% pour limiter les risques liés à la déshydratation. L'animal est ensuite placé seul dans une cage de réveil dans une pièce chauffée pour le préserver des risques d'hypothermie. Après leur réveil, les animaux sont replacés individuellement dans la pièce d'hébergement de l'animalerie avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Les animaux sont surveillés quotidiennement, leur poids est consigné et ils sont manipulés délicatement afin de vérifier leur état de santé, ainsi que l'évolution de la cicatrisation. Une semaine après la chirurgie, l'expérimentateur habitue chaque animal à la manipulation de l'implant et il branche l'émetteur afin de vérifier la qualité des signaux. Les animaux bénéficient au total de quinze jours de repos post-opératoire avant le début de l'apprentissage.

G. Acquisition des données vidéo et électrophysiologiques

Chaque session comportementale est filmée par trois caméras : l'une placée verticalement au-dessus du centre de la cage et les deux autres sur les parois latérales de l'enceinte. Reliées à un ordinateur muni du logiciel Volcan développé au laboratoire, cette installation permet l'acquisition et l'analyse des images obtenues. L'activité électrique cérébrale de type potentiel de champ local (LFP) est recueillie par télémetrie à l'aide d'un dispositif sans fil à quatre voies (RodentPack EMKA Technology) par l'intermédiaire d'un émetteur connecté à l'implant du rat et un boîtier récepteur situé à distance. Les signaux enregistrés sont amplifiés (gain : x4000), filtrés entre 0,1 et 100 Hz, et numérisés à une fréquence de 2000 Hz par une carte d'acquisition fabriquée au laboratoire. Les signaux sont visualisés en ligne à l'aide du logiciel Neurolescope également développé au laboratoire. Les enregistrements vidéo et électrophysiologiques sont ensuite synchronisés avec une précision de l'ordre de 40 millisecondes.

Avant chaque session, l'émetteur est délicatement branché sur le connecteur de l'implant du rat (**Figure 52.a**). La bonne réception et la qualité des signaux sont vérifiées avant de débiter la session comportementale. Les signaux sont enregistrés en continu durant chaque session d'apprentissage, soit entre 20 et 40 minutes en moyenne. Toutes les données sont ensuite importées dans une base de données en vue de leur analyse ultérieure.

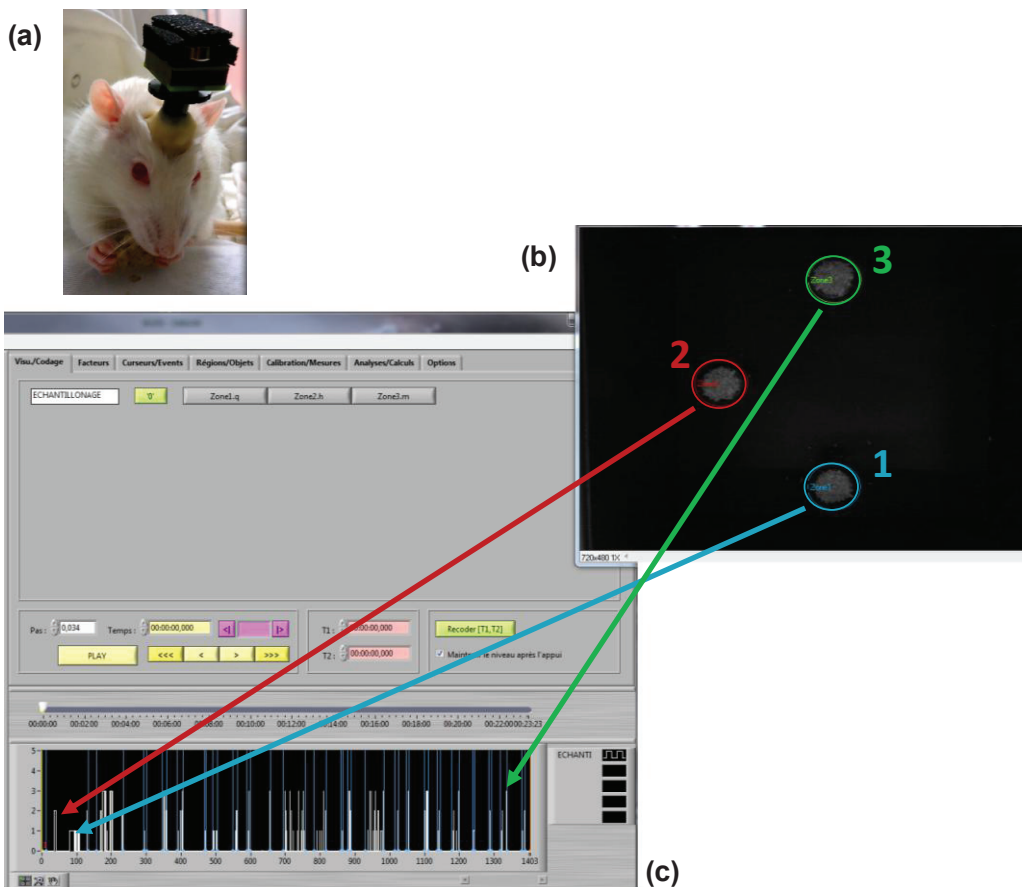


Figure 52 : Utilisation du logiciel Volcan pour caractériser le comportement de l'animal. (a) Photo d'un rat prêt pour l'enregistrement électrophysiologique. (b) Une zone de 10 cm de diamètre est déterminée autour de chaque pot, soit 1 cm à compter du contour du pot. (c) Le logiciel permet d'enregistrer les fenêtres pendant lesquelles l'animal échantillonne le ou les stimuli proposés, en fonction de la position des pots, selon une séquence pseudo-aléatoire (zone 1 en bleu, zone 2 en rouge et zone 3 en vert).

H. Analyse des données vidéo et électrophysiologiques

Les vidéos enregistrées font l'objet d'une analyse de codage visuel consistant à déterminer à quels moments l'animal s'approche d'un pot et pendant combien de temps il l'échantillonne. Pour cela, des zones de 10 cm de diamètre sont déterminées autour de chaque pot, soit à une distance de 1 cm à compter du contour extérieur du pot (**Figure 52.b**). Avec une résolution temporelle de 120 ms, ce codage permet de repérer l'ensemble des périodes durant lesquelles l'animal échantillonne le ou les stimuli proposés (**Figure 52.c**). Pour cela, des critères stricts sont utilisés. Concernant les tâches bimodales OT et unimodale tactile, il est considéré que l'animal échantillonne le stimulus tactile quand son museau est dans la zone d'échantillonnage, en contact avec la bande de texture. Concernant les tâches olfactives, il est défini que l'animal échantillonne le stimulus proposé quand son museau est en contact ou à faible distance de la sciure remplissant le pot, à travers laquelle diffuse l'odeur. La vue par les trois angles différents est alors un outil précieux pour la détermination des périodes d'échantillonnage selon ces différents critères.

Au cours d'un essai, l'animal est libre de visiter autant de pots qu'il le souhaite avant de faire son choix dans les deux minutes de l'essai. L'analyse est donc effectuée pour chaque échantillonnage du stimulus (olfactif, tactile ou OT) du pot, suite auquel l'animal peut décider de creuser le pot (condition « Digging »). Il s'agit soit d'une bonne réponse (condition « Correct »), soit d'une mauvaise réponse (condition « Incorrect »). Il peut aussi choisir de ne pas creuser le pot échantillonné (condition « No-digging ») et en visiter un autre. Selon ses performances, deux niveaux d'expertise sont déterminés : condition « Débutant », lorsque l'animal commence l'apprentissage et fait de nombreuses erreurs, et condition « Expert » lorsqu'il a atteint le critère de réussite (cinq essais corrects parmi six consécutifs) et ne commet donc presque plus d'erreurs.

Les analyses électrophysiologiques sont restreintes à de courtes périodes autour de l'échantillonnage, entre -1 seconde avant et +1,5 seconde après. Seules les périodes comprenant un échantillonnage d'une durée minimale de 360 ms sont prises en compte dans l'analyse (en moyenne, la durée d'échantillonnage est de 550 ms). Les 2,5 secondes de la période d'analyse sont divisées en cinq fenêtres de 500 ms chacune durant lesquelles le comportement de l'animal est bien caractérisé : fenêtre de référence, d'approche du pot, d'échantillonnage du pot, de décision précoce et de décision tardive c'est-à-dire creuser ou éviter le pot échantillonné ; **Figure 53**).

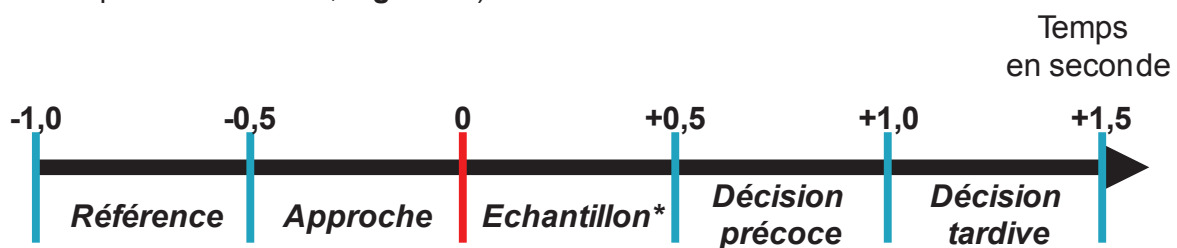


Figure 53 : Illustration des fenêtres d'analyses utilisées pour caractériser les signaux électrophysiologiques (période d'analyse de 2,5 secondes au total). Pour chaque essai, cette période est découpée en cinq fenêtres d'analyse de 500 ms chacune : référence, approche du pot, échantillonnage du pot, décision précoce et décision tardive (creuser le pot ou l'éviter). Le temps 0 correspond au début de l'échantillonnage. La durée minimale d'échantillonnage du stimulus est de 360 ms, et la durée moyenne est de 550 ms. Le terme échantillon* signifie échantillonnage.

Les signaux électrophysiologiques sont tout d'abord filtrés dans le but de conserver exclusivement les portions oscillatoires dépourvues d'artéfacts, que ce soit par saturation du système d'acquisition ou par microcoupure du signal. Par la suite, l'analyse des signaux est effectuée par des scripts développés au laboratoire avec le langage de programmation Python.

Le but étant de caractériser l'activité des LFP au cours du temps selon leur fréquence, une première analyse consiste à calculer des cartes temps-fréquence pour l'ensemble des essais pour chaque apprentissage proposé, chaque structure étudiée et chaque animal inclus dans l'étude. Obtenues par décomposition des signaux bruts au moyen d'ondelettes de Morlet, ces cartes permettent de décrire les variations spectrales du signal au cours du temps et de détecter les variations transitoires ou maintenues des activités oscillatoires. L'évolution temporelle du contenu fréquentiel se visualise sur une carte présentant le temps en abscisse, la fréquence en ordonnée et l'amplitude du signal selon un code couleur variant du bleu foncé (peu ample – quelques μV) au jaune (très ample – quelques dizaines de μV).

Pour chaque essai, l'amplitude du signal dans les différentes fenêtres d'analyse est normalisée sous forme de ratio par la moyenne et l'écart-type par rapport à l'activité oscillatoire enregistrée dans la fenêtre de référence (-1 sec à -0,5 sec avant le début de l'échantillonnage). Une représentation de ce type pour l'ensemble des fréquences de 1 à 100 Hz permet de déterminer les bandes de fréquence d'intérêt, à savoir le rythme θ , entre 5 et 12 Hz ; le rythme β , entre 15 et 40 Hz ; le rythme γ , entre 60 et 90 Hz. Les enveloppes spectrales des signaux dans les différentes bandes de fréquences sont ensuite obtenues par filtrage et transformée de Hilbert. Cette représentation permet de suivre l'évolution de l'amplitude des oscillations au cours du temps, dans chaque bande de fréquence. Sur ce type de représentation, le temps et l'amplitude du signal (présentée sous forme de ratio) sont respectivement indiqués en abscisse et en ordonnée. Pour chaque essai, l'amplitude du signal est normalisée selon les mêmes paramètres que pour les cartes temps-fréquence.

Pour une bande de fréquence donnée, le spectre de cohérence est un outil qui permet de déterminer la proportion de temps pendant laquelle deux structures génèrent ces mêmes oscillations au cours d'une période d'analyse définie par l'expérimentateur. Pour cela, les spectres d'amplitude normalisés des signaux émis dans deux structures cibles sont croisés et le signal obtenu est divisé par la somme des carrés des deux signaux individuels. La formule de cohérence indique une valeur comprise entre 0 et 1 : plus la valeur est proche de 1, plus la durée pendant laquelle les signaux génèrent les mêmes oscillations est longue. Ce type de représentation renseigne donc sur l'indice de la cohérence (en ordonnée) en fonction de la fréquence (en abscisse). Cet indice est calculé pour toute la durée de l'essai (référence, approche, échantillonnage, décision précoce et décision tardive). Dans cette analyse, la fréquence est séquencée par tranche de 4 Hz. Afin de déterminer précisément la ou les fenêtres au cours desquelles la cohérence entre deux structures varie, une analyse dynamique de la cohérence par fenêtre glissante sera prochainement réalisée.

Chaque analyse est effectuée en deux temps : les cartes temps-fréquence, les enveloppes de Hilbert et les cartes de cohérence sont tout d'abord calculées individuellement, puis moyennées pour l'ensemble des animaux. Différentes conditions sont étudiées :

- selon la décision de l'animal : condition « Digging » (qui comprend l'ensemble des échantillonnages suivis de la fouille du pot, indépendamment de la réussite de l'essai et du niveau d'expertise de l'animal) ou condition « No-digging » (qui comprend l'ensemble des échantillonnages qui n'ont pas été suivis de la fouille du pot) ;

Dans le cas de la condition « Digging » :

- selon la réussite de l'animal : condition « Correct » ou condition « Incorrect » ;
- selon l'expertise de l'animal : condition « Débutant » ou condition « Expert ».

I. Contrôle histologique

Deux semaines après la fin des tests, les animaux sont profondément anesthésiés avec une dose létale de pentobarbital sodique (100 mg/kg, Ceva Santé Animal). Une stimulation électrique d'une intensité proportionnelle à l'impédance de chaque électrode (1 mA pour 1M Ω) est ensuite appliquée afin d'induire une coagulation des tissus à l'extrémité de chaque électrode. Cette technique permet ainsi de visualiser l'emplacement intracérébral de chacune d'elles.

La procédure histologique est décrite dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 2 (page 103).

J. Variables comportementales mesurées

Ces variables sont décrites dans la section Matériel & Méthodes du chapitre 1 (page 66).

K. Analyses statistiques

Les données sont traitées avec le logiciel Systat 13.0®. Des tests statistiques non paramétriques sont réalisés sur les données électrophysiologiques, compte-tenu du nombre restreint d'animaux, même si chacun effectue un grand nombre d'essais. Des analyses de Friedman sont utilisées pour traiter les données appariées, ainsi que des analyses de Kruskal-Wallis pour les données indépendantes. Ces analyses sont complétées si besoin par des tests de Wilcoxon des rangs signés pour les données appariées, et par des tests de Mann-Whitney pour les données indépendantes. Pour chaque test, le seuil de rejet de l'hypothèse nulle est de 5%.

II. RESULTATS

Parmi les douze animaux implantés, les sites d'enregistrement de l'activité multi-unitaire ont été correctement localisés pour quatre animaux dans les quatre structures cibles à savoir la région antérieure du cortex piriforme (aPC), le barrel cortex (S1BC), la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1) et le cortex entorhinal latéral (CEL), et dans deux ou trois des quatre structures cibles pour quatre autres animaux. Ces huit animaux ont donc été inclus dans l'étude. En revanche, quatre autres animaux ont été exclus pour des raisons non seulement histologiques, mais aussi liées à la mauvaise qualité du signal (très nombreux artéfacts) et au comportement (faibles durées d'échantillonnage, nombreux essais non fouillés, peu de motivation à accomplir l'exercice...) offrant donc trop peu d'essais pour permettre une analyse fiable, en dépit de l'implantation correcte des électrodes dans certaines structures cibles. Le nombre d'animaux dont les données électrophysiologiques ont été analysées est le suivant : aPC, n=5 ; S1BC, n=7 ; dCA1, n=8 ; CEL, n=8. La localisation des sites est représentée sur la **figure 54**.

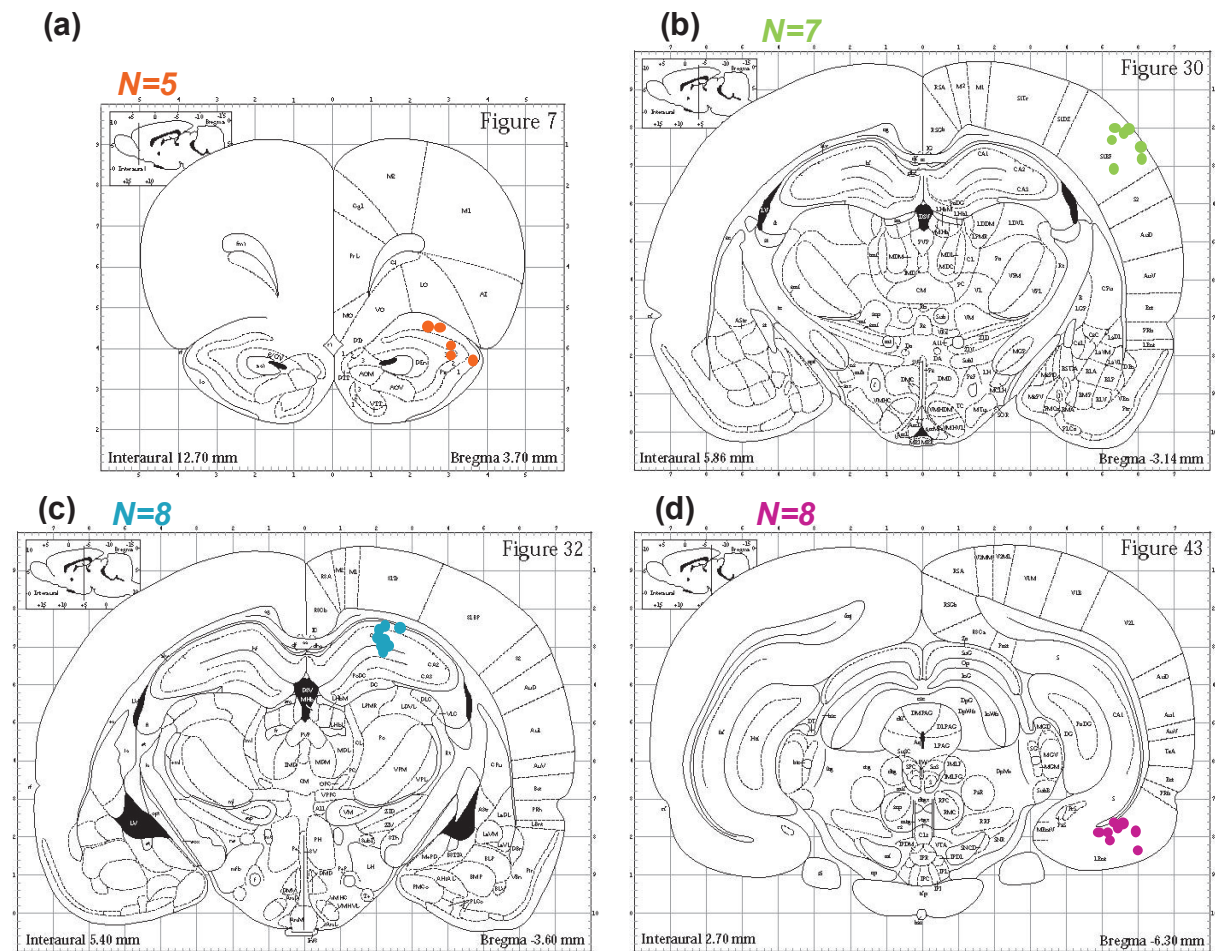


Figure 54 : Planches anatomiques représentant la localisation des enregistrements électrophysiologiques dans le cortex piriforme antérieur (a), le barrel cortex (b), la région CA1 de l'hippocampe dorsal (c) et le cortex entorhinal latéral (d). Les sites d'enregistrement ont été visualisés après électrocoagulation des électrodes sur animal profondément anesthésié. Ne sont représentés que les sites d'enregistrement correspondant aux animaux ayant été conservés dans les analyses. D'après l'atlas de Paxinos et Watson (2005).

A. Résultats comportementaux

Parmi les huit animaux retenus pour les analyses, cinq animaux ont tout d'abord été soumis à l'apprentissage des tâches bimodales (OT), puis unimodales olfactives (OLF) et tactile (TACT) selon un ordre pseudo-aléatoire, et trois animaux ont réalisé les mêmes procédures, mais dans l'ordre inverse. Quatre protocoles différents ont donc été effectués. En raison du faible nombre d'animaux par protocole, l'ensemble des données comportementales et électrophysiologiques a été groupé, indépendamment de l'ordre d'apprentissage des différentes tâches.

Les performances obtenues par les animaux lors de l'acquisition et du reversal de la tâche olfactive, lors de l'acquisition de la tâche tactile, et lors de l'acquisition et de la recombinaison de la tâche OT sont similaires à celles présentées dans la section résultats du chapitre 1 (**Figure 26**, page 78 ; **Figure 19**, page 68 ; **Figure 24**, page 73) et sont représentées sur la **figure 55**. Chaque acquisition est proposée sous forme de session quotidienne de vingt-quatre essais pendant trois jours consécutifs, tandis que le reversal et la recombinaison sont effectués en une session unique de vingt-quatre essais.

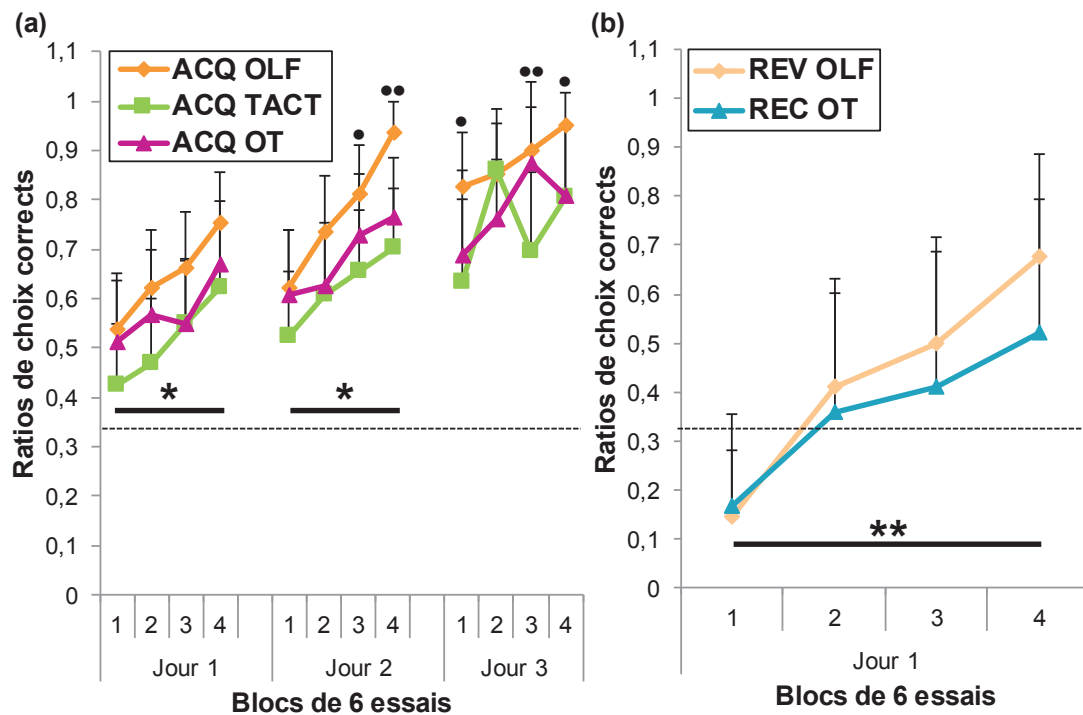


Figure 55 : Evolution rapide des performances : (a) lors de l'acquisition de la tâche olfactive (ACQ OLF, en orange, $n=8$ rats), de la tâche tactile (ACQ TACT, en vert, $n=7$ rats) et de la tâche OT (ACQ OT, en violet, $n=8$ rats) et (b) lors du reversal de la tâche olfactive (REV OLF, en orange clair, $n=5$ rats) et de la recombinaison de la tâche OT (REC OT, en bleu, $n=8$ rats). Chaque acquisition est réalisée en trois sessions effectuées sur trois jours consécutifs, tandis que le reversal et la recombinaison sont effectués en une session unique de vingt-quatre essais. Moyenne des ratios de choix corrects \pm S.E.M. dans chacun des quatre blocs de six essais consécutifs (1, 2, 3, 4) lors des trois jours (a) et lors d'une session unique (b) d'apprentissage. $*$ = $p<0,05$ et $$ = $p<0,01$ entre les blocs d'une session donnée pour tous les apprentissages. \bullet = $p<0,05$ et $\bullet\bullet$ = $p<0,01$ entre ACQ OLF et ACQ TACT dans un bloc donné.**

B. Exemple de signaux bruts de potentiels de champ locaux

La **figure 56** représente un exemple d'enregistrement de LFP bruts et des cartes temps-fréquences correspondantes obtenus dans les quatre structures cibles (dCA1, S1BC, aPC et CEL) lors de l'acquisition de la tâche OT chez un rat « type » (c'est-à-dire un animal présentant des signaux de bonne qualité dans les quatre structures enregistrées). Dans les fenêtres de référence et d'approche, des oscillations thêta de grande amplitude autour de 10 Hz sont détectées dans le dCA1 et dans le CEL, et des oscillations thêta émergent dans le S1BC au cours de l'échantillonnage. Enfin, dans les fenêtres de décision, des oscillations bêta, de grande amplitude dans l'aPC, et d'amplitude modérée dans le CEL, émergent autour de 25 Hz.

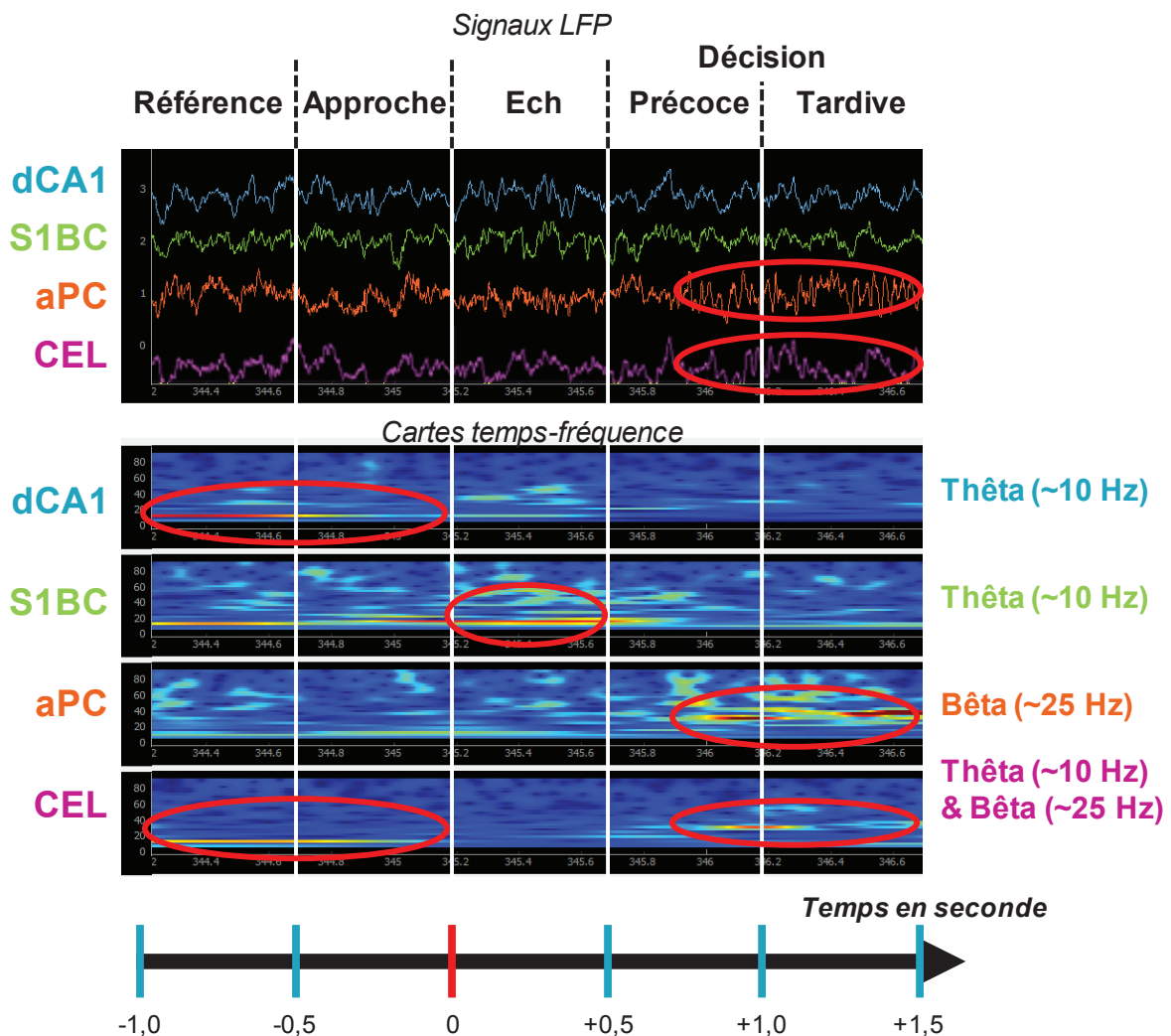


Figure 56 : Exemple type de signaux LFP bruts et des cartes temps-fréquence correspondantes obtenus dans les quatre structures cibles (dCA1, S1BC, aPC et CEL) pendant un essai lors de l'acquisition de la tâche OT. Dans les fenêtres de référence et d'approche, des oscillations thêta autour de 10 Hz sont observées dans le dCA1 et dans le CEL. Dans la fenêtre d'échantillonnage, des oscillations thêta autour de 10 Hz sont détectées dans le S1BC. Enfin, dans les fenêtres de décision, des oscillations bêta autour de 25 Hz émergent dans l'aPC et le dans CEL. Le terme Ech signifie Echantillonnage.

Dans une première partie, les données électrophysiologiques obtenues lors de l'acquisition des tâches unimodales olfactive et tactile, et bimodale OT sont décrites. Dans une deuxième partie, les analyses sont orientées vers la comparaison des données d'enregistrement entre les trois conditions expérimentales précédemment décrites. Dans une troisième partie, des comparaisons sont effectuées entre l'acquisition et la recombinaison de la tâche OT.

Dans ces différents paragraphes, les données analysées correspondent à de nombreux cas de figures déterminés par le type de tâche (olfactive, tactile ou OT), le type d'apprentissage (acquisition, recombinaison ou reversal), la structure enregistrée (dCA1, S1BC, aPC et CEL), la bande de fréquence (thêta, bêta, gamma), la décision prise par l'animal suite à l'échantillonnage (condition « Digging » versus condition « No-digging »), la réussite de l'essai (condition « Correct » versus condition « Incorrect »), le niveau d'expertise de l'animal (condition « Débutant » versus condition « Expert »)... Seuls les phénomènes donnant lieu à des modulations significatives de l'activité oscillatoire sont décrits.

C. Activités oscillatoires en réponse à l'échantillonnage d'un stimulus olfactif, tactile ou bimodal olfacto-tactile

1. Acquisition de la tâche olfactive

Dans cette tâche, aucune modulation significative de l'activité oscillatoire n'a été observée dans le dCA1 et dans le S1BC. Seules les données d'enregistrement obtenues dans l'aPC et le CEL dans la bande de fréquence bêta sont présentées.

Les **figures 57 et 58** représentent la dynamique oscillatoire moyenne enregistrée dans la bande bêta dans l'aPC (n=5 rats) et le CEL (n=8 rats) respectivement, lors de l'acquisition de la tâche olfactive au cours de la période d'analyse, soit entre -1 seconde avant le début de l'échantillonnage et +1,5 seconde après.

La **figure 57.a** représente la carte temps-fréquence moyenne de l'activité de l'aPC enregistrée pour l'ensemble des échantillonnages de la condition « Digging », indépendamment de la réussite des essais et du niveau d'expertise de l'animal. Cette figure montre que des oscillations bêta de grande amplitude émergent environ 500 ms après le début de l'échantillonnage dans une bande de fréquence comprise entre 25 et 45 Hz. Ces oscillations sont maintenues jusqu'à la fin de la période d'analyse (+1,5 seconde). La **figure 57.b** représente les enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans l'aPC dans les conditions « Digging » (n=160 essais) et « No-digging » (n=623 essais), dans le but de quantifier les observations précédemment décrites. Cette figure montre une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision dans les deux conditions. Toutefois, cette hausse est plus marquée dans la condition « Digging » (jusqu'à +70% de la valeur de référence) que dans la condition « No-digging » (autour de +30% de la valeur de référence). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans les conditions « Digging » et « No-digging » ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la fenêtre de référence, et les fenêtres d'échantillonnage et de décision

dans les deux conditions ($p < 0,05$), ainsi qu'entre les conditions « Digging » et « No-digging » dans la fenêtre de décision tardive ($p < 0,05$). Seule une tendance est montrée entre les deux conditions dans la fenêtre de décision précoce ($p = 0,08$).

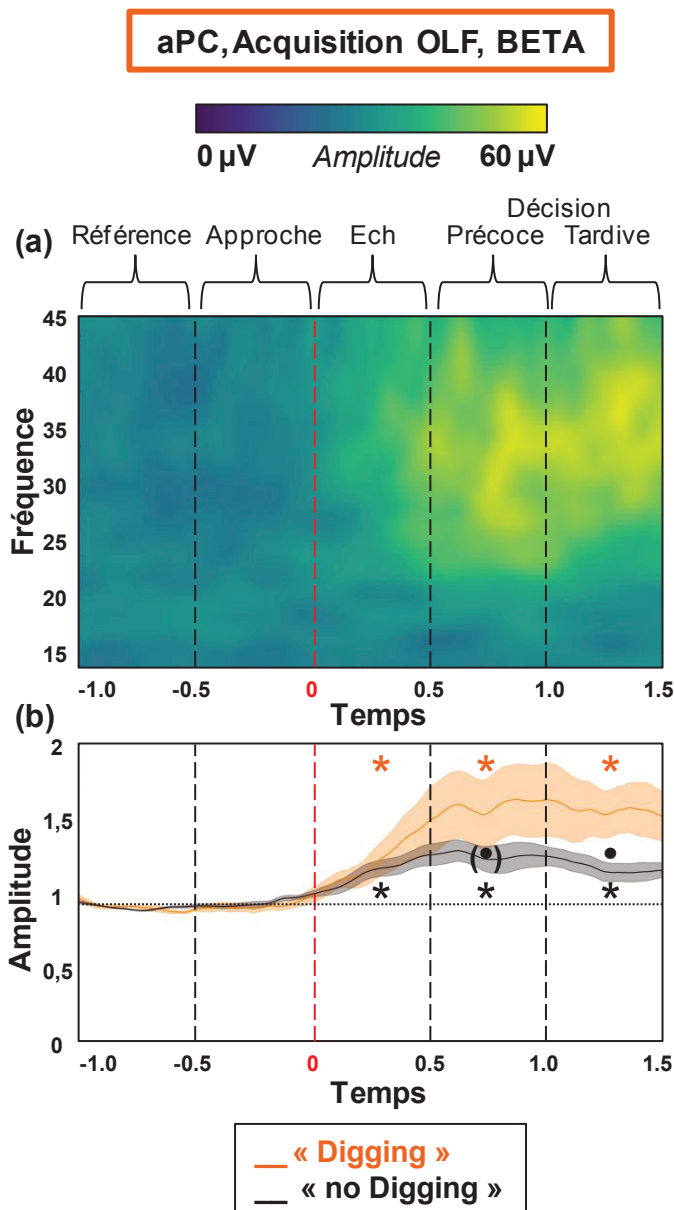


Figure 57 : Effet de la décision sur l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition de la tâche olfactive dans l'aPC.

(a) Carte temps-fréquence montrant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux dans la condition « Digging ». La carte représente la moyenne normalisée de la carte temps-fréquence calculée pour chaque période d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque rat ($n=5$ rats et $n=160$ essais). L'échelle de couleur code pour l'amplitude du signal.

(b) Enveloppes de Hilbert des oscillations bêta dans les conditions « Digging » (en orange, $n=160$ essais) et « No-digging » (en noir, $n=623$ essais). Chacune des deux courbes représente une moyenne normalisée des enveloppes calculées pour l'ensemble des essais de chaque animal, superposée à la S.E.M.. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ et (•) = $p = 0,08$ entre les deux conditions dans une fenêtre donnée.

La **figure 58.a** représente la carte temps-fréquence moyenne de l'activité du CEL enregistrée pour l'ensemble des échantillonnages de la condition « Digging ». Cette figure montre que des oscillations bêta de faible amplitude émergent environ 500 ms après le début de l'échantillonnage dans une bande de fréquence située autour de 25 Hz. Ces oscillations sont maintenues jusqu'à la fin de la période d'analyse. La **figure 58.b** représente les enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans le CEL dans les conditions « Digging » ($n=524$ essais) et « No-digging » ($n=2104$ essais). Cette figure montre une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision dans les deux conditions. Toutefois, cette hausse est plus marquée dans la condition « Digging » (jusqu'à +25%) que dans la condition « No-digging » (autour de +10%). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence

significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans les conditions « Digging » et « No-digging » ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la fenêtre de référence, et les fenêtres d'échantillonnage et de décision précoce et tardive dans les deux conditions ($p < 0,05$), ainsi qu'entre les conditions « Digging » et « No-digging » dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

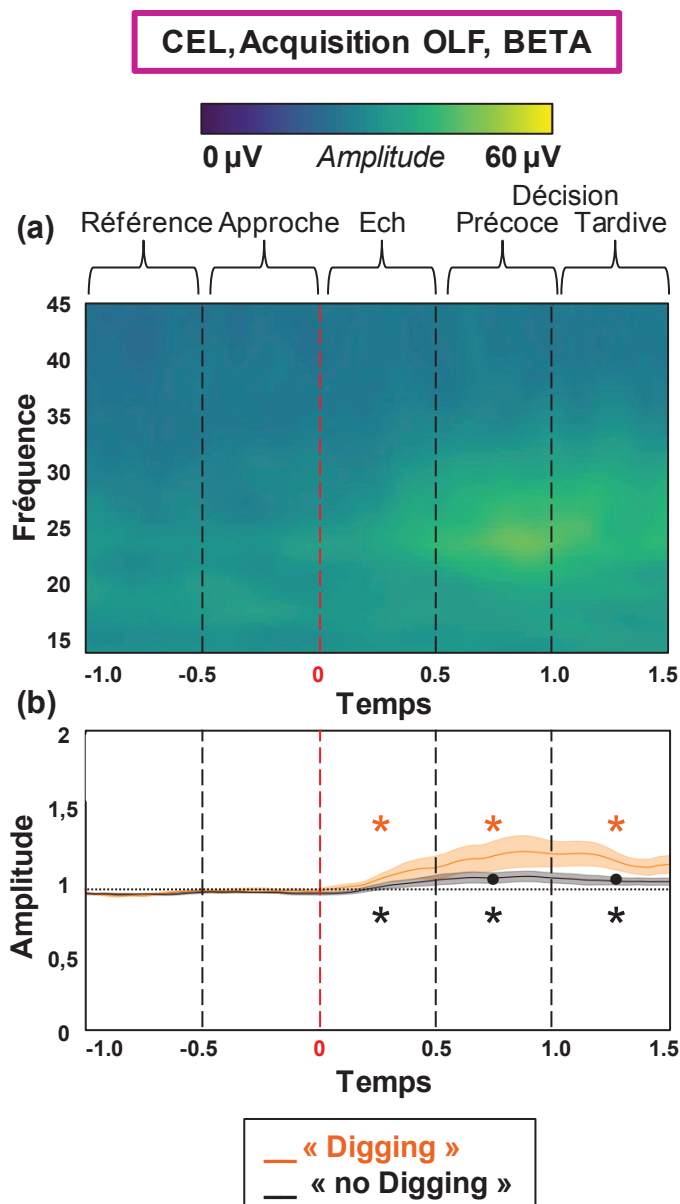


Figure 58 : Effet de la décision sur l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition de la tâche olfactive dans le CEL.

(a) Carte temps-fréquence montrant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux dans la condition « Digging ». La carte représente la moyenne normalisée de la carte temps-fréquence calculée pour chaque période d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque rat ($n=8$ rats et $n=524$ essais). L'échelle de couleur code pour l'amplitude du signal.

(b) Enveloppes de Hilbert des oscillations bêta dans les conditions « Digging » (en orange, $n=524$ essais) et « No-digging » (en noir, $n=2104$ essais). Chacune des deux courbes représente une moyenne normalisée des enveloppes calculées pour l'ensemble des essais de chaque animal, superposée à la S.E.M.. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ entre les deux conditions dans une fenêtre donnée.

En conclusion, l'échantillonnage du stimulus olfactif induit une augmentation de l'amplitude des oscillations dans la bande bêta de façon très importante au niveau de l'aPC, et de façon moins marquée au niveau du CEL, et cette hausse est détectée tardivement par rapport au début de l'échantillonnage. La réponse est significativement plus importante dans la condition « Digging » que dans la condition « No-digging », suggérant que l'émergence de ces oscillations est liée au comportement de l'animal.

2. Acquisition de la tâche tactile

Dans cette tâche, aucune modulation significative de l'activité oscillatoire n'a été observée dans le dCA1, l'aPC et le CEL. Seules les données d'enregistrement obtenues dans le S1BC dans la bande de fréquence thêta sont présentées.

La **figure 59** représente la dynamique oscillatoire moyenne enregistrée dans la bande thêta dans le S1BC (n=6 rats) lors de l'acquisition de la tâche tactile au cours de la période d'analyse.

La **figure 59.a** représente la carte temps-fréquence moyenne de l'activité du S1BC enregistrée pour l'ensemble des échantillonnages de la condition « Digging ». Cette figure montre des oscillations thêta entre 8 et 10 Hz présentes dès le début de la période d'analyse, qui diminuent en amplitude et en fréquence dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision, tandis que des oscillations thêta entre 10 et 12 Hz émergent dans les fenêtres d'approche et d'échantillonnage. La **figure 59.b** représente les enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans le S1BC dans les conditions « Digging » (n=226 essais) et « No-digging » (n=943 essais). Cette figure montre une augmentation de l'amplitude des oscillations thêta dans les fenêtres d'approche et d'échantillonnage dans les deux conditions (en moyenne +15%). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans les conditions « Digging » et « No-digging » ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la fenêtre de référence, et les fenêtres d'approche et d'échantillonnage dans la condition « No-digging » ($p < 0,05$), et entre la fenêtre de référence et la fenêtre d'échantillonnage dans la condition « Digging » ($p < 0,05$).

En conclusion, l'échantillonnage du stimulus tactile induit l'émergence d'oscillations thêta transitoires entre 10 et 12 Hz au niveau du S1BC, dans les fenêtres d'approche et d'échantillonnage. Ces oscillations sont d'amplitude similaire dans les conditions « Digging » et « No-digging », suggérant que l'émergence de ces oscillations est liée à l'anticipation et/ou au traitement sensoriel des stimuli présentés. Ainsi, l'émergence d'oscillations thêta entre 10 et 12 Hz semble être la signature électrophysiologique de l'échantillonnage d'un stimulus tactile pertinent pour la résolution d'une tâche.

Le S1BC et le dCA1 sont deux structures caractérisées par un rythme lent thêta, associé au whisking dans le S1BC, et à l'activité motrice de l'animal et aux processus mnésiques au niveau du dCA1 (pour revue, *Colgin, 2013*). Une analyse de cohérence entre les activités oscillatoires du S1BC et celles du dCA1 dans la bande thêta a été effectuée pour l'ensemble de la durée de chaque essai. Un pic de la valeur de l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires de ces deux structures est détecté autour d'une valeur de 0,40 dans la bande thêta, entre 8 et 12 Hz. Une analyse statistique de Friedman confirme cette observation et montre une différence significative de la valeur de l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires de ces deux structures entre les différentes tranches de fréquence pour l'acquisition de la tâche tactile ($p < 0,05$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre que la valeur de la tranche 8-12 Hz est significativement différente de celle des tranches 0-4 Hz, 4-8 Hz, 12-16 Hz et 16-20 Hz ($p < 0,05$).

S1BC, Acquisition TACT, THETA

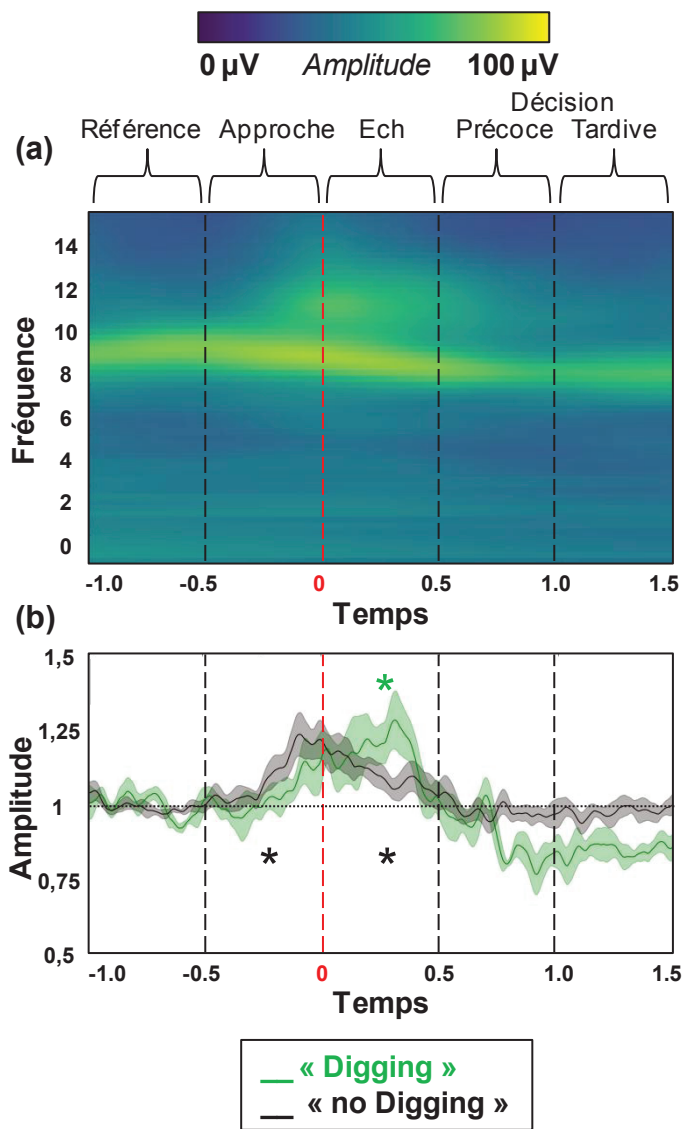


Figure 59 : Effet de la décision sur l'amplitude du signal dans la bande thêta lors de l'acquisition de la tâche tactile dans le S1BC.

(a) Carte temps-fréquence montrant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux dans la condition « Digging ». La carte représente la moyenne normalisée de la carte temps-fréquence calculée pour chaque période d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque rat (n=6 rats et n=226 essais). L'échelle de couleur code pour l'amplitude du signal.

(b) Enveloppes de Hilbert des oscillations thêta dans les conditions « Digging » (en vert, n=226 essais) et « No-digging » (en noir, n=943 essais). Chacune des deux courbes représente une moyenne normalisée des enveloppes calculées pour l'ensemble des essais de chaque animal, superposée à la S.E.M.. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = p<0,05 dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence.

3. Acquisition de la tâche olfacto-tactile

Dans cette tâche, les mêmes réponses oscillatoires que celles présentées dans le paragraphe précédent décrivant l'acquisition de la tâche tactile ont été obtenues dans le S1BC dans la bande de fréquence thêta. Seules les données d'enregistrement obtenues dans l'aPC et le CEL dans la bande de fréquence bêta sont présentées dans ce paragraphe.

Les figures 60 et 61 représentent la dynamique oscillatoire moyenne enregistrée dans la bande bêta dans l'aPC (n=5 rats) lors de l'acquisition de la tâche OT au cours de la période d'analyse.

La figure 60.a représente la carte temps-fréquence moyenne de l'activité de l'aPC enregistrée pour l'ensemble des échantillonnages de la condition « Digging ». Cette figure montre que des oscillations bêta d'amplitude modérée émergent environ 500 ms après le début de l'échantillonnage dans une bande de fréquence comprise entre 25 et 45 Hz. Ces oscillations sont maintenues jusqu'à la fin de la période d'analyse. La figure 60.b représente

les enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans l'aPC dans les conditions « Digging » (n=205 essais) et « No-digging » (n=840 essais). Cette figure montre une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres de décision dans les deux conditions. Toutefois, cette hausse est plus marquée dans la condition « Digging » (jusqu'à +25%) que dans la condition « No-digging » (autour de +6%). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans les conditions « Digging » et « No-digging » ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la fenêtre de référence et les fenêtres de décision dans les deux conditions ($p < 0,05$), ainsi qu'entre les conditions « Digging » et « No-digging » dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

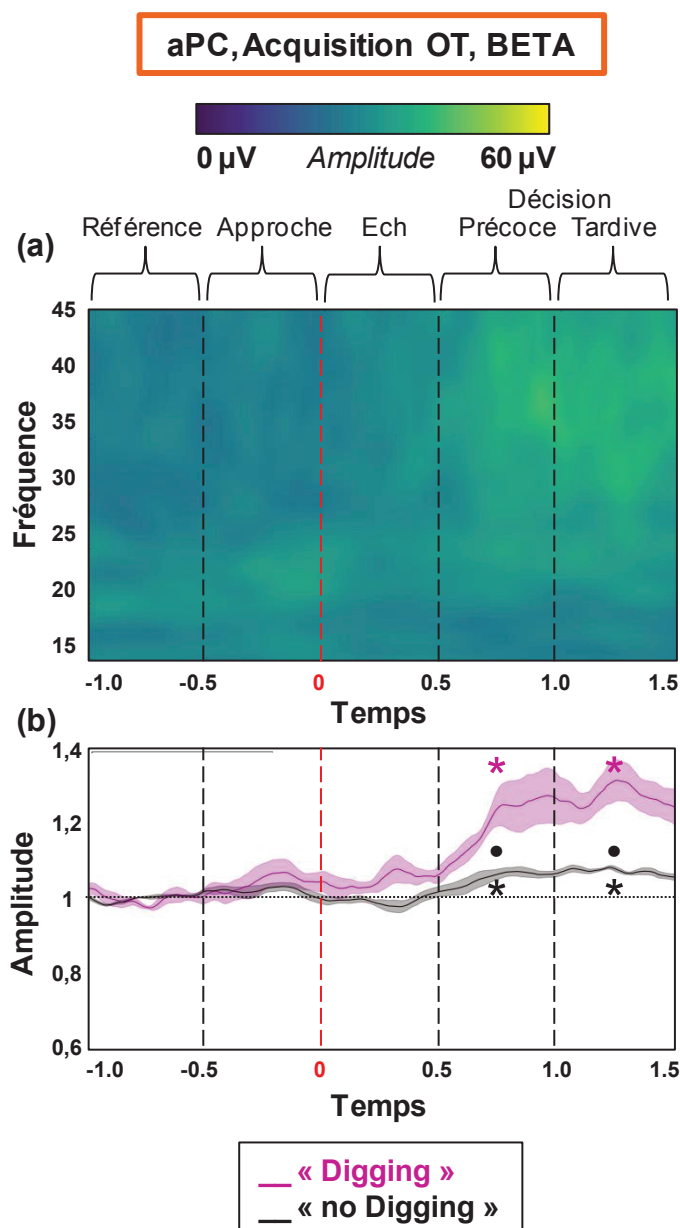


Figure 60 : Effet de la décision sur l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition de la tâche OT dans l'aPC.

(a) Carte temps-fréquence montrant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux dans la condition « Digging ». La carte représente la moyenne normalisée de la carte temps-fréquence calculée pour chaque période d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque rat (n=5 rats et n=205 essais). L'échelle de couleur code pour l'amplitude du signal.

(b) Enveloppes de Hilbert des oscillations bêta dans les conditions « Digging » (en violet, n=205 essais) et « No-digging » (en noir, n=840 essais). Chacune des deux courbes représente une moyenne normalisée des enveloppes calculées pour l'ensemble des essais de chaque animal, superposée à la S.E.M.. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ entre les deux conditions dans une fenêtre donnée.

La **figure 61** représente les enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans l'aPC en fonction du niveau d'expertise des animaux, c'est-à-dire dans les conditions « Débutant » (n=91 essais) et « Expert » (n=104 essais). Cette figure montre une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres de décision dans les deux conditions. Toutefois, cette hausse est plus marquée dans la condition « Expert » (jusqu'à +37%) que dans la condition « Débutant » (jusqu'à +13%). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans les conditions « Débutant » et « Expert » ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la fenêtre de référence et la fenêtre de décision tardive dans la condition « Débutant » ($p < 0,05$), entre la fenêtre de référence et les fenêtres de décision précoce et tardive dans la condition « Expert » ($p < 0,05$), ainsi qu'entre les conditions « Digging » et « No-digging » dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

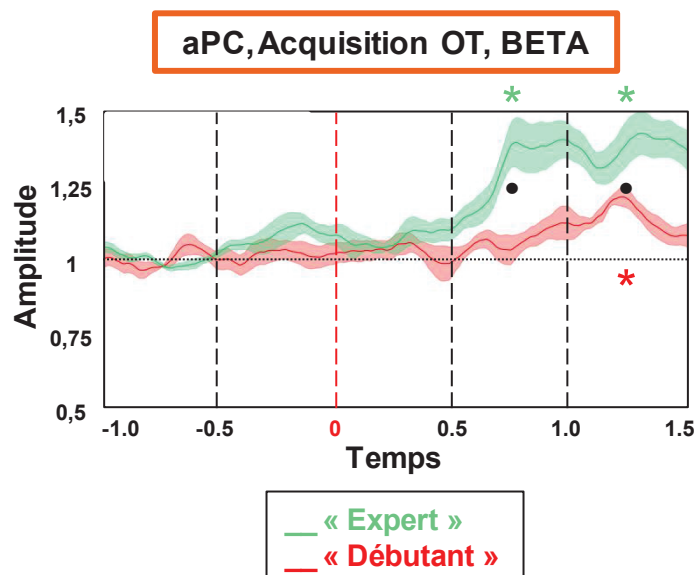


Figure 61 : Effet du niveau d'expertise sur l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition de la tâche OT dans l'aPC. Enveloppes de Hilbert des oscillations bêta dans les conditions « Débutant » (en rouge, n=5 rats et n=91 essais) et « Expert » (en cyan, n=5 rats et n=104 essais). Chacune des deux courbes représente une moyenne normalisée des enveloppes calculées pour l'ensemble des essais de chaque animal, superposée à la S.E.M.. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ entre les deux conditions dans une fenêtre donnée.

La **figure 62** représente la dynamique oscillatoire moyenne enregistrée dans la bande bêta dans le CEL (n=8 rats) lors de l'acquisition de la tâche OT au cours de la période d'analyse.

La **figure 62.a** représente la carte temps-fréquence moyenne de l'activité du CEL enregistrée pour l'ensemble des échantillonnages de la condition « Digging ». Cette figure montre que des oscillations bêta de faible amplitude émergent environ 500 ms après le début de l'échantillonnage dans une bande de fréquence autour de 25 Hz. Ces oscillations sont maintenues jusqu'à la fin de la période d'analyse. La **figure 62.b** représente les enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans le CEL dans les conditions « Digging » (n=480 essais) et « No-digging » (n=2132 essais). Cette figure montre une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres de décision dans les deux conditions. Toutefois, cette hausse est plus marquée dans la condition « Digging » (jusqu'à +18%) que dans la condition « No-digging » (autour de +7%). Une analyse

statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans les conditions « Digging » et « No-digging » ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la fenêtre de référence et les fenêtres de décision dans les deux conditions ($p < 0,05$), ainsi qu'entre les conditions « Digging » et « No-digging » dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

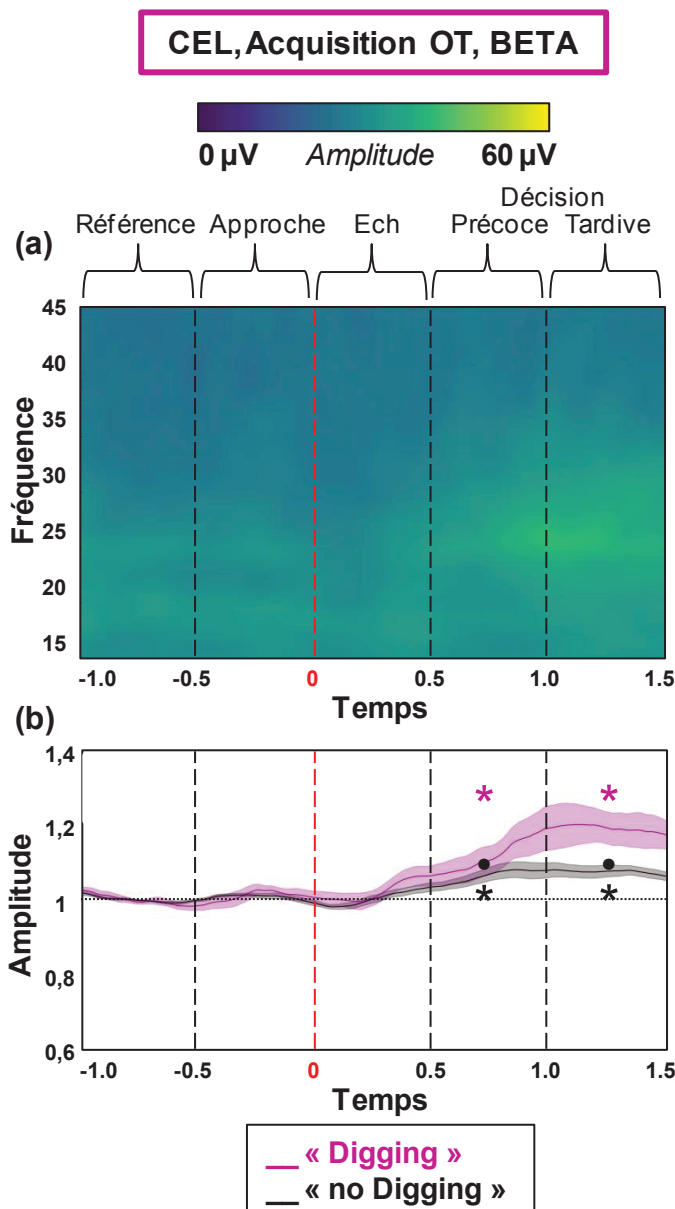


Figure 62 : Effet de la décision sur l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition de la tâche OT dans le CEL.

(a) Carte temps-fréquence montrant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux dans la condition « Digging ». La carte représente la moyenne normalisée de la carte temps-fréquence calculée pour chaque période d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque rat ($n=8$ rats et $n=480$ essais). L'échelle de couleur code pour l'amplitude du signal.

(b) Enveloppes de Hilbert des oscillations bêta dans les conditions « Digging » (en violet, $n=480$ essais) et « No-digging » (en noir, $n=2132$ essais). Chacune des deux courbes représente une moyenne normalisée des enveloppes calculées pour l'ensemble des essais de chaque animal, superposée à la S.E.M.. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ entre les deux conditions dans une fenêtre donnée.

En résumé, l'échantillonnage du stimulus OT induit une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans l'aPC et dans le CEL : ces oscillations sont modérément amples et à une fréquence comprise entre 25 et 45 Hz dans l'aPC, et peu amples et centrées sur une fréquence de 25 Hz dans le CEL. Ces oscillations bêta émergent tardivement par rapport au début de l'échantillonnage. Ces oscillations sont plus amples dans la condition « Digging » que dans la condition « No-digging », appuyant l'hypothèse selon laquelle l'émergence de ces oscillations dépend du comportement de l'animal.

Dans la mesure où une modulation significative de l'activité oscillatoire dans la bande bêta a été détectée dans l'aPC et le CEL lors de l'acquisition de la tâche OT, une analyse de cohérence a été réalisée entre les activités oscillatoires de ces deux structures pour l'ensemble de la durée des essais dans la bande bêta. Celle-ci montre que la valeur de l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires de l'aPC et celles du CEL est faible (0,20) et ne varie pas de façon significative, quelle que soit la tranche de 4 Hz d'intérêt (données non représentées).

D'autre part, en lien étroit avec la respiration, l'activité des structures olfactives telles que l'aPC est caractérisée par un rythme lent associé au sniffing (5-12 Hz), tandis qu'en tant que structure impliquée dans le whisking, l'activité du S1BC est également caractérisée par ce rythme lent. Dès lors, l'acquisition d'une tâche OT pourrait être définie par une synchronisation entre les activités oscillatoires de l'aPC et du S1BC dans une basse fréquence. Toutefois, la valeur de l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires de l'aPC et celles du S1BC dans la bande thêta est très faible (0,10 : données non représentées).

D. Comparaison des réponses bêta à un stimulus olfactif, tactile ou olfacto-tactile

Nos résultats pharmacologiques montrent que le CEL est impliqué pour l'acquisition d'une tâche bimodale OT, mais que son activité n'est pas nécessaire pour sous-tendre l'acquisition des tâches unimodales olfactive (OLF) et tactile (TACT). Ainsi, pour déterminer si la sélectivité de l'implication du CEL est sous-tendue par des réponses oscillatoires différentes selon la tâche proposée, les signaux obtenus dans cette structure lors de l'acquisition de ces trois tâches ont été comparés. La **figure 63** représente les moyennes normalisées des enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans la bande bêta dans chaque fenêtre d'analyse (approche, échantillonnage, décision précoce et décision tardive) pour l'ensemble des essais de chaque animal lors de l'acquisition des tâches OLF, TACT et OT dans la condition « Digging » dans l'aPC (n=5 rats pour OLF ; n=4 rats pour TACT ; n=5 rats pour OT) et dans le CEL (n=8 rats pour OLF ; n=7 rats pour TACT ; n=8 rats pour OT).

Les enregistrements obtenus dans l'aPC au cours de la tâche tactile sont inattendus et montrent une forte augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres de décision dans la condition « Digging » (**Figure 63.a** ; jusqu'à +65%, n=96 essais). Une augmentation moindre de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres de décision est également détectée dans le CEL dans la condition « Digging » (**Figure 63.b** ; jusqu'à +18%, n=319 essais). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux obtenus entre les fenêtres d'analyse dans la condition « Digging » dans l'aPC et dans le CEL ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la valeur de référence et les fenêtres d'échantillonnage et de décision précoce et tardive dans l'aPC ($p < 0,05$) et entre la valeur de référence et les fenêtres de décision dans le CEL ($p < 0,05$) dans la condition « Digging ».

RYTHME BETA

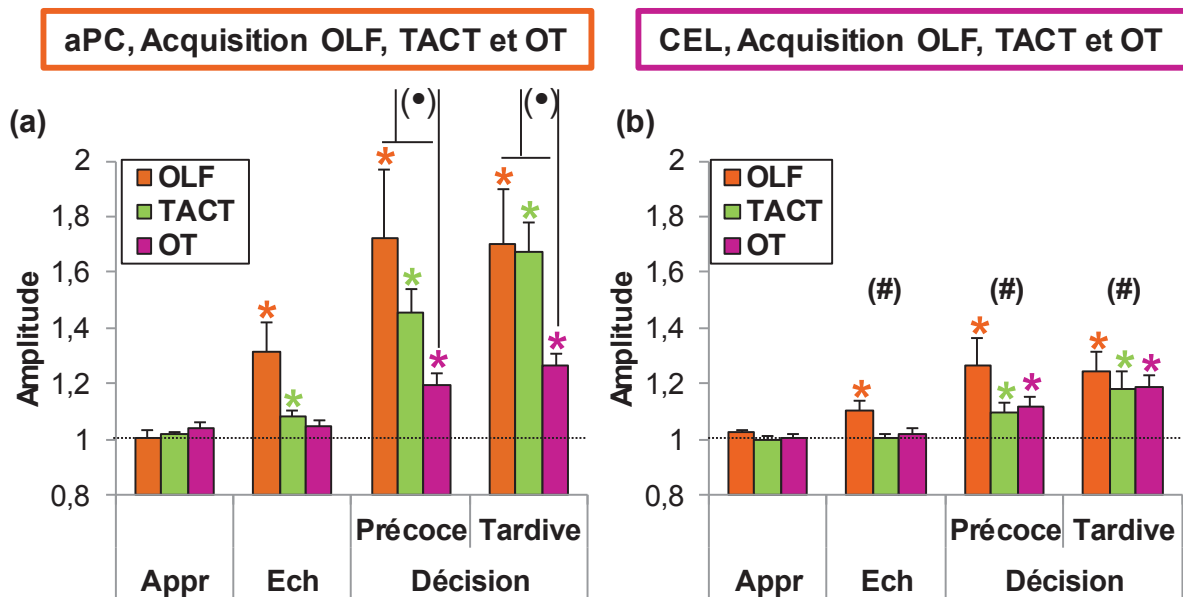


Figure 63 : Comparaison de l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition de la tâche olfactive, tactile et OT dans l'aPC (a) et le CEL (b) dans la condition « Digging ». Histogrammes représentant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux pour la tâche olfactive (OLF, en orange, aPC : n=5 rats et CEL : n=8 rats), tactile (TACT, en vert, aPC : n=4 rats et CEL : n=7 rats) et olfactive-tactile (OT, en violet, aPC : n=5 rats et CEL : n=8 rats). Les valeurs présentées correspondent à une moyenne normalisée \pm S.E.M. des enveloppes calculées pour chaque fenêtre d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque animal (aPC : OLF, n=160 essais ; TACT, n=96 essais ; OT, n=195 essais et CEL, OLF, n=524 essais ; TACT, n=319 essais ; OT : n=480 essais). Appr pour approche, Ech pour échantillonnage. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. (•) = $p = 0,08$ entre les tâches unimodales et bimodale dans une fenêtre donnée dans l'aPC. (#) = $p = 0,08$ entre l'aPC et le CEL respectivement pour la tâche bimodale et pour les tâches unimodales dans une fenêtre donnée.

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans l'aPC (**Figure 63.a**) entre les trois tâches montre que l'amplitude des oscillations bêta obtenues lors de la tâche olfactive est supérieure à celle des oscillations bêta obtenues lors de la tâche OT dans les fenêtres de décision. Par ailleurs, ces oscillations sont plus amples lors de la tâche tactile que lors de la tâche OT dans ces mêmes fenêtres, mais d'amplitude similaire lors de la tâche olfactive et lors de la tâche tactile. En revanche, ces trois tâches génèrent des oscillations bêta d'amplitude faible et similaire dans le CEL (**Figure 63.b**). Une analyse statistique de Kruskal-Wallis confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les différentes tâches dans les fenêtres de décision précoce et tardive dans l'aPC ($p < 0,05$), mais pas dans le CEL (p n.s). Une analyse statistique de Mann-Whitney montre que l'amplitude des signaux obtenus lors des tâches unimodales olfactive et tactile tend à être significativement différente de celle des signaux obtenus lors de la tâche bimodale OT dans les fenêtres de décision dans l'aPC uniquement ($p = 0,08$).

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans les trois tâches entre l'aPC et le CEL suggère que les oscillations bêta sont plus amples dans l'aPC que

dans le CEL dans les fenêtres de décision. Une analyse statistique de Mann-Whitney confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux obtenus entre les deux structures dans les fenêtres de décision pour la tâche bimodale OT ($p < 0,05$). En raison du faible nombre d'animaux inclus dans l'étude, seule une tendance est mise en évidence pour les tâches unimodales olfactive ($p = 0,08$) et tactile ($p = 0,068$).

En résumé, le rythme bêta détecté lors de l'échantillonnage du ou des stimuli proposés est plus ample dans l'aPC que dans le CEL. Plus précisément au niveau de l'aPC, l'amplitude des réponses oscillatoires dans la bande bêta dépend du type de stimuli présenté dans la tâche avec un ordre de grandeur tel que : unimodal olfactif et tactile > bimodal OT. Ainsi, un stimulus olfactif ou tactile seul évoque une réponse plus grande qu'un stimulus OT dans l'aPC. En revanche, l'amplitude des réponses obtenues dans le CEL ne diffère pas entre les trois tâches. La réponse oscillatoire dans la bande bêta ne met donc pas en évidence l'implication différentielle du CEL en fonction du type de la tâche à accomplir.

E. Comparaison des réponses à un stimulus olfacto-tactile entre l'acquisition et la recombinaison

1. Analyse de cohérence entre le CEL et le dCA1 dans la bande thêta

Nos résultats pharmacologiques montrent que le CEL est impliqué dans l'acquisition et dans la recombinaison d'une tâche OT, tandis que dCA1 est impliqué dans les processus sous-tendant la recombinaison. Ainsi, pour déterminer si l'établissement de ces deux apprentissages fait appel à une interaction fonctionnelle différente entre ces deux structures, une étude de cohérence des activités oscillatoires de ces deux structures et lors des différents apprentissages OT (acquisition et recombinaison) a été effectuée (**Figure 64**).

L'activité des structures composant la formation hippocampique est caractérisée par un rythme thêta ample notamment associé à l'activité motrice de l'animal explorant son environnement et aux processus de mise en mémoire d'une information (voir la [section 1 de l'introduction, page 34](#)). Dès lors, l'acquisition et/ou la recombinaison d'une tâche OT pourrai(en)t être définie(s) par une synchronisation entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1, dans la bande thêta. La **figure 64.a** représente l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires enregistrées dans les deux structures au cours des deux apprentissages. Cette figure montre un pic de la valeur de l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires de ces deux structures autour de 0,40 à 0,50 dans la bande thêta, entre 8 et 12 Hz, pour les deux apprentissages. Ceci suggère que les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 sont synchronisées pendant plus de 40% de la durée de la période d'analyse, et ce, pour les deux apprentissages considérés. Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de la valeur de l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 entre les différentes tranches de fréquence pour les deux apprentissages ($p < 0,05$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre que la valeur de l'indice de cohérence de la tranche 8-12 Hz est significativement différente de celle des tranches 0-4 Hz, 4-8 Hz, 12-16 Hz et 16-20 Hz pour les deux apprentissages ($p < 0,05$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de cette valeur entre les deux apprentissages (acquisition 0,47 ; recombinaison : 0,43) pour la tranche 8-12 Hz ($p < 0,05$).

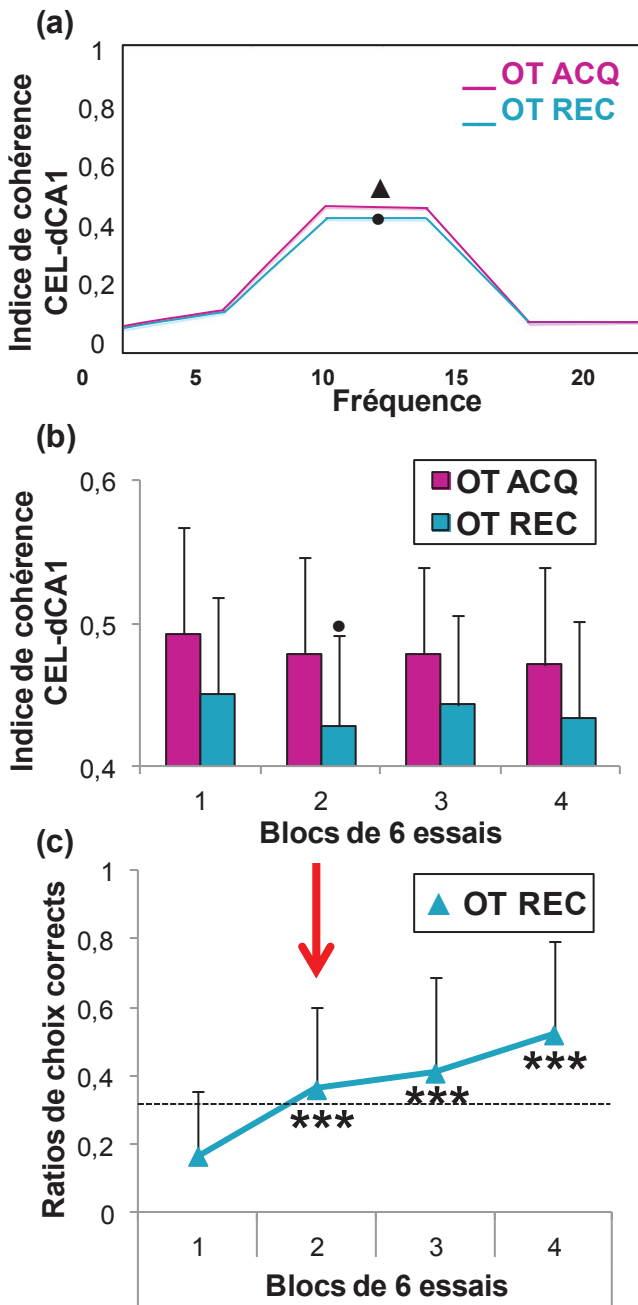


Figure 64 : Comparaison de la cohérence des activités oscillatoires entre le CEL et le dCA1 dans les basses fréquences (0-20 Hz) lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche OT. (a) Carte montrant les variations spectrales croisées des activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 lors de l'acquisition (OT ACQ, en violet, CEL et dCA1 : $n=8$ rats) et lors de la recombinaison (OT REC, en bleu, CEL et dCA1 : $n=8$ rats) d'une tâche OT. Indice de cohérence calculé pour le premier jour d'acquisition OT ($n=456$ essais) et pour la session unique de recombinaison OT ($n=129$ essais) dans la condition « Digging ». (b) Histogrammes présentant l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 par blocs de six essais consécutifs pour la première session d'acquisition (en violet) et pour la session de recombinaison (en bleu). (c) Performances obtenues lors de la recombinaison en une session unique de vingt-quatre essais. La flèche rouge indique le bloc au cours duquel les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 se découplent, en comparaison avec l'acquisition. $\blacktriangle = p < 0,05$ entre la tranche 8-12 Hz et les tranches 0-4 Hz, 4-8 Hz, 12-16 Hz et 16-20 Hz. $\bullet = p < 0,05$ entre OT ACQ et OT REC pour la tranche 8-12 Hz (a) ou dans un bloc (b) donné. $*** p < 0,001$ comparé au premier bloc.

(b) Histogrammes présentant l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 par blocs de six essais consécutifs pour la première session d'acquisition (en violet) et pour la session de recombinaison (en bleu).

(c) Performances obtenues lors de la recombinaison en une session unique de vingt-quatre essais. La flèche rouge indique le bloc au cours duquel les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 se découplent, en comparaison avec l'acquisition. $\blacktriangle = p < 0,05$ entre la tranche 8-12 Hz et les tranches 0-4 Hz, 4-8 Hz, 12-16 Hz et 16-20 Hz. $\bullet = p < 0,05$ entre OT ACQ et OT REC pour la tranche 8-12 Hz (a) ou dans un bloc (b) donné. $*** p < 0,001$ comparé au premier bloc.

Afin d'étudier plus finement l'évolution des interactions entre le CEL et le dCA1, les sessions de vingt-quatre essais du premier

jour d'acquisition et de recombinaison de la tâche OT ont été divisées en quatre blocs de six essais (**Figure 64.b**). Une analyse de Wilcoxon des rangs signés montre que la valeur de l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 diffère significativement entre l'acquisition et la recombinaison dans le bloc 2 uniquement, c'est-à-dire pour les essais 7 à 12 ($p < 0,05$). Lors de la recombinaison, les faibles ratios de choix corrects obtenus pour le premier bloc (environ 0,20) augmentent progressivement pour atteindre un score de 0,50 en fin de session (**Figure 64.c**).

En résumé, les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 sont en partie synchronisées lors de l'acquisition et lors de la recombinaison d'une tâche OT. Toutefois, cette synchronisation est plus faible lors de la recombinaison. Ceci suggère que la recombinaison est caractérisée par un découplage entre ces deux structures, spécifiquement au cours du second quart de la session.

2. Comparaison de la réponse thêta en fonction de la décision de l'animal dans le CEL et le dCA1

Afin mieux comprendre les mécanismes sous-tendant le relatif découplage entre les activités du CEL et celles du dCA1 mis en évidence dans l'étude de cohérence, la dynamique oscillatoire moyenne enregistrée dans la bande thêta dans le CEL (n=8 rats) et dans le dCA1 (n=8 rats) est comparée entre l'acquisition et la recombinaison de la tâche OT au cours de la période d'analyse. Ceci permet également de confronter la dynamique de l'activité oscillatoire enregistrée dans ces deux structures dans cette bande de fréquence.

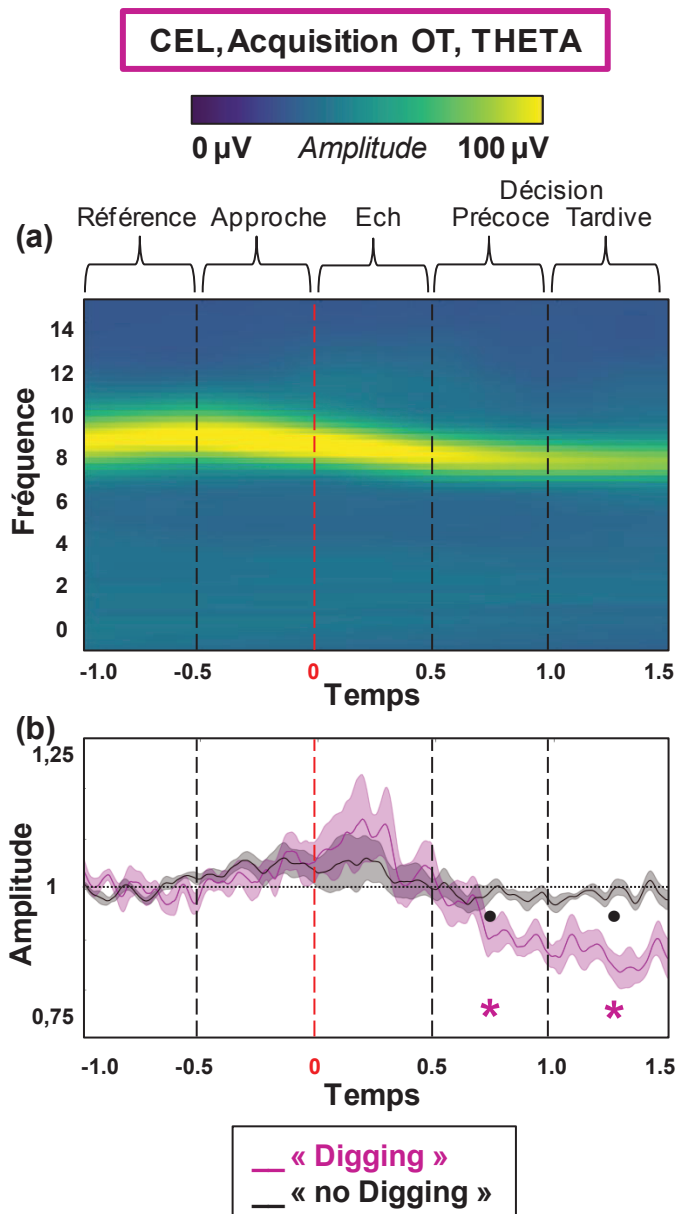


Figure 65 : Effet de la décision sur l'amplitude du signal dans la bande thêta lors de l'acquisition de la tâche OT dans le CEL.

(a) Carte temps-fréquence montrant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux dans la condition « Digging ». La carte représente la moyenne normalisée de la carte temps-fréquence calculée pour chaque période d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque rat (n=8 rats et n=480 essais). L'échelle de couleur code pour l'amplitude du signal.

(b) Enveloppes temps-fréquence des oscillations thêta dans les conditions « Digging » (en violet, n=480 essais) et « No-digging » (en noir, n=2132 essais). Chacune des deux courbes représente une moyenne normalisée des enveloppes calculées pour l'ensemble des essais de chaque animal, superposée à la S.E.M.. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ entre les deux conditions dans une fenêtre donnée.

La **figure 65** représente la dynamique oscillatoire moyenne enregistrée dans la bande thêta dans le CEL (n=8 rats) lors de l'acquisition de la tâche OT au cours de la période d'analyse.

La **figure 65.a** représente la carte temps-fréquence moyenne de l'activité du CEL enregistrée pour l'ensemble des échantillonnages de la condition « Digging ». La figure montre des oscillations thêta amples entre 8 et 10 Hz avant le début de l'échantillonnage, dont l'amplitude et la fréquence diminuent dans les fenêtres de décision. La **figure 65.b** représente les enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans le CEL dans les conditions « Digging » (n=480 essais) et « No-digging » (n=2132 essais). Cette figure montre une diminution de l'amplitude des oscillations thêta dans les fenêtres de décision dans les deux conditions. Toutefois, cette baisse est plus marquée dans la condition « Digging » (jusqu'à -13% de la valeur de référence) que dans la condition « No-digging » (autour de -2% de la valeur de référence). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans les conditions « Digging » et « No-digging » ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la fenêtre de référence et les fenêtres de décision dans la condition « Digging » uniquement ($p < 0,05$), ainsi qu'entre les conditions « Digging » et « No-digging » dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

En résumé, une diminution de l'amplitude des oscillations thêta est détectée dans le CEL dans les fenêtres de décision lors de l'acquisition de la tâche OT. Cette réduction est davantage marquée dans la condition « Digging », suggérant que cette baisse est essentiellement liée à l'immobilité relative de l'animal, contrairement à la condition « No-digging ».

La **figure 66** représente la dynamique oscillatoire moyenne enregistrée dans la bande thêta dans le dCA1 (n=8 rats) lors de l'acquisition de la tâche OT au cours de la période d'analyse.

La **figure 66.a** représente la carte temps-fréquence moyenne de l'activité du dCA1 enregistrée pour l'ensemble des échantillonnages de la condition « Digging ». La figure montre des oscillations thêta amples entre 8 et 10 Hz avant le début de l'échantillonnage, dont l'amplitude et la fréquence diminuent au cours de l'échantillonnage et dans les fenêtres de décision. La **figure 66.b** représente les enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans le dCA1 dans les conditions « Digging » (n=456 essais) et « No-digging » (n=2003 essais). Cette figure montre une diminution de l'amplitude des oscillations thêta dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision dans les deux conditions. Toutefois, cette baisse est plus marquée dans la condition « Digging » (jusqu'à -15%) que dans la condition « No-digging » (autour de -7%). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans les conditions « Digging » et « No-digging » ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la fenêtre de référence, et les fenêtres d'échantillonnage et de décision dans les deux conditions ($p < 0,05$), ainsi qu'entre les conditions « Digging » et « No-digging » dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

En résumé, une diminution de l'amplitude des oscillations thêta est détectée dans le dCA1 dans la fenêtre d'échantillonnage et dans les fenêtres de décision lors de l'acquisition de la tâche OT. Cette réduction est davantage marquée dans la condition « Digging », suggérant que cette baisse est essentiellement liée à l'immobilité relative de l'animal caractérisant cette condition.

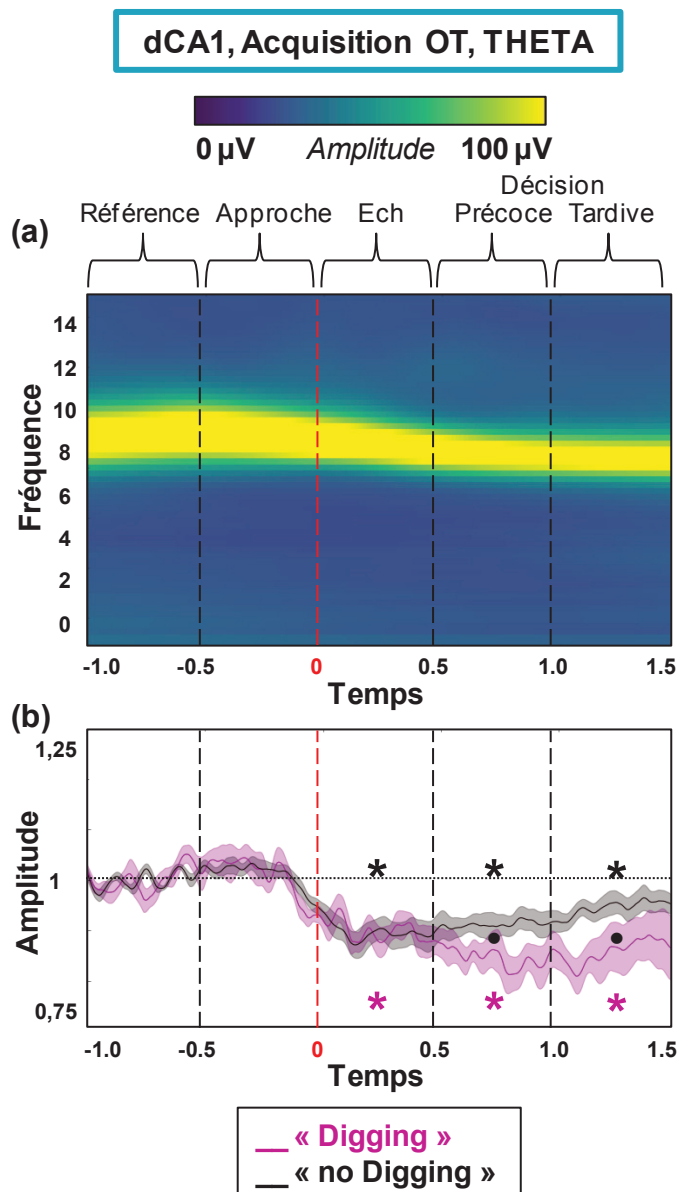


Figure 66 : Effet de la décision sur l'amplitude du signal dans la bande thêta lors de l'acquisition de la tâche OT dans le dCA1.

(a) Carte temps-fréquence montrant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux dans la condition « Digging ». La carte représente la moyenne normalisée de la carte temps-fréquence calculée pour chaque période d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque rat ($n=8$ rats et $n=456$ essais). L'échelle de couleur code pour l'amplitude du signal.

(b) Enveloppes temps-fréquence des oscillations thêta dans les conditions « Digging » (en violet, $n=456$ essais) et « No-digging » (en noir, $n=2003$ essais). Chacune des deux courbes représente une moyenne normalisée des enveloppes calculées pour l'ensemble des essais de chaque animal, superposée à la S.E.M.. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ entre les deux conditions dans une fenêtre donnée.

La **figure 67** représente les moyennes normalisées des enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans la bande thêta pour chaque fenêtre d'analyse pour l'ensemble des essais de chaque animal lors de l'acquisition (OT ACQ) et lors de la recombinaison (OT REC) dans la condition « Digging » dans le CEL ($n=8$ pour OT ACQ et OT REC) et dans le dCA1 ($n=8$ rats pour OT ACQ et OT REC).

La dynamique de l'amplitude des signaux lors de la recombinaison est similaire à celle décrite lors de l'acquisition OT, avec une diminution de l'amplitude des oscillations thêta dans la condition « Digging » dans le CEL dans les fenêtres de décision (jusqu'à -15%,

n=135 essais ; **Figure 67.a**) et dans le dCA1 dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision (jusqu'à -18%, n=129 essais ; **Figure 67.b**). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans le CEL et dans le dCA1 ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la valeur de référence et la fenêtre de décision tardive pour le CEL ($p < 0,05$), et entre la valeur de référence et les fenêtres d'échantillonnage et de décision pour le dCA1 ($p < 0,05$).

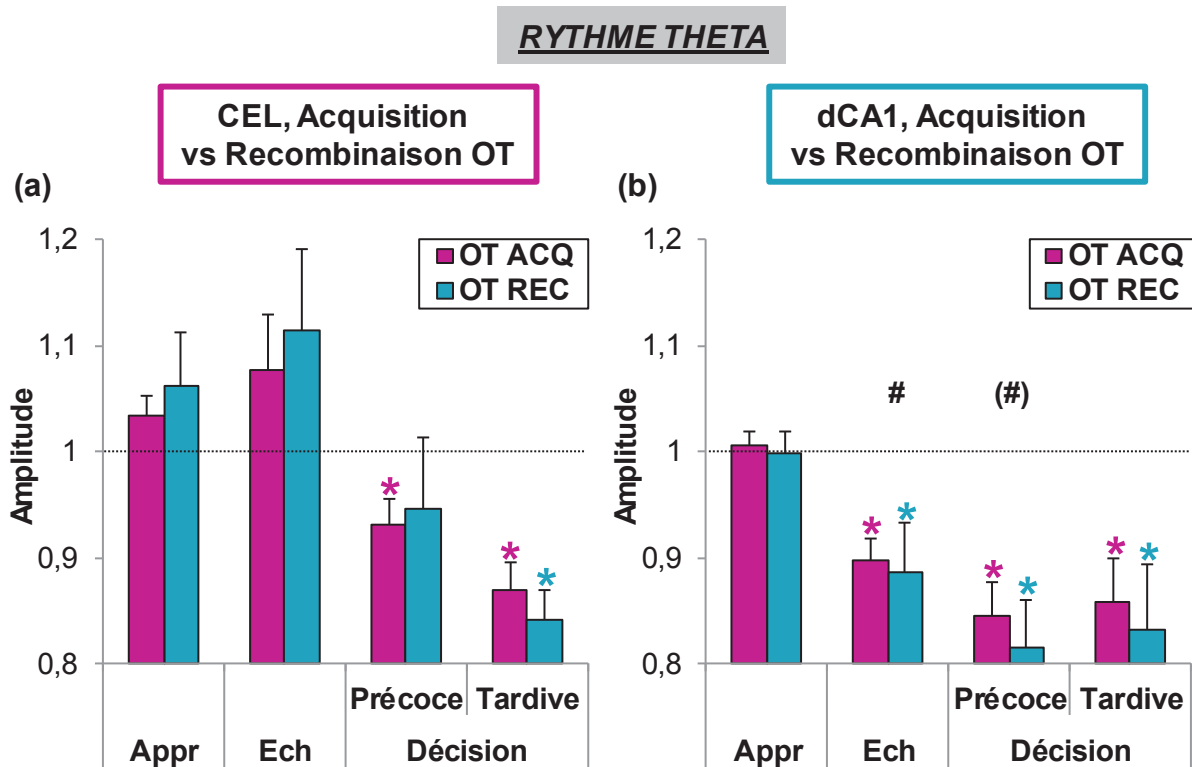


Figure 67 : Comparaison de l'amplitude du signal dans la bande thêta lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche OT dans le CEL (a) et le dCA1 (b) dans la condition « Digging ». Histogrammes représentant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux dans le CEL et le dCA1 lors de l'acquisition (OT ACQ, en violet, CEL, n=8 rats et dCA1, n=8 rats) et lors de la recombinaison d'une tâche olfacto-tactile (OT REC, en bleu, CEL, n=8 rats et dCA1, n=8 rats). Les valeurs présentées correspondent à une moyenne normalisée \pm S.E.M. des enveloppes calculées pour chaque fenêtre d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque animal (CEL : OT ACQ, n=480 essais ; OT REC, n=135 essais et dCA1 : OT ACQ, n=456 essais ; OT REC, n=129 essais). Appr pour approche, Ech pour échantillonnage. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la fenêtre de référence. # = $p < 0,05$ entre le CEL et le dCA1 pour OT ACQ et OT REC, et une fenêtre d'analyse donnée.

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans le CEL (**Figure 67.a**) et dans le dCA1 (**Figure 67.b**) entre les deux apprentissages (acquisition et recombinaison) montre que l'amplitude du rythme thêta est similaire, quelle que soit la fenêtre d'analyse (Wilcoxon des rangs signés, p n.s).

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux dans les deux apprentissages entre le CEL et le dCA1 montre que l'amplitude des oscillations thêta diminue de façon plus importante et plus précoce dans le dCA1 que dans le CEL, lors des fenêtres d'échantillonnage et de décision précoce. Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux obtenus entre les deux structures et dans les deux apprentissages, dans la fenêtre d'échantillonnage ($p < 0,05$). Seule une tendance est mise en évidence dans la fenêtre de décision précoce ($p = 0,08$).

En résumé, l'amplitude des oscillations thêta évolue de façon similaire lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche bimodale, dans le CEL et dans le dCA1. En revanche, l'amplitude des oscillations thêta diminue dès la fenêtre d'échantillonnage dans le dCA1, tandis qu'elle ne baisse qu'à partir de la fenêtre de décision précoce dans le CEL.

3. Comparaison de la réponse bêta dans l'aPC et le CEL

a. Entre l'acquisition et la recombinaison d'une tâche olfacto-tactile

Nos résultats pharmacologiques montrent que le CEL est impliqué dans l'acquisition et dans la recombinaison d'une tâche bimodale OT. Afin de préciser le processus dans lequel le CEL est impliqué, les réponses oscillatoires de cette structure dans la bande bêta ont été comparées entre ces deux apprentissages. La figure 68 représente les moyennes normalisées des enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans la bande bêta pour chaque fenêtre d'analyse pour l'ensemble des essais de chaque animal lors de l'acquisition (OT ACQ) et lors de la recombinaison (OT REC) dans la condition « Digging » dans l'aPC (n=5 rats pour OT ACQ et OT REC) et dans le CEL (n=8 rats pour OT ACQ et OT REC).

La **figure 68** montre que l'acquisition et la recombinaison se caractérisent chacune par une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres de décision dans la condition « Digging » dans l'aPC (**Figure 68.a** : OT ACQ, jusqu'à +25%, n=205 essais et OT REC, jusqu'à +60%, n=50 essais) et dans le CEL (**Figure 68.b** : OT ACQ, jusqu'à +18%, n=480 essais et OT REC, jusqu'à +30%, n=135 essais). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans l'aPC et dans le CEL, lors d'OT ACQ et lors d'OT REC ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la valeur de référence et les fenêtres de décision dans les deux structures et lors des deux apprentissages ($p < 0,05$).

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans l'aPC (**Figure 68.a**) et dans le CEL (**Figure 68.b**) entre les deux apprentissages (OT ACQ et OT REC) montre que les oscillations bêta sont plus amples lors d'OT REC que lors d'OT ACQ, dans les fenêtres de décision. Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les deux apprentissages dans l'aPC et dans le CEL dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans les deux apprentissages entre l'aPC et le CEL suggère que l'augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres de décision est plus importante dans l'aPC que dans le

CEL. Une analyse statistique de Mann-Whitney confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les deux structures et dans les deux apprentissages, dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

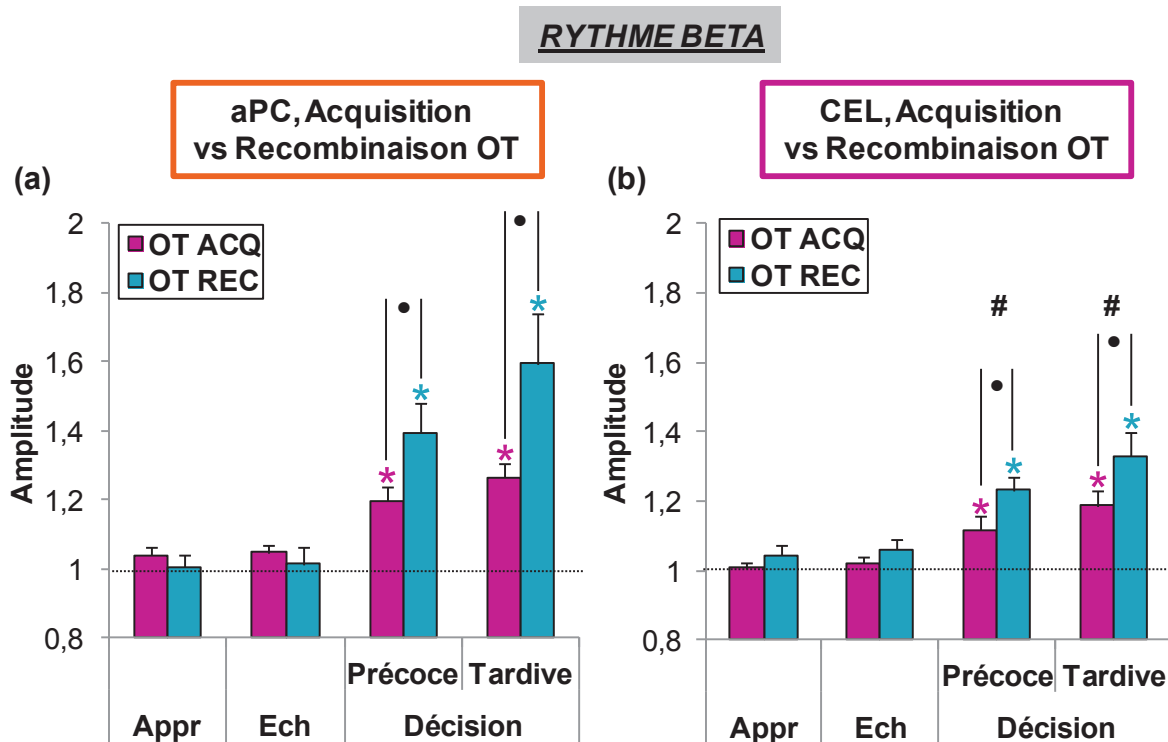


Figure 68 : Comparaison de l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche OT dans l'aPC (a) et le CEL (b) dans la condition « Digging ». Histogrammes représentant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux lors de l'acquisition (OT ACQ, en violet, aPC : $n=5$ rats et CEL : $n=8$ rats) et lors de la recombinaison (OT REC, en bleu, aPC : $n=5$ rats et CEL : $n=8$ rats). Les valeurs présentées correspondent à une moyenne normalisée \pm S.E.M. des enveloppes calculées pour chaque fenêtre d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque animal (aPC : OT ACQ, $n=195$ essais ; OT REC, $n=50$ essais et CEL : OT ACQ, $n=480$ essais ; OT REC, $n=135$ essais). Appr pour approche, Ech pour échantillonnage. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ entre OT ACQ et OT REC dans une fenêtre d'analyse et une structure donnée. # = $p < 0,05$ entre l'aPC et le CEL pour les deux apprentissages et une fenêtre donnée.

En conclusion, l'échantillonnage du stimulus OT induit une augmentation de l'amplitude des signaux dans la bande bêta dans l'aPC et dans le CEL lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche OT. Cette hausse est toutefois plus importante lors de la recombinaison que lors de l'acquisition, dans l'aPC et dans le CEL. L'augmentation de l'amplitude des oscillations bêta est également plus marquée dans l'aPC que dans le CEL pour ces deux apprentissages.

b. Entre l'acquisition et de reversal d'une tâche olfactive

Comme montré précédemment, l'émergence des oscillations bêta est modulée dans les structures olfactives telles que l'aPC en fonction du niveau d'expertise de l'animal pour les stimuli proposés (**Figure 61**). Or, la recombinaison OT repose sur l'utilisation des stimuli

familiers rencontrés en acquisition, mais réassociés en combinaisons inédites. Les animaux testés en recombinaison sont donc considérés comme Experts pour ces stimuli, bien qu'ils soient désormais proposés sous forme de combinaisons inédites et que leurs valences hédoniques aient été inversées. Afin de tester si l'utilisation des mêmes stimuli entre l'acquisition et la recombinaison est responsable de la différence significative de l'amplitude de la réponse oscillatoire précédemment mise en évidence entre OT ACQ et OT REC dans l'aPC (**Figure 68.a**) et dans le CEL (**Figure 68.b**), les animaux ont été soumis à un reversal unimodal olfactif. Les signaux obtenus dans la bande bêta ont été comparés à ceux obtenus lors de l'acquisition de la tâche olfactive. La **figure 69** représente les moyennes normalisées des enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans la bande bêta pour chaque fenêtre d'analyse pour l'ensemble des essais de chaque animal lors de l'acquisition (OLF ACQ) et lors du reversal (OLF REV) dans la condition « Digging » dans l'aPC (n=5 rats pour OLF ACQ et OLF REV) et dans le CEL (n=8 rats pour OLF REV et n=5 rats pour OLF REV).

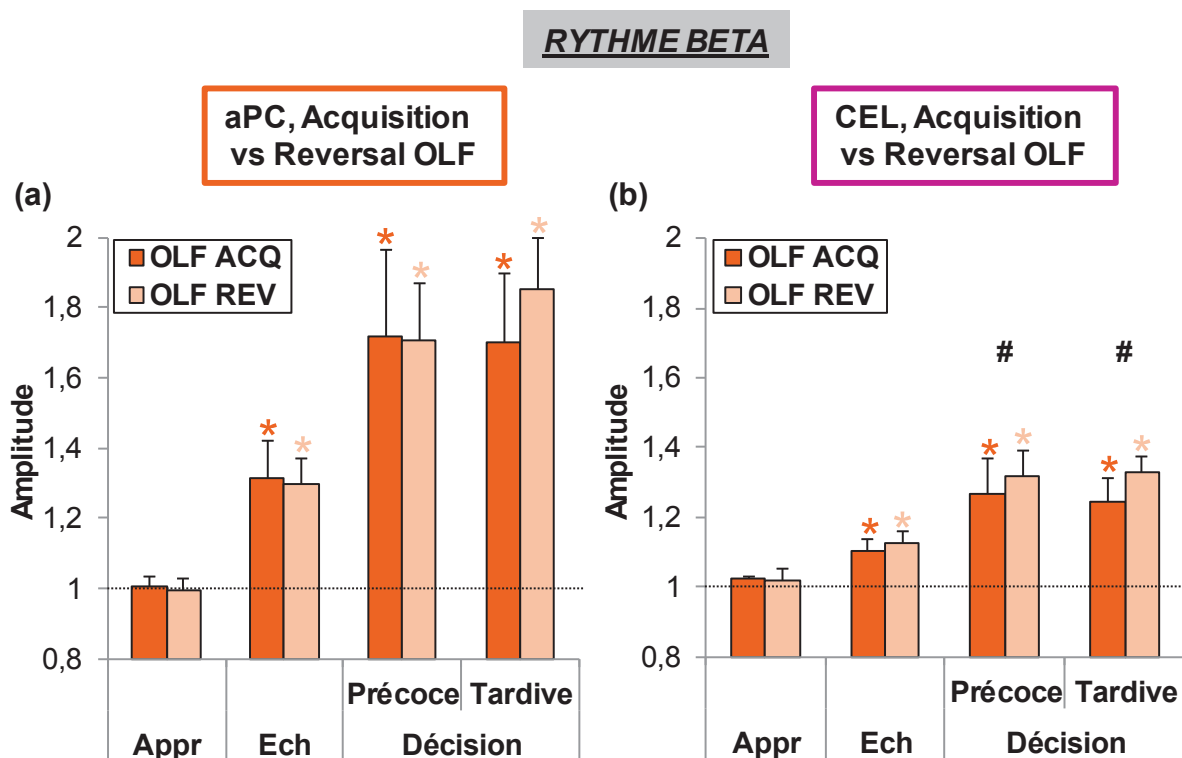


Figure 69 : Comparaison de l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition et lors du reversal de la tâche olfactive dans l'aPC (a) et le CEL (b) dans la condition « Digging ». Histogrammes représentant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux lors de l'acquisition (OLF ACQ, en orange, aPC : n=5 rats et CEL : n=8 rats) et lors du reversal olfactif (OLF REV, en orange clair, aPC : n=5 rats et CEL : n=5 rats). Les valeurs présentées correspondent à une moyenne normalisée \pm S.E.M. des enveloppes calculées pour chaque fenêtre d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque animal (aPC : OLF ACQ, n=160 essais ; OLF REV, n=73 essais et CEL : OLF ACQ, n=524 essais ; OLF REV, n=98 essais). Appr pour approche, Ech pour échantillonnage. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. # = $p < 0,05$ entre l'aPC et le CEL pour les deux apprentissages et une fenêtre donnée.

La **figure 69** montre que l'acquisition et le reversal d'une tâche olfactive se caractérisent chacun par une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision dans la condition « Digging », dans l'aPC (**Figure 69.a** : OLF ACQ, jusqu'à +70%, n=160 essais et OLF REV, jusqu'à +85%, n=73 essais) et dans le CEL (**Figure 69.b** : OLF ACQ, jusqu'à +25%, n=524 essais et OLF REV, jusqu'à +33%, n=98 essais). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans l'aPC et dans le CEL, lors d'OLF ACQ et lors d'OLF REV ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la valeur de référence, et les fenêtres d'échantillonnage et de décision dans les deux structures et dans les deux apprentissages ($p < 0,05$).

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans l'aPC (**Figure 69.a**) et dans le CEL (**Figure 69.b**) entre les deux apprentissages (OLF ACQ et OLF REV) montre que l'amplitude des oscillations bêta est similaire, quelle que soit la fenêtre d'analyse (Wilcoxon des rangs signés, p . n.s).

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans les deux apprentissages entre l'aPC et le CEL suggère que l'augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans les fenêtres de décision est plus importante dans l'aPC que dans le CEL. Une analyse statistique de Mann-Whitney confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les deux structures et dans les deux apprentissages, dans les fenêtres de décision ($p < 0,05$).

En conclusion, l'échantillonnage du stimulus olfactif induit une augmentation de l'amplitude des signaux dans la bande bêta dans l'aPC et dans le CEL lors de l'acquisition et lors du reversal de la tâche olfactive. Cette hausse est similaire dans ces deux apprentissages. L'augmentation de l'amplitude des oscillations bêta est cependant plus marquée dans l'aPC que dans le CEL pour ces deux apprentissages.

c. Entre l'acquisition et la recombinaison d'une tâche olfacto-tactile en fonction de la valence du stimulus olfactif

Le paradigme OT est un apprentissage dans lequel l'animal doit former des représentations bimodales. Ainsi, pour préciser les résultats précédemment décrits quant aux oscillations obtenues lors de l'acquisition et lors de la recombinaison OT dans l'aPC (**Figure 68.a**) et dans le CEL (**Figure 68.b**), l'amplitude des signaux obtenus dans la bande bêta dans la condition « Digging » dans ces deux structures en réponse à l'odeur renforcée lors de l'acquisition a été comparée à celle obtenue en réponse à cette même odeur désormais non renforcée lors de la recombinaison de la tâche OT. La **figure 70** représente les moyennes normalisées des enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans la bande bêta pour chaque fenêtre d'analyse pour l'ensemble des essais de chaque animal lors de l'acquisition (cas OT ACQ O+) et lors de la recombinaison (cas OT REC O-) dans la condition « Digging » dans l'aPC (n=5 rats pour OT ACQ O+ et OT REC O-) et dans le CEL (n=8 rats pour OT ACQ O+ et OT REC O-).

RYTHME BETA

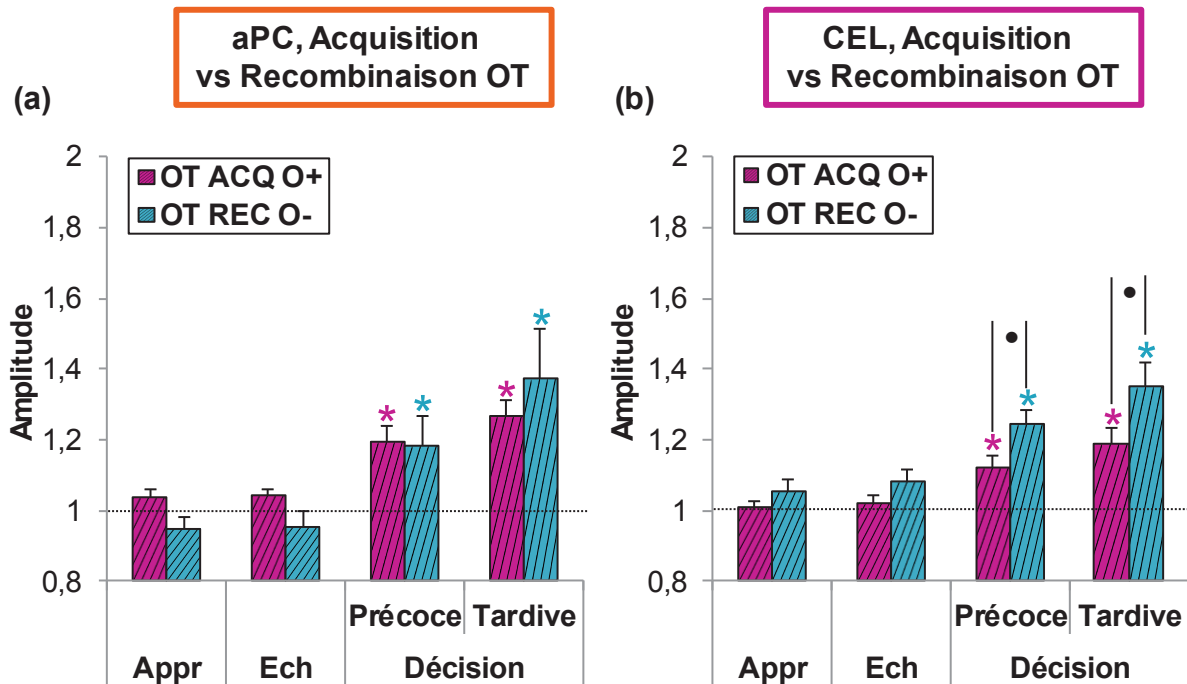


Figure 70 : Comparaison de l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche OT dans l'aPC (a) et le CEL (b) dans la condition « Digging ». Histogrammes représentant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux lors des échantillonnages de l'odeur correcte lors de l'acquisition (OT ACQ O+, en violet hachuré, aPC : n=5 rats et CEL : n=8 rats) et lors des échantillonnages de l'odeur incorrecte (renforcée en acquisition) lors de la recombinaison OT (OT REC O-, en bleu hachuré, aPC : n=5 rats et CEL : n=8 rats). Les valeurs présentées correspondent à une moyenne normalisée \pm S.E.M. des enveloppes calculées pour chaque fenêtre d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque animal (aPC : OT ACQ O+, n=191 essais ; OT REC O-, n=32 essais et CEL : OT ACQ O+, n=473 essais ; OT REC O-, n=69 essais). Appr pour approche, Ech pour échantillonnage. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence. • = $p < 0,05$ entre OT ACQ O+ et OT REC O- dans le CEL dans une fenêtre d'analyse donnée.

La **figure 70** montre que l'amplitude des oscillations bêta augmente dans le cas OT ACQ O+ et dans le cas OT REC O- dans les fenêtres de décision dans la condition « Digging » dans l'aPC (**Figure 70.a** : OT ACQ O+, jusqu'à +27%, n=191 essais et OT REC O-, jusqu'à +37%, n=32 essais) et dans le CEL (**Figure 70.b** : OT ACQ O+, jusqu'à +19%, n=473 essais et OT REC O-, jusqu'à +35%, n=69 essais). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans l'aPC et dans le CEL, dans les deux cas ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la valeur de référence et les fenêtres de décision, dans les deux cas et dans les deux structures ($p < 0,05$).

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans l'aPC (**Figure 70.a**) entre les deux cas (OT ACQ O+ et OT REC O-) montre que l'amplitude des oscillations bêta est similaire, quelle que soit la fenêtre d'analyse (Wilcoxon des rangs signés, p n.s.). En

revanche, ce rythme est plus ample dans le CEL (**Figure 70.b**) dans OT REC O- que dans OT ACQ O+, dans les fenêtres de décision (Wilcoxon des rangs signés, $p < 0,05$).

En conclusion, l'échantillonnage du stimulus olfactif renforcé en acquisition et non renforcé en recombinaison, dans le cadre de la tâche bimodale OT, induit une augmentation de l'amplitude des signaux dans la bande bêta dans l'aPC et dans le CEL, dans ces deux cas OT. Dans le CEL, cette hausse est toutefois plus importante lors de l'extinction de la persistance pour l'odeur précédemment renforcée lors de la recombinaison (OT REC O-), que lors de la formation initiale de l'association entre l'odeur et le renforcement lors de l'acquisition (OT ACQ O+).

d. Entre l'acquisition et le reversal d'une tâche olfactive en fonction de la valence du stimulus

L'analyse précédente s'apparente à un reversal unimodal olfactif (comparaison des signaux obtenus entre l'acquisition d'une association « odeur-renforcement » et l'extinction de la persistance pour cette même association désormais non renforcée). Ainsi, afin de tester l'effet du type de tâche (unimodal olfactive ou bimodal olfacto-tactile) sur la différence significative de la réponse oscillatoire précédemment mise en évidence entre OT ACQ O+ et OT REC O- dans le CEL (**Figure 70.b**), l'amplitude des signaux obtenus dans la bande bêta dans la condition « Digging » dans l'aPC et dans le CEL en réponse à l'odeur renforcée lors de l'acquisition de la tâche olfactive a été comparée à celle obtenue en réponse à l'odeur désormais non renforcée lors du reversal de cette tâche olfactive. La **figure 71** représente les moyennes normalisées des enveloppes spectrales de l'amplitude des signaux obtenus dans la bande bêta pour chaque fenêtre d'analyse pour l'ensemble des essais de chaque animal lors de l'acquisition (cas OLF ACQ O+) et lors du reversal (cas OLF REV O-) dans la condition « Digging » dans l'aPC ($n=5$ rats pour OLF ACQ O+ et OLF REV O-) et dans le CEL ($n=8$ rats pour OLF REV O+ et $n=5$ rats pour OLF REV O-).

La **figure 71** montre que l'amplitude des oscillations bêta augmente dans le cas OLF ACQ O+ et dans le cas OLF REV O- dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision dans la condition « Digging » dans l'aPC (**Figure 71.a** : OLF ACQ O+, jusqu'à +70%, $n=139$ essais et OLF REV O-, jusqu'à +74%, $n=43$ essais) et dans le CEL (**Figure 71.b** : OLF ACQ O+, jusqu'à +28%, $n=436$ essais et OLF REV O-, jusqu'à +30%, $n=88$ essais). Une analyse statistique de Friedman confirme ces observations et montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre les fenêtres d'analyse dans l'aPC et dans le CEL dans les deux cas ($p < 0,01$). Une analyse statistique de Wilcoxon des rangs signés montre une différence significative de l'amplitude des signaux entre la valeur de référence, et les fenêtres d'échantillonnage et de décision, dans les deux cas et dans les deux structures ($p < 0,05$).

La comparaison des valeurs de l'amplitude des signaux obtenus dans l'aPC (**Figure 71.a**) et le CEL (**Figure 71.b**) entre les deux cas (OLF ACQ O+ et OLF REV O-) montre que l'amplitude des oscillations bêta est similaire, quelle que soit la fenêtre d'analyse (Mann-Whitney, p n.s).

RYTHME BETA

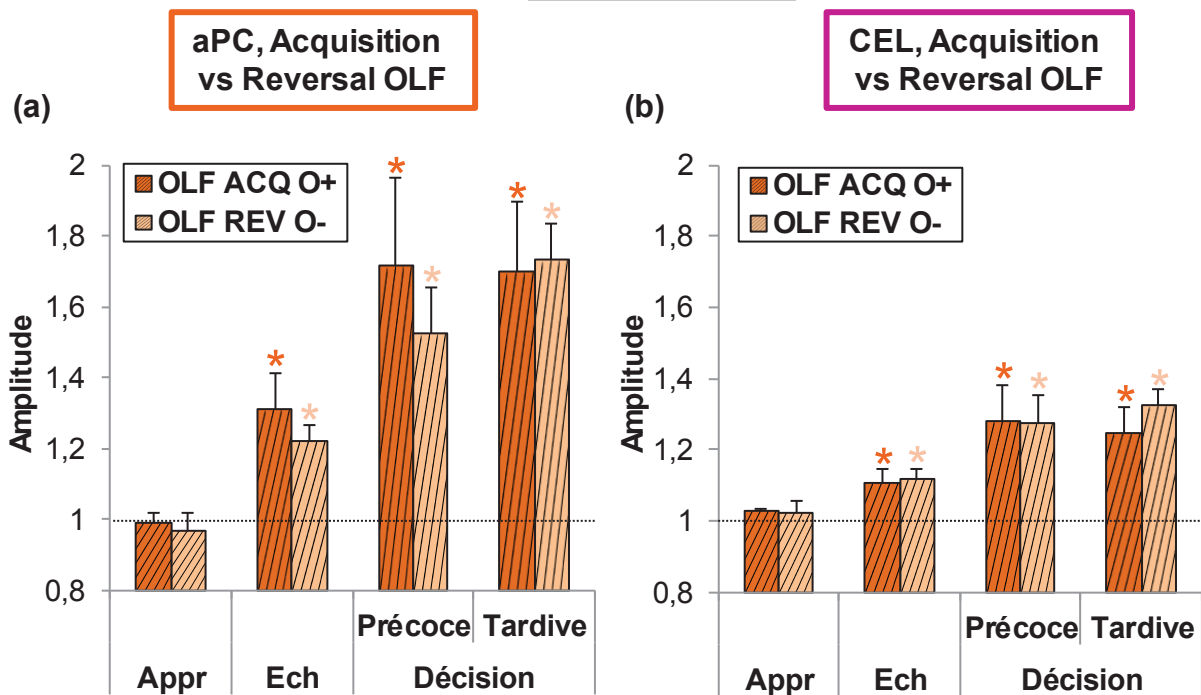


Figure 71 : Comparaison de l'amplitude du signal dans la bande bêta lors de l'acquisition et lors du reversal de la tâche olfactive dans l'aPC (a) et le CEL (b) dans la condition « Digging ». Histogrammes représentant les variations spectrales de l'activité oscillatoire pour l'ensemble des animaux lors des échantillonnages de l'odeur correcte lors de l'acquisition (OLF ACQ O+, en orange hachuré, aPC : n=5 rats et CEL : n=8 rats) et lors des échantillonnages de l'odeur incorrecte (renforcée en acquisition) lors du reversal olfactif (OLF REV O-, en orange clair hachuré, aPC : n=5 rats et CEL : n=5 rats). Les valeurs présentées correspondent à une moyenne normalisée \pm S.E.M. des enveloppes calculées pour chaque fenêtre d'analyse et pour l'ensemble des essais de chaque animal (aPC : OLF ACQ O+, n=139 essais ; OLF REV O-, n=43 essais et CEL : OLF ACQ O+, n=436 essais ; OLF REV O-, n=88 essais). Appr pour approche, Ech pour échantillonnage. La ligne horizontale correspond au niveau d'activité de référence. * = $p < 0,05$ dans une fenêtre d'analyse comparée à la référence.

En conclusion, l'échantillonnage du stimulus olfactif renforcé en acquisition et non renforcé en reversal, dans le cadre de la tâche unimodale olfactive, induit une augmentation de l'amplitude des signaux dans la bande bêta dans l'aPC et dans le CEL, dans ces deux cas olfactifs. Cette hausse est similaire lors de la formation de l'association « odeur-renforcement » lors de l'acquisition de la tâche olfactive (OLF ACQ O+), et lors de l'extinction de la persistance pour cette odeur précédemment renforcée lors du reversal de cette tâche olfactive (OLF REV O-).

L'ensemble des résultats comparant l'amplitude des oscillations bêta dans l'aPC et le CEL selon le type de tâche (unimodale olfactive ou bimodale olfacto-tactile) met en évidence une signature électrophysiologique différente et spécifique dans le CEL entre l'acquisition et la recombinaison d'une tâche bimodale OT. Or, cette différence n'est pas liée à l'utilisation des mêmes stimuli entre l'acquisition et la recombinaison, puisque l'augmentation de l'amplitude de ces oscillations est similaire entre l'acquisition et le reversal d'une tâche olfactive, utilisant pourtant les mêmes stimuli (seule la valence hédonique respective de chaque stimulus étant inversée entre l'acquisition et la recombinaison/le reversal). Plus précisément, la réponse bêta est plus ample lorsque l'animal doit éteindre la persistance pour l'odeur précédemment renforcée lors de la recombinaison, que lorsqu'il forme initialement l'association « odeur-renforcement » pendant l'acquisition, spécifiquement dans la tâche OT.

Le CEL présente donc une activité oscillatoire différente et caractérisée lors de la recombinaison d'une tâche bimodale olfacto-tactile.

III. DISCUSSION

A. Qu'est-ce qu'un potentiel de champ local ?

Les potentiels de champs locaux (LFP) sont des champs de courants détectés à proximité des synapses (principalement au niveau des dendrites, région riche en canaux ioniques). Les LFP reflètent donc plusieurs processus. En effet, le niveau d'activité de chaque région cérébrale est non seulement modulé par des inputs externes, mais aussi par le traitement local de ces informations, par l'activation de boucles excitatrices et inhibitrices, ainsi que par l'activation de connexions fonctionnelles entre les structures appartenant à un même réseau. Dès lors, notre approche électrophysiologique ne permet pas d'évaluer l'influence respective de chacun des processus cités dans l'émergence d'une oscillation à un instant donné et dans une structure d'intérêt. De plus, l'utilisation d'électrodes monopolaires ne permet pas d'estimer finement le volume cérébral enregistré, tandis que la prédominance de certains rythmes oscillatoires, notamment le rythme thêta caractérisant l'activité de la formation hippocampique, complique l'analyse des autres bandes de fréquence tant il est ample. Enfin, l'enregistrement des LFP ne renseigne pas nécessairement sur l'activité unitaire des neurones situés à proximité de l'électrode : la mise en évidence d'une activité oscillatoire importante ne correspond pas nécessairement à une activité unitaire importante. En effet, les potentiels d'actions génèrent des courants au niveau du corps cellulaire et des axones du neurone, et les LFP captent une partie de ces courants, mais aussi ceux générés au niveau de l'arbre dendritique. Or, une forte proportion de courants de type PPSE (Potentiel Post-Synaptique Excitateur) et PPSI (Potentiel Post-Synaptique Inhibiteur) générés au niveau de l'arbre dendritique ne déclenche pas systématiquement un potentiel d'action.

De façon étonnante, peu d'oscillations gamma (60-90 Hz) ont été enregistrées dans les structures cibles, et celles qui ont été enregistrées ne varient selon aucune condition et/ou fenêtre d'analyse, contrairement à de précédents travaux menés au niveau de l'aPC (*Martin et al., 2004b*) ou de l'hippocampe (pour revue, *Buzsaki, 2002 ; Colgin et al., 2009b*). En conséquence, seules les informations tirées de l'analyse des bandes de fréquence thêta et bêta sont discutées dans cette section.

B. Les oscillations bêta comme corrélats électrophysiologiques de l'apprentissage olfactif

L'apprentissage de la tâche olfactive est caractérisé par l'émergence d'oscillations bêta de forte amplitude dans l'aPC environ 500 ms après le début de l'échantillonnage, dans une bande de fréquence comprise entre 25 et 45 Hz (**Figure 57.a**, page 167). Ces oscillations sont maintenues jusqu'à la fin de la période d'analyse. La latence observée entre le début de l'échantillonnage du stimulus et l'émergence de ces oscillations pourrait s'expliquer par le fait que la présentation d'une odeur ne génère des oscillations bêta qu'en cas de forte stimulation, c'est-à-dire quand le museau de l'animal est proche de la source odorante, au moment de la fouille. Cette latence pourrait aussi s'expliquer par le fait qu'un délai soit nécessaire pour permettre la genèse de ce rythme. En effet, il a été montré que l'expression du rythme bêta dans les structures olfactives dépend de l'action combinée de l'information olfactive elle-même, mais aussi de l'activité des structures centrales (pour

revue, *Kay et al., 2009* ; pour revue, *Martin et Ravel, 2014*). La réponse bêta suite à l'échantillonnage de l'odeur est également détectée dans une autre structure olfactive en aval de l'aPC, le CEL (**Figure 58.a, page 168**). Comme dans l'aPC, elle apparaît environ 500 ms après le début de l'échantillonnage et est maintenue jusqu'à la fin de la période d'analyse. Son amplitude est plus faible que celle détectée dans l'aPC, et ces oscillations sont plus étroitement centrées autour de 25 Hz. L'émergence de ces oscillations après le début de l'échantillonnage confirme des travaux précédemment menés dans l'équipe, ayant mis en évidence l'émergence d'oscillations bêta lors d'un apprentissage olfactif finement contrôlé (nose poke) dans le BO (*Ravel et al., 2003* ; *Martin et al., 2004a*), dans l'aPC (*Martin et al., 2004b* ; *Martin et al., 2006* ; *Cohen et al., 2015*), dans le pPC (*Martin et al., 2004b* ; *Martin et al., 2006*) et dans le CEL (*Martin et al., 2004b*). Ces données suggèrent que notre codage visuel est fiable puisque ces oscillations émergent suite à la stimulation olfactive, en dépit d'une résolution de codage assez faible (120 ms) et malgré l'absence de contrôle strict de certains paramètres expérimentaux (durée de l'échantillonnage, diffusion et concentration des odeurs...).

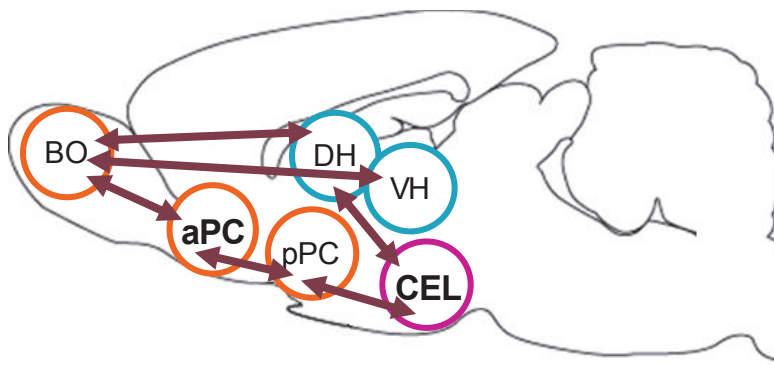


Figure 72 : Réseau de structures impliquées dans l'apprentissage d'une tâche olfactive mis en évidence par l'étude des activités oscillatoires dans la bande bêta. Le bulbe olfactif (BO), le cortex piriforme antérieur (aPC) et postérieur (pPC), le cortex entorhinal latéral (CEL), ainsi que l'hippocampe dorsal (DH) et ventral (VH) sont

caractérisés par des oscillations bêta d'amplitude variable en réponse à un stimulus olfactif. Marqueur de liaison fonctionnelle entre les structures, l'émergence de ce rythme met en évidence un large réseau de structures dont les activités sont modulées et synchronisées, notamment en fonction du niveau d'expertise de l'animal. Les structures enregistrées dans notre étude sont indiquées en gras.

Dans l'aPC comme dans le CEL, les oscillations bêta sont plus amples dans la condition « Digging » que dans la condition « No-digging » (**Figures 57.b et 58.b, pages 167 et 168**). Ceci suggère que l'émergence de ce rythme peut être en lien avec la durée et la qualité du traitement sensoriel du stimulus olfactif (*Ravel et al., 2003*), puisque lorsque l'animal creuse, la durée de l'échantillonnage est importante et la concentration de l'odeur est maximale. Cette forte augmentation de l'amplitude de ces oscillations peut également représenter l'influence des structures impliquées dans les processus sensori-moteurs et de prise de décision, notamment via des modulations top-down en provenance des structures frontales. D'autre part, il a été montré que les oscillations bêta favorisent la liaison entre les structures du réseau impliqué dans l'exécution de la tâche (pour revue, *Fries, 2005* ; pour revue, *Fell et Axmacher, 2011*), comme mis en évidence entre le BO et l'aPC (*Martin et al., 2006*), entre le BO, l'aPC, le pPC et le CEL (*Chabaud et al., 1999*), ainsi qu'avec le gyrus denté (*Mouly et al., 2001*), ou encore entre le BO et l'hippocampe dorsal et ventral (*Martin et*

al., 2007). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les oscillations bêta sous-tendent les processus de reconnaissance et de représentation cohérente de l'odeur (*Ravel et al.*, 2003). En accord avec cette littérature, nos données suggèrent que les oscillations bêta pourraient être un marqueur de liaison fonctionnelle, mettant en évidence la construction de représentations olfactives entre les différentes structures impliquées dans le traitement de ce type de stimulus (**Figure 72**).

C. Les oscillations thêta comme corrélat électrophysiologique de l'apprentissage tactile ?

L'échantillonnage des textures est caractérisé par des oscillations thêta entre 10 et 12 Hz dans le S1BC (**Figure 59.a**, page 170). Ces réponses sont détectées environ 200 ms avant le contact avec la texture et persistent pendant l'échantillonnage (durée minimale de 360 ms, durée moyenne de 580 ms). Même si une incertitude quant à la précision du codage visuel n'est pas à exclure (résolution de 120 ms), l'émergence précoce de ces oscillations peut résulter d'un processus d'anticipation du traitement des stimuli. En effet, une étude récente a montré que des oscillations thêta émergent 200 ms avant le début de l'échantillonnage, et persistent pendant l'échantillonnage du stimulus tactile (*Grion et al.*, 2016). Or, cette étude repose sur une tâche dans laquelle le comportement de l'animal est codé avec une résolution temporelle supérieure à la nôtre (20 ms). Ainsi, la fenêtre pendant laquelle ces oscillations apparaissent est cohérente avec nos critères de détermination de l'échantillonnage des pots. De plus, nos données montrent que ces oscillations émergent de façon similaire quelle que soit la finalité de l'essai (fouille ou non du pot échantillonné), suggérant qu'elles sont associées au phénomène de whisking et reposent essentiellement sur un processus de traitement sensoriel des stimuli tactiles (**Figure 59.b**, page 170). L'ensemble de nos données montre donc que les oscillations thêta pourraient sous-tendre les processus d'anticipation et de traitement sensoriel des stimuli tactiles lors de la tâche.

La cohérence correspond à la génération d'une activité oscillatoire de même fréquence dans deux sites d'enregistrement différents pendant une durée définie. Cette cohérence est généralement considérée comme un indice de synchronisation entre les activités oscillatoires de deux structures, donc comme un indice de leurs interactions fonctionnelles. Ainsi, nos données montrent un indice de cohérence relativement élevé (valeur de 0,40) entre les oscillations thêta du S1BC et celles du dCA1, qui pourrait correspondre à une interaction entre ces deux structures, en accord avec la littérature (*Grion et al.*, 2016). Toutefois, la/les fenêtre(s) durant lesquelles ces deux structures sont synchronisées reste à être précisées par une analyse de cohérence par fenêtre glissante.

Enfin, alors qu'une étude a montré l'émergence d'oscillations entre 25 et 45 Hz dans le S1BC lorsque l'animal est dans l'anticipation des stimuli tactiles à explorer (*Hamada et al.*, 1999), ce rythme n'a pas été mis en évidence dans la fenêtre d'approche, ni dans aucune fenêtre d'analyse dans les données obtenues dans notre étude.

D. L'acquisition olfacto-tactile : quel(s) corrélát(s) électrophysiologique(s) ?

1. Oscillations bêta dans l'aPC et le CEL

L'échantillonnage de la combinaison « odeur-texture » dans le cadre de l'acquisition de la tâche bimodale OT évoque des réponses oscillatoires bêta dans l'aPC et dans le CEL (**Figures 60 et 62**, pages 171 et 173), comme précédemment décrit lors de l'acquisition de la tâche olfactive.

La comparaison des activités oscillatoires entre les conditions « Débutant » et « Expert » montre que les oscillations bêta sont plus amples dans l'aPC lorsque l'animal a atteint le critère de réussite (**Figure 61**, page 172). L'amplitude de l'activité oscillatoire dépend notamment du nombre de neurones activés et/ou d'une meilleure synchronisation de l'activité des mêmes neurones, dans la structure enregistrée (ici l'aPC) et/ou dans les structures modulant l'activité de la structure enregistrée (l'activité de l'aPC est notamment modulée par les inputs olfactifs issus du BO). Dès lors, la condition « Expert » serait sous-tendue par le recrutement d'un réseau neuronal plus large ou dont l'activité est plus étroitement synchronisée, ce qui permettrait de générer des oscillations bêta de plus grande amplitude. Au contraire, le réseau recruté dans la condition « Débutant » serait plus petit et/ou caractérisé par une activité moins synchronisée entre les neurones sollicités. Cette augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans l'aPC en parallèle de l'amélioration des performances des animaux a déjà été montrée par des travaux de l'équipe utilisant une tâche de Go-NoGo (*Martin et al., 2004b*). Néanmoins, des travaux récemment publiés et utilisant le même paradigme n'ont pas montré d'augmentation de l'amplitude des oscillations bêta en fonction du niveau d'expertise de l'animal (*Frederick et al., 2016*).

Cet effet de l'expertise sur l'amplitude des oscillations bêta n'apparaît pas au niveau du CEL, en accord avec de précédentes études de l'équipe (*Martin et al., 2004b*). En effet, si le stade Expert pour un apprentissage utilisant la modalité olfactive est effectivement sous-tendu par le recrutement d'un plus large réseau de structures, notamment modulé par les inputs du BO, les données anatomiques montrent que les connexions directes entre le BO et le CEL sont relativement peu nombreuses, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet de l'expertise sur l'activité oscillatoire du CEL.

2. Faible cohérence des oscillations thêta entre l'aPC et le S1BC

L'activité des structures olfactives, comme l'aPC, et tactiles, comme le S1BC, est respectivement modulée par les phénomènes de sniffing et de whisking, et chacune est reflétée par des oscillations lentes autour de 10 Hz (*Kay, 2005 ; Ranade et al., 2013 ; Kleinfeld et al., 2016*). La faible valeur de l'indice de cohérence entre les activités oscillatoires de l'aPC et celles du S1BC dans la bande thêta suggère que l'acquisition de la tâche bimodale OT n'est pas sous-tendue par une interaction entre le cortex piriforme et le S1BC, en opposition avec la littérature (voir la section 3 de l'introduction, page 53 ; *Ye et al., 2012 ; Wang et al., 2015*).

3. Oscillations thêta dans le CEL et le dCA1

Beaucoup d'études se sont intéressées au rôle des oscillations thêta au niveau de l'hippocampe (pour revue, *Buzsaki, 2002* ; *Goutagny et al., 2009* ; *Colgin et Moser, 2009a* ; pour revue, *Colgin, 2013*) et du cortex entorhinal (*Dickson et al., 2000* ; *Deshmukh et al., 2010*). Le rythme thêta est notamment lié aux processus d'encodage d'une information, ainsi qu'à l'activité motrice de l'animal (voir la [section 3 de l'introduction, page 35](#)). L'importance de ces oscillations lentes a ainsi été mise en évidence dans un apprentissage associatif « son-choc » (*Takehara-Nishiuchi et al., 2012*). Les auteurs de cette étude ont en effet montré que la synchronisation entre les activités oscillatoires thêta du CE et celles du cortex préfrontal augmente lors de l'acquisition et lors de la consolidation de cette association, en parallèle d'une diminution de la synchronisation entre les activités oscillatoires du CE et celles de l'hippocampe dans cette même bande de fréquence.

Dans notre paradigme, les oscillations thêta diminuent à la fois en amplitude et en fréquence dans la fenêtre d'échantillonnage (dans le dCA1 uniquement) et dans les fenêtres de décision dans le CEL (**Figure 65, page 178**) et dans le dCA1 (**Figure 66, page 180**). Cette baisse est d'autant plus marquée quand l'animal fouille le pot échantillonné. Cette dynamique est en accord avec la littérature montrant que le rythme thêta est modulé par l'activité motrice dans la formation hippocampique (pour revue, *Colgin, 2013*), puisque l'animal est relativement immobile quand il creuse un pot, tandis qu'il se déplace et explore l'arène expérimentale et son contenu lorsqu'il a choisi de ne pas creuser le pot échantillonné.

La composante motrice des oscillations thêta pourrait donc masquer d'éventuelles modulations de ce rythme lent en fonction de l'apprentissage. Dès lors, nos données ne nous permettent pas de déterminer finement la part respective de la composante motrice et des processus mnésiques sur la diminution de l'amplitude des oscillations thêta, contrairement à la littérature (*Takehara-Nishiuchi et al., 2012*).

D'autre part, nos données montrent qu'il n'y a pas d'augmentation de l'amplitude des oscillations thêta au niveau du dCA1 lors de l'acquisition de la tâche OT. Ce résultat est en désaccord avec une étude ayant montré une augmentation de l'amplitude de ces oscillations lors d'un apprentissage associatif relationnel bimodal de positive patterning (voir la [section 2 de l'introduction, page 38](#) ; *Sakimoto et al., 2013*) en comparaison avec l'apprentissage d'une tâche simple de Go-NoGo. Ceci suggère que l'activité oscillatoire thêta ne sous-tend pas l'apprentissage de la tâche bimodale OT avec notre procédure.

L'ensemble des activités oscillatoires en réponse à l'apprentissage d'une tâche OT est résumé sur la **figure 73**.

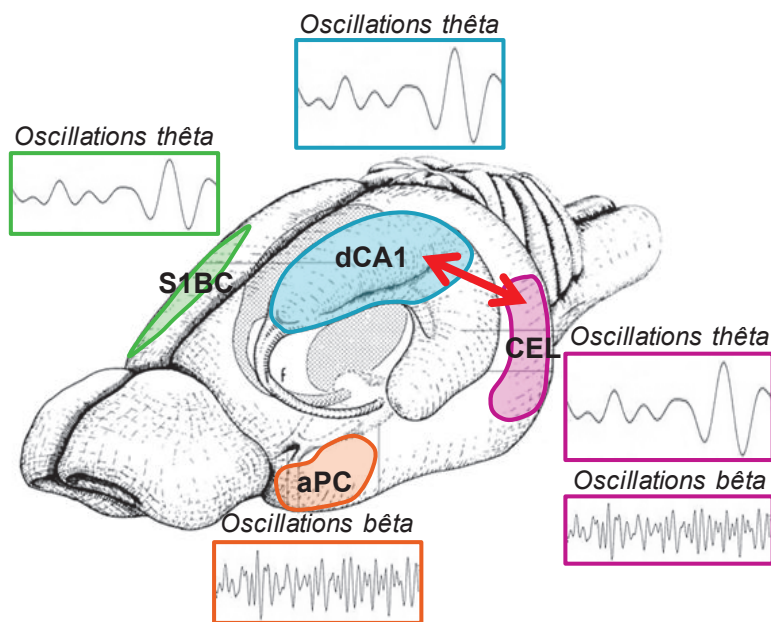


Figure 73 : Représentation schématique des réponses induites par l'échantillonnage des stimuli proposés, dans le cortex entorhinal latéral (CEL), la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1), le cortex piriforme antérieur (aPC) et le barrel cortex (S1BC) lors de l'acquisition de la tâche OT. Cortex de traitement primaire, l'aPC et le S1BC sont respectivement caractérisés par des oscillations de fréquence intermédiaire (bêta, 25 à 40 Hz) et de basse fréquence (thêta, 5 à 12 Hz). Toutefois, si l'émergence d'oscillations thêta

dans le S1BC est centrée sur la fenêtre d'échantillonnage du stimulus OT, les oscillations bêta dans l'aPC ne sont détectées que 500 ms à compter du début de l'échantillonnage. Structure limbique fonctionnellement impliquée dans la formation des associations OT, le CEL présente à la fois des oscillations thêta amples, caractéristiques de la formation hippocampique et notamment associées à l'activité motrice de l'animal, et des oscillations bêta de faible amplitude. En revanche, non indispensable pour ce type d'apprentissage, le dCA1 est uniquement caractérisé par une activité thêta ample. Enfin, les activités oscillatoires thêta du CEL et celles du dCA1 sont étroitement couplées.

E. Comparaison des réponses à un stimulus olfactif, tactile et bimodal olfacto-tactile : oscillations bêta dans l'aPC et dans le CEL

Comme précédemment discuté, des oscillations bêta émergent dans l'aPC en réponse à l'échantillonnage d'un stimulus olfactif ou OT. De manière inattendue, l'enregistrement de l'activité de l'aPC montre que les réponses oscillatoires bêta sont d'amplitude similaire lors des tâches unimodales olfactive et tactile, quelle que soit la fenêtre d'analyse (**Figure 63.a**, page 175). Cette absence de différence observée sur l'activité oscillatoire entre les apprentissages utilisant un stimulus olfactif ou un stimulus tactile pourrait traduire le fonctionnement d'une interaction fonctionnelle entre le cortex piriforme et le barrel cortex (Wang et al., 2015 ; voir la section 3 de l'introduction, page 53). Toutefois, ces travaux suggèrent que cette connexion se développe après une dizaine de sessions d'apprentissage, alors que nous détectons ce rythme dès les premiers essais de notre tâche. D'autre part, tous les animaux inclus dans notre étude et dont l'activité de l'aPC a été enregistrée et conservée pour les analyses ont d'abord appris les tâches bimodales, avant d'être confrontés aux tâches unimodales. Ils sont donc habitués à chercher un stimulus olfactif, pouvant engendrer des oscillations bêta dans l'aPC comme mis en évidence précédemment. Des expériences complémentaires visant à randomiser l'ordre des tâches et augmenter la taille de chaque groupe expérimental permettront de vérifier si cette augmentation de l'amplitude des oscillations bêta dans l'aPC se maintient dans le cas où la tâche tactile est le premier apprentissage proposé.

Dans l'aPC, l'acquisition d'une tâche bimodale OT est caractérisée par des oscillations bêta de moindre amplitude que celles obtenues lors de l'acquisition des tâches unimodales olfactive ou tactile (**Figure 63.a**, [page 175](#)). Or, au niveau unitaire, des études sur l'activité du colliculus supérieur montrent que des neurones répondant aux stimulations auditives et visuelles (neurones bimodaux audiovisuels) peuvent présenter des réponses additives, mais aussi des réponses soustractives à la présentation simultanée d'un stimulus audiovisuel chez le chat anesthésié (*Meredith et Stein, 1986*). Dès lors, la faible amplitude des oscillations bêta obtenues dans l'aPC lors de l'acquisition de la tâche bimodale OT pourrait correspondre à une réponse suppressive de même type, induite par la présentation conjointe des stimuli olfactif et tactile, via les propriétés excitatrices et inhibitrices du réseau dont le rôle respectif reste à déterminer.

D'autre part, les données présentées dans la [section résultats du chapitre 2](#) ([pages 107 et 109](#)) montrent que le CEL est un site critique pour la formation des associations bimodales OT, mais que son inactivation ne perturbe pas la formation des associations unimodales « odeur-renforcement » et « texture-renforcement ». Par ailleurs, une étude récente confirme que le CEL est directement et réciproquement connecté avec les structures olfactives (*Leitner et al., 2016*). En revanche, ces connexions anatomiques avec le système somesthésique restent peu caractérisées, ce qui laisse penser que ces connexions sont peu développées. L'ensemble de ces données anatomiques suggère alors que les oscillations bêta dans le CEL sont amples en réponse à un stimulus olfactif, de faible amplitude ou absentes en réponse à un stimulus tactile, et peuvent donc être potentialisées dans la tâche bimodale OT.

Or, nos données indiquent que les oscillations bêta sont d'amplitude faible et similaire lors de l'acquisition de chacune de ces trois tâches dans le CEL (**Figure 63.b**, [page 175](#)). Ce résultat peut être expliqué par différents arguments. Il est tout d'abord possible que l'électrode ne soit pas insérée dans la couche impliquée dans la formation des associations OT (hypothétiquement la couche superficielle III d'après la [section discussion du chapitre 2](#), [page 148](#)). Il est également envisageable que le rythme bêta ne soit pas le corrélât de l'apprentissage de la tâche OT, contrairement à son rôle bien identifié dans l'apprentissage olfactif. Dans cette hypothèse, il resterait à identifier cet autre rythme. Or, concernant le rythme thêta, nos données montrent que la dynamique de ces oscillations lentes est similaire quelle que soit la tâche considérée, tandis que les oscillations gamma sont généralement de très faible amplitude. Dès lors, des enregistrements unitaires dans le CEL permettront peut-être de mettre en évidence l'existence d'une population neuronale dont la réponse est plus ample lors de la tâche bimodale, que lors des tâches unimodales olfactive ou tactile.

La **figure 74** présente un résumé des réponses induites dans l'aPC et dans le CEL dans la bande bêta lors des tâches unimodales olfactive, tactile et bimodale OT.

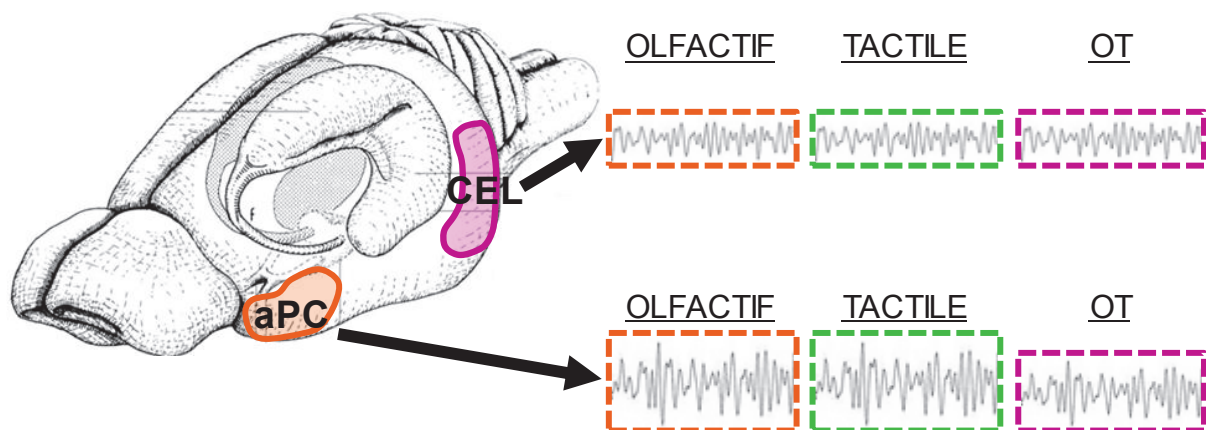


Figure 74 : Représentation schématique des réponses induites par l'échantillonnage des stimuli dans le cortex piriforme antérieur (aPC) et dans le cortex entorhinal latéral (CEL) lors de l'acquisition d'une tâche olfactive, tactile et OT. L'apprentissage olfactif induit une forte réponse dans la bande bêta dans l'aPC, de même que l'apprentissage tactile. En revanche, l'apprentissage de la tâche OT est caractérisé par des oscillations bêta d'amplitude modérée dans cette structure. Dans le CEL, ces trois tâches induisent une réponse de faible amplitude. Ainsi, l'implication fonctionnelle du CEL dans la formation d'associations OT n'est pas mise en évidence au niveau de l'activité oscillatoire de cette structure dans la bande bêta.

F. La recombinaison olfacto-tactile : quel(s) corrélat(s) électrophysiologique(s) ?

1. Oscillations thêta dans le CEL et le dCA1

L'analyse de la dynamique du rythme thêta dans les fenêtres d'analyse séquençant chaque essai met en évidence une diminution de l'amplitude et de la fréquence des oscillations thêta dans le CEL (**Figure 67.a**, page 181) et dans le dCA1 (**Figure 67.b**, page 181) et ce, dans les deux apprentissages (acquisition et recombinaison). Ainsi, cette variation ne met pas en évidence l'implication fonctionnelle différente de ces deux structures, puisque le CEL est indispensable pour les deux apprentissages, tandis que le dCA1 n'est nécessaire que pour la recombinaison. En revanche, l'amplitude des oscillations thêta diminue de façon plus précoce dans le dCA1 (dès la fenêtre d'échantillonnage) que dans le CEL (à partir des fenêtres de décision). L'hippocampe étant l'oscillateur principal du rythme thêta (pour revue, *Colgin, 2013*), il impose vraisemblablement un rythme au cortex entorhinal, justifiant le court délai séparant la diminution de l'amplitude et de la fréquence des oscillations thêta entre ces deux structures.

En référence à nos données pharmacologiques montrant que le dCA1 est sélectivement impliqué pour la recombinaison OT, ainsi qu'à l'étude montrant que l'extinction d'une persistance pour un stimulus est sous-tendue par une diminution de l'amplitude de l'activité oscillatoire thêta dans l'hippocampe (*Sakimoto et Sakata, 2016*), notre étude a cherché à déterminer si cette activité lente sous-tend le rôle du dCA1 dans l'apprentissage de recombinaison. Or les données électrophysiologiques obtenues montrent que la diminution de l'amplitude des oscillations thêta dans le dCA1 dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision ne diffère pas entre l'acquisition et la recombinaison (**Figure 67.b**, page 181).

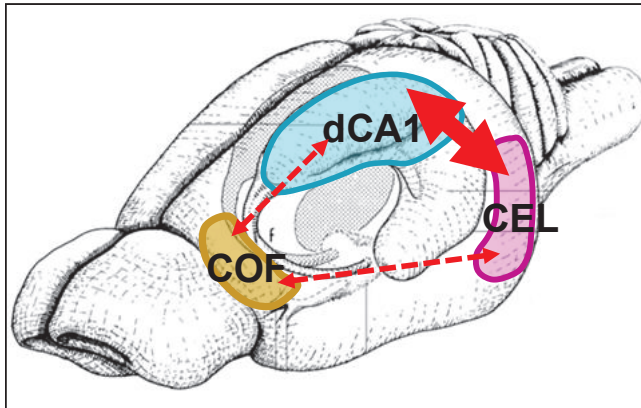
2. Modulation de la cohérence des oscillations thêta entre le CEL et le dCA1

Afin de mettre en évidence une interaction fonctionnelle entre le CEL et le dCA1, une analyse de cohérence entre les activités oscillatoires de ces deux structures a été réalisée dans la bande thêta. En effet, la synchronisation des activités entre deux structures a été proposée comme le reflet d'une interaction fonctionnelle entre les différentes régions participant à un réseau (pour revue, *Fell et Axmacher, 2011*). La comparaison entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 dans la bande thêta montre que la valeur de l'indice de cohérence est relativement élevée (entre 0,40 et 0,50) lors de l'acquisition et lors de la recombinaison (**Figure 64.a, page 177**). Toutefois, cette valeur est significativement supérieure lors de l'acquisition. Dès lors, nous postulons que cette valeur relativement élevée de l'indice de cohérence dans le rythme thêta lors de l'acquisition pourrait être le reflet de la forte connectivité réciproque entre le CEL et le dCA1, et représenter une valeur basale. En revanche, quand la tâche devient hippocampe-dépendante, comme la recombinaison, le dialogue entre ces deux structures se réduit, et s'établit probablement avec d'autres structures également impliquées dans ce type d'apprentissage. Pour le moment, ces structures ne sont pas identifiées, mais le cortex orbitofrontal est un candidat plausible pouvant sous-tendre la baisse de cohérence entre le CEL et le dCA1 observée lors de la recombinaison (voir la section perspectives, page 208 ; **Figure 75**). Néanmoins, une interaction, même réduite, entre le CEL et le dCA1 est indispensable, puisque l'inactivation du dCA1, donc la rupture totale de la communication avec le CEL, perturbe fortement la recombinaison.

D'autre part, si ces deux structures se découplent partiellement dans la bande thêta, il est possible que leurs interactions soient renforcées dans d'autres bandes de fréquence, tel que mis en évidence entre ces deux structures dans la bande bêta lors de l'acquisition d'une tâche associative « odeur-place » (*Igarashi et al., 2014*). Toutefois, notre procédure ne nous a pas permis de mettre en évidence une synchronisation entre les activités oscillatoires de ces deux structures dans la bande bêta. Par ailleurs, les oscillations bêta ont un profil particulier au niveau du dCA1. Entre 17 et 19 Hz, donc plus lentes que dans les structures olfactives telles que l'aPC et le CEL, ces oscillations sont amples dans la fenêtre d'approche et diminuent à la fois en amplitude et en fréquence dans les fenêtres d'échantillonnage et de décision. Rythme classiquement associé à la détection de la nouveauté (*Berke et al., 2008* ; *Franca et al., 2014*) et à l'apprentissage des associations « odeur-place » (*Igarashi et al., 2014*) et « odeur-contexte » (*Rangel et al., 2016*), l'amplitude des oscillations bêta est similaire lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche OT.

Enfin, peu d'oscillations gamma ont été détectées. Néanmoins, intercalées dans le rythme lent thêta, ces oscillations rapides auraient pu être la signature de la communication entre le CEL et le dCA1 lors de la recombinaison, comme mis en évidence entre le CEM et le dCA1 dans un paradigme d'apprentissage associatif spatial (*Yamamoto et al., 2014*).

(a) **ACQUISITION**



(b) **RECOMBINAISON**

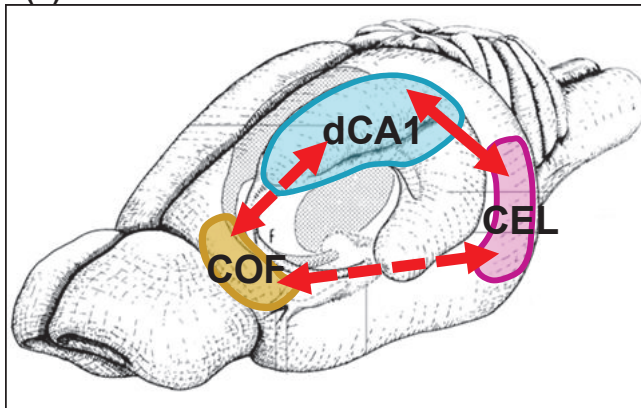


Figure 75 : Réseau hypothétique impliquant le cortex entorhinal latéral (CEL), la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1) et le cortex orbitofrontal (COF) lors de l'acquisition et lors de la recombinaison de la tâche bimodale OT. (a) Lors de l'acquisition, le couplage entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 est relativement fort dans les basses fréquences, tandis que le couplage entre le COF et ces deux structures est hypothétiquement faible. (b) En revanche, lors de la recombinaison, alors que les activités oscillatoires thêta du CEL et du dCA1 sont moins synchronisées que lors de l'acquisition, les interactions avec le COF seraient hypothétiquement renforcées. Les données montrent que la recombinaison repose sur un couplage moins fort entre les activités lentes du CEL et celles du dCA1, et cette dynamique permettrait d'élargir le réseau à d'autres structures particulièrement impliquées dans les processus sous-tendant la flexibilité comportementale, comme le COF par exemple.

Quoi qu'il en soit, le découplage observé dans la bande thêta est délicat à interpréter. En effet, l'apprentissage utilisé repose sur deux processus complémentaires : lors de l'approche, l'animal est en mouvement et anticipe les stimuli à échantillonner, alors que l'échantillonnage actif des stimuli est associé à l'immobilité relative de l'animal. Or, le rythme thêta est en lien étroit avec l'activité motrice de l'animal. Dès lors, il est difficile de déterminer dans quelle mesure la part respective des composantes sensorielles, sensori-motrices, mais aussi mnésiques, dans l'émergence du rythme thêta.

D'autre part, l'indice de cohérence présenté ici ne renseigne pas sur la dynamique de la synchronisation entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 au cours de l'essai. En effet, ce calcul est réalisé pour l'ensemble des fenêtres d'approche, d'échantillonnage et de décision précoce et tardive. Des analyses plus précises avec la méthode de cohérence par fenêtre glissante seront nécessaires pour préciser la/les fenêtres de l'essai au cours desquelles les structures se désynchronisent. De plus, la valeur de l'indice de cohérence n'est pas homogène au cours de la session : la division de l'ensemble des essais de la session en quatre blocs distincts permet de déterminer à quel moment de la session cette réduction de l'interaction entre le CEL et le dCA1 se met en place. Les données montrent que ce découplage intervient au cours du second quart de la session (**Figure 64.b, page 177**). S'il est plutôt surprenant que ce ne soit pas également le cas dès les premiers essais de la session, il est important de rappeler que le premier bloc d'essais se

caractérise par de nombreux essais non fouillés, pendant lesquels l'animal n'apprend donc pas la tâche. Ainsi, il n'aurait pas suffisamment d'éléments pour enclencher le mode « recombinaison » hypothétiquement nécessaire pour induire un découplage relatif entre le CEL et le dCA1. En revanche, lorsque les performances commencent à progresser (second bloc), la baisse de cohérence de l'activité oscillatoire lente entre ces deux structures est détectée : ces essais sont vraisemblablement critiques pour que le réseau bascule en « mode recombinaison » (**Figure 64.c**, [page 177](#)). En revanche, les deux derniers blocs correspondraient à un retour au « mode acquisition » car une absence de découplage entre les activités oscillatoires de ces deux structures est observée. Ceci est en accord avec le comportement de l'animal lors de la deuxième partie de la session, puisqu'il apprend la nouvelle tâche, et comme précédemment montré, la formation d'associations « odeur-texture » repose sur un plus fort couplage entre le CEL et le dCA1.

3. Oscillations bêta dans le CEL

Comme précédemment décrit pour l'acquisition, la recombinaison d'une tâche OT est associée à l'émergence d'oscillations bêta relativement amples dans l'aPC, et d'amplitude modérée dans le CEL. Toutefois, ces oscillations sont plus amples lors de la recombinaison que lors de l'acquisition, dans l'aPC (**Figure 68.a**, [page 183](#)) et dans le CEL (**Figure 68.b**, [page 183](#)). En revanche, ces oscillations sont d'amplitude similaire entre l'acquisition et le reversal d'une tâche olfactive dans l'aPC (**Figure 69.a**, [page 184](#)) et dans le CEL (**Figure 69.b**, [page 184](#)). Or, ces deux couples d'apprentissages (acquisition et recombinaison OT ; acquisition et reversal olfactif) se caractérisent tous les deux par l'utilisation des mêmes stimuli, mais dont la valence hédonique est inversée entre les deux apprentissages. Ce résultat exclut donc l'argument selon lequel l'augmentation de l'amplitude des oscillations bêta lors de la recombinaison serait un simple effet d'expertise liée à la réutilisation des stimuli proposés.

D'autre part, l'apprentissage de la tâche bimodale repose sur la construction d'une association « (odeur-renforcement) – texture ». Ainsi, pour déterminer plus précisément les mécanismes sous-tendant l'émergence de ces oscillations bêta, une analyse a été effectuée en sélectionnant les réponses induites par l'échantillonnage de l'odeur renforcée lors de l'acquisition, et en comparant ces activités oscillatoires à celles obtenues en réponse à l'échantillonnage de cette même odeur désormais non renforcée lors de la recombinaison. Les données montrent que l'amplitude des oscillations bêta est similaire dans l'aPC dans ces deux cas (**Figure 70.a**, [page 186](#)). Au contraire, au niveau du CEL, les oscillations bêta sont plus amples lors de la recombinaison (c'est-à-dire lorsque l'animal doit éteindre la persistance pour l'odeur précédemment renforcée), que lors de l'acquisition initiale (lorsqu'il forme l'association « odeur-renforcement » ; **Figure 70.b**, [page 186](#)). En revanche, l'amplitude du signal est similaire lorsque l'animal associe l'odeur au renforcement lors de l'acquisition de la tâche olfactive, et lorsqu'il doit éteindre la persistance pour cette odeur désormais non renforcée lors du reversal de cette tâche, dans l'aPC (**Figure 71.a**, [page 188](#)) et dans le CEL (**Figure 71.b**, [page 188](#)).

L'ensemble de ces données est résumé sur la **figure 76**.

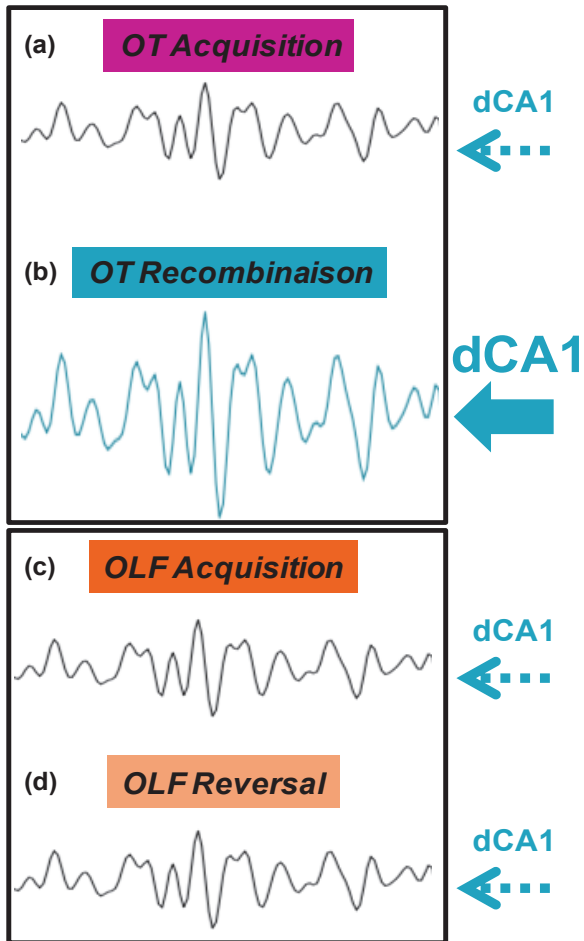


Figure 76 : Comparaison des activités oscillatoires dans la bande bêta dans le cortex entorhinal latéral (CEL) selon l'apprentissage proposé : acquisition de la tâche OT (a), recombinaison de la tâche OT (b), acquisition de la tâche olfactive (OLF) (c), reversal de la tâche olfactive (d). Des oscillations bêta de faible amplitude sont observées dans le CEL lors de l'acquisition de la tâche OT et de la tâche olfactive, ainsi que lors du reversal de la tâche olfactive. Le dCA1 n'est fonctionnellement nécessaire pour aucun de ces trois apprentissages. En revanche, le dCA1 est indispensable pour la recombinaison d'une tâche OT, au cours de laquelle de plus amples oscillations bêta sont détectées dans le CEL.

Conclusion

Ces multiples comparaisons suggèrent que la forte réponse bêta obtenue dans le CEL est spécifiquement associée aux processus sous-tendant la recombinaison d'une tâche OT. En effet, si cette structure est fonctionnellement sollicitée lors de l'acquisition et lors de la recombinaison, les données suggèrent que le réseau dans lequel intervient le CEL lors de recombinaison, diffère de celui impliqué lors de l'acquisition.

Alors que les résultats issus de notre étude pharmacologique montrent que le dCA1 est spécifiquement impliqué dans le réseau sous-tendant la recombinaison d'une tâche OT, les activités oscillatoires enregistrées dans cette structure sont similaires quel que soit le type d'apprentissage (acquisition ou recombinaison) et la bande de fréquence considérés. Néanmoins, le couplage entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 est réduit lors de la recombinaison, en comparaison avec l'acquisition. Dès lors, ceci suggère que la réduction de la synchronisation entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 favoriserait le recrutement d'autres structures. Celles-ci permettraient alors de moduler à la hausse l'amplitude de l'activité oscillatoire du CEL dans la bande bêta lors de la recombinaison. Ces structures restent à identifier, mais en tant que structure impliquée dans la flexibilité de l'association « stimulus-renforcement », le COF est un candidat idéal (*Ramus et Eichenbaum, 2003 ; Schoenbaum et al., 2003 ; Roesch et al., 2006 ; Figure 75*).

Les données obtenues suggèrent donc que le dCA1 exerce une modulation indirecte sur les activités oscillatoires du CEL lors de la recombinaison, et que l'amplitude du rythme bêta dans ce cortex est une signature du traitement du stimulus OT lors de cet apprentissage complexe.

CONCLUSION

MODELE DE TRAVAIL & INTEGRATION DE NOS DONNEES DANS LA LITTERATURE

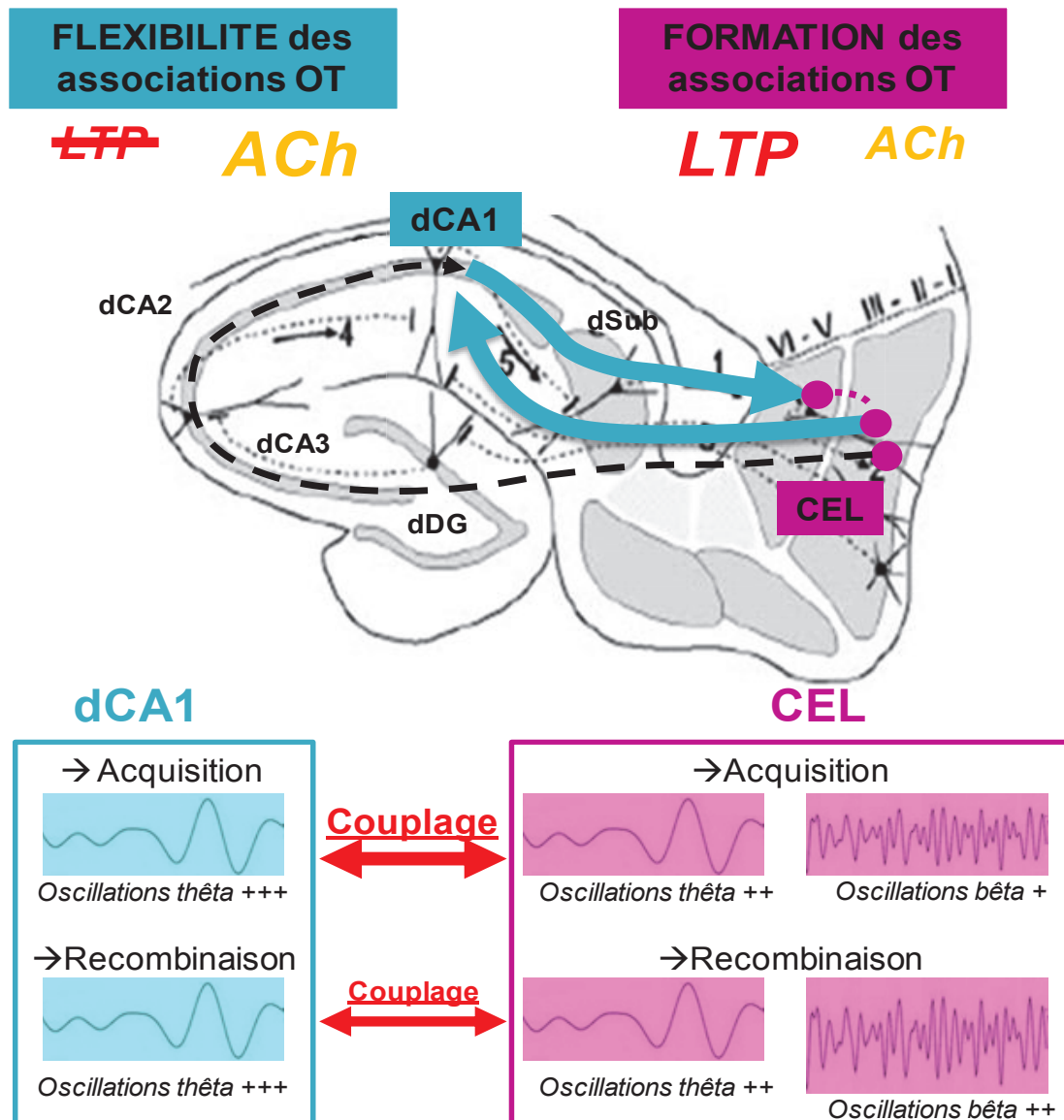


Figure 77 : Modèle d'interaction entre le cortex entorhinal latéral (CEL) et la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1) pour la formation et la flexibilité comportementale des associations olfacto-tactiles. L'étude pharmacologique a établi l'importance critique du CEL pour la formation d'associations OT avec des stimuli nouveaux (acquisition) et avec des stimuli familiers (recombinaison). Les processus cognitifs sous-tendant ces deux apprentissages reposent de façon critique sur le système glutamatergique de type NMDA et partiellement sur la modulation cholinergique muscarinique. En revanche, si le dCA1 n'est pas nécessaire pour l'acquisition OT, il est indispensable pour la recombinaison, via un mécanisme non-NMDA dépendant, mais fortement cholinergique muscarinique dépendant. En comparaison avec l'acquisition, l'étude électrophysiologique montre que la recombinaison est marquée par une réponse bêta plus ample dans le CEL, et par un découplage entre les activités oscillatoires thêta du CEL et celles du dCA1. La réciprocity des connexions entre ces deux structures forme une boucle de communication étroite et fonctionnelle.

L'ensemble des résultats obtenus par les études complémentaires de pharmacologie et d'électrophysiologie nous a permis de construire un modèle d'interaction entre le CEL et la région CA1 de l'hippocampe dorsal (dCA1), dont le fonctionnement sous-tendrait l'apprentissage de la tâche olfacto-tactile (**Figure 77**). Sur ce modèle figurent les connexions réciproques existant entre ces deux structures : depuis la couche superficielle III du CEL vers le dCA1 par la voie monosynaptique temporoammonique, et depuis le dCA1 vers la couche profonde V du CEL par l'intermédiaire éventuel du subiculum (*Naber et al., 2001*). Enfin, des connexions des couches profondes aux couches superficielles du CEL, au niveau desquelles les associations OT sont hypothétiquement formées (voir la section discussion du chapitre 2, page 148), complètent ce circuit (*Kloosterman et al., 2003* ; pour revue, *Canto et al., 2008* ; **Figure 48**). Selon notre modèle, l'interaction fonctionnelle entre le CEL et le dCA1 sous-tend les processus d'acquisition et de flexibilité comportementale des apprentissages bimodaux OT. L'activité de ces deux structures lors de cet apprentissage est modulée et synchronisée par la transmission cholinergique muscarinique. Ce modèle rejoint des travaux ayant porté sur la communication fonctionnelle entre l'hippocampe et le cortex entorhinal lors d'apprentissages associatifs utilisant des indices spatiaux (*Igarashi et al., 2014* ; *Miao et al., 2015*). Toutefois, l'une des nouveautés de nos travaux repose sur la mise en évidence du rôle critique joué par l'hippocampe dans un apprentissage qui ne présente aucune composante contextuelle et/ou spatiale.

Notre étude pharmacologique a permis de montrer que le CEL est impliqué dans le processus d'association entre un stimulus olfactif et un stimulus tactile sous-tendant l'acquisition et la recombinaison d'une tâche bimodale OT via un mécanisme de plasticité synaptique dépendant des récepteurs NMDA, tandis que le DH joue un rôle dans le processus de flexibilité à la base de la recombinaison. Notre étude électrophysiologique a permis de préciser les mécanismes selon lesquels les deux structures interagissent lors de ces deux apprentissages. En effet, l'enregistrement de l'activité multi-unitaire dans le CEL montre que les oscillations bêta de cette structure sont plus amples lors de la recombinaison que lors de l'acquisition. Ces résultats confirment nos données pharmacologiques quant à l'implication du CEL dans ce type d'apprentissage, et suggèrent de plus que le rôle de ce cortex dans la recombinaison implique probablement une interaction avec d'autres structures, notamment le DH, et hypothétiquement le cortex orbitofrontal. D'autre part, l'étude des oscillations thêta enregistrées dans le CEL et dans le dCA1 montre que les activités oscillatoires de ces deux structures sont synchronisées lors de l'acquisition et lors de la recombinaison, avec un niveau de cohérence toutefois plus faible lors de la recombinaison. Bien que l'activité du DH soit nécessaire pour l'expression de la flexibilité comportementale caractérisant la recombinaison, ces données suggèrent que cet apprentissage reposerait sur un mécanisme de découplage partiel entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1, ce qui permettrait d'établir des interactions avec d'autres structures, telles que celles composant le cortex frontal.

L'ensemble de nos données est en accord avec les théories de hiérarchie des structures en fonction de la complexité de la tâche à opérer (pour revue, *Lavenex et Amaral, 2000*). En effet, l'apprentissage de tâches associatives unimodales repose sur les structures néocorticales (voir la section discussion du chapitre 2, page 131, en ce qui concerne la modalité olfactive), tandis que l'apprentissage des tâches associatives plus complexes (telles que celles présentés dans ce manuscrit) sont sous-tendues par les structures de la région parahippocampique, ici le CEL, ainsi que par l'hippocampe.

Ces résultats complètent des travaux s'étant intéressés à l'hippocampe et aux régions parahippocampiques, notamment le cortex périrhinal. En effet, recevant des informations visuelles, auditives et tactiles, ce cortex est largement impliqué dans les processus de reconnaissance d'objet (pour revue, *Murray et Richmond, 2001* ; pour revue, *Buckley et Gaffan, 2006*), ainsi que dans les apprentissages associatifs impliquant la modalité visuelle (*Buckley et Gaffan, 1998* ; pour revue, *Murray et Richmond, 2001* ; *Winters et Reid, 2010* ; *Jacklin et al., 2016*).

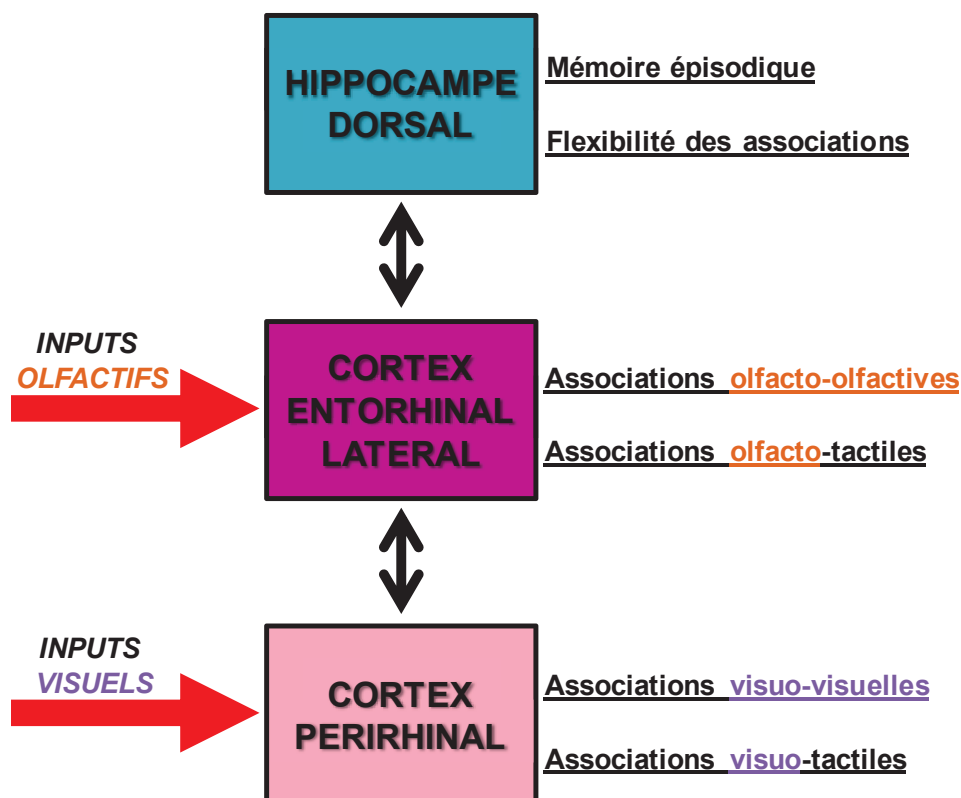


Figure 78 : Modèle de fonctionnement du cortex périrhinal, du cortex entorhinal latéral (CEL) et de l'hippocampe dorsal pour la formation et la flexibilité d'associations bimodales. Les associations comprenant une composante visuelle sont préférentiellement construites dans le cortex périrhinal, structure recevant de forts inputs visuels. En revanche, recevant de forts inputs olfactifs, le CEL est particulièrement sollicité pour la formation d'associations incluant un stimulus olfactif. Enfin, l'hippocampe dorsal est impliqué dans l'encodage d'un épisode, c'est-à-dire la construction d'associations entre un objet (dont la représentation est encodée en amont, dans le cortex périrhinal et dans le CEL), son contexte, sa localisation et sa dimension temporelle. L'hippocampe dorsal est également nécessaire pour la flexibilité des associations précédemment mises en mémoire.

L'ensemble de ces études ainsi que nos travaux suggère que les différentes structures de la formation hippocampique sont impliquées de façon différentielle selon le type de stimuli à associer (**Figure 78**). Ainsi, alors qu'il a été montré que le cortex périrhinal et le CEL sont majoritairement sollicités pour le traitement respectif des informations visuelles et olfactives, la littérature ainsi que nos travaux suggèrent que le cortex périrhinal est impliqué dans la formation d'associations visuo-visuelles (*Murray et Richmond, 2001*) et visuo-tactiles (*Winters et Reid, 2010 ; Jacklin et al., 2016*), tandis que le CEL est engagé dans la formation d'associations olfacto-olfactives (*Bunsey et Eichenbaum, 1993*) et olfacto-tactiles (*Boisselier et al., 2014*). Enfin, l'hippocampe dorsal est à la fois responsable de la formation de l'association entre les caractéristiques de l'objet (encodées et fusionnées dans les structures en amont) avec les informations contextuelles, spatiales et temporelles disponibles (*Ergorul et Eichenbaum, 2004*). De plus, comme montré et en accord avec d'autres études, l'hippocampe dorsal est impliqué dans les processus cognitifs sous-tendant la flexibilité des réponses comportementales par rapport aux associations formées dans les structures en amont (*Alvarado et Rudy, 1995 ; Bunsey et Eichenbaum, 1996 ; Dusek et Eichenbaum, 1998 ; Rondi-Reig et al., 2001 ; Boisselier et al., 2016*).

PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans ce travail de thèse proposent un nouveau modèle de circuit dans lequel l'interaction fonctionnelle entre le CEL et le DH sous-tendrait les processus d'acquisition et de flexibilité d'un apprentissage associatif relationnel bimodal. Ces travaux ouvrent de multiples possibilités d'études complémentaires quant au réseau impliqué dans l'apprentissage d'une tâche olfacto-tactile, et notamment lors de la recombinaison.

Une dissection fine des mécanismes cholinergiques sous-tendant la recombinaison pourrait notamment être obtenue par l'utilisation de la technique d'optogénétique. En effet, celle-ci permettrait d'inactiver sélectivement les terminaisons cholinergiques issues du septum médian au niveau du CEL et du DH. Pour cela, le développement du paradigme OT sur le modèle souris pourrait s'avérer précieux. Cette approche permettrait d'étudier les performances des animaux lorsque le CEL et le DH sont tous les deux privés de l'influence cholinergique et cette étude pourrait être effectuée à des moments précis, par exemple uniquement lors des premiers essais de la session ou encore exclusivement pendant l'échantillonnage. En effet, si les résultats obtenus en pharmacologie mettent en évidence le rôle critique de ce système de neurotransmission dans le CEL et dans le DH au cours de deux expériences différentes, l'effet d'un double blocage de ce système dans les deux structures n'a pas été testé. Cette étude permettrait également de préciser le rôle du système cholinergique dans le découplage entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1 lors de la recombinaison, et d'expliquer l'apparente contradiction entre les données pharmacologiques et électrophysiologiques.

En effet, l'inactivation des récepteurs cholinergiques muscariniques du dCA1 perturbe fortement la recombinaison, tandis que l'enregistrement des LFP a montré que cet apprentissage complexe repose sur une réduction de la cohérence entre les activités oscillatoires du CEL et celles du dCA1, en comparaison avec l'acquisition. Dès lors, le déficit comportemental observé est vraisemblablement au moins en partie lié à l'absence de découplage entre le CEL et le dCA1 comme évoqué dans la section discussion du chapitre 3 (page 198). Toutefois, cette hypothèse n'est pas en accord avec l'un des rôles du système cholinergique, notamment connu pour favoriser la synchronisation entre les activités oscillatoires de plusieurs structures (pour revue, *Colgin, 2013*). Dès lors, l'idée selon laquelle le blocage de fixation de l'acétylcholine sur ses récepteurs au niveau du DH empêcherait le découplage entre le CEL et le dCA1 est contre-intuitive. En effet, la recombinaison reposant sur un découplage entre les activités oscillatoires de ces deux structures, il est très surprenant que le blocage des récepteurs cholinergiques muscariniques du DH conduise à un fort déficit comportemental. Au contraire, l'inactivation de ces récepteurs devrait conduire à une baisse de la cohérence entre le CEL et le dCA1, caractéristique électrophysiologique signifiant la réussite de cet apprentissage, et non à un déficit des performances.

D'autre part, la technique d'optogénétique serait idéale pour s'assurer que les effets obtenus suite à l'inactivation du CEL ou du DH sont effectivement sélectifs de la structure cible, et permettrait également de tester l'implication du CEM et de l'hippocampe ventral dans l'apprentissage de la tâche OT pour les raisons développées dans la section discussion

du chapitre 2 (page 146). En effet, s'affranchissant de problèmes liés à la diffusion, l'optogénétique autorise des inactivations très précises à la fois dans le temps (durée de l'inactivation) et dans l'espace (couche sélective à inactiver).

Les données obtenues nous ont permis de construire un modèle partiel quant au réseau sous-tendant la gestion des interférences caractérisant la recombinaison (**Figure 46, page 142**). Or, ce modèle implique non seulement le CEL et le dCA1, dont l'importance respective a été montrée dans ce travail de thèse, mais inclut également le cortex orbitofrontal (COF), qui pourrait jouer un rôle dans le processus de rétention à long-terme des associations OT précédemment apprises (*Bontempi et al., 1999* ; pour revue, *Frankland et Bontempi, 2005*). En effet, le modèle de consolidation systémique des traces mnésiques développé par ces auteurs repose notamment sur le transfert de ces traces depuis les structures limbiques, où elles sont encodées, jusqu'aux structures néocorticales, où elles sont conservées. L'inactivation sélective du COF permettrait de tester son implication dans le rappel d'un apprentissage de la tâche OT, avec des délais variables, et notamment entre trois et sept jours, fenêtre temporelle au cours de laquelle une récente étude de l'équipe a établi le désengagement du CEL dans la rétention des associations OT (voir la section discussion du chapitre 2, page 145).

Le COF est également un site privilégié d'associations multisensorielles, recevant notamment des informations olfactives et tactiles (*Rolls et al., 1996*). Ainsi, cette structure est sollicitée lors de l'apprentissage de l'association « odeur-place » (*Lipton et al., 1999*), et plus globalement dans la mise en relation d'événements successifs utilisant des stimuli olfactifs (*DeVito et al., 2010b*). Le COF pourrait donc également être impliqué dans les processus sous-tendant la formation des associations OT, en complément du CEL.

De plus, la bibliographie est riche en études ayant mis en évidence l'implication du COF dans les processus de reversal impliquant notamment la modalité olfactive (*Schoenbaum et al., 2003* ; *Kim et Ragozzino, 2005* ; *Roesch et al., 2006*). Or la recombinaison est en partie un reversal, puisque l'animal doit inverser la valence hédonique des stimuli et donc adapter sa réponse comportementale en fonction des combinaisons de stimuli proposées. Ainsi, nous avons montré que la recombinaison repose sur la succession de différents processus cognitifs : tout d'abord l'extinction de la persistance pour l'association « (odeur-renforcement) – texture » précédemment apprise, par un processus dépendant de l'activité de l'hippocampe, et ensuite la formation d'associations OT, par un processus dépendant de l'activité du CEL. Dès lors il est envisageable que le COF soit également impliqué dans les processus sous-tendant la recombinaison, notamment en tant que structure impliquée dans les processus sous-tendant la flexibilité comportementale inhérente à la résolution de cet apprentissage complexe (*De Brun et al., 2000* ; *Coutureau et al., 2012*).

Enfin, depuis près d'une cinquantaine d'années, l'existence de cellules de lieu, qui répondent spécifiquement à la localisation de l'animal dans son environnement, a été établie au niveau de l'hippocampe, et notamment dans sa région dCA1. De plus, il a été montré que ces neurones répondent non seulement aux indices spatiaux donc majoritairement visuels, mais aussi à certains stimuli non-spatiaux tels que l'odeur (Wood *et al.*, 1999) et la texture (Young *et al.*, 1994). Dès lors, l'enregistrement de l'activité de ces neurones particuliers lors de la recombinaison, ainsi que la comparaison de leur activité en réponse à des stimuli unimodaux olfactifs et/ou tactiles pourrait permettre de confirmer leur rôle global en tant que cellules multisensorielles (Ravassard *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces études complémentaires permettrait ainsi d'affiner nos connaissances sur l'interaction fonctionnelle entre le CEL et le DH, et nous permettrait de compléter ce réseau par d'autres structures comme le COF ou encore par d'autres structures connectées avec le CEL (Kerr *et al.*, 2007) et recevant à la fois des informations olfactives et tactiles, comme le tubercule olfactif (pour revue, Wesson et Wilson, 2011), le cortex somesthésique secondaire (Brett-Green *et al.*, 2004 ; Menzel et Barth, 2005), l'amygdale basolatérale (Uwano *et al.*, 1995), le cortex piriforme postérieur (Ye *et al.*, 2012) ou encore l'hippocampe ventral (Weeden *et al.*, 2014), structures qui pourraient donc jouer un rôle dans l'acquisition et surtout dans la recombinaison d'une tâche OT. L'ensemble des structures potentiellement impliquées dans l'apprentissage d'une tâche bimodale olfacto-tactile est résumé sur la **figure 79**.

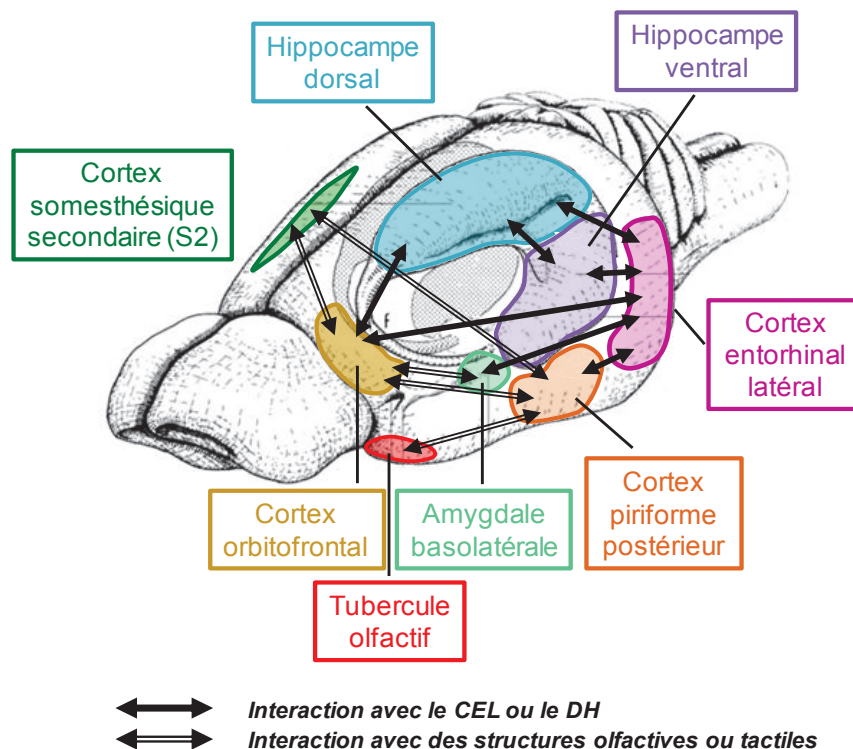


Figure 79 : Modèle du réseau de structures potentiellement impliquées dans les processus mnésiques sous-tendant la formation et la flexibilité comportementale des associations olfacto-tactiles. Outre le cortex entorhinal latéral et l'hippocampe dorsal, le cortex orbitofrontal, l'amygdale basolatérale, le cortex somesthésique secondaire (S2), le tubercule olfactif, le cortex piriforme postérieur et l'hippocampe ventral reçoivent des informations olfactives et

vraisemblablement tactiles. L'ensemble de ces structures forme un réseau étroitement et réciproquement connecté, notamment avec la formation hippocampique. (Toutes les connexions anatomiques ne sont volontairement pas représentées dans un souci de clarté de la figure).

Toutefois, si la recombinaison est vraisemblablement sous-tendue par un large réseau des structures, ce n'est pas parce que plusieurs structures participent à un apprentissage qu'elles y contribuent nécessairement de la même façon. En effet, le CEL et le DH sont tous les deux recrutés lors de l'apprentissage de la tâche OT, mais dans des processus distincts. D'un point de vue ergonomique, il est en effet peu vraisemblable que deux structures du cerveau réalisent exactement la même opération cognitive, car même si elles participent à l'apprentissage d'une même tâche, chacune présente des connectivités, des modulations par des neurotransmetteurs et des aspects fonctionnels différents, avec des propriétés intrinsèques propres, et ces structures ne reçoivent vraisemblablement pas exactement les mêmes inputs. Ainsi, c'est tout l'enjeu des neurosciences cognitives que de comprendre les mécanismes selon lesquels une information donnée est traitée de façon différentielle par chacune des structures qui la reçoit.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agster, K., and Burwell, R. (2009). Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the Rat. *Hippocampus* 19, 1159–1186.
- Agster, K., and Burwell, R. (2013). Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal and entorhinal cortices of the rat. *Behavioural Brain Research* 254, 50–64.
- Agster, K.-L., Fortin, N., and Eichenbaum, H. (2002). The hippocampus and disambiguation of overlapping sequences. *The Journal of Neuroscience* 22, 5760–5768.
- Albasser, M., Chapman, R., Amin, E., Iordanova, M., Vann, S., and Aggleton, J. (2010). New behavioral protocols to extend our knowledge of rodent object recognition memory. *Learning & Memory* 17, 407–419.
- Albasser, M., Dumont, J., Amin, E., Holmes, J., Horne, M., Pearce, J., and Aggleton, J. (2013). Association rules for rat spatial learning, the importance of the hippocampus for binding item identity with item location. *Hippocampus* 23, 1162–1178.
- Alvarado, M., and Rudy, J. (1995). Rats with damage to the hippocampal-formation are impaired on the transverse-patterning problem but not on elemental discrimination. *Behavioral Neuroscience* 109, 204–211.
- Amaral, D., and Witter MP (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation, a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571–591.
- Astur, R., Klein, R., Mumby, D., Protz, D., Sutherland, R., and Martin, G. (2004). A role for olfaction in object recognition by normal and hippocampal-damaged rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 78, 186–191.
- Atkinson, R.C. and Shiffrin, R.M. (1968). Human Memory: A proposed system and its control processes. *Psychology of Learning and Motivation* 2, 89-195.
- Atri, A., Sherman, S., Norman, K., Kirchhoff, B., Nicolas, M., Greicius, M., Cramer, S., Breiter, H., Hasselmo, M., and Stern, C. (2004). Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behavioral Neuroscience* 118, 223–236.
- Barnes, C. (1995). Involvement of LTP in memory / Are we searching under the street light. *Neuron* 15, 751–754.
- Barry, C., Heys, J., and Hasselmo, M. (2012). Possible role of acetylcholine in regulating spatial novelty effects on theta rhythm and grid cells. *Frontiers in Neural Circuits* 6, 1–13.
- Beauchamp, M., Lee, K., Argall, B., and Martin, A. (2004). Integration of auditory and visual information about objects in superior temporal sulcus. *Neuron* 41, 809–823.
- Beer, Z., Chwiesko, C., Kitsukawa, T., and Sauvage, M. (2013). Spatial and stimulus-type tuning in the LEC, MEC, POR, PrC, CA1, and CA3 during spontaneous item recognition memory. *Hippocampus* 23, 1425–1438.
- Bennett, T., and Nunn, P. (1971). Effects of scopolamine on hippocampal theta and correlated discrimination performance. *Physiology & Behavior* 7, 451–454.
- Berg, R., Whitmer, D., and Kleinfeld, D. (2006). Exploratory whisking by rat is not phase locked to the hippocampal theta rhythm. *The Journal of Neuroscience* 26, 6518–6522.
- Berke, J., Hetrick, V., Breck, J., and Greene, R. (2008). Transient 23–30 Hz Oscillations in Mouse Hippocampus during exploration of novel environments. *Hippocampus* 18, 519–529.
- Bethus, I., Tse, D., and Morris, R. (2010). Dopamine and memory: Modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *The Journal of Neuroscience* 30, 1610–1618.
- Biella, G., and de Curtis, M. (2000). Olfactory inputs activate the medial entorhinal cortex via the hippocampus. *Journal of Neurophysiology* 83, 1924–1931.
- Bliss, T., and Collingridge, G. (1993). A synaptic model of memory long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.
- Bliss, T., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentialisation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Neurophysiology* 232, 331–356.
- Bodyak, N., and Slotnick, B. (1999). Performance of mice in an automated olfactometer odor detection, discrimination and odor memory. *Chemical Senses* 24, 637–645.
- Bohbot, V., Otahal, P., Liu, Z., Nadel, L., and Bures, J. (2007). Electroconvulsive shock and lidocaine reveal rapid consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 4016–4019.

- Bohn, I., Giertler, C., and Hauber, W. (2003). Orbital prefrontal cortex and guidance of instrumental behaviour in rats under reversal conditions. *Behavioural Brain Research* 143, 49–56.
- Boisselier, L., Ferry, B., and Gervais, R. (2014). Involvement of the lateral entorhinal cortex for the formation of cross-modal olfactory-tactile associations in the rat. *Hippocampus* 24, 877–891.
- Boisselier, L., Ferry, B., and Gervais, R. (2016). Respective role of the dorsal hippocampus and the lateral entorhinal cortex for the recombination of previously learned olfactory-tactile associations in the rat. *Learning and Memory* 24, 34–34.
- Bologrini, N., Papagno, C., Moroni, D., and Maravita, A. (2010). Tactile temporal processing in the auditory cortex. *Journal of Cognitive Neuroscience* 22, 1201–1211.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., and Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400, 671–675.
- Botly, L., and De Rosa, E. (2007). Cholinergic influences on feature binding. *Behavioral Neuroscience* 121, 264–276.
- Botly, L., and De Rosa, E. (2009). Cholinergic deafferentation of the neocortex using 192 IgG-saporin impairs feature binding in rats. *The Journal of Neuroscience* 29, 4120–4130.
- Bouret, S., and Sara, S. (2004). Reward expectation, orientation of attention and locus coeruleus-medial frontal cortex interplay during learning. *European Journal of Neuroscience* 20, 791–802.
- Brecht, M., Prelowski, B., and Merzenich, M. (1997). Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behavioural Brain Research* 84, 81–97.
- Brett-Green, B., Fifkova, E., Larue, D., Winer, J., and Barth, D. (2003). A multisensory zone in rat parietotemporal cortex, intra- and extracellular physiology and thalamocortical connections. *The Journal of Comparative Neurology* 460, 223–237.
- Brett-Green, B., Paulsen, M., Staba, R., Fifkova, E., and Barth, D. (2004). Two distinct regions of secondary somatosensory cortex in the rat- topographical organization and multisensory responses. *Journal of Neurophysiology* 91, 1327–1336.
- Buckley, M., and Gaffan, D. (1998). Perirhinal cortex ablation impairs configural learning and paired associate learning equally. *Neuropsychologia* 36, 535–546.
- Buckley, M., and Gaffan, D. (2006). Perirhinal cortical contributions to object perception. *TRENDS in Cognitive Science* 10, 100–107.
- Bunsey, M., and Eichenbaum, H. (1993). Critical role of the parahippocampal region for paired-associate learning in rats. *Behavioral Neuroscience* 107, 740–747.
- Bunsey, M., and Eichenbaum, H. (1996). Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature* 379, 255–257.
- Buonviso, N., Amat, C., and Litaudon, P. (2006). Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chemical Senses* 31, 145–154.
- Burman, M., and Gewirtz, J. (2007). Hippocampal activity, but not plasticity, is required for early consolidation of fear conditioning with a short trace interval. *European Journal of Neuroscience* 25, 2483–2490.
- Burwell, R. (2000). The parahippocampal region corticocortical connectivity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 911, 25–42.
- Burwell, R., and Amaral, D. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 398, 179–205.
- Bushara, K., Hanakawa, T., Toma, K., Kansaku, K., and Hallett, M. (2002). Neural correlates of cross-modal binding. *Nature Neuroscience* 6, 190–195.
- Buzsaki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33, 325–340.
- Cain, D., Saucier, D., Hall, J., Hargreaves, E., and Boon, F. (1996). Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX - Contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behavioral Neuroscience* 110, 86–102.
- Calu, D., Roesch, M., Stalnaker, T., and Schoenbaum, G. (2007). Associative encoding in posterior piriform cortex during odor discrimination and reversal learning. *Cerebral Cortex* 17, 1342–1349.
- Calvert, G. (2001). Crossmodal processing in the human brain - insights from functional neuroimaging studies. *Cerebral Cortex* 11, 1110–1123.
- Canto, C., Wouterlood, F., and Witter, M. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plasticity* 2008, 1–18.

- Cappe, C., Rouiller, E., and Barone, P. (2009). Multisensory anatomical pathways. *Hearing Research* 258, 28–36.
- Carvell, G., and Simons, D. (1990). Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *The Journal of Neuroscience* 10, 2628–2648.
- Carvell, G., and Simons, D. (1995). Task- and Subject-Related Differences in sensorimotor behavior during active touch. *Somatosensory and Motor Sensory* 12, 1–9.
- Chabaud, P., Ravel, N., Wilson, D., and Gervais, R. (1999). Functional coupling in rat central olfactory pathways, a coherence analysis. *Neuroscience Letters* 276, 17–20.
- Chang, S.-D., Chen, D.-Y., and Liang, K. (2008). Infusion of lidocaine into the dorsal hippocampus before or after the shock training phase impaired conditioned freezing in a two-phase training task of contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory* 89, 95–105.
- Chao, O., Huston, J., Li, J.-S., Wang, A.-L., and de Souza Silva, M. (2016). The Medial Prefrontal Cortex-Lateral Entorhinal Cortex Circuit Is Essential for Episodic-Like Memory and Associative Object Recognition. *Hippocampus* 26, 633–645.
- Chapuis, J., and Wilson, D. (2013a). Cholinergic modulation of olfactory pattern separation. *Neuroscience Letters* 545, 50–53.
- Chapuis, J., Cohen, Y., He, X., Shang, Z., Xu, F., and Wilson, D. (2013b). Lateral entorhinal modulation of piriform cortical activity and fine odor discrimination. *The Journal of Neuroscience* 33, 13449–13459.
- Chapuis, J., Garcia, S., Messaoudi, B., Thevenet, M., Ferreira, G., Gervais, R., and Ravel, N. (2009). The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval. *The Journal of Neuroscience* 29, 10287–10298.
- Chen, X., Feng, J., Liao, Z., Li, X., Wang, H., Li, X., and He, J. (2013). Encoding and retrieval of artificial visuoauditory memory traces in the auditory cortex requires the entorhinal cortex. *The Journal of Neuroscience* 33, 9963–9974.
- Cheong, M., Yun, S., Mook-Juin, I., Joo, I., Huh, K., and Jung, M. (2001). Cholinergic modulation of synaptic physiology in deep layer entorhinal cortex of the rat. *Journal of Neuroscience Research* 66, 117–121.
- Cho, Y., and Kesner, R. (1995). Relational object association learning in rats with hippocampal lesions. *Behavioural Brain Research* 67, 91–98.
- Chudasama, Y., and Robbins, T. (2003). Dissociable contributions of the orbitofrontal and infralimbic cortex to Pavlovian autoshaping and discrimination reversal learning. *The Journal of Neuroscience* 23, 8771–8780.
- Cleland, T., and Linstner, C. (2005). Computation in the olfactory system. *Chemical Senses* 30, 801–813.
- Cohen, L., Rothschild, G., and Mizrahi, A. (2011). Multisensory integration of natural odors and sounds in the auditory cortex. *Neuron* 72, 357–369.
- Cohen, Y., Putrino, D., and Wilson, D. (2015). Dynamic cortical lateralization during olfactory discrimination learning. *Journal of Physiology* 593, 1701–1714.
- Colgin, L. (2013). Mechanisms and functions of theta rhythms. *Annual Review Neuroscience* 36, 295–312.
- Colgin, L., and Moser, E. (2009a). Hippocampal theta rhythms follow the beat of their own drum. *Nature Neuroscience* 2009, 1483–1484.
- Colgin, L., Denniger, T., Fyhn, M., Harting, T., Bonnevie, T., Jensen, O., Moser, M.-B., and Moser, E. (2009b). Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature* 462, 353–358.
- Cousens, G., and Otto, T. (1998). Both pre and post training excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 112, 1092–1103.
- Coutureau, E., and Di Scala, G. (2009). Entorhinal cortex and cognition. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 33, 753–761.
- Coutureau, E., Esclassan, F., Di Scala, G., and Marchand A (2012). The role of the rat medial prefrontal cortex in adapting to changes in instrumental contingency. *PLoS ONE* 7, 1–9.
- Davachi, L., and Wagner, A. (2002). Hippocampal contributions to episodic encoding- Insights from relational and item-based learning. *Journal of Neurophysiology* 88, 982–990.

- Davis, R. (2004). Olfactory learning. *Neuron* 44, 31–48.
- De Bruin, J., Feenstra, M., Broersen, L., van Leeuwen, M., Arens, C., De Vries, S., and Joosten, R. (2000). Role of the prefrontal cortex of the rat in learning and decision making- effects of transient inactivation. *Progress in Brain Research* 126, 103-113.
- Dees, R., and Kesner, R. (2013). The role of the dorsal dentate gyrus in object and object-context recognition. *Neurobiology of Learning and Memory* 106, 112–117.
- Deller, T., Martinez, A., Nitsch, R., and Frotscher, M. (1996). A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus : Direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *The Journal of Neuroscience* 16, 3322–3333.
- Dematte, M., Sanabria, D., Sugaman, R., and Spence, C. (2006). Cross-modal interactions between olfaction and touch. *Chemical Senses* 31, 291–300.
- Dennis, S., Pasqui, F., Colvin, E., Sanger, H., Mogg, A., Felder, C., Broad, L., Fitzjohn, S., Isaac, J., and Mellor, J. (2016). Activation of muscarinic M1 acetylcholine receptors induces LTP in the hippocampus. *Cerebral Cortex* 26, 414–426.
- De Rosa, E., and Hasselmo, M. (2000). Muscarinic cholinergic neuromodulation reduces proactive interference between stored odor memories during associative learning in rats. *Behavioral Neuroscience* 114, 32–41.
- Deschênes, M., Moore, J., and Kleinfeld, D. (2012). Sniffing and whisking in rodents. *Current Opinion in Neurobiology* 22, 243–250.
- Deshmukh, S., Yoganarasimha, D., Voicu, H., and Knierim, J. (2010). Theta modulation in the medial and the lateral entorhinal cortices. *Journal of Neurophysiology* 104, 994–1006.
- Deshmukh, S., and Knierim, J. (2012). Representation of non-spatial and spatial information in the lateral entorhinal cortex. *Behavioral Neuroscience* 5, 1–39.
- DeVito, L., Kanter, B., and Eichenbaum, H. (2010a). The hippocampus contributes to memory expression during transitive inference in mice. *Hippocampus* 20, 208–217.
- DeVito, L., Lykken, C., Kanter, B., and Eichenbaum, H. (2010b). Prefrontal cortex, role in acquisition of overlapping associations and transitive inference. *Learning & Memory* 17, 161–167.
- Diamond, M., von Heimendalh, M., and Arabzadeh, E. (2004). Whisker-mediated texture discrimination. *PLoS Biology* 6, 1627–1630.
- Diamond, M., von Heimendalh, M., Knutsen, P., Kleinfeld, D., and Ahissar, E. (2008). Where and what in the whisker sensorimotor system. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 601–612.
- Dickson, C., Magistretti, J., Shalinsky, M., Hamam, B., and Alonso, A. (2000). Oscillatory activity in entorhinal neurons and circuits. Mechanisms and function. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 127–150.
- Doty, R. (1986). Odor-guided behavior in mammals. *Experientia* 42, 257–271.
- Douchamps, V., Jeewajee, A., Blundell, P., Burgess, N., and Lever, C. (2013). Evidence for encoding versus retrieval Hippo theta ACh. *The Journal of Neuroscience* 33, 8689–8704.
- Driscoll, R., Sutherland, R., Prusky, G., and Rudy, J. (2004). Damage to the hippocampal formation does not disrupt representational flexibility as measured by a novelty transfer test. *Behavioral Neuroscience* 118, 1427–1432.
- Driver, J., and Spence, C. (2000). Multisensory perception beyond modularity and convergence. *Current Biology* 10, 731–735.
- Driver, K., and Noesselt, T. (2008). Multisensory interplay reveals cross modal influences on sensory-specific brain regions, neural responses, and judgments. *Neuron Review* 57, 11–23.
- Dusek, J., and Eichenbaum, H. (1997). The hippocampus and memory for orderly stimulus relations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 7109–7114.
- Dusek, J., and Eichenbaum, H. (1998). The hippocampus and transverse patterning guided by olfactory cues. *Behavioral Neuroscience* 112, 762–771.
- Easton, A., Douchamps, V., Eacott, M., and Lever, C. (2012a). A specific role of septo hippocampal acetylcholine in memory. *Neuropsychologia* 50, 3156–3168.
- Easton, A., Webster, A., and Eacott, M. (2012b). The episodic nature of episodic-like memories. *Learning & Memory* 19, 146–150.
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews Neuroscience* 1, 41–50.

- Eichenbaum, H. (2008). Using olfaction to study memory. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 657–669.
- Eichenbaum, H., Fagan, A., and Cohen, N. (1986). Normal olfactory discrimination learning set and facilitation of reversal learning after medial-temporal damage in rats, implications for an account of preserved learning abilities in amnesia. *The Journal of Neuroscience* 6, 1876–1884.
- Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Young, B., and Bunsey, M. (1996). Functional organization of the hippocampal memory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 13500–13507.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A., and Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review Neuroscience* 30, 123–152.
- Ergorul, C., and Eichenbaum, H. (2004). The hippocampus and memory for what, where and when. *Learning & Memory* 11, 397–405.
- Ernst, M., and Bühlhoff, H. (2004). Merging the senses into a robust percept. *TRENDS in Cognitive Science* 8, 62–69.
- Ernst, M., Banks, M., and Bühlhoff, H. (2000). Touch can change visual slant perception. *Nature Neuroscience* 3, 69–73.
- Esclassan, F., Coutureau, E., Di Scala, G., and Marchand, A. (2009). A cholinergic dependent role for the entorhinal cortex in trace fear conditioning. *The Journal of Neuroscience* 29, 8087–8093.
- Feldman, D., and Brecht, M. (2005). Map plasticity in somatosensory cortex. *Science* 310, 810–815.
- Fell, J., and Axmacher, N. (2011). The role of phase synchronization in memory processes. *Nature Reviews Neuroscience* 12, 105–118.
- Ferry, B., Oberling, P., Jarrard, L., and Di Scala, G. (1996). Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behavioral Neuroscience* 110, 443–450.
- Ferry, B., Ferreira, G., Trissard, N., and Majchrak, M. (2006). Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behavioral Neuroscience* 120, 1180–1186.
- Ferry, B., Gervasoni, D., and Vogt, C. (2014). *Stereotaxis Neurosurgery in Laboratory Rodent - Handbook on best practices* (New-York).
- Fortin, N., Agster, K.-L., and Eichenbaum, H. (2002). Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nature Neuroscience* 5, 458–462.
- Franca, A., do Nascimento, G., Lopes-dos-Santos, V., Muratori, L., Ribeiro, S., Lobao-Soares, B., and Tort, A. (2014). Beta oscillations (23-30 Hz) in the mouse hippocampus during novel object recognition. *European Journal of Neuroscience* 40, 3693–3703.
- Frank, L., Rudy, J., and O'Reilly, R. (2003). Transitivity, flexibility, conjunctive representations, and the hippocampus. II. A computational analysis. *Hippocampus* 13, 341–354.
- Frankland, P., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 119–130.
- Frederick, D., Brown, A., Brim, E., Mehta, N., Vujovic, M., and Kay, L. (2016). Gamma and Beta Oscillations Define a Sequence of neurocognitive mode present in Odor processing. *The Journal of Neuroscience* 36, 7750–7767.
- Fries, P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics, neuronal communication through neuronal coherence. *TRENDS in Cognitive Science* 9, 474–480.
- Furtak, S., Wei, S., Agster, K.-L., and Burwell, R. (2007). Functional Neuroanatomy of the Parahippocampal Region. *Hippocampus* 17, 709–722.
- Fuster, J., Bodner, M., and Kroger, J. (2000). Cross-modal and cross-temporal association in neurons of frontal cortex. *Nature* 405, 347–351.
- Gaykema, R., Luiten, P., Nyakas, C., and Traber, J. (1990). Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *The Journal of Comparative Neurology* 293, 103–124.
- Gervais, R., Holley, A., and Keeverne, B. (1988). The importance of central noradrenergic influences on the olfactory bulb in the processing of learned olfactory cues. *Chemical Senses* 13, 3–12.
- Ghazanfar, A., and Schroeder, C. (2006). Is neocortex essentially multisensory? *TRENDS in Cognitive Science* 10, 278–285.
- Gilbert, P., and Kesner, R. (2002). Role of the rodent hippocampus in paired-associate learning involving associations between a stimulus and a spatial location. *Behavioral Neuroscience* 116, 63–71.

- Gilbert, P., and Kesner, R. (2003). Localization of function within the dorsal hippocampus, the role of the CA3 subregion in paired-associate learning. *Behavioral Neuroscience* *117*, 1385–1394.
- Gilbert, P., Kesner, R., and Lee, I. (2001). Dissociating hippocampal subregions: a double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* *11*, 626–636.
- Gisquet-Verrier, P., and El Massioui, N. (1997). Selective hippocampal lesions in rats disrupt acquisition and retention of a positive patterning discrimination. *Physiology & Behavior* *61*, 577–589.
- Goutagny, R., Jackson, J., and Williams, S. (2009). Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nature Neuroscience* *12*, 1491–1493.
- Gray, C., and Freeman, W. (1986). Chemical dependencies of learning in the rabbit olfactory bulb, acquisition of the transient spatial pattern change depends on norepinephrine. *Behavioral Neuroscience* *100*, 585–596.
- Grion, N., Akrami, A., Zuo, Y., Stella, F., and Diamond, M. (2016). Coherence between rat sensorimotor system and hippocampus is enhanced during tactile discrimination. *PLoS Biology* *14*, doi: 10.1371/journal.pbio.1002384.
- Guic-Robles, E., Valdivieso, C., and Guajardo, G. (1989). Rats can learn a roughness discrimination using only their vibrissal system. *Behavioural Brain Research* *31*, 285–289.
- Guic-Robles, E., Jenkins, W., and Bravo, H. (1992). Vibrissal roughness discrimination is barrel cortex-dependent. *Behavioural Brain Research* *48*, 145–152.
- Hafting, T., Fyhn, M., Model, S., Moser, M.-B., and Moser, E. (2005). Microstructural of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* *436*, 801–806.
- Hamada, Y., Miyashita, E., and Tanaka, H. (1999). Gamma-band oscillations in the barrel cortex precede rat exploratory whisking. *Neuroscience* *88*, 667–671.
- Hargreaves, E., Rao, G., Lee, I., and Knierim, J. (2005). Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science* *308*, 1792–1795.
- Hasselmo, M. (2006a). The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology* *16*, 710–715.
- Hasselmo, M. (1999). Neuromodulation- acetylcholine and memory consolidation. *TRENDS in Cognitive Science* *3*, 351–359.
- Hasselmo, M., and Barkai, E. (1995). Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation. *The Journal of Neuroscience* *15*, 6592–6604.
- Hasselmo, M., and McGaughy, J. (2004). High acetylcholine circuit dynamics for attention and encoding, Low acetylcholine sets dynamics for consolidation. *Progress in Brain Research* *145*, 207–231.
- Hasselmo, M., and Sarter, M. (2011). Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology* *36*, 52–73.
- Hasselmo, M., and Stern, C. (2006b). Mechanisms underlying working memory for novel information. *TRENDS in Cognitive Science* *10*, 487–493.
- Hasselmo, M., and Stern, C. (2013). Theta rhythm and the encoding and retrieval of space and time. *NeuroImage* *85*, 656–666.
- Hasselmo, M., and Wyble, B. (1997). Free recall and recognition in a network model of the hippocampus, simulating effects of scopolamine on human memory function. *Behavioural Brain Research* *89*, 1–34.
- Hasselmo, M., Bodelon, C., and Wyble, B. (2002). A proposed function for hippocampal theta rhythm- Separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Computation* *14*, 793–817.
- Hebb, D. (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological approach*. John Wiley & Sons.
- Hegoburu, C., Parrot, S., Ferreira, G., and Mouly, A.-M. (2014). Differential involvement of amygdala and cortical NMDA receptors activation upon encoding in odor fear memory. *Learning & Memory* *21*, 651–655.
- von Heimendahl, M., Itskov, P., Arabzadeh, E., and Diamond, M. (2007). Neuronal activity in rat barrel cortex underlying texture discrimination. *PLoS Biology* *5*, 2696–2708.
- Ho, C., and Spence, C. (2005). Olfactory facilitation of dual-task performance. *Neuroscience Letters* *389*, 35–40.
- Igarashi, K. (2015). Plasticity in oscillatory coupling between hippocampus and cortex. *Current Opinion in Neurobiology* *35*, 163–168.

- Igarashi, K., Colgin, L., Moser, M.-B., and Moser, E. (2014). Coordination of entorhinal hippocampal ensemble activity during associative learning. *Research Letter* 510, 143–147.
- Inglis, F., and Fibiger, H. (1995). Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience* 66, 81–86.
- Insausti, R., Herrero, M., and Witter, M. (1997). Entorhinal cortex of the rat: Cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* 7, 146–183.
- Iversen, I. (2008). An inexpensive and automated method for presenting olfactory or tactile stimuli to rats in a two-choice discrimination task. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* 90, 113–124.
- Jacklin, D., Cloke, J., Potvin, A., Garrett, I., and Winters, B. (2016). The dynamic multisensory engram: neural circuitry underlying crossmodal object recognition in rats changes with the nature of object experience. *The Journal of Neuroscience* 36, 1273–1289.
- Jadauji, B., Djordjevic, J., Lundström, J., and Park, C. (2012). Modulation of olfactory perception by visual cortex stimulation. *The Journal of Neuroscience* 32, 3095–3100.
- Jeffery, K. (2007). Do discrimination tasks discourage multi-dimensional stimulus processing - Evidence from a cross-modal object discrimination in rats. *Behavioural Brain Research* 183, 213–221.
- Kadoshisa, M., and Wilson, D. (2006). Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 15206–15211.
- Kay, L. (2005). Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 3863–3868.
- Kay, L., Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Libano, D., and Kopell, N. (2009). Olfactory oscillations- the what, how and what for. *TRENDS in Neuroscience* 32, 207–214.
- Kayser, C., and Logothetis, N. (2007). Do early sensory cortices integrate cross-modal information? *Brain Structure and Function* 212, 121–132.
- Kemp, A., and Manahan-Vaughan, D. (2008). B-adrenoreceptors comprise a critical element in learning-facilitated long-term plasticity. *Cerebral Cortex* 18, 1326–1334.
- Kerr, K., Agster, K.-L., Furtak, S., and Burwell, R. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, 697–708.
- Kesner, R. (2013). Role of the hippocampus in mediating interference as measured by pattern separation processes. *Behavioural Processes* 93, 148–154.
- Kesner, R., Hunsaker, M., and Gilbert, P. (2005). The role of CA1 in the acquisition of an object-trace-odor paired associate task. *Behavioral Neuroscience* 119, 781–786.
- Khakpai, F., Nasehi, M., Haeri-Rohani, A., and Eidi, A. (2012). Scopolamine induced memory impairment-possible involvement of NMDA receptor mechanisms of dorsal hippocampus and-or septum. *Behavioural Brain Research* 231, 1–10.
- Kim, J., and Ragozzino, M. (2005). The involvement of the orbitofrontal cortex in learning under changing task contingencies. *Neurobiology of Learning and Memory* 83, 125–133.
- Kinnavane, L., Amin, E., Horne, M., and Aggleton, J. (2014). Mapping parahippocampal systems for recognition and recency memory in the absence of the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 40, 3720–3734.
- Kitamura, T., Pignatelli, M., Suh, J., Kohara, K., Yoshiki, A., Abe, K., and Tonegawa, S. (2014). Island Cells Control Temporal Association Memory. *Science* 343, 896–901.
- Kitamura, T., Macdonald, C., and Tonegawa, S. (2015). Entorhinal-hippocampal neuronal circuits bridge temporally discontinuous events. *Learning & Memory* 22, 438–443.
- Kleinfeld, D., Deschênes, M., and Ulanovsky, N. (2016). Whisking, sniffing, and the hippocampal theta-rhythm, a tale of two oscillators. *PLoS Biology* 14, doi: 10.1371/journal.pbio.1002385.
- Kloosterman, F., van Haften, T., Witter, M., and Lopes da Silva, F. (2003). Electrophysiological characterization of interlaminarentorhinal connections an essential link for re-entrance in the hippocampal-entorhinal system. *European Journal of Neuroscience* 18, 3037–3052.
- Knierim, J., Lee, I., and Hargreaves, E. (2006). Hippocampal place cells- Parallel input streams, subregional processing and implications for episodic memory. *Hippocampus* 16, 755–764.
- Knierim, J., Neunuebel, J., and Deshmukh, S. (2014). Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortices. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 369, 1–7.
- Krupa, D., Wiest, M., Shuler, M., Laubach, M., and Nicolelis, M. (2004). Layer-specific somatosensory cortical activation during active tactile discrimination. *Science* 304, 1989–1992.

- Langston, R., Stevenson, C., Wilson, C., Saunders, I., and Wood, E. (2010). The role of hippocampal subregions in memory for stimulus associations. *Behavioural Brain Research* 215, 275–291.
- Laroche, S. (2010). Cellular and molecular mechanisms of memory. *Biologie Aujourd'hui* 204, 93–102.
- Lavenex, P., and Amaral, D. (2000) Hippocampal neocortical interaction. *Hippocampus* 10, 420–430.
- Lee, M., Chrobak, J., Sik, A., Wiley, R., and Buzsaki, G. (1994). Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* 62, 1033–1047.
- Leitner, F., Melzer, S., Lütcke, H., Pinna, R., Seeburg, P., Helmchen, F., and Monyer, H. (2016). Spatially segregated feedforward LEC to Hippocampus supporting odor processing. *Nature Neuroscience* 19, 935–944.
- Leung, L., Shen, B., Rajakumar, N., and Ma, J. (2003). Cholinergic activity enhances hippocampal long-term potentiation in CA1 during walking in rats. *The Journal of Neuroscience* 23, 9297–9304.
- Lipton, P., Alvarez, P., and Eichenbaum, H. (1999). Crossmodal associative memory representations in rodent orbitofrontal cortex. *Neuron* 22, 349–359.
- Lipton, P., White, J., and Eichenbaum, H. (2007). Disambiguation of overlapping experiences by neurons in the medial entorhinal cortex. *The Journal of Neuroscience* 27, 5787–5795.
- Lisman, J., and Otmakhova, N. (2001). Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus, elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus* 11, 551–568.
- Litaudon, P., Mouly, A.-M., Sullivan, R., Gervais, R., and Cattarelli, M. (1997). Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. *European Journal of Neuroscience* 9, 1593–1602.
- Litaudon, P., Amat, C., Bertrand, B., Vigouroux, M., and Buonviso, N. (2003). Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *European Journal of Neuroscience* 17, 2457–2461.
- Lu, X., and Slotnick, B. (1990). Acquisition of an olfactory learning-set in rats with lesions of the mediodorsal thalamic nucleus. *Chemical Senses* 15, 713–724.
- Macrides, F., Eichenbaum, H., and Forbes, W. (1982). Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *The Journal of Neuroscience* 2, 1705–1717.
- Manns, J., and Eichenbaum, H. (2006). Evolution of declarative memory. *Hippocampus* 16, 795–808.
- Maren, S., and Holt, W. (2000). The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behavioural Brain Research* 110, 97–108.
- Martin, J. (1991). Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neuroscience Letters* 127, 160–164.
- Martin, C., and Ravel, N. (2014). Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks, different rhythms for different functional networks. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8, 1–13.
- Martin, C., Gervais, R., Chabaud, P., Messaoudi, B., and Ravel, N. (2004b). Learning-induced modulation of oscillatory activities in the mammalian olfactory system, the role of the centrifugal fibers. *Journal of Physiology* 98, 467–478.
- Martin, C., Gervais, R., Hugues, E., Messaoudi, B., and Ravel, N. (2004a). Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb- a correlate of odor recognition. *The Journal of Neuroscience* 24, 389–397.
- Martin, C., Gervais, R., Messaoudi, B., and Ravel, N. (2006). Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition a network activity. *European Journal of Neuroscience* 23, 1801–1810.
- Martin, C., Beshel, J., and Kay, L. (2007). An olfacto-hippocampal network is dynamically involved in odor-discrimination learning. *Journal of Neurophysiology* 98, 2196–2205.
- Masuoka, T., Fujii, Y., and Kamei, C. (2006). Effect of scopolamine on the hippocampal theta rhythm during an eight-arm radial maze task in rats. *European Journal of Pharmacology* 539, 76–80.
- Matus-Amat, P., Higgins, E., Barrientos, R., and Rudy, J. (2004). The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *The Journal of Neuroscience* 24, 2431–2439.
- McAlonan, K., and Brown, V. (2003). Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. *Behavioural Brain Research* 146, 97–103.

- McDonald, J., Adibi, M., Clifford, C., and Arabzadeh, E. (2014). Sampling time and performance in rat whisker sensory system. *PLoS ONE* 9, doi: 10.1371/journal.pone.0116357.
- McDonald, R., Murphy, R., Guarraci, F., Gortler, J., White, N., and Baker, A. (1997). Systematic comparison of the effects of hippocampal and fornix-fimbria lesions on acquisition of three configural discriminations. *Hippocampus* 7, 371–388.
- McGaughy, J., Koene, R., Eichenbaum, H., and Hasselmo, M. (2005). Cholinergic deafferentation of the entorhinal cortex in rats impairs encoding of novel but not familiar stimuli in a delayed nonmatch-to-sample Task. *The Journal of Neuroscience* 25, 10273–10281.
- McHugh, T., and Tonegawa, S. (2009). CA3 NMDA receptors are required for the rapid formation of a salient contextual representation. *Hippocampus* 19, 1153–1158.
- Menzel, R., and Barth, D. (2005). Multisensory and secondary somatosensory cortex in rat. *Cerebral Cortex* 15, 1690–1696.
- Meredith, A., and Stein, B. (1983). Interactions among converging sensory inputs in the superior colliculus. *Science* 221, 389–391.
- Meredith, M., and Stein, B. (1986). Visual, auditory, and somatosensory convergence on cells in superior colliculus results in multisensory integration. *Journal of Neurophysiology* 56, 640–662.
- Mesulam, M. (1998). From sensation to cognition. *Brain* 121, 1013–1052.
- Meunier, M., Bachevalier, J., Mishkin, M., and Murray, E. (1993). Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. *The Journal of Neuroscience* 13, 5418–5432.
- Miao, C., Cao, Q., Ito, H., Yamahachi, H., Witter, M., Moser, M.-B., and Moser, E. (2015). Hippocampal remapping after partial inactivation of the medial entorhinal cortex. *Neuron* 88, 590–603.
- Molholm, S., and Foxe, J. (2010). Making sense of multisensory integration. *European Journal of Neuroscience* 31, 1709–1712.
- Mori, K., Nagao, H., and Yoshihara, Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286, 711–715.
- Morita, T., Kang, H., Wolfe, J., Jadhav, S., and Feldman, D. (2011). Psychometric curve and behavioral strategies for whisker-based texture discrimination in rats. *PLoS ONE* 6, 1–10.
- Morris, R. (1989). Synaptic plasticity and learning selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV. *The Journal of Neuroscience* 9, 3040–3057.
- Morris, R. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology* 74, 32–40.
- Morris, R., Garrud, P., Rawlins, J., and O'Keefe, J. (1982). Place-navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
- Morris, R., Anderson, E., Lynch, G., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774–776.
- Morrissey, M., and Takehara-Nishiuchi, K. (2014). Diversity of mnemonic function within the entorhinal cortex: A meta-analysis of rodent behavioral studies. *Neurobiology of Learning and Memory* 115, 95–107.
- Moser, M., Rowland, D., and Moser, E. (2015). Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7, doi: 10.1101/cshperspect.a021808.
- Mouly, A.-M., and Di Scala, G. (2006). Entorhinal cortex stimulation modulates amygdala and piriform cortex responses to olfactory bulb inputs in the rat. *Neuroscience* 137, 1131–1141.
- Mouly, A., Fort, A., Ben-Boutayab, N., and Gervais, R. (2001). Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. *Neuroscience* 102, 11–21.
- Mumby, D., Kornecook, T., Wood, E., and Pinel, J. (1995). The role of experimenter-odor cues in the performance of object memory tasks by rats. *Animal Learning & Behavior* 23, 447–453.
- Murray, E., and Richmond, B. (2001). Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 188–193.
- Naber, P., Lopes da Silva, F., and Witter, M. (2001). Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus* 11, 99–104.

- Newman, E., Gillet, S., Climer, J., and Hasselmo, M. (2013). Cholinergic blockade reduces theta-gamma phase amplitude coupling and speed modulation of theta frequency consistent with behavioral effects on encoding. *The Journal of Neuroscience* 33, 19635–19646.
- Newmark, R., Schon, K., Ross, R., and Stern, C. (2013). Contributions of the hippocampal subfields and entorhinal cortex to disambiguation during working memory. *Hippocampus* 23, 467–475.
- O'Keefe, D., and Dobrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research* 34, 171–175.
- Otto, T., and Eichenbaum, H. (1992). Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task. *Behavioral Neuroscience* 106, 762–775.
- Otto, T., Schottler, F., Staubli, U., Eichenbaum, H., and Lynch, G. (1991). Hippocampus and olfactory discrimination learning- Effects of Entorhinal Cortex lesions on olfactory learning and memory in a successive-cue, Go-No-Go Task. *Behavioral Neuroscience* 105, 111–119.
- Packard, M., and McGaugh, J. (1996). Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 65, 65–72.
- Paxinos, G., Watson, C.R. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th edition. New York : Academic Press, Spiral Bound.
- Pereira, A., Ribeiro, S., Wiest, M., Moore, L., Pantoja, J., Lin, S.-C., and Nicolelis, M. (2007). Processing of tactile information by the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18286–18291.
- Petersen, C. (2008). The functional organization of the barrel cortex. *Neuron Review* 56, 339–355.
- Philips, R., and LeDoux, J. (1992). Differential contribution of amygdale and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience* 106, 274–285.
- Pickens, C., and Holland, P. (2004). Conditioning and Cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28, 651–661.
- Pierret, T., Lavallée, P., and Deschênes, M. (2000). Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *The Journal of Neuroscience* 20, 7455–7462.
- Pignatelli, M., Beyeler, A., and Leinekugel, X. (2012). Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. *Journal of Physiology* 106, 81–92.
- Piri, M., Rostampour, M., Nasehi, M., and Zarrindast, M. (2013). Blockade of the dorsal hippocampal dopamine D1 receptors inhibits the scopolamine-induced state-dependent learning in rat. *Neuroscience* 252, 460–467.
- Power, A., Vazdarjanova, A., and McGaugh, J. (2003). Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory* 80, 178–193.
- Prigg, T., Goldreich, D., Carvell, G., and Simons, D. (2002). Texture discrimination and unit recordings in the rat whisker-barrel system. *Physiology & Behavior* 77, 671–675.
- Prusky, G., Harker, K., Douglas, R., and Whishaw, I. (2002). Variation in visual acuity within, and between pigmented and albino rat strains. *Behavioural Brain Research* 136, 339–348.
- Ragozzino, M., and Rozman, S. (2007). The effect of rat anterior cingulate inactivation on cognitive flexibility. *Behavioral Neuroscience* 121, 698–706.
- Raij, T., Ahveninen, J., Lin, F.-H., Witzel, T., Jääskeläinen, I., Letham, B., Israeli, E., Sahyoun, C., Vasios, C., Stufflebeam, S., Hämäläinen, M., and Belliveau, J. (2010). Onset timing of cross-sensory activation and multisensory interactions in auditory and visual sensory cortices. *European Journal of Neuroscience* 31, 1772–1782.
- Ramón y Cajal, M.D.L. (1905). *Régénérescence des nerfs et critiques de la théorie de l'autorégénération des nerfs*. *Compte rendu de la Société de Biologie, Paris*.
- Ramus, S., and Eichenbaum, H. (2003). Neural correlates of olfactory recognition memory in the rat orbitofrontal cortex. *The Journal of Neuroscience* 20, 8199–8208.
- Ranade, S., Hangya, B., and Kepecs, A. (2013). Multiple modes of phase locking between sniffing and whisking during active exploration. *The Journal of Neuroscience* 33, 8250–8256.
- Rangel, L., Rueckermann, J., Riviere, P., Keefe, K., Porter, B., Heimbuch, I., Budlong, C., and Eichenbaum, H. (2016). Rhythmic coordination of hippocampal neurons during associative memory processing. *eLIFE* 5, doi: 10.7554/eLife.09849.

- Ravassard, P., Kees, A., Willers, B., David, H., Aharoni, D., Cushman, J., Aghajan, Z., and Mehta, M. (2013). Multisensory control of hippocampal spatiotemporal selectivity. *Science* *340*, 1342–1346.
- Ravel, N., Vigouroux, M., Elaagouby, A., and Gervais, R. (1992). Scopolamine impairs delayed matching in an olfactory task in rats. *Psychopharmacology* *109*, 439–443.
- Ravel, N., Elaagouby, A., and Gervais, R. (1994). Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behavioral Neuroscience* *108*, 317–324.
- Ravel, N., Chabaud, P., Martin, C., Gaveau, V., Hugues, E., Tallon-Baudry, C., Bertrand, O., and Gervais, R. (2003). Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60-90Hz) and beta (15-40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience* *17*, 350–358.
- Reid, J., Jacklin, D., and Winters, B. (2012). Crossmodal object recognition in rats with and without multimodal object pre-exposure - No effect of hippocampal lesions. *Neurobiology of Learning and Memory* *98*, 311–319.
- Roesch, M., Stalnaker, T., and Schoenbaum, G. (2006). Associative encoding in anterior piriform cortex versus orbitofrontal cortex during odor discrimination and reversal learning. *Cerebral Cortex* *17*, 643–652.
- Rolls, E. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. *Frontiers in Systems Neuroscience* *7*, 1–21.
- Rolls, E., Everitt, B., and Roberts, A. (1996). The orbitofrontal cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society* *351*, 1433–1444.
- Rondi-Reig, L., Libbey, M., Eichenbaum, H., and Tonegawa, S. (2001). CA1-specific N-methyl-D-aspartate receptor knockout mice are deficient in solving a nonspatial transverse patterning task. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 3543–3548.
- Roohbakhsh, A., Shamsizadeh, A., Kazemi-Rababadi, M., Ayoobi, F., Fatemi, I., Allahtavakoli, M., and Mohammad-Zadeh, M. (2016). Tactile learning in rodents, *Neurobiology and neuropharmacology*. *Life Sciences* *147*, 1–8.
- Rudy, J., and Sutherland, R. (1995). Configural association theory and the hippocampal formation, an appraisal and reconfiguration. *Hippocampus* *5*, 375–389.
- Ruivo, L., and Mellor, J. (2013). Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* *5*, 1–15.
- Sakimoto, Y., and Sakata, S. (2016). Change in hippocampal theta activity with overlapping elements. *Behavioural Brain Research* *282*, 111–116.
- Sakimoto, Y., Hattori, M., Takeda, K., Okada, K., and Sakata, S. (2013). Hippocampal theta wave activity during configural and non-configural tasks in rats. *Experience Brain Research* *225*, 177–185.
- Samu, D., Eros, P., Ujfalussy, B., and Kiss, T. (2009). Robust path integration in the entorhinal grid cell system with hippocampal feed-back. *Biological Cybernetics* *101*, 19–34.
- Sanderson, D., Pearce, J., Kyd, R., and Aggleton, J. (2006). The importance of the rat hippocampus for learning the structure of visual arrays. *European Journal of Neuroscience* *24*, 1781–1788.
- Santiago, A., and Shammah-Lagnado, S. (2004). Efferent connections of the nucleus of the lateral olfactory tract in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* *471*, 314–332.
- Sara, S., Roullet, P., and Przybylski, J. (1999). Consolidation of memory for odor-reward association, beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learning & Memory* *6*, 88–96.
- Sarter, M., Hasselmo, M., Bruno, J., and Givens, B. (2005). Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs- interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Research Reviews* *48*, 98–111.
- Saucier, D., and Cain, D. (1995). Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature* *378*, 186–189.
- Schenberg, E., Kramer Soares, J., and Menezes Oliveira, M. (2005). Effects of pre- or post-training entorhinal cortex AP5 injection on fear conditioning. *Physiology & Behavior* *86*, 508–515.
- Schoenbaum, G., Setlow, B., Nugent, S., Saddoris, M., and Gallagher, M. (2003). Orbitofrontal lesions in rats impair reversal but not acquisition of go, no-go discriminations. *Learning & Memory* *10*, 129–140.
- Schroeder, C., and Foxe, J. (2005). Multisensory contributions to low-level, “unisensory” processing. *Current Opinion in Neurobiology* *15*, 454–458.

- Schultz, H., Sommer, T., and Peters, J. (2012). Direct evidence for domain-sensitive functional subregions in human entorhinal cortex. *The Journal of Neuroscience* 31, 4716–4723.
- Schwerdtfeger, W., Buhl, E., and Germroth, P. (1990). Disynaptic olfactory input to the hippocampus mediated by stellate cells in the entorhinal cortex. *The Journal of Comparative Neurology* 292, 163–177.
- Scoville, W., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 20, 11–21.
- Slotnick, B. (2001). Animal cognition and the rat olfactory system. *TRENDS in Cognitive Science* 5, 216–222.
- Slotnick, B., and Risser, J. (1990). Odor memory and odor learning in rats with lesions of the lateral olfactory tract and mediodorsal thalamic nucleus. *Brain Research* 529, 23–29.
- Sohal, V., and Hasselmo, M. (1998). GABA(B) modulation improves sequence disambiguation in computational models of hippocampal region CA3. *Hippocampus* 8, 171–193.
- Squire, L., and Zola-Morgan, B. (1991). Memory, Brain and Hippocampus. *The Cognitive Neuroscience* 825–837.
- Sreenivasan, V., Karmakar, K., Rihli, F., and Petersen, C. (2015). Parallel pathways for whisker movements mice. *European Journal of Neuroscience* 41, 354–367.
- Staubli, U., Ivy, G., and Lynch, G. (1984). Hippocampal denervation causes rapid forgetting of olfactory information in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 5885–5887.
- von Stein, A., Rappelsberger, P., Sarnthein, J., and Persche, H. (1999). Synchronization between temporal and parietal cortex during multimodal object processing in man. *Cerebral Cortex* 9, 137–150.
- Stevens, C. (1998). A million dollar question does LTP = Memory. *Neuron* 20, 1–2.
- Steward, O. (1976). Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 167, 285–314.
- van Strien, N., Cappaert, N., and Witter MP (2009). The anatomy of memory, an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 272–284.
- Suh, J., Rivest, A., Nakashiba, T., Tominaga, T., and Tonegawa, S. (2011). Entorhinal cortex layer III input to the hippocampus is crucial for temporal association memory. *Science* 334, 1415–1420.
- Sutherland, R., and McDonald, R. (1990). Hippocampus, amygdala, and memory deficits in rats. *Behavioural Brain Research* 37, 57–79.
- Sutherland, R., and Rudy, J. (1989). Configural association theory- The role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. *Psychobiology* 17, 129–144.
- Suzuki, W., and Eichenbaum, H. (2000). The neurophysiology of memory. *Annals of the New-York Academy of Sciences* 911, 175–191.
- Swanson, L., and Köhler, C. (1986). Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *The Journal of Neuroscience* 6, 3010–3023.
- Tahvildari, B., Fransen, E., Alonso, A., and Hasselmo, M. (2007). Switching between on and off states of persistent activity in lateral entorhinal layer III neurons. *Hippocampus* 17, 257–263.
- Takehara-Nishiuchi, K., Maal-Bared, G., and Morrissey, M. (2012) Increased Entorhinal-Prefrontal Thêta Synchronization Parallels Decreased Entorhinal-Hippocampal Thêta Synchronization during Learning and Consolidation of Associative Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5, 1–13.
- Tanninen, S., Yu, X., Giritharan, T., Tran, L., Bakir, R., Volle, J., Morrissey, M., and Takehara-Nishiuchi, K. (2015). Cholinergic, but not NMDA, receptors in the lateral entorhinal cortex mediates acquisition in trace eye conditioning. *Hippocampus* 25, 1456–1464.
- Tronel, S., and Sara, S. (2002). Mapping of olfactory memory circuit- region-specific c-Fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learning & Memory* 9, 105–111.
- Uchida, N., and Mainen, Z. (2003). Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nature Neuroscience* 6, 1224–1229.
- Uwano, T., Nishijo, H., Ono, T. and Tamura, R. (1995). Neuronal responsiveness to various sensory stimuli and associative learning in the rat amygdala. *Neuroscience* 68, 339–361.
- Van Cauter, T., Camon, J., Alvernhe, A., Elduayen, C., Sargolini, F., and Save, E. (2013). Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition. *Cerebral Cortex* 23, 451–549.

- Van der Jeugd, A., Goddyn, H., Laeremans, A., Arckens, L., D'Hooge, R., and Verguts, T (2009). Hippocampal involvement in the acquisition of relational associations, but not in the expression of a transitive inference task in mice. *Behavioral Neuroscience* 123, 109–114.
- Van Elzakker, M., O'Reilly, R., and Rudy, J. (2003). Transitivity, flexibility, conjunctive representations, and the hippocampus. I. An empirical analysis. *Hippocampus* 13, 292–298.
- Varga, A., and Wesson, D. (2012). Distributed auditory sensory input within the mouse olfactory cortex. *European Journal of Neuroscience* 37, 564–571.
- Veyrac, A., Allernborn, M., Gros, A., Michon, F., Raguét, L., Kenney, J., Godinot, F., Thevenet, M., Garcia, S., Messaoudi, B., Laroche, S., and Ravel, N. (2015). Memory of occasional events in rats- Individual episodic memory profiles, flexibility and neural substrate. *The Journal of Neuroscience* 35, 7575–7586.
- Wallenstein, G., Eichenbaum, H., and Hasselmo, M. (1998). The hippocampus as an associator of discontinuous events. *TRENDS in Neuroscience* 21, 317–323.
- Wang, D., Zhao, J., Gao, Z., Chen, N., Wen, B., Lu, W., Lei, Z., Chen, C., Liu, Y., Feng, J., and Wang, J-H. (2015). Neurons in the barrel cortex turn into processing whisker and odor signals a cellular mechanism for the storage and retrieval of associative signals. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9, 1–17.
- Wang, H., Hu, Y., and Tsien, J. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Progress in Neurobiology* 79, 123–135.
- Wang, S.-H., Finnie, P., Hardt, O., and Nader, K. (2012). Dorsal hippocampus is necessary for novel learning but sufficient for subsequent similar learning. *Hippocampus* 22, 2157–2170.
- Weeden, C., Hu, N., Ho, L., and Kesner, R. (2014). Role of ventral DG in olfactory pattern separation. *Hippocampus* 24, 553–559.
- Wesson, D., and Wilson, D. (2011). Sniffing out the contribution of the olfactory tubercle. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35, 655–668.
- Whishaw, I., and Tomie, J.-A. (1991). Acquisition and retention by hippocampal rats of simple, conditional, and configural tasks using tactile and olfactory cues implications for hippocampal function. *Behavioral Neuroscience* 105, 787–797.
- Whishaw, I., Tomie, J., and Kolb, B. (1992). Ventrolateral prefrontal cortex lesions in rats impair the acquisition and retention of a tactile-olfactory configural task. *Behavioral Neuroscience* 106, 597–603.
- Wilson, D., and Sullivan, R. (2011). Cortical processing of odor objects. *Neuron Review* 72, 506–519.
- Wilson, D., Langston, R., Schlesiger, M., Wagner, M., Watanabe, S., and Ainge, J. (2013a). Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus* 23, 352–366.
- Wilson, D., Watanabe, S., Milner, H., and Ainge, J. (2013b). Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus* 23, 1280–1290.
- Winters, B., and Reid, J. (2010). A distributed cortical representation underlies crossmodal object recognition in rats. *The Journal of Neuroscience* 30, 6253–6261.
- Wirth, S., Ferry, B., and Di Scala, G. (1998). Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behavioural Brain Research* 91, 49–59.
- Wise, R. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 1–13.
- Witter, M. (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system, a review of current anatomical data. *Hippocampus* 3, 33–44.
- Wolak, D., and Thorne, R. (2013). Diffusion of macromolecules in the brain, implications for drug delivery. *Molecular Pharmaceutics* 10, 1492–1504.
- Wood, E., Dudchenko, P., and Eichenbaum, H. (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity. *Nature* 397, 613–616.
- Xu, W., and Wilson, D. (2012). Odor-evoked activity in the mouse lateral entorhinal cortex. *Neuroscience* 223, 12–20.
- Yamamoto, J., Suh, J., Takeuchi, D., and Tonegawa, S. (2014). Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. *Cell* 157, 845–857.
- Ye, B., Huang, L., Gao, Z., Chen, P., Ni, H., Guan, S., Zhu, Y., and Wang, J.-H. (2012). The functional upregulation of piriform cortex is associated with cross-modal plasticity in loss of whisker tactile inputs. *PLoS ONE* 7, e41986.

- Yee, B., and Rawlins, J. (1998). A comparison between the effects of medial septal lesions and entorhinal cortex lesions on performance of nonspatial working memory tasks and reversal learning. *Behavioural Brain Research* 94, 281–300.
- Young, B., Fox, G., and Eichenbaum, H. (1994). Correlates of hippocampal complex-spike cell activity in rats performing a nonspatial radial maze task. *The Journal of Neuroscience* 14, 6553–6563.
- Yun, S., Cheong, M., Mook-Jung, I., Lee, C.-J., and Jung, M. (2000a). Cholinergic modulation of synaptic transmission and plasticity in entorhinal cortex and hippocampus of the rat. *Neuroscience* 97, 671–676.
- Yun, S., Huh, K., and Jung, M. (2000b). Selective enhancement of non-NMDA receptor-mediated responses following induction of long-term potentiation in entorhinal cortex. *SYNAPSE* 35, 1–7.
- Zador, Z., Magzoub, M., Songwan, J., Manley, G., Papadopoulos, M., and Verkman, A. (2008). Microfiber optic fluorescence photo bleaching reveals size-dependent macromolecule diffusion in extracellular space deep in brain. *The FASEB Journal* 22, 870–879.
- Zhang, G., Gao, Z., Guan, S., Zhu, Y., and Wang, J.-H. (2013). Upregulation of excitatory neurons and downregulation of inhibitory neurons in barrel cortex are associated with loss of whisker inputs. *Molecular Brain* 6, doi: 10.1186/1756-6606-6-2.
- Zhang, H., Lin, S.-C., and Nicolelis, M. (2010). Spatiotemporal coupling between hippocampal acetylcholine release and theta oscillations in vivo. *The Journal of Neuroscience* 30, 13440–13431.

ARTICLES

ARTICLE 1

Boisselier, L., Ferry, B., Gervais, R. (2014).
Involvement of the lateral entorhinal cortex for the formation
of cross-modal olfactory-tactile associations in the rat.
Hippocampus 24, 877-891.

Involvement of the Lateral Entorhinal Cortex for the Formation of Cross-Modal Olfactory-Tactile Associations in the Rat

Lise Boisselier, Barbara Ferry, and Rémi Gervais*

ABSTRACT: While the olfactory and tactile vibrissal systems have been extensively studied in the rat, the neural basis of these cross-modal associations is still elusive. Here we tested the hypothesis that the lateral entorhinal cortex (LEC) could be particularly involved. In order to tackle this question, we have developed a new behavioral paradigm which consists in finding one baited cup (+) among three, each of the cups presenting a different and specific odor/texture (OT) combination. During the acquisition of a first task (Task OT1), the three cups were associated with the following OT combination: O1T1 for the baited cup; O2T1 and O1T2 for non-baited ones. Most rats learn this task within three training sessions (20 trials/session). In a second task (Task OT2) animals had to pair another OT combination with the reward using a new set of stimuli (O3T3+, O4T3, and O3T4). Results showed that rats manage to learn Task OT2 within one session only. In a third task (Task OT3) animals had to learn another OT combination based on previously learned items (e.g. O4T4+, O1T4 and O4T1). This task is called the “recombination task.” Results showed that control rats solve the recombination task within one session. Animals bilaterally implanted with cannulae in the LEC were microinfused with d-APV (3 µg/0.6 µL) just before the acquisition or the test session of each task. The results showed that NMDA receptor blockade in LEC did not affect recall of Task OT1 but strongly impaired acquisition of both Task OT2 and OT3. Moreover, two control groups of animals infused with d-APV showed no deficit in the acquisition of unimodal olfactory and tactile tasks. Taken together, these data show that the NMDA system in the LEC is involved in the acquisition of association between an olfactory and a tactile stimulus during cross-modal learning task. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: olfacto-tactile task; lateral entorhinal cortex; NMDA; cross-modal; rat

INTRODUCTION

Organisms use several sensory modalities (vision, audition, olfaction...) to code the different stimuli of their environment. In order to create a coherent perception of a given object, information sent to different sen-

sory channels has to merge in several brain areas such as parahippocampal and hippocampal structures. This cognitive function is called cross-modal integration (Mesulam, 1998; Calvert, 2001) and is mobilized in various situations such as object recognition, context recognition, or spatial navigation. As a component of the medial temporal lobe system the lateral entorhinal cortex (LEC) in association with the perirhinal cortex play an important role in object recognition. More specifically, the LEC is suspected to play a key role during acquisition and recall of sensory characteristics of encountered objects taking into account the familiarity of items (Eichenbaum et al., 2007). An important feature of cross-modal integration is flexibility of the representations. Indeed, the same item can be associated with different objects. For example, the same red color can be an attribute to some apple and some clothe. The role of the LEC in acquisition, recall and flexibility of multisensory representations is still a matter of debate. The present study was designed to test these questions using a novel behavioral task based on cross-modal olfacto-tactile association.

In presence of an object, rats present active sniffing (Slotnick, 2001) and active whiskers movements (Diamond et al., 2008) providing cross-modal cues, which are likely to contribute to object discrimination in natural conditions. Taken separately, olfactory and tactile stimuli have been shown to be easily discriminated and associated with an unconditional stimulus in various types of learning paradigms (Guić-Robles et al., 1989; Carvell and Simons, 1990; Slotnick, 2001; Ravel et al., 2003; Diamond et al., 2008). In contrast, olfactory-tactile (OT) associations have rarely been used to evidence the brain structures involved in the circuit of associative learning and memory.

For example, Whishaw and Tomie (1991, 1992) have used a particular OT task in which animals had to pull down an odorant string of a particular length in order to obtain a reward. In this paradigm, authors have shown that a large lesion of ventrolateral prefrontal cortex and the hippocampus induced impairment in the acquisition and retention of this cross-modal associative learning task. However, this task, involving tactile detection of the string by the animal's paws, was difficult to achieve and authors reported a training duration of several weeks.

More recently, Botly and De Rosa (2007) have used another type of learning where the animal had to distinguish different OT associations represented by

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Team Olfaction: From Coding to Memory, UMR CNRS 5292INSERM U 1028, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France

Grant sponsor: LABEX CORTEX of Université de Lyon; Grant number: ANR-11-LABX-0042; Grant sponsor: “Investissements d’Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR); Grant number: ANR-11-IDEX-0007.

*Correspondence to: Rémi Gervais, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, 50 avenue Tony Garnier, 69366 Lyon, France.

E-mail: rgervais@olfac.univ-lyon1.fr

Accepted for publication 1 April 2014.

DOI 10.1002/hipo.22277

Published online 14 May 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

digging bowls covered in a particular texture and scented with a particular odor. With this paradigm, the authors have shown that blockade of muscarinic transmission with systemic injection of scopolamine selectively impaired configurational discrimination of this task.

Taken together, these studies have provided little data on the structures involved in the circuit of cross-modal associative learning and memory.

Although olfactory and vibrissal information play a key role in object exploration and recognition in rats, no obvious anatomical point of convergence for these two modalities has been identified so far. Olfactory information travels through the olfactory nerve to the olfactory bulb and then to the piriform cortex, to the LEC and to the cortical amygdala (Santiago and Shammah-Lagnado, 2004). Tactile information originating from the vibrissae mechanoreceptors goes by the trigeminal nerve through the brain stem, the posterior part of median ventral thalamus and then the primary somatosensory barrel cortex (S1) (Brecht et al., 1996; Diamond et al., 2008) which projects on many structures such as secondary somatosensory cortex (S2) and then hippocampus (Pereira et al., 2007). Direct but weak projections from the LEC to the barrel cortex have been identified (Swanson and Kohler, 1986; Insausti, 1997) but direct projections from the barrel cortex to the LEC remain to be identified. However, S1 and S2 areas send projections to the perirhinal cortex, which establishes strong links with LEC (Burwell, 2000).

Interestingly, some studies have shown that the LEC is not critical for olfactory discrimination but plays an important role in olfactory learning (Staubli et al., 1984; Otto et al., 1991; Wirth et al., 1998; Ferry et al., 1996, 1999, 2006). In a recent study, LEC has also been found to be involved in object-context associative recognition (Wilson et al., 2013). However, to our knowledge there is no data on the role of LEC in tactile discrimination.

The present study is aimed at testing the role of the LEC in the formation of cross-modal associations. In the hypothesis that olfactory and tactile information converge on LEC neurons and induce synaptic plasticity that is important for this associative process, we tested the effect of NMDA receptor blockade in the LEC in this cross-modal association. To do this, the effect of bilateral d-APV injections into the LEC during acquisition, recall and recombination of OT tasks has been tested. In additional control experiments, the effects of d-APV infusions into the LEC were also measured in rats performing similar but unimodal olfactory or tactile tasks. The fact that the task uses both familiar and unfamiliar items and requires discrimination between objects having overlapping sensory characteristics allowed to test the functional importance of the LEC.

METHODS

Animals

Young adult male Wistar rats ($n = 54$, Charles River, France) weighing 250 to 300 g were used. Experimental groups were

constituted as follows: 20 animals were used for the OT tasks and 34 animals for the unimodal olfactory or tactile tasks. Animals were housed in a standard home cage (380 mm long \times 380 mm wide \times 160 mm high, $21 \pm 1.5^\circ\text{C}$ and $55 \pm 10\%$ wet) in groups of four or five and were maintained on a 12-12 hour inverted light-dark. After habituation to the housing condition, animals were food deprived to 90% of their free-feeding weight with free access to water. Testing took place during the dark phase of the cycle between 9AM and 2PM. Experiments were conducted in accordance to European Guidelines and in accordance with the local Animal Ethic Committee (n° 69000675 and n° A 69387 0202).

Apparatus

The experimental cage consisted of a gray polyvinyl chloride (PVC) rectangular box (500 mm long \times 500 mm wide \times 400 mm high). A removable door (500 mm long \times 400 mm high) allowed the experimenter to divide the cage into two compartments: the main one in which three cups were placed and the small one as the starting compartment (Fig. 1a). In order to minimize any visual discrimination, the room was lit by a red light. Cups consisted of PVC cylinders 90 mm high with an outer diameter of 60 mm. Each cup was filled with molten steel and paraffin used as ballast so that the cup would not tip when the rat explore it. A grid was placed at the bottom of the cup, just above the paraffin. A small piece of food pellet (Kellogg's Special K®) was placed under the grid of two cups (so that the animals could not reach it) and above the grid of the remaining cup (Fig. 1b). The cups were filled with clean litter. With these procedures, olfactory cues from food emanating from the three cups were similar and animals could reach the food in one cup only, named the baited cup. The cage was equipped with a video system allowing post experiment behavioral analysis.

Learning Tasks

Generalities

The task was based on the rats' natural digging abilities to find food in its environment, to be attracted by novelty and to explore new environments spontaneously (Dusek and Eichenbaum, 1997). In our task, animals were encouraged to dig cups filled with litter in order to find the hidden food reward accessible in only one of them, basing their choice on particular sensory cues controlled by the experimenter. These cues were either represented by an odor, a texture or an odor-texture combination on each cup.

For the bimodal task, each cup was characterized by a specific combination of an olfactory and a tactile cue. Olfactory stimulus was represented by 150 μl of an odorant solution (obtained by diluting a pure solution in mineral oil at 1/10) dropped on a filter paper placed under the grid of each cup. Six different odorant stimuli were used (Table 1): anethol (Fluka), limonene (-) (Fluka), geraniol (Aldrich), peppermint (Aldrich), eugenol (Fluka) and carvone (-) (Fluka). The

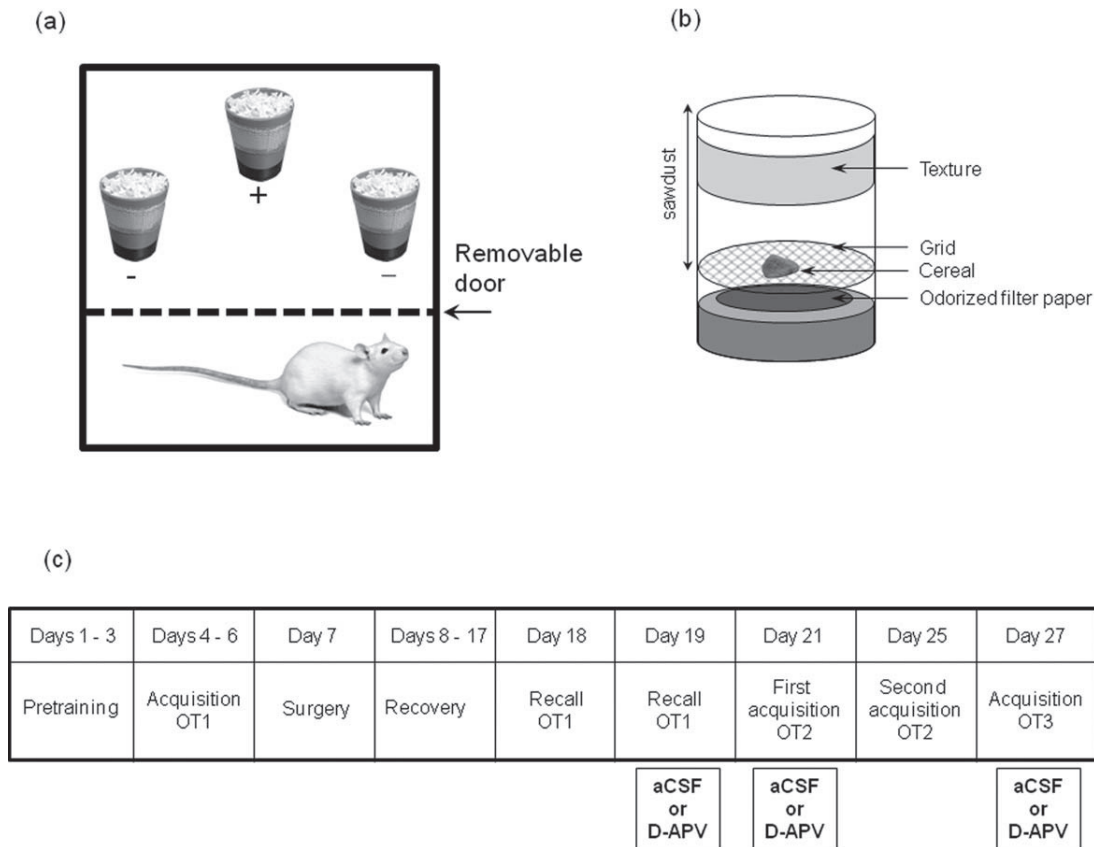


FIGURE 1. Experimental set up and protocol. (a) Schematic representation of the experimental cage. On each trial, the position of the three cups containing olfactory-tactile (OT) cues was determined in a pseudorandom manner. Sign + indicates the baited cup presenting the correct OT combination; sign - indicates the non baited cups presenting the incorrect OT combinations. (b) Schematic representation of the olfactory and tactile stimuli presented in the cup: the tactile cue surrounding the exter-

nal border and the olfactory cue located inside the cup. The piece of cereal is present in each cup: above the grid in the cup presenting the correct OT combination and under the grid (non accessible) in the two cups presenting the wrong OT combination. (c) Different phases and duration of the experimental protocol. An animal injected with d-APV for a given test was injected with aCSF for the next one at least 48 h later and vice versa.

amount of solution dropped was chosen to be perceived as equal and at a moderate concentration by two experimenters. The tactile stimuli were represented by 2 cm wide bands of different textures but of the same color placed around each cup, 1 cm away from the upper border (Fig. 1b). Six different textures were used (Table 1): sandpaper with three different grit sizes (smooth, thin, rough) and bands of grid with three different wire nettings (flexible, tight, broad).

For the unimodal olfactory task, each of the three cups contained a different odorant and only one was baited (containing the accessible reinforcement). For the unimodal tactile task, each of the three cups was wrapped with a different texture and only one was baited (containing the accessible reinforcement).

Protocol

The main steps of the protocol are summarized in Figure 1c.

Pretraining

Pretraining took place over three consecutive days. The first 2 days, one cup was introduced in the experimental cage. A few food pellets were placed on the floor of the cage and gradually buried over the trials in the litter to encourage the foraging behavior. Rats were free to explore the cage and eat the reinforcement for up to 2 min and one food pellet per trial. On the third day, two cups were used, one of which contained the food pellet. After a few trials, a third cup was introduced and only one was baited. Each digging behavior is followed by a new trial so the animal learns that only one cup is baited. In this phase, the cups were devoted to olfactory and tactile cues.

Discrimination tasks

Bimodal olfactory-tactile (OT) task: on the fourth day, the olfactory and tactile cues are introduced so the animal has to

TABLE 1.

List of items used for the tasks. (a) Sets of olfactory-tactile (OT) combinations used for OT1, OT2 and OT3 tasks. For each animal, three different sets were used. From OT1 to OT2 other items (randomly chosen in sets A and B) were used so the OT combinations were totally new. For Task OT3, familiar items used in the two previous tasks (randomly chosen in set C and D) were recombined to form OT combinations. (b) Set of olfactory (O) stimuli used for the unimodal olfactory task (Set E). The baited stimulus was counter-balanced between animals. (c) Set of tactile (T) stimuli used for the unimodal tactile task (Set F). The baited stimulus was counter-balanced between animals

	Odor	Texture
(a) Set A	Anethol	Smooth sandpaper
	Limonene	Smooth sandpaper
(a) Set B	Anethol	Flexible grid
	Geraniol	Tight grid
	Peppermint	Tight grid
(a) Set C	Geraniol	Rough sandpaper
	Peppermint	Rough sandpaper
	Anethol	Rough sandpaper
(a) Set D	Peppermint	Smooth sandpaper
	Limonene	Flexible grid
	Geraniol	Flexible grid
(b) Set E	Limonene	Tight grid
	Peppermint	
	Carvone	
(c) Set F	Eugenol	
	Tight grid	
	Smooth sandpaper	
	Broad grid	

learn to associate one out of three specific olfactory-tactile combinations to the reinforcement (Table 1; a). For a given animal and a given task, the same set of stimuli and the same baited cup were used over trials.

In these experimental conditions each rat had to solve successively three different tasks (Fig. 1c). Task OT1 and OT2 allowed for the animal to associate one particular olfactory-tactile combination with the reinforcement. Each task used a different set of OT combinations (Table 1; a, set A and B), the choice of the sets being counter-balanced between tasks. In Task OT3 (recombination task), items previously used in Task OT1 and OT2 were recombined to form new OT associations. This was done to test the flexibility of previously learned associations. For Task OT3, two sets of OT recombination were used (Table 1; a, set C and D). Half of the animals were exposed to set C and the other half to set D.

Unimodal olfactory and tactile tasks: animals had to learn to associate one out of three different olfactory or tactile stimuli to the reinforcement (Table 1; b and c). The reinforced stimulus was counter-balanced between animals.

Each daily training session included 20 trials and lasted for about 20 min. On each trial the three cups were placed on an equilateral triangle at the opposite end of the door. To avoid

any spatial recognition of the cups, position of each cup was pseudo-randomly changed across trials, so that each cup took up one out of the three positions with the same frequency throughout one session. Opening the removable door marked trial onset. The trial ended as soon as the rat dug in one cup or after 120 sec when animals made no choice. Then the rat was gently brought back behind the door and locked.

For each trial, three variables were recorded: the cup that was firstly approached (first approach); the cup that was dug in (correct or incorrect) and the response latency (in sec) corresponding to the time elapsed between the beginning of the trial and the rat's choice. For the first task, the learning criterion was reached when at least nine of 10 consecutive trials were correct.

Surgery

All surgical procedures were conducted by authorized personnel under optimal aseptic, analgesic and ethical animal care conditions (Ferry et al., 2014). Animals were anaesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection (0.2 ml/100g) of a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and fixed in a stereotaxic frame in the flat skull position. A stainless steel guide cannula (23 gauge, 12 mm long; CMA/12, CMA) was placed 2 mm above the LEC at the following coordinates: anteroposterior -6.5 mm relative to bregma, medio-lateral ± 5.5 mm from midline, dorsoventral -7.5 mm from skull surface according to the Paxinos and Watson atlas (2013). The cannulae were fixed to the skull with dental acrylic cement and anchored with two surgical screws placed in the skull. Stylets were inserted into the guide cannulae to prevent blockage during the postsurgical recovery period. The animals were allowed 10 days of postsurgical recovery during which they were regularly handled.

Microinfusions

Infusions took place on Days 19, 21, and 27 (Fig. 1c). Implanted animals received bilateral microinfusions as follows: while gently handled, injection needles (30 gauge) were inserted to a depth of 2 mm beyond the tips of the guide cannula and connected via polyethylene tubing to a 10 μ l Hamilton syringe driven by an automated syringe pump (Harvard PHD 2000). Injection of 3 μ g of d-APV dissolved in 0.6 μ l sterile artificial cerebrospinal fluid (aCSF, Harvard Apparatus) was delivered over a period of 60 sec. The dose of d-APV has been chosen according to previous data showing that 3 μ g/0.6 μ l of d-APV in the LEC induced a deficit in fear conditioning (Schenberg et al., 2005). The injection needle was then left in place at the injection site for an additional 60 sec. After the end of the injection procedure, each animal was gently placed in the experimental cage and the trial started. The timing of injections is presented in Figure 1c. Repeated infusions in the same animal were separated by 48 h. A within-subject pharmacological design was used so that the same rats were used throughout all three tasks and each rat participated in each of the two drug conditions.

Control of experimental bias

On Day 18, animals performed an OT1 recall session without any infusion to ensure anesthesia and recovery postoperative period did not alter performances.

During learning sessions, some experimental biases that could explain how animals found the baited cup have been controlled. To minimize visual bias all three cups had the same visual characteristics and the experimental room was lit with red light. To minimize olfactory cues left by the rats or the experimenter on the outside of cups, all of them were regularly cleaned with alcohol 70°, the litter was changed every four trials and each cup was similarly manipulated between each trial. Also, all three cups contained a similar piece of cereal so the animals could not base their choice on the cereal. To test for the efficiency of this procedure, number of "probe trials" were run with well-trained rats during which no reward was present in the "baited cup"; when the rat dug in the correct cup, he would received the reward afterwards.

Histology

After completion of the last behavioral testing, each rat was given an overdose of sodium pentobarbital (100 mg/kg) and was transcardially perfused with 50 ml of 0.9% saline (w/v) solution (4°C) followed by 50 ml of phosphate-buffered 4% paraformaldehyde (pH 7.4; 4°C). The brain was then extracted, post fixed for 4 h in the same fixative (4°C) and transferred into a 0.1M phosphate-buffered 20% sucrose (w/v) solution for about 36 h (4°C) for cryoprotection. Coronal sections 20 µm thick were dried at room temperature and stained with cresyl violet, according to Klüver and Barrera (1953). A microscopic inspection was then performed to determine the location of the cannulae track placement.

Statistical Analysis

All analyses were performed with Systat 12.0®. Variables "Mean ratios of correct responses" and "Mean response latencies" were averaged in blocks of five successive trials (1, 2, 3, 4). Data for OT1 acquisition were analyzed with a two-way repeated-measures ANOVA with Day as the between-subjects factor and Block as the within-subjects factor, followed by one-way ANOVAs and post-hoc Bonferroni tests for pairwise intragroup comparisons. Data obtained in OT1 recall, OT2 and OT3 acquisition were analyzed with a two-way repeated-measures ANOVA with Drug as the between-subjects factor and Block as the within-subjects factor, followed by one-way ANOVAs and post-hoc Bonferroni tests for pairwise intragroup comparisons. Intergroup comparisons were obtained with independent *t*-tests. The "First approach" variable was analyzed with one-way ANOVA. Data obtained for the probe tests were compared to standard trials with independent *t*-tests. Variable "Mean ratios of errors" was compared with paired *t*-tests. A probability level of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Figure 2a represents the results obtained during the first day of OT1 training in animals that managed pretraining ($n = 18$). As shown by the figure, mean ratios of correct responses obtained throughout the trials suggested that the task was rapidly solved by all animals in one session of 20 trials. A detailed observation of the figure revealed that animals randomly chose one of the three OT combination during the first two trials and started to associate the correct OT combination with the reward from the third trial (67% of correct responses; $P < 0.05$ compared to the chance level with a *t*-test). From this point, performances increase regularly to reach 95% of correct responses at the end of this first session (20 trials). Figure 2b represents the mean latencies obtained during the first day of OT1 training in all animals. As shown by the figure, the response latencies decrease rapidly along the trials to reach an average of 20 sec from the third trial.

Observation of the videos during OT1 training revealed that animals explored randomly and extensively each of the cups during the first trials before digging. Therefore, the magnitude of the latencies measured during the first trials was high (average 80 sec). Then, performances improved rapidly throughout the trials and the response latencies decreased and stabilized around 20 sec after a few trials.

Figure 3a represents the mean performances calculated by blocks of five trials during the three successive days of OT1 training. As depicted, animals showed an increase of performances between the first and the last block of five trials in each of the three consecutive days of training and the animals reached the learning criterion (at least nine correct trials of 10 consecutive) after 35 ± 3 trials. A two-way ANOVA with repeated measures with factor Day (1, 2, 3) as between-subjects variable and factor Block (1, 2, 3, 4) as within-subjects variable revealed a significant effect of factor Day ($F_{(2,51)} = 31.94$, $P < 0.001$) and a significant effect of factor Block ($F_{(3,153)} = 15.03$, $P < 0.001$) but no significant effect of Day \times Block interaction ($F_{(6,153)} = 0.14$, P n.s). One-way ANOVA within-group comparisons confirmed this description and showed a significant effect of factor block in each training day ($F_{(3,68)} = 4.57$, $P < 0.01$; $F_{(3,68)} = 3.34$, $P < 0.05$; $F_{(3,68)} = 8.84$, $P < 0.001$, in day 1, 2, and 3, respectively).

Figure 3b represents the changes in mean response latencies calculated over the three days of training in all animals. As shown by the figure, the response latencies decrease between the first and the last block of five trials in each of the consecutive days of training. A two-way ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Day ($F_{(2,51)} = 5.51$, $P < 0.01$), a significant effect of factor Block ($F_{(3,153)} = 21.99$, $P < 0.001$) and a significant effect of Day \times Block interaction ($F_{(6,153)} = 2.44$, $P < 0.05$). One-way ANOVA within-group comparisons confirm this description and show a significant effect of factor Block in the first 2 days of training ($F_{(3,68)} = 12.23$, $P < 0.001$ and $F_{(3,68)} = 3.37$, $P < 0.05$, respectively) but no effect in Day 3 ($F_{(3,68)} = 2.68$, $P = 0.054$).

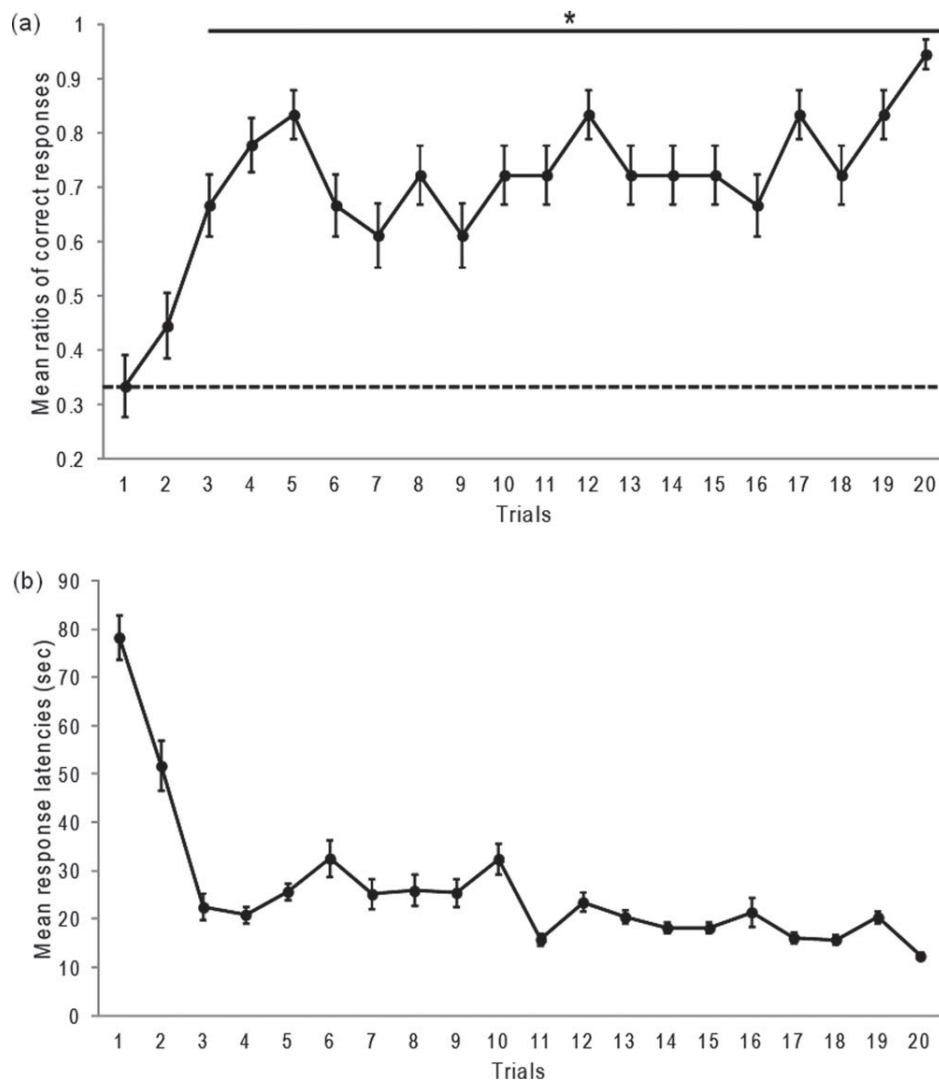


FIGURE 2. Performances obtained during the first olfacto-tactile (OT) training session (Task OT1). (a) Mean ratios of correct responses \pm SEM calculated over the 20 trials of the session. (b) Mean response latencies \pm SEM calculated over the 20 trials of the session. The dotted line represents the chance level (33%). * $P < 0.05$ compared to the chance level. $n = 18$.

Control of Possible Bias

Possible biases by which performances could have been reached by the animals were tested. First cup approaches were noted at each trial in order to detect a possible spontaneous preference or avoidance of a given odor and also distal detection of odorant stimuli. A one-way ANOVA on the first approach frequencies toward each cup did not reveal any significant difference between cups whatever the set of stimuli used ($F_{(2,412)} = 2.61$, P n.s.). Moreover, the average number of explored cups on each trial before the final choice throughout the trials was 2.06 ± 0.11 cups.

To check whether the correct responses result from the recognition of the scent each animal has left on the baited cup, performances were compared between standard trials ($n = 213$)

and punctual trials in which the sawdust of each cup was changed from one trial to the other ($n = 77$) on Day 3. Independent t -tests did not reveal any significant difference between the performances in these two conditions ($91.5 \pm 1.4\%$ and $90.9 \pm 1.4\%$ of correct responses, respectively, P n.s.) suggesting that the animals' choice was not influenced by the olfactory marking sawdust.

In order to check whether the correct OT response resulted from the detection of the food reward hidden in the baited cup, punctual probe trials ($n = 70$) were run with trained rats (on Day 3) in which the correct OT cup did not contain any reward. Performances were compared to standard trials ($n = 213$). Independent t -tests did not reveal any significant difference between the performances obtained between the

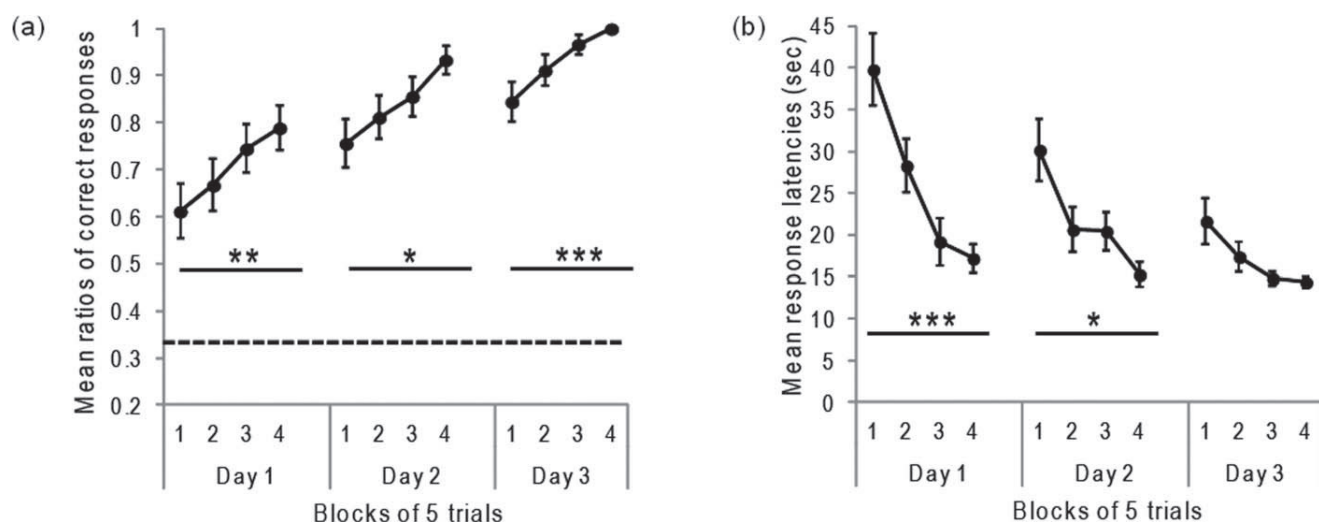


FIGURE 3. Performances obtained during the 3 days of training for Task OT1. (a) Mean ratios of correct responses \pm SEM calculated over the four blocks of five trials during each training day (Day 1 to Day 3). (b) Mean response latencies \pm SEM calculated

over the four blocks of five trials during each training day (Day 1 to Day 3). The dotted line represents the chance level (33%). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ between blocks of a given day. $n = 18$.

standard and probe trials ($91.5 \pm 1.4\%$ and $94.3 \pm 1.1\%$ of correct responses, respectively, P n.s). These data showed that the animals' choice was not based on the detection of the reward's odor.

Finally, visual observation of the videos by three different experimenters evidenced a typical behavior of olfactory and tactile sampling of each cups during the trials. In addition, each time a new set of stimuli was introduced, the animals' behavior changed drastically with response latencies increasing from around 15 sec to more than 40 sec in the first trials. Figure 4 represents the mean response latencies calculated for all animals

during the first and last blocks of five trials during each bimodal task (Tasks OT1, OT2, and OT3). As shown by the figure, the response latencies decreased from the first to the last block of trials in all tasks (from 40 sec to 18 sec for Task OT1 (Day 1), from 52 sec to 26 sec for task OT2 and from 38 sec to 12 sec for Task OT3). Paired t -tests performed on the mean response latencies confirmed this description and showed a significant difference between the first and the last blocks of five trials in the three tasks ($P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively).

Taken together, these data suggest that the OT combination chosen by the animals resulted from the association between the olfactory and tactile cues and the reward during each of the tasks. Analyses aimed at controlling possible biases have clearly demonstrated that in our protocol, animal based their choice specifically according to the OT combination of stimuli presented on each cup and not according to uncontrolled cues such as their own odor or the odor of the small food pellet hidden at the bottom of the cup.

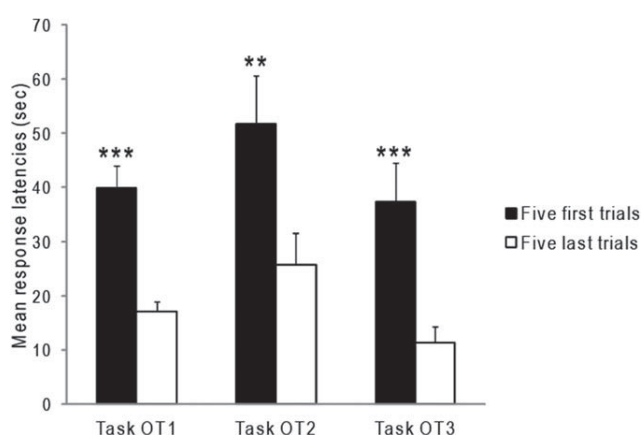


FIGURE 4. Comparison between mean response latencies obtained during the first and the last block of five consecutive trials in each of the three OT tasks. Black bars represent mean response latencies \pm SEM calculated for the five first trials; white bars represent mean response latencies \pm SEM calculated for the five last trials. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ between the two blocks. $n = 18$ for OT1 and $n = 17$ for OT2 and OT3.

Analysis of Errors

Figure 5 represents the principle of OT tasks and the corresponding mean number of errors calculated for all the animals. As indicated in Figure 5a, each OT combination of the two non-baited cups (B and C) contains one component of the OT reinforced combination. The analysis of the number of errors during Tasks OT1 and OT2 in Figure 5b reveals that animals made much more mistakes digging in the cup which is represented by odor 1 associated to the reinforcement in the correct OT combination (75.6% and 68.6% of errors, respectively in tasks OT1 and OT2) than digging in the cup represented by texture 1 reinforced in the correct OT combination (24.4%

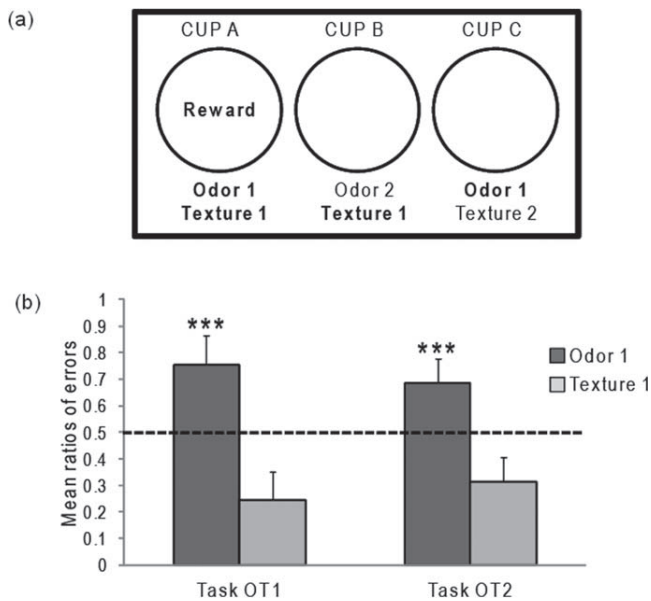


FIGURE 5. Distribution of errors among the two non-baited cups during Task OT1 and OT2. (a) Schematic representation of the OT combinations used for both OT tasks (items of the baited cup A in bold). Cup A represents the correct OT combination, cup B represents the texture similar to cup A but a different odor and cup C represents the odor similar to cup A but a different texture. (b) Dark gray bars represent mean ratios of errors \pm SEM digging in the cup C; light gray bars represent mean ratios of errors \pm SEM digging in the cup B. The dotted line represents the chance level (50%). *** $P < 0.001$ compared to the chance level. $n = 18$ for OT1 and $n = 17$ for OT2.

and 31.4% of errors, respectively in tasks OT1 and OT2). Paired t -tests confirmed this observation and revealed a significant difference between the number of errors for the incorrect cup represented by the baited odor and the incorrect cup represented by the baited texture in the two tasks (all P values < 0.001).

Taken together these data suggest that the animals first based their choices on olfactory stimuli.

Effect of d-APV Infusion on Task OT1 Recall

One animal died after surgery, final experiment groups were as follows: d-APV ($n = 8$); control ($n = 9$). Ten days after surgery (11 days after the end of OT1 acquisition), recall of OT1 was tested. The results showed that animals achieved 80% to 100% of correct responses in 20 trials (data not shown). Twenty-four hours later, the effect of d-APV or aCSF bilateral microinfusions into the LEC was tested on a second session of OT1 recall. Figure 6 represents the results obtained in the two groups of animals during the test. On this figure, the mean ratios of correct responses were similar between the two groups (between 90% and 100%) from blocks 1 to 4. A two-factor ANOVA with repeated measures with factor Drug (d-APV or aCSF) as between-subjects variable and factor Block (1,2,3,4) as within-subject variable revealed no significant effect of factor Drug ($F_{(1,15)} = 0.003$, P n.s.), no significant effect of factor

Block ($F_{(3,45)} = 1.95$, P n.s.) and no interaction between both factors ($F_{(3,45)} = 0.91$, P n.s.).

These data show that microinfusion of 3 μ g of d-APV in the LEC did not disrupt (1) the olfactory nor tactile processing and (2) the 24 h OT recall suggesting that NMDA system in the LEC is not involved in the short-term retention of OT task.

Effect of d-APV Infusion on Task OT2 Acquisition

Two days after recall of Task OT1, the effect of d-APV infusion was tested on the acquisition of Task OT2 with a new set of olfactory and tactile stimuli. Animals that were microinfused in OT1 with d-APV received aCSF in OT2 and vice versa. Bilateral infusions of d-APV ($n = 9$) or aCSF ($n = 8$) into the LEC were done immediately before acquisition of OT2. Figure 7 represents the results obtained in the two groups of animals during the task. On this figure, the progression of the mean ratios calculated for each block of five trials showed that control animals managed to learn the task in 20 trials (60% of correct responses in block 1 to more than 90% of correct responses in block 4). In contrast with the control group, d-APV group did not manage to solve the task since the mean ratios of correct responses calculated for this group ranged from 52% in block 1 to 60% in block 4. A two-factor ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Drug ($F_{(1,15)} = 28.18$, $P < 0.001$), a significant effect of factor Block ($F_{(3,45)} = 4.17$, $P < 0.05$) but no interaction between both factors ($F_{(3,45)} = 1.76$, P n.s.). One-way within-group comparisons confirmed this description and showed a significant effect of factor Block in control group

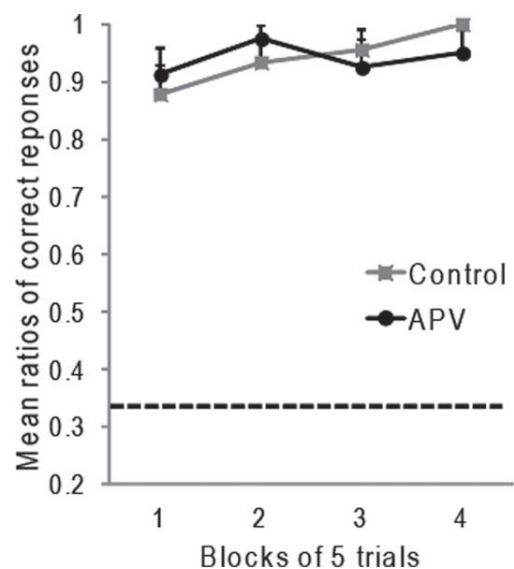


FIGURE 6. Effect of injection of d-APV into the LEC during the 24 h recall of OT1. Mean ratios of correct responses \pm SEM calculated in each block of five trials for the d-APV infused (black; $n = 8$) and the control (gray, $n = 9$) groups. The dotted line represents the chance level (33%).

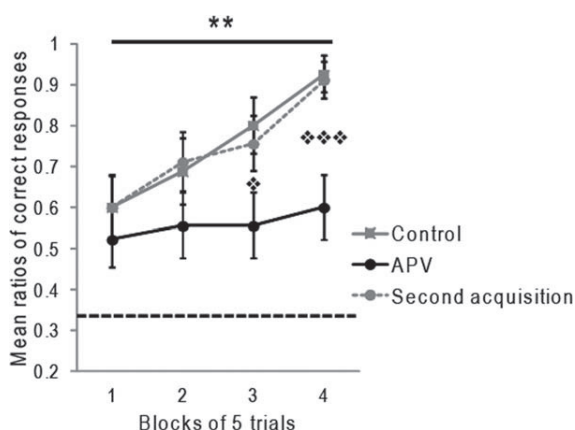


FIGURE 7. Effect of the injection of d-APV into the LEC during the acquisition of Task OT2. Mean ratios of correct responses \pm SEM calculated in each block of five trials for the d-APV infused (black; $n = 8$) and the control (gray; $n = 9$) groups. The horizontal dotted line represents the chance level (33%). $\square P < 0.05$; $\square\square P < 0.001$ between control and d-APV groups and between first and second OT2 acquisitions for d-APV group; $**P < 0.01$ between blocks for d-APV group during the second acquisition of OT2 and also between blocks for control group.

($F_{(3,28)} = 5.27, P < 0.01$). Post-hoc tests (Bonferroni) revealed a significant difference between blocks 1 and 4 ($P < 0.01$). One-way ANOVA within-group comparisons showed no effect of factor Block in d-APV group ($F_{(3,32)} = 0.35, P$ n.s). An independent t -test between group comparisons indicated a significant difference between control and d-APV groups in blocks 3 and 4 ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively) thus suggesting that d-APV infusion into the LEC disrupted the acquisition of OT2.

Four days later, the ability of d-APV group to learn OT2 was tested without drug in an additional experiment. The dotted line in gray in Figure 7 represents the performances obtained in this group during a second acquisition session of OT2 but without any infusion. The observation of the progression curve shows that d-APV group managed to learn the task similarly to the control one during the acquisition of OT2. A two-factor ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Block ($F_{(3,45)} = 8.68; P < 0.001$) but no significant effect of factor Drug ($F_{(1,15)} = 0.06, P$ n.s) and no significant interaction between both factors ($F_{(3,45)} = 0.1, P$ n.s). One-way ANOVA within-group comparisons showed a significant effect of factor Block in d-APV group during second acquisition ($F_{(3,32)} = 4.60, P < 0.01$). Post-hoc tests (Bonferroni) revealed a significant difference between blocks 1 and 4 ($P < 0.01$).

In Figure 7, the comparison between the performances of d-APV group during the first (with infusion) and second acquisition (without infusion) suggested that without infusion animals acquired the task as if it were a new acquisition. A two-factor ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Block ($F_{(3,48)} = 3.76, P < 0.05$) and a significant effect of factor Drug ($F_{(1,16)} = 25.01, P < 0.001$) but no interaction between both factors ($F_{(3,48)} = 1.39, P$ n.s). An independent t -test performed on the mean ratios of correct responses

obtained during the first and second acquisition of OT2 in the same d-APV group confirmed this description and revealed a significant difference between the two conditions in the last two blocks of trials ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). These data show that olfactory-tactile acquisition with new items requires the LEC NMDA function.

Effect of d-APV Infusion on Task OT3 Acquisition

Two days after Task OT2 acquisition, the effect of d-APV infusion into the LEC was tested in the acquisition of OT3 (recombination task). In the majority of cases, animals that received d-APV infusion during acquisition of OT2 received aCSF in OT3 and vice versa. However, and because of technical problems that occurred during the injection of aCSF during OT2 acquisition (one cannula seemed to be partially clogged and the aCSF diffused slowly), some animals ($n = 3$) received also aCSF during OT3 acquisition. In order to balance the number of animals per group in the best possible way, some animals ($n = 3$) that received d-APV in OT2 acquisition were also injected with d-APV during OT3 acquisition. We have observed that neither order nor nature of previous injections influenced the effects obtained during the tests. Bilateral infusions of d-APV ($n = 9$) or aCSF ($n = 8$) into the LEC were done immediately before acquisition of OT3. Figure 8 represents the results obtained during this task in d-APV and control groups. As shown by the figure, control animals rapidly managed to learn OT3 and managed to learn the task in 20 trials (44% of correct responses in block 1 to 88% in block 4). In contrast, d-APV group did not manage to solve the task since the mean ratios of correct responses calculated for this group ranged from 38% in block 1 to 59% in block 4. A two-

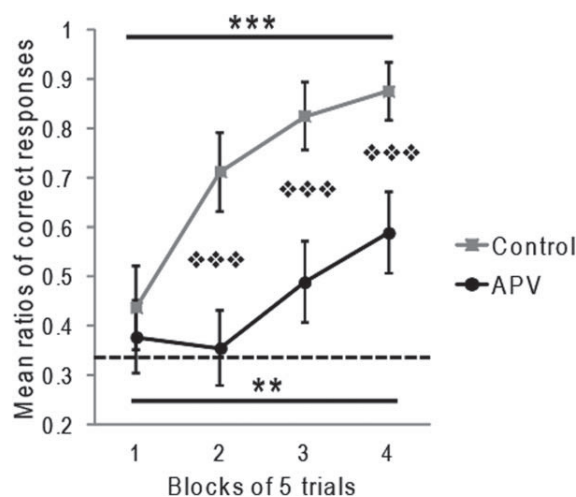


FIGURE 8. Effect of the injection of d-APV into the LEC during the acquisition of Task OT3. Mean ratios of correct responses \pm SEM calculated in each block of five trials for the d-APV infused (black; $n = 9$) and the control (gray; $n = 8$) groups. The dotted line represents the chance level (33%). $\square\square\square P < 0.001$ between control and d-APV groups; $**P < 0.01$ between blocks in d-APV group and $***P < 0.001$ between blocks in control group.

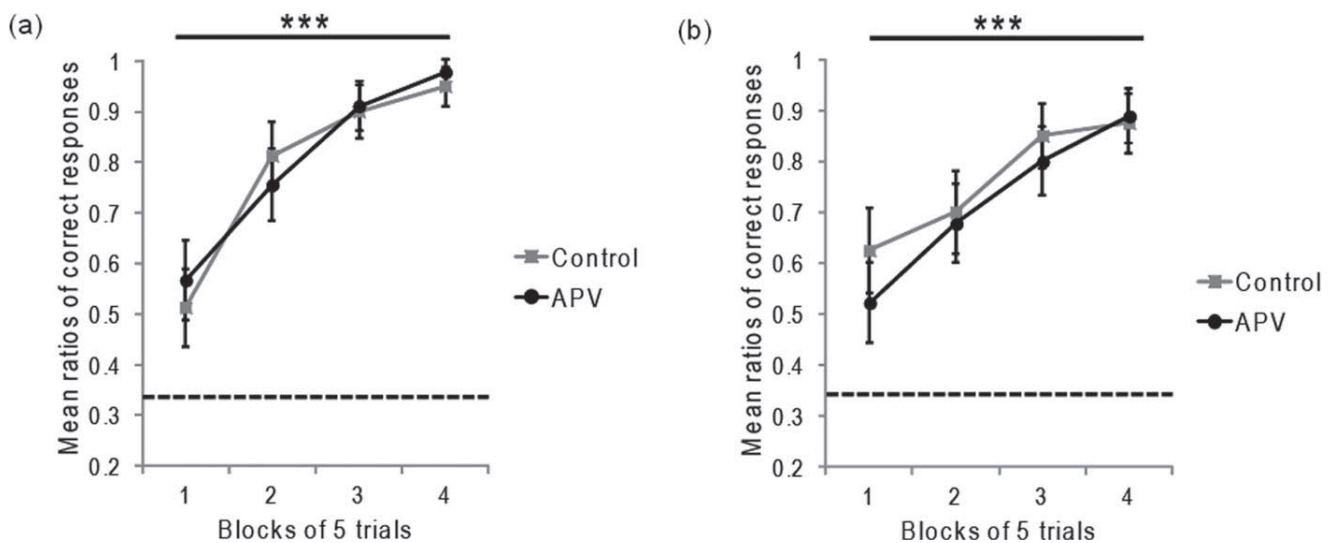


FIGURE 9. Effect of the injection of d-APV into the LEC during the unimodal olfactory (a) and tactile (b) acquisition tasks. Mean ratios of correct responses \pm SEM calculated in each block of five trials for the d-APV infused (black; $n = 9$) and the control (gray, $n = 8$) groups. The dotted line represents the chance level (33%). *** $P < 0.001$ between blocks for each experimental group.

factor ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Block ($F_{(3,45)} = 16.78$, $P < 0.001$), a significant effect of factor Drug ($F_{(1,15)} = 67.96$, $P < 0.001$) and a significant effect of Drug \times Block interaction ($F_{(3,45)} = 3.86$, $P < 0.05$). A one-way ANOVA confirmed this description and revealed a significant effect of factor Drug in the control group ($F_{(3,28)} = 17.21$, $P < 0.001$) and post-hoc tests (Bonferroni) revealed a significant difference between block 1 and the three others blocks ($P < 0.01$; $P < 0.001$; $P < 0.001$, respectively). A one-way ANOVA revealed a significant effect of factor Drug in d-APV group ($F_{(3,32)} = 4.96$, $P < 0.01$) and post hoc tests (Bonferroni) revealed a significant difference between blocks 1 and 4 ($P < 0.05$). Independent t -test between group comparisons indicated a significant difference between groups in blocks 2, 3, and 4 (all P values < 0.001) thus suggesting that d-APV infusion into the LEC disrupted the acquisition of OT3. These data show that reversal learning of olfactory-tactile task with recombination of familiar items requires the LEC NMDA function.

Observation of errors during OT3 Task showed that d-APV rats dug in the cup associated with the odor that was rewarded in the previous OT learning during the first two blocks. Then, during blocks 3 and 4, animals developed another strategy consisting of digging in the cup containing the new rewarded odor without taking the associated texture, thus explaining the performances of 60% of correct response. This suggests that in a condition of uncertainty, rats have a bias towards olfactory cues, probably their dominant sensory system.

Effect of d-APV Infusion on Olfactory or Tactile Unimodal Task Acquisition

In order to examine the selectivity of the afore-described effect of d-APV on the OT acquisition, two additional groups of ani-

mals bilaterally infused into the LEC were subjected to the acquisition of new olfactory (d-APV, $n = 9$; control, $n = 8$) or tactile (d-APV, $n = 9$; control, $n = 8$) unimodal tasks. Figure 9 represents the results obtained in each experimental group during each of these tasks. As shown by Figures 9a and b, control and d-APV groups similarly reached 90% of correct responses in a single session of 20 trials. Regarding the olfactory task, a two-way ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Block ($F_{(3,45)} = 40.58$, $P < 0.001$) but no significant effect of factor Drug ($F_{(1,15)} = 0.14$, P n.s) and no significant interaction between both factors ($F_{(3,45)} = 0.49$, P n.s). One-way within-group comparisons confirmed this description and showed a significant effect of factor Block in control group ($F_{(3,28)} = 14.53$, $P < 0.001$) and d-APV group ($F_{(3,32)} = 36.12$, $P < 0.001$). Bonferroni post-hoc indicated a significant difference between block 1, and blocks 2, 3, and 4 ($P < 0.01$; $P < 0.001$; $P < 0.001$, respectively) for both experimental groups thus suggesting that d-APV infusion into the LEC did not affect the acquisition of unimodal olfactory tasks.

Regarding the tactile task, a two-way ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Block ($F_{(3,45)} = 30.20$, $P < 0.001$) but no significant effect of factor Drug ($F_{(1,15)} = 0.30$, P n.s) and no significant interaction between both factors ($F_{(3,45)} = 0.048$, P n.s). One-way within-group comparisons confirmed this description and showed a significant effect of factor Block in control group ($F_{(3,28)} = 11.32$, $P < 0.001$) and d-APV group ($F_{(3,32)} = 16.54$, $P < 0.001$). Bonferroni post-hoc indicated a significant difference between block 1, and blocks 3 and 4 ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) for control group, and between block 1, and blocks 2, 3, and 4 ($P < 0.05$; $P < 0.001$; $P < 0.001$, respectively) for d-APV group, thus suggesting that d-APV infusion into the LEC does not affect the acquisition of unimodal tactile tasks.

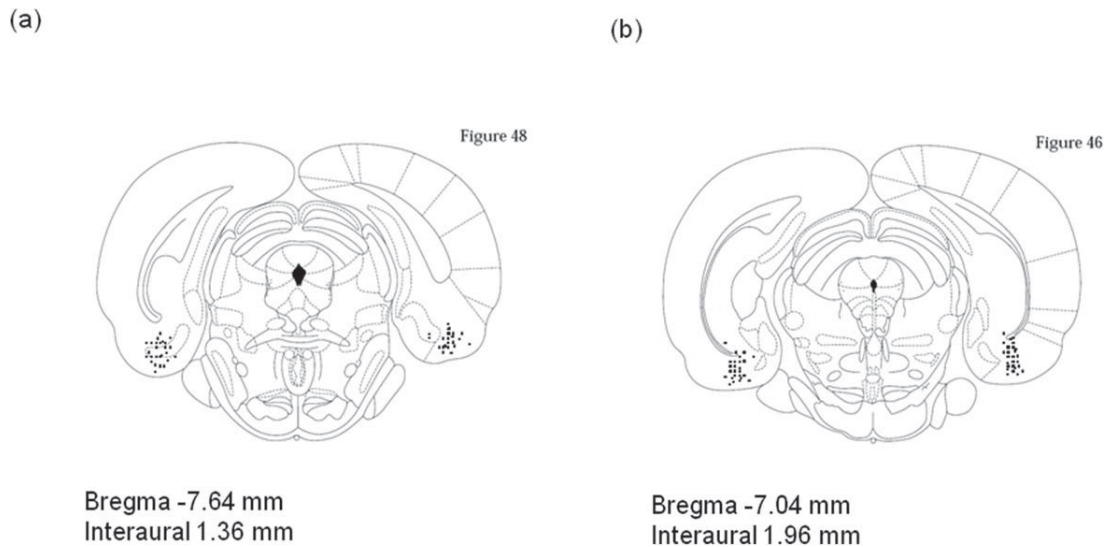


FIGURE 10. Frontal sections of the brain showing all the injection site locations (small solid circles) in the experimental groups. The different plates were adapted from Paxinos and Watson (1998).

Histology

At the end of the experiments, position of each cannula was checked and reported into two atlas boards (Fig. 10). A detailed analysis of the position of each injection needle placement revealed that injection sites were mostly centered in LEC and some were close to the limit between the LEC and the anterior part of the medial EC ($n = 4$ animals tested in OT tasks; $n = 1$ animal tested in the unimodal olfactory task and $n = 2$ animals tested in the unimodal tactile task). Therefore, all infused animals were included in the final statistic analyses.

DISCUSSION

The present experiments concern a new learning paradigm enabling study of the neurobiological substrate involved in multimodal association learning and recall in the rat. One of the main qualities of the olfacto-tactile paradigm developed here lies in the way the olfactory and tactile stimuli were presented on the cup, matching as closely as possible the natural way sensory stimuli representing a new object are processed by a rat during exploration (Dusek and Eichenbaum, 1997; Sara et al., 1999; Kim and Ragozzino, 2005). The results for the first task (OT1) showed that olfactory-tactile associations were rapidly acquired (in 3 days, Fig. 3A) with the experimental protocol. This is of particular interest since this is the first time such an OT task has been learned so easily, in a single series of OT acquisition sessions.

The major finding of the present study is that infusion of d-APV in the LEC disrupted acquisition but not recall of the OT task, whatever the olfactory and tactile stimuli used for the OT combinations.

The processes affected by NMDA system blockade in the LEC can be of different types. First of all, the absence of deficit in the d-APV group during recall of OT1 tasks and acquisition of unimodal olfactory and tactile tasks suggested that the NMDA function of the LEC is critical neither to tactile or olfactory processing. In addition, the performance of animals infused with d-APV during acquisition of unimodal olfactory and tactile tasks (Fig. 9) reached a 90% correct response rate in one learning session, suggesting that d-APV did not affect in the ability to associate an olfactory or tactile stimulus with reinforcement. Whether the effect of d-APV during acquisition of both OT tasks was due to a sensory-motor deficit can be discussed with reference to the work of Cain (1996) and Morris (1989), demonstrating deficit induced by intracerebroventricular d-APV. In the present study, however, close observation of general behavior under d-APV during acquisition and recall of each OT task found it to be similar to that of controls, in terms of response latency and number of cups explored throughout the trials during the three tasks. Moreover, the hypothesis that the d-APV effect could result from a deficit in motivation or/and acquisition of learning rules can be discarded, since animals infused in the LEC with d-APV did not differ from controls in terms of recall of previous bimodal OT1 or unimodal olfactory and tactile tasks.

Secondly, the absence of d-APV effect in the LEC during OT1 task recall suggests that the NMDA system in the LEC was not involved in the memory processes underlying OT1 recall. However, the protocol did not specifically test short or long-term recall, and further experiments will be needed to address this question. In addition, the present results cannot exclude possible involvement of the LEC in the process of OT recall that could be tested with a complete LEC inactivation.

Given the size of the d-APV molecule and the tortuosity reported in cortical structures (Zador et al., 2008), it cannot be

ruled out that the drug may have diffused in structures neighboring the LEC. The posterior part of the piriform cortex (pPCX) in particular deserves attention: a large body of electrophysiological and behavioral data suggests that the pPCX is involved in the encoding of odors (Litaudon et al., 2003; Kadoshisa and Wilson, 2006) and of odor-reinforcement associations (Chabaud et al., 1999; Calu et al., 2007). In the present study, however, d-APV in the LEC did not affect the ability to associate a particular odor with a reward or to select the reinforced odor among three different stimuli. Therefore, even though it cannot be completely excluded that d-APV diffused into the pPCX, it is unlikely that the observed impairment of OT acquisition was significantly due to NMDA system blockade in the pPCX.

If direct involvement of the pPCX in the present effect seems unlikely, some data suggest that the anterior part of the piriform cortex could be indirectly involved in the OT acquisition deficit. The LEC projects onto the anterior piriform cortex (aPCX) (Haberly and Price, 1978; Cleland and Lister, 2005; Agster and Burwell, 2009) and this feedback from LEC to PCX could convey a range of important olfactory information (Xu and Wilson, 2012). In addition, Wilson and Stevenson (2003) showed that olfactory bulb circuitry creates odor-specific spatiotemporal patterns that are synthesized and stored in the PCX, where each odor is encoded as a particular object. Moreover, bilateral reversible aPCX lesions have been shown to impair simple olfactory discrimination. It could thus be argued that the impairment observed during OT acquisition in d-APV-infused rats was mediated by a change in activity in the aPCX onto which the LEC projects. While this argues for a role of the aPCX in simple olfactory discrimination, some evidence indicates that such was not the case in the present study. Indeed, Chapuis et al. (2013) showed that reversible LEC lesions enhanced local field potential oscillations in the aPCX, and that this was accompanied by impaired fine but not gross odor discrimination. In the present learning task, animals had to choose between two distinct odors paired with the texture; the protocol was thus closer to a simple discrimination task. Therefore, it seems unlikely that the observed d-APV effects resulted from disruption of aPCX network activity by LEC modulation.

The hippocampus has been shown to be widely involved in processes underlying episodic memory and, in particular, in disambiguation: i.e., minimizing interference between events sharing overlapping elements (O'Reilly and McClelland, 1994; McClelland et al., 1995; Levy, 1996; Hasselmo and Wyble, 1997; Sohal and Hasselmo, 1998; Agster et al., 2002; Hasselmo and Eichenbaum, 2005). However, some data suggested that disambiguation begins not in the hippocampus but upstream, involving entorhinal cortex function (Lipton et al., 2007). Indeed, anatomical connections between EC and the CA1 and subiculum (Witter and Amaral, 1991) provide a major route through which information about an object is transmitted to the hippocampus, where long-term stable representations of the object are formed (Remondes and Schuman, 2004) and some electrophysiological and imaging data pointed

to entorhinal cortex involvement in the process of disambiguation in an episodic context (see Newmark et al., 2013 for review). Interestingly, some models suggested that the entorhinal cortex may play a crucial role in binding and maintaining representations that distinguish overlapping events, or stimuli with overlapping features, across working memory time, regardless of the nature of the overlap (Lipton et al., 2007; Newmark et al., 2013).

In the present design, each of the three OT combinations shared a stimulus with the others, and, in order to solve the task, the animals had to disambiguate between these overlapping features to build and maintain distinct representations of each OT object over the inter-trial interval. Thus, our results suggest that impairing effect of LEC d-APV infusion during OT acquisition may reflect a deficit in disambiguation capacity, preventing the necessary differentiation between objects with overlapping olfactory features. Possible involvement of the LEC NMDA system in disambiguation upstream of the formation of the OT representation may be essential to the encoding and/or representation of the OT association.

Recent findings concerning the medial entorhinal cortex (MEC) suggest an important role in spatial information processing within the hippocampal system. The MEC receives considerable visual-spatial and temporal association projections and direct CA1 inputs (Burwell, 2000; Kerr et al., 2007) and sends direct projections to the dorsal hippocampus (Witter et al., 1989; Dolorfo and Amaral, 1998). Interestingly, earlier studies identified MEC neurons involved in disambiguation of overlapping routes in spatial navigation (Frank et al., 2000; Hafting et al., 2005). Also, Lipton et al. (2007) showed that MEC activity clearly reflected both environmental spatial features and task requirements for disambiguation of distinct experiences. The literature on the role of the MEC in disambiguation has essentially concerned spatial learning, but further studies will determine the aspects of the disambiguation process in which each part of the entorhinal cortex (lateral versus medial) seems to be involved. In particular, since post-histological observation of infusion sites found that d-APV was injected in the caudal part of the LEC, very close to the MEC, it would be interesting to study selective NMDA system blockade in each part of the EC, so as to be able to discount MEC involvement in the effects observed in the present study.

Another important finding in the present study was that the NMDA system in the LEC affected an OT reversal task (OT3) in which familiar O and T stimuli were recombined to form new associations. Comparison of the two experimental groups in the various phases of OT3 acquisition shed light on the basis of the impairment; whether this deficit involved disruption of the disambiguation enabling representation of stimuli with overlapping features is further discussed. Behavioral flexibility is an adaptive change in behavior in response to modifications in experimental contingencies. Flexibility usually reflects the ability to acquire reversal learning, which in turn requires a shift in specific choice patterns (Ferry et al., 2000; Schoenbaum et al., 2002; Bohn et al., 2003; Chudasama and Robbins, 2003; McAlonan and Brown, 2003). The present OT3 task involved reversal

learning based on a shift in which the animal had to inhibit the response to previously reinforced olfactory and tactile stimuli and learn to associate a new OT pair, composed of familiar stimuli, with a reward. The fact that control animals acquired OT3 much more slowly than OT2 suggests that this reversal learning made heavy cognitive demands. Detailed observation of scores in the first series of trials revealed that both d-APV and control animals preferentially dug in the cup containing the previously correct odor. This perseveration behavior, already widely reported in reversal learning in olfactory discrimination tasks (Fagan et al., 1985; Eichenbaum et al., 1986; Fagan and Olton, 1986), shows that NMDA system inactivation in the LEC did not affect perseveration behavior, but on the contrary seemed to prolong the acquired rewarding response strategy. Moreover, given the involvement of the LEC in the sense of familiarity, these data suggest that preference for a previously rewarded odor probably results from a recollection process (Eichenbaum et al., 2007).

As shown in Figure 8, perseveration behavior extinguished in the control group between blocks 1 and 2 and the new OT-reward association was acquired in the third block of trials. In contrast, scores in d-APV group were significantly lower during the first two blocks of trials but increased to 60% at the end of the training session. Detailed observation of choices made in blocks 3 and 4 revealed that animals basically dug in the two cups associated with the odor only reinforced in the new OT combination. In agreement with previous findings that the LEC is not involved in olfactory reversal learning (Staubli et al., 1984), the present results showed that NMDA receptor blockade in the LEC did not impair inhibition of response to the previously reinforced odor stimuli nor acquisition of a new odor-reinforcement association, suggesting that flexibility was not affected. In the first series of trials in OT1 and OT2 acquisition, control animals consistently started to learn the OT task by digging in the cup associated with the olfactory component of the rewarded OT pair. This behavior lasted for approximately 10 trials (2 blocks, for OT2) before responses changed so as to choose the correct texture associated with the right odor. In the d-APV group, results for OT3 blocks 3 and 4, like OT2 blocks 1 and 2, indicated that NMDA receptor blockade in the LEC selectively impaired the processes enabling the formation of representations of the correct rewarded OT pair. An alternative to this hypothesis is that the 60% correct response rate obtained in OT3 blocks 3 and 4 represented a prolongation of the process associating the olfactory component of the OT combination with the reward preceding the association between texture and rewarded odor. This has been widely described in amygdala lesions (Cador et al., 1989; Everitt and Robbins 1992; Gaffan, 1992; McDonald and White, 1993) and, since the present design included only 4 blocks of trials, it is difficult to conclude whether d-APV in the LEC disrupted or merely retarded encoding of the OT association. It will be therefore interesting to test the effect of d-APV in the LEC over a larger number of trials in both OT2 and OT3 in a coming study.

As a whole, the results presented in the present paper demonstrate that the LEC plays a role in the processes underlying

formation of new OT associations during olfacto-tactile tasks in rat, but not in subsequent recall. In addition, the results showed that, in reversal learning, animals were able to shift their response pattern. Fine analysis of behavior in each block of OT acquisition trials shed light on the basis of the effect induced by d-APV in the LEC. These observations suggested that the role of the LEC NMDA system in olfacto-tactile association is mediated by its involvement in the disambiguation process leading to the encoding and representation of stimuli with overlapping features. In conclusion, the present results confirm the critical importance of the LEC in merging the sensory characteristics of objects to create new memories (Eichenbaum et al., 2007), and extend this concept to objects with olfacto-tactile features.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the contribution of Ounsa Jelassi-Ben-Hellal for animal care, Marc Thevenet for the video tracking system and Anna Andréa Obé-Gervais for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

- Agster KL, Burwell RD. 2009. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* 19: 1159–1186.
- Agster KL, Fortin NJ, Eichenbaum H. 2002. The hippocampus and disambiguation of overlapping sequences. *J. Neurosci* 22:5760–5768.
- Bohn I, Gierler C, Hauber W. 2003. Orbital prefrontal cortex and guidance of instrumental behaviour in rats under reversal conditions. *Behav Brain Res* 143:49–56.
- Botly LC, De Rosa E. 2007. Cholinergic influences on feature binding. *Behav Neurosci* 121:264–276.
- Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM. 1996. Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behav Brain Res* 4:81–97.
- Burwell RD. 2000. The parahippocampal region: Corticocortical connectivity. *Ann NY Acad Sci* 911:25–42.
- Cador M, Robbins TW, Everitt BJ. 1989. Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: Interaction with the ventral striatum. *Neuroscience* 30:77–86.
- Cain DP, Saucier D, Hall J, Hargreaves EL, Boon F. 1996. Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: Contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. *Behav Neurosci* 110:86–102.
- Calu DJ, Roesch MR, Stalnaker TA, Schoenbaum G. 2007. Associative encoding in posterior piriform cortex during odor discrimination and reversal learning. *Cereb Cortex* 17:1342–1349.
- Calvert GA. 2001. Crossmodal processing in the human brain: Insights from functional neuroimaging studies. *Cereb Cortex* 11: 1110–1123.
- Carvell GE, Simons DJ. 1990. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10:2638–2648.
- Chabaud P, Ravel N, Wilson DA, Gervais R. 1999. Functional coupling in rat central olfactory pathways: A coherence analysis. *Neurosci Lett* 276:17–20.

- Chapuis J, Cohen Y, He X, Zhang Z, Jin S, Xu F, Wilson DA. 2013. Lateral entorhinal modulation of piriform cortical activity and fine odor discrimination. *J Neurosci* 33:13449–13459.
- Chudasama Y, Robbins TW. 2003. Dissociable contributions of the orbitofrontal and infralimbic cortex to Pavlovian autoshaping and discrimination reversal learning: Further evidence for the functional heterogeneity of the rodent frontal cortex. *J Neurosci* 23:8771–8780.
- Cleland TA, Linster C. 2005. Computation in the olfactory system. *Chem Senses* 30:801–813.
- Diamond ME, Von Heimendahl M, Knutsen PM, Kleinfield D, Ahissar E. 2008. “Where” and “what” in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci* 9:601–612.
- Dolorfo CL, Amaral DG. 1998. Entorhinal cortex of the rat: Topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 398: 25–48.
- Dusek JA, Eichenbaum H. 1997. The hippocampus and memory for orderly stimulus relations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7109–7114.
- Eichenbaum H, Fagan A, Cohen NJ. 1986. Normal olfactory discrimination learning set and facilitation of reversal learning after medial-temporal damage in rats: Implications for an account of preserved learning abilities in amnesia. *J Neurosci* 6:1876–1884.
- Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C. 2007. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30:123–152.
- Everitt BJ, Robbins TW. 1992. Amygdala-ventral striatal interactions and reward-related processes. In: Aggleton JP, editor. *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*. New York: Wiley-Liss. pp 401–429.
- Fagan A, Eichenbaum H, Cohen N. 1985. Normal learning set and facilitation of reversal learning in rats with combined fornix-amygdala lesions: Implications for preserved learning abilities in amnesia. *Ann NY Acad Sci* 444:510–512.
- Fagan AM, Olton DS. 1986. Learning sets, discrimination reversal, and hippocampal function. *Behav Brain Res* 21:13–20.
- Ferry AT, Lu XCM, Price JL. 2000. Effects of excitotoxic lesions in the ventral striatopallidal-thalamocortical pathway on odor reversal learning: inability to extinguish an incorrect response. *Exp Brain Res* 131:320–335.
- Ferry B, Oberling P, Jarrard LE, Di Scala G. 1996. Facilitation of conditioned odor aversion learning by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behav Neurosci* 110:443–450.
- Ferry B, Wirth S, Di Scala G. 1999. Functional interaction between entorhinal cortex and basolateral amygdala during trace conditioning of odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* 113:118–125.
- Ferry B, Ferreira G, Traissard N, Majchrzak M. 2006. Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* 120:1180–1186.
- Ferry B, Gervasoni D, Vogt C. 2014. *Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent—Handbook on best Practices*. New York: Springer Verlag.
- Frank LM, Brown EN, Wilson M. 2000. Trajectory encoding in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuron* 27:169–178.
- Gaffan D. 1992. Amygdala and the memory of reward. In: Aggleton JP, editor. *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*. New York: Wiley-Liss. pp 471–483.
- Guié-Robles E, Valdivieso C, Guajardo G. 1989. Rats can learn a roughness discrimination using only their vibrissal system. *Behav Brain Res* 31:285–289.
- Haberly LB, Price JL. 1978. Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. I. Systems originating in the piriform cortex and adjacent areas. *J Comp Neurol* 178:711–740.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser E. 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436: 801–806.
- Hasselmo ME, Wyble BP. 1997. Free recall and recognition in a network model of the hippocampus: simulating effects of scopolamine on human memory function. *Behav Brain Res* 89:1–34.
- Hasselmo ME, Eichenbaum H. 2005. Hippocampal mechanisms for the context-dependent retrieval of episodes. *Neural Netw* 18: 1172–1190.
- Insausti R, Herrero MT, Witter MP. 1997. Entorhinal cortex of the rat: Cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* 7:146–183.
- Kadohisa M, Wilson DA. 2006. Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15206–15211.
- Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17:697–708.
- Kim J, Ragozzino ME. 2005. The involvement of the orbitofrontal cortex in learning under changing task contingencies. *Neurobiol Learn Mem* 83:125–133.
- Klüver H, Barrera E. 1953. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12:400–403.
- Levy WB, Wu X, Tyrcha JM. 1996. Solving the transverse patterning problem by learning context present: A special role for input codes. In: INNS World Congress on Neural Networks. Lawrence Erlbaum Associates, Inc., New-York Plenum Press. pp 1305–1309.
- Lipton PA, White JA, Eichenbaum H. 2007. Disambiguation of overlapping experiences by neurons in the medial entorhinal cortex. *J Neurosci* 27:5787–5795.
- Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M, Buonviso N. 2003. Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *Eur J Neurosci* 17:2457–2461.
- McAlonan K, Brown VJ. 2003. Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. *Behav Brain Res* 146:97–103.
- McClelland JL. 1995. Constructive memory and memory distortions: A parallel-distributed processing approach. In: Schacter DL, editor. *Memory Distortions: How Minds, Brains, and Societies Reconstruct the Past*. Harvard University Press, Cambridge. pp 69–90.
- McDonald RJ, White NM. 1993. A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala and dorsal striatum. *Behav Neurosci* 107:3–22.
- Mesulam MM. 1998. From sensation to cognition. *Brain* 121:1013–52.
- Morris RGM. 1989. Synaptic plasticity and learning: Selective impairment of learning in rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9:3040–3047.
- Newmark RE, Schon K, Ross RS, Stern CE. 2013. Contributions of the hippocampal subfields and entorhinal cortex to disambiguation during working memory. *Hippocampus* 23:467–475.
- O’Reilly RC, McClelland JL. 1994. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: Avoiding a trade-off. *Hippocampus* 4:661–682.
- Otto T, Schottler F, Staubli U, Eichenbaum H, Lynch G. 1991. Hippocampus and olfactory discrimination learning effects of entorhinal cortex lesions on olfactory learning and memory in a successive-cue, go-no-go task. *Behav Neurosci* 105:111–119.
- Paxinos G, Watson CR. 2013. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact 7th ed. New York: Academic Press. ISBN: 9780123919496.
- Pereira A, Ribeiro S, Wiest M, Moore LC, Pantoja J, Lin SC, Nicolelis MAL. 2007. Processing of tactile information by the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18286–18291.
- Ravel N, Chabaud P, Martin C, Gaveau V, Hugues E, Tallon-Baudry C, Bertrand O, Gervais R. 2003. Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma

- (60–90 Hz) and beta (15–40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 17:350–358.
- Remondes M, Schuman EM. 2004. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature* 431:699–703.
- Santiago AC, Shammah-Lagnado SJ. 2004. Efferent connections of the nucleus of the lateral olfactory tract in the rat. *J Comp Neurol* 471:314–332.
- Sara SJ, Rouillet P, Przsbylowski J. 1999. Consolidation of memory for odor-reward association: Beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learn Mem* 6:88–96.
- Schenberg EE, Soares JCK, Oliveira MGM. 2005. Effects of pre- or post-training entorhinal cortex AP5 injection on fear conditioning. *Physiol Behav* 86:508–515.
- Schoenbaum G, Nugent SL, Saddoris MP, Setlow B. 2002. Orbitofrontal lesions in rats impair reversal but not acquisition of go, no-go odor discriminations. *Neuroreport* 13:885–890.
- Slotnick B. 2001. Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Cogn Sci* 5:216–222.
- Sohal VS, Hasselmo ME. 1998. GABA_B modulation improves sequence disambiguation in computational models of hippocampal region CA3. *Hippocampus* 8:171–193.
- Staubli U, Ivy G, Lynch G. 1984. Hippocampal denervation causes rapid forgetting of olfactory information in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5885–5887.
- Swanson LW, Köhler C. 1986. Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *J Neurosci* 6:3010–3023.
- Whishaw IQ, Tomie JA. 1991. Acquisition and retention by hippocampal rats of simple, conditional, and configural tasks using tactile and olfactory cues: Implications for hippocampal function. *Behav Neurosci* 105:787–797.
- Whishaw IQ, Tomie JA, Kolb B. 1992. Ventrolateral prefrontal cortex lesions in rats impair the acquisition and retention of a tactile-olfactory configural task. *Behav Neurosci* 106:597–603.
- Wilson DA, Stevenson RJ. 2003. The fundamental role of memory in olfactory perception. *Trends Neurosci* 26:243–247.
- Wilson DI, Langston RF, Schlesiger MI, Wagner M, Watanabe S, Ainge JA. 2013. Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus* 23:352–366.
- Wirth S, Ferry B, Di Scala G. 1998. Facilitation of olfactory recognition by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behav Brain Res* 91:49–59.
- Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. 1989. Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci* 9:216–228.
- Witter MP, Amaral DG. 1991. Entorhinal cortex of the monkey. 5. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol* 307:437–459.
- Xu W, Wilson DA. 2012. Odor-evoked activity in the mouse lateral entorhinal cortex. *Neuroscience* 223:12–20.
- Zador Z, Magzoub M, Jin S, Manley GT, Papadopoulos MC, Verkman AS. 2008. Microfiber optic fluorescence photobleaching reveals size-dependent macromolecule diffusion in extracellular space deep in brain. *FASEB J* 22:870–879.

ARTICLE 2

Boisselier, L., Ferry, B., Gervais, R. (2016).

Respective role of the dorsal hippocampus and the lateral entorhinal cortex for the recombination of previously learned olfactory-tactile associations in the rat.

Learning and Memory 24, 24-34.

Research

Respective role of the dorsal hippocampus and the entorhinal cortex during the recombination of previously learned olfactory–tactile associations in the rat

Lise Boisselier,¹ Barbara Ferry,^{1,2} and Rémi Gervais^{1,2}

¹Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Team CMO, CNRS UMR 5292, INSERM U 1028, Université Lyon 1, Université de Lyon, 69366 Lyon, France

The hippocampal formation has been extensively described as a key component for object recognition in conjunction with place and context. The present study aimed at describing neural mechanisms in the hippocampal formation that support olfactory–tactile (OT) object discrimination in a task where space and context were not taken into account. The task consisted in discriminating one baited cup among three, each of them presenting overlapping olfactory or tactile elements. The experiment tested the involvement of the entorhinal cortex (EC) and the dorsal hippocampus (DH) in the acquisition of this cross-modal task, either with new items or with familiar but recombined items. The main results showed that DH inactivation or cholinergic muscarinic blockade in the DH selectively and drastically disrupted performance in the recombination task. EC inactivation impaired OT acquisition of any OT combinations while cholinergic blockade only delayed it. Control experiments showed that neither DH nor EC inactivation impaired unimodal olfactory or tactile tasks. As a whole, these data suggest that DH–EC interactions are of importance for flexibility of cross-modal representations with overlapping elements.

The rodent hippocampus has been shown to be critically involved in several memory processes including spatial navigation (Morris et al. 1982), contextual learning (Philips and LeDoux 1992), object–place and odor–place associations (Gilbert and Kesner 2002) and episodic-like memory (Easton et al. 2012; Veyrac et al. 2015). All these processes require computation of information from either one sensory modality such as extra maze visual cues (intramodal associations) or from different sensory modalities such as odor–place (cross-modal associations). The importance of the rodent hippocampus in behavioral responses to complex forms of association has also been shown in several studies in which the reward cue (e.g., A+) is configural dependent. These studies were based on tasks such as negative patterning (A+, B+, AB−) (McDonald et al. 1997), symmetry learning (A/B+, B/A+) (Bunsey and Eichenbaum 1996), transitivity (A/B+, B/C+, A+/C−) (Bunsey and Eichenbaum 1996), transverse patterning (A/B+, B/C+, C+/A−) (McDonald et al. 1997), and sequential learning (A>B>C>D>E) (Fortin et al. 2002) where letters stand for the cue and the signs + or − stand for rewarded or nonrewarded, respectively. However, the results obtained with this set of elegant studies were based on lesion to the hippocampus. Such an approach did not provide information on intrahippocampal mechanisms supporting acquisition of these complex forms of memory, nor did it provide information on the role of afferent structures such as the entorhinal cortex (EC). In addition, in most of these behavioral paradigms, animals had to process information from one category of sensory cues only, such as olfactory or visual cues.

Consequently, the present study aimed at characterizing the importance of the dorsal hippocampus (DH) and the EC and intrinsic mechanisms supporting cross-modal acquisition and re-

combination of previously learned associations. This was done using a new cross-modal learning task described in a recent study (Boisselier et al. 2014). While the olfactory and the rat vibrissal systems have been extensively studied separately (Slotnick 2001; Diamond et al. 2008), very little is known on how rats build cross-modal olfactory–tactile associations. This is surprising since rats explore any new object with active whisking and sniffing, which likely contributes to forming olfactory (O) tactile (T) associations required for future recognition. In this behavioral paradigm, rats were trained to distinguish between three different olfactory–tactile (OT) pairs presenting overlapping elements (e.g., O1T1, O1T2, and O2T1) to find the only pair that is rewarded (O1T1). It was shown that the EC plays a critical role in the acquisition of such cross-modal associations through a NMDA-dependent mechanism (Boisselier et al. 2014). In addition to the EC, some data suggest the DH could play a role in the acquisition of OT representations through a functional interaction with the EC. Indeed, the DH receives strong input from the EC and neurons in the DH respond to both olfactory (Igarashi et al. 2014) and tactile (Pereira et al. 2007) stimuli. The DH and the EC are strongly interconnected (Witter 1993) and both structures interact during the course of odor–place association learning through fine oscillatory dynamics coordination (Igarashi et al. 2014). Finally, both structures receive a strong cholinergic projection from the basal forebrain (Gaykema et al. 1990), which has been shown to modulate syn-

²These authors contributed equally to this work.

Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.043299.116>.

© 2016 Boisselier et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first 12 months after the full-issue publication date (see <http://learnmem.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

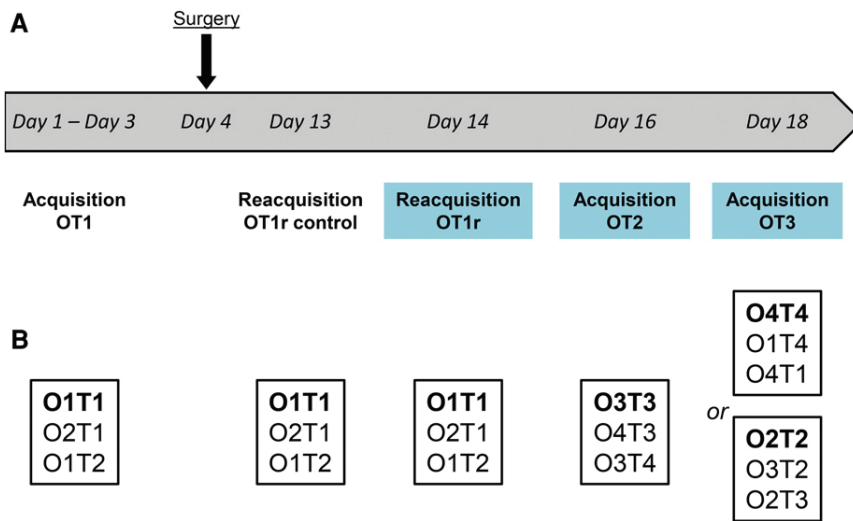


Figure 1. (A) Experimental chronology showing the succession of the different learning tasks. Following surgery and just before each task (OT1r, OT2, OT3) bilateral intracerebral infusion were done either in the DH or in the EC with aCSF, lidocaine, or scopolamine (tasks indicated in blue) (B) OT combinations used in each of the three tasks. Each task comprised 20 trials in which only the cup here indicated in bold characters contained a reward that can be reached by the rat.

aptic plasticity, learning and to prevent interference between incoming new and previously learned information (Hasselmo 2006). Therefore, our present study tested first the effect of selective inactivation of the DH and the EC, and then cholinergic muscarinic receptor inactivation in each structure on the processes underlying the acquisition and recombination of these cross-modal OT representations.

Results

Each rat was tested in three successive cross-modal olfactory–tactile tasks named OT1, OT2, and OT3. Figure 1 represents the succession of the OT tasks and the design of OT combinations used for each task. Different sets of items were used for OT1 and OT2 tasks. New pairs of familiar items were used for OT3 task (recombination task). Bilateral local infusions of lidocaine before each session were used to test the effect of DH and EC inactivation in reacquisition of OT1 (OT1r), acquisition of OT2, and acquisition of OT3 by recombination. Further local scopolamine infusions (muscarinic receptor antagonist) were used to test the role of cholinergic transmission during the tasks. Since the DH was selectively involved in the recombination task, the role of NMDA synaptic transmission in this structure was further tested by using local D-APV injection.

Detailed analysis of well-conditioned rat performances demonstrated that animals did not make their choice based on the scent of the reward in the baited cup. Two-sample paired *t*-test comparing performance in standard trials ($n = 53$ rats and $n = 497$ trials) and in probe tests ($n = 53$ rats and $n = 235$ trials) showed no effect of type of trial

on performance (the mean ratios of correct response during standard and probe tests were 0.90 ± 0.09 and 0.93 ± 0.10 , respectively; $t = -1.639$; $df = 52$; P n.s.), showing that animals did not use the scent of the reward to find the correct cup.

A complete description of the experimental bias control has been published recently (Boisselier et al. 2014).

Olfactory–tactile tasks

A week before surgery, all animals acquired a first olfactory–tactile task (Task OT1). The learning criterion for OT1 was reached in 3 d with a mean of 38 ± 5 trials (Boisselier et al. 2014).

Ten days after surgery, animals were tested in reacquisition of Task OT1 without infusion (OT1r control). Results showed that at least 80% of the animals showed a correct response in the first trial, which has been performed without any reinforcement ($89\% \pm 31$ for DH animals and $82\% \pm 39$ for EC animals, data not shown) thus suggesting

that surgery did not affect animals' performances.

Absence of effect of lidocaine infusion in the DH and in the EC on Task OT1 reacquisition (OT1r)

This experiment tested whether transient DH or EC inactivation affected reacquisition of a previously learned task (OT1r control). To do this, lidocaine infusion in the DH or in the EC was tested in a second reacquisition of OT1 (OT1r) 24 h following the session without injection of task OT1.

Figure 2A and B show the results obtained in the groups, respectively, infused in the DH and the EC. The mean ratio of correct responses during the first trial (which has been performed without any reinforcement) was between 0.9 and 1.0 for all the

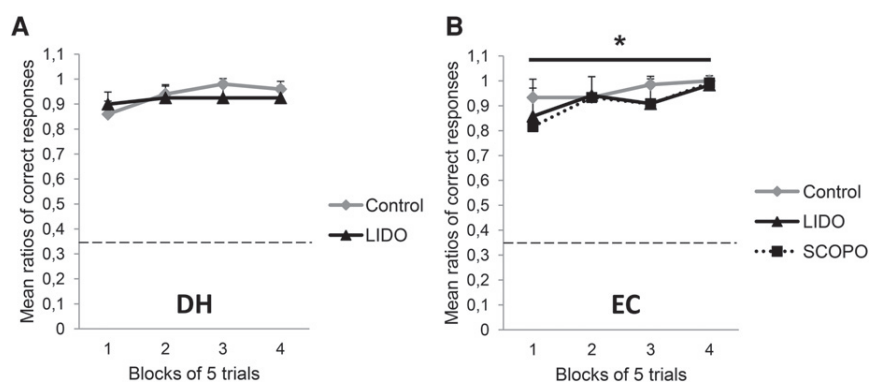


Figure 2. Absence of effect of injection of lidocaine into the DH (left) or the EC (right) during the OT reacquisition (Task OT1r). The graphs represent the mean ratios of correct responses \pm SEM calculated in each block of five trials in the OT reacquisition task. The black solid lines and the black dotted lines represent the results obtained in the groups infused with lidocaine and scopolamine, respectively, while the gray lines represent results obtained in the groups infused with aCSF (control). (A) Reacquisition of Task OT1 in the groups infused in the DH with lidocaine ($n = 10$) and aCSF ($n = 8$). (B) Reacquisition of Task OT1 in the groups infused in the EC with lidocaine ($n = 8$), scopolamine ($n = 8$), and aCSF ($n = 9$). Results indicated that lidocaine infusion in the DH or in the EC or scopolamine infusion in the EC did not impair the OT reacquisition task. The dotted line represents the chance level (0.33). (*) $P < 0.05$ between blocks for each experimental group.

DH and EC experimental groups. A two-factor ANOVA with repeated-measures with factor Drug as between-subjects variable and factor Block (1,2,3,4) as within-subject variable revealed no significant effect of factor Drug (DH: $F_{(1,16)} = 1.13$; P n.s./EC: $F_{(2,22)} = 2.68$; P n.s.), of factor Block (DH: $F_{(3,48)} = 1.77$; P n.s./EC: $F_{(3,66)} = 8.14$; P n.s.) or interaction between both factors (DH: $F_{(3,48)} = 0.70$; P n.s./EC: $F_{(6,66)} = 1.01$; P n.s.).

These data showed that local infusions of lidocaine in the DH or in the EC did not disrupt either the sensory olfactory and tactile processing or reacquisition of a well-known OT task. In addition, since there was no reward on the first trial of the reacquisition task and 34 over 35 rats performed correctly, this suggests that retrieval was also optimal.

Differential effect of lidocaine or scopolamine infusion in the DH and in the EC on Task OT2 acquisition (new items)

This experiment tested whether transient inactivation of DH or EC and/or disruption of muscarinic transmission impaired acquisition of a cross-modal OT.

Figure 3A shows the results obtained in the groups infused in the DH during acquisition of Task OT2. On this figure, the control, LIDO and SCOPO groups reached a mean ratio of correct responses of 0.8 in 20 trials (from 0.50 ± 0.15 in block 1 to 0.88 ± 0.10 in block 4 in control group; from 0.47 ± 0.15 in block 1 to 0.93 ± 0.09 in block 4 in LIDO group; from 0.48 ± 0.17 in block 1 to 0.93 ± 0.09 in SCOPO group). A two-way ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Block ($F_{(3,69)} = 63.59$; $P < 0.001$) but no significant effect of factor Drug ($F_{(2,23)} = 0.21$; P n.s.) and no interaction between these factors ($F_{(6,69)} = 0.56$; P n.s.).

Figure 3B shows the results obtained in the groups infused in the EC during acquisition of Task OT2. On this figure, the control group reached the learning criterion of 0.8 in 15 trials (mean ratios of correct responses from 0.38 ± 0.16 in block 1 to 0.88 ± 0.11 in block 4) whereas the SCOPO group only tended to reach the criterion in the fourth block of trials (mean ratios of correct responses from 0.38 ± 0.14 in block 1 to 0.78 ± 0.13 in block 4). In contrast, animals of the LIDO group were strongly impaired in the acquisition of the task (mean ratios of correct responses between 0.40 ± 0.15 and 0.45 ± 0.18 only in blocks 1–4). A two-way ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Drug ($F_{(2,22)} = 33.79$; $P < 0.001$), of factor Block ($F_{(3,66)} = 18.10$; $P < 0.001$) and an interaction between both factors ($F_{(6,66)} = 5.16$; $P < 0.001$). Post hoc tests on within group comparisons revealed a significant difference between block 1 and blocks 2, 3, 4 (all P values < 0.001) in the control group, but only between blocks 1 and 4 ($P < 0.001$) in the SCOPO group. Post hoc tests on between group comparisons also indicated a significant difference between control and LIDO groups in blocks 2, 3, and 4, between

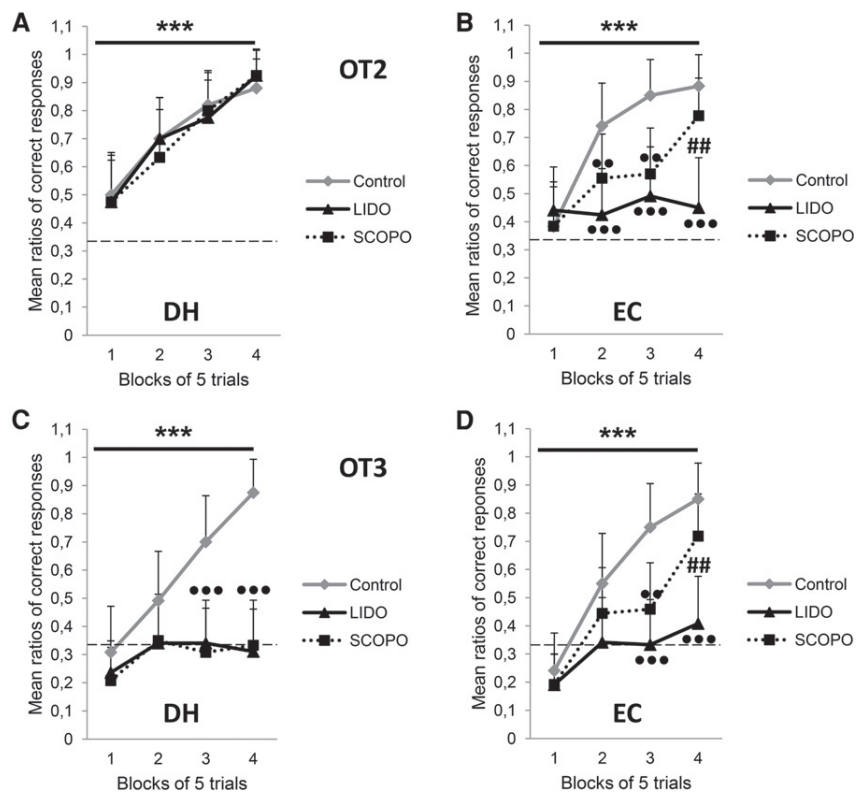


Figure 3. Differential effect of drug infusions into the DH (left) or the EC (right) during the OT acquisition (Task OT2, new stimuli upper part) or recombination (Task OT3, new pairs of familiar stimuli, lower part). The graphs represent the mean ratios of correct responses \pm SEM calculated in each block of five trials in acquisition and recombination tasks. The black solid lines and the black dotted lines represent the results obtained in the groups infused with lidocaine and scopolamine, respectively, while the gray lines represent results obtained in the groups infused with aCSF (control). (A) Acquisition of OT task in the groups infused in the DH with lidocaine ($n = 8$), scopolamine ($n = 8$), and aCSF ($n = 10$). (B) Acquisition of OT task in the groups infused in the EC with lidocaine ($n = 8$), scopolamine ($n = 9$), and aCSF ($n = 9$). (C) Recombination of OT task in the groups infused in the DH with lidocaine ($n = 9$), scopolamine, ($n = 9$) and aCSF ($n = 8$). (D) Recombination of OT task in the groups infused in the EC with lidocaine ($n = 8$), scopolamine ($n = 8$), and aCSF ($n = 9$). Results indicated that lidocaine and scopolamine infusion in the DH impaired the recombination task while lidocaine and scopolamine infusion in the EC impaired and delayed, respectively, both the acquisition and recombination of the OT task. Horizontal dotted lines represent the chance level (0.33). (***) $P < 0.001$ between blocks for each experimental group (A), for control and scopolamine groups (B,D), for control group (C). (•••) $P < 0.01$; (••••) $P < 0.001$ in comparison to control. (##) $P < 0.01$ between scopolamine and lidocaine groups.

control and SCOPO groups in blocks 2 and 3, and between SCOPO and LIDO groups in block 4 (all P values < 0.001).

Comparisons in behavioral performances have been conducted between DH and EC groups for each drug injected. Two-way ANOVAs with repeated measures on LIDO and SCOPO groups revealed a significant effect of factor Structure (LIDO: $F_{(1,14)} = 128.45$; $P < 0.001$ /SCOPO: $F_{(1,15)} = 23.10$; $P < 0.001$), of factor Block (LIDO: $F_{(3,42)} = 7.74$; $P < 0.001$ /SCOPO: $F_{(3,45)} = 24.24$; $P < 0.001$) and an interaction between both factors for LIDO groups (LIDO: $F_{(3,42)} = 6.41$; $P < 0.01$ but SCOPO: $F_{(3,45)} = 0.93$; P n.s.). A two-way ANOVA with repeated measures on aCSF groups revealed a significant effect of factor Block ($F_{(3,48)} = 54.08$; $P < 0.001$) but no significant effect of factor Structure ($F_{(1,16)} = 0.10$; P n.s.) and no significant interaction between both factors ($F_{(3,48)} = 1.83$; P n.s.).

These results showed that neither lidocaine nor scopolamine infusions into the DH disrupted the formation of OT associations with new items. However when infused in the EC, the drugs induced contrasting effects. Whereas lidocaine strongly impaired

acquisition of Task OT2, scopolamine substantially affected the progression of the learning curve and the animals were delayed in reaching the learning criterion. These data suggest that the cholinergic activity in the EC is involved in the processes underlying OT association whereas the DH is not involved in these processes.

Differential effect of lidocaine or scopolamine infusion in the DH and in the EC on Task OT3 acquisition (recombination)

This experiment was aimed at testing the involvement of the DH and the EC in the processes underlying the OT recombination task. The present OT3 task involved reversal learning based on a shift in which the animal had to inhibit the response to previously reinforced items (used in OT1 and OT2; see Fig. 1) and learn to associate a new OT pair, composed of familiar stimuli, with a reward.

Figure 3C shows the results obtained in the groups infused in the DH during the OT recombination task. As shown in the figure, the control group reached the learning criterion of 0.8 in 20 trials (mean ratios of correct responses from 0.31 ± 0.16 in block 1 to 0.88 ± 0.12 in block 4). In contrast, animals in the LIDO and SCOPO groups were markedly impaired in the task as shown by the mean ratios of correct responses that were close to chance level throughout the trials (ranging from 0.24 ± 0.11 in block 1 to 0.31 ± 0.15 in block 4 in LIDO group; and from 0.21 ± 0.12 in block 1 to 0.33 ± 0.16 in block 4 in SCOPO group). A two-way ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Drug ($F_{(2,22)} = 95.58$; $P < 0.001$), of factor Block ($F_{(3,66)} = 13.95$; $P < 0.001$) and an interaction between both factors ($F_{(6,66)} = 5.94$; $P < 0.001$). Post hoc tests on within group comparisons indicated a significant difference between block 1 and blocks 3 and 4 for control group (all P values < 0.001). Post hoc tests on between group comparisons also revealed a significant difference between control group, LIDO and SCOPO groups in blocks 3 and 4 (all P values < 0.001).

Interestingly, analysis of the mean ratios of errors obtained in each block of trials showed in the control group that perseveration behavior toward previously reinforced odor extinguished between blocks 1 and 2 and the new OT–reward association was acquired in the third block of trials ($P < 0.01$ between blocks 1 and 2, $P < 0.001$ between block 1 and blocks 3,4; Fig. 4A) whereas rats infused with lidocaine or scopolamine showed a preference throughout the trials for the cup associated with the odor that was previously rewarded in OT1 and OT2 tasks (P n.s. between blocks in LIDO and SCOPO groups). These data suggest that lidocaine and scopolamine infusions in the DH disrupted the flexibility processes underlying either the reversal odor–reward association and/or the ability to build new OT associations in a context of interference but not the behavioral perseveration process.

Acquisition of hippocampal-dependent task which involve computation of multisensory information such as spatial and contextual memory were found to involve NMDA receptor activation (Wang et al. 2006). However, as presented on the Figure 5, we

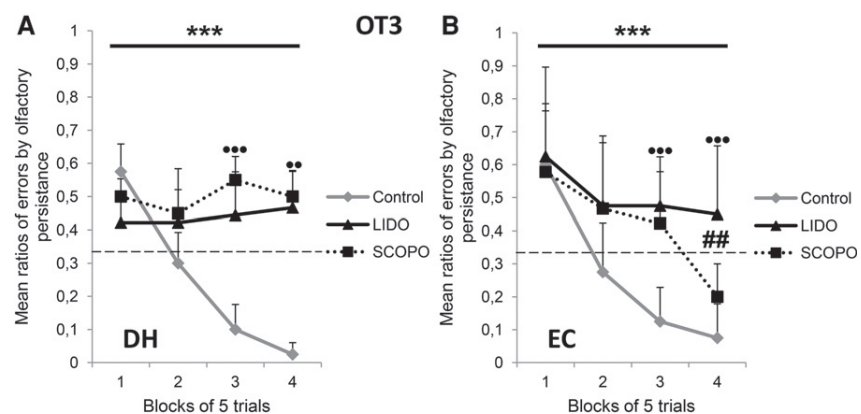


Figure 4. Differential effect of drug injections into the DH (left) or the EC (right) on olfactory persistence observed during the OT recombination. The graphs represent the mean ratios of errors \pm SEM calculated in each block of five trials in the OT recombination task. The black solid lines and the black dotted lines represent the results obtained in the groups infused with lidocaine and scopolamine, respectively, while the gray lines represent results obtained in the groups infused with aCSF (control). (A) Recombination of OT task in the groups infused in the DH with lidocaine ($n = 8$), scopolamine ($n = 9$), and aCSF ($n = 8$). (B) Recombination of OT task in the groups infused in the EC with lidocaine ($n = 8$), scopolamine ($n = 8$), and aCSF ($n = 9$). Using familiar items, animals naturally begin the OT recombination task by digging in the cup containing the previously correct odor. Results indicated that control animals present a rapid strategy adaptation by shifting to the new correct cup while this olfactory persistence is strongly increased by lidocaine infusion in the DH and in the EC, and scopolamine infusion in the DH. This adaptation is only delayed by scopolamine infusion in the EC. Horizontal dotted lines represent the chance level (0.33). (***) $P < 0.001$ between blocks for control group (A) and for control and scopolamine groups (B). (••) $P < 0.01$; (•••) $P < 0.001$ between control and drugs (lidocaine or scopolamine) groups. (##) $P < 0.01$ between scopolamine and lidocaine groups.

showed that local injection of D-APV, a specific NMDA antagonist did not affect the acquisition of OT3. A two-way ANOVA with repeated measures with factor Drug (D-APV or aCSF) and factor Block confirmed this description and revealed a significant effect of factor Block ($F_{(3,45)} = 44.32$; $P < 0.001$) but no significant effect of factor Drug ($F_{(1,15)} = 0.14$; P n.s.) and no interaction between factors ($F_{(3,45)} = 0.64$; P n.s.).

Figure 3D shows the results obtained in the groups infused in the EC during the acquisition of Task OT3. As shown in the figure, the control group reached the learning criterion of 0.8 in 20 trials (mean ratios of correct responses from 0.24 ± 0.13 in block 1 to 0.85 ± 0.13 in block 4) whereas animals in the SCOPO group only tended to reach the criterion in the fourth block of trials (mean ratios of correct responses from 0.19 ± 0.11 in block 1 to 0.72 ± 0.15 in block 4). In contrast, animals in the LIDO group were impaired in the acquisition of the task (as shown by the ratios of correct responses that were close to chance level throughout the trials (ranging from 0.19 ± 0.11 in block 1 to 0.41 ± 0.17 in block 4). A two-way ANOVA with repeated measures revealed a significant effect of factor Drug ($F_{(2,22)} = 21.38$; $P < 0.001$), of factor Block ($F_{(3,66)} = 42.34$; $P < 0.001$) and an interaction between both factors ($F_{(6,66)} = 4.00$; $P < 0.01$). Post hoc tests on within group comparisons revealed a significant difference between block 1 and blocks 2, 3, and 4 ($P < 0.01$; $P < 0.001$ and $P < 0.001$ for the control group and $P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$ for the SCOPO group). Post hoc tests between group comparisons also indicated a significant difference between control and LIDO groups in blocks 3 and 4, between control and SCOPO groups in block 3 (all P values < 0.01) and between SCOPO and LIDO groups in block 4 ($P < 0.01$).

As previously observed in DH control, analysis of the mean ratios of errors obtained in each block of trials showed that, in EC control animals, perseveration behavior toward previously reinforced odor extinguished between blocks 1 and 2 and the new

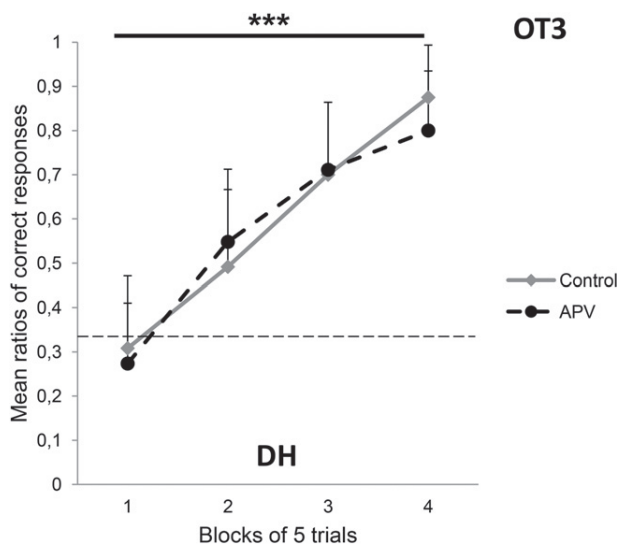


Figure 5. Absence of effect of injection of D-APV into the DH during the OT recombination. The graph represents the mean ratios of correct responses \pm SEM calculated in each block of five trials in the OT recombination task. The black dotted lines represent the results obtained in the groups infused with D-APV while the gray lines represent results obtained in the groups infused with aCSF (control). Recombination of OT task in the groups infused in the DH with D-APV ($n = 9$, 2 μ g of D-APV in 0.6 μ L aCSF, infused immediately before the beginning of the task, as described by Boisselier et al. 2014) and aCSF ($n = 8$). Results indicated that D-APV infusion did not impair the OT recombination task. The dotted line represents the chance level (0.33). (***) $P < 0.001$ between blocks for each experimental group.

OT-reward association was acquired in the third block of trials ($P < 0.001$ between block 1 and blocks 2, 3, 4) (Figure 4B). In contrast, rats infused with lidocaine showed a preference throughout the trials for the cup associated with the odor that was previously rewarded in OT1 and OT2 tasks (P n.s. between blocks) and animals in the SCOPO group showed a preference for the previously reinforced odor during the first three blocks of trials but shifted their choice in the fourth block of trials ($P < 0.001$ between blocks 1 and 4 only). These data show that lidocaine infusion in the EC disrupted the flexibility processes underlying either the reversal odor-reward association and/or the ability to build new OT associations in a context of interference but not the behavioral perseveration process. Moreover, our result suggests that scopolamine treatment delayed OT3 acquisition.

Comparisons in behavioral performances have been conducted between DH and EC groups for each drug injected. A two-way ANOVA with repeated measures on SCOPO groups revealed a significant effect of factor Structure (SCOPO: $F_{(1,15)} = 31.45$; $P < 0.001$), of factor Block (SCOPO: $F_{(3,45)} = 13.62$; $P < 0.001$) and an interaction between both factors for SCOPO groups (SCOPO: $F_{(3,45)} = 5.42$; $P < 0.01$). Two-way ANOVAs with repeated measures on aCSF and LIDO groups revealed a significant effect of factor Block (aCSF: $F_{(3,42)} = 44.89$; $P < 0.001$ /LIDO: $F_{(3,45)} = 4.23$; $P < 0.05$) but no significant effect of factor Structure (aCSF: $F_{(1,14)} = 0.01$; P n.s./LIDO: $F_{(1,15)} = 0.10$; P n.s.) and no significant interaction between both factors (aCSF: $F_{(3,42)} = 0.63$; P n.s./LIDO: $F_{(3,45)} = 0.871$; P n.s.).

As a whole, these data showed that the recombination task critically depends on DH neuronal activity and local muscarinic modulation. Moreover, similarly to what was observed in acquisition of Task OT2, EC activity is required for learning the recombination

task and performances are modulated by muscarinic transmission.

Control unimodal tasks

Absence of effect of lidocaine infusion in the EC on acquisition of unimodal acquisition

The deficit observed on acquisition of OT tasks in EC groups could be due to a disturbance in stimulus-reward association.

To test this hypothesis, two groups of animals received bilateral infusions of lidocaine into the EC during the acquisition of an olfactory or a tactile unimodal task. Naïve groups of animals were used in reference to previous data showing that successive bimodal and unimodal tasks resulted in unstable behavioral performance when switching from one task to another. Figure 6A and B show the results obtained in the various groups during each of these tasks. As shown in the figures, control and LIDO groups similarly reached the learning criterion of 0.8 in a single session of 20 trials. Two-way ANOVAs with repeated measures revealed a significant effect of factor Block (olfactory: $F_{(3,39)} = 25.13$; $P < 0.001$ /tactile: $F_{(3,39)} = 15.95$; $P < 0.001$) but no significant effect of factor Drug (olfactory: $F_{(1,13)} = 0.18$; P n.s./tactile: $F_{(1,13)} = 0.05$; P n.s.) and no significant interaction between both factors (olfactory: $F_{(3,39)} = 0.36$; P n.s./tactile: $F_{(3,39)} = 0.53$; P n.s.).

These results suggest that lidocaine infusion into the EC did not affect the acquisition of unimodal olfactory or tactile task.

Absence of effect of lidocaine infusion in the DH and in the EC on unimodal reversal learning

Solving the recombination task required a reversal learning process. Perturbation of this process could potentially explain the impairment observed in the recombination task with lidocaine infusion in the DH and in the EC. To test this hypothesis, four groups of animals received bilateral infusions of lidocaine into the DH or EC during the reversal of an olfactory or a tactile unimodal task acquired previously. Figure 6C, D, E, F show the results obtained in the various groups during each of the olfactory and tactile tasks. As shown in the figures, control and LIDO groups similarly reached the learning criterion of 0.8 in a single session of 20 trials. Two-way ANOVAs with repeated measures revealed a significant effect of factor Block (olfactory EC: $F_{(3,45)} = 36.29$; $P < 0.001$ /olfactory DH: $F_{(3,48)} = 33.69$; $P < 0.001$ /tactile EC: $F_{(3,48)} = 24.52$; $P < 0.001$ /tactile DH: $F_{(3,45)} = 33.81$; $P < 0.001$) but no significant effect of factor Drug (olfactory EC: $F_{(1,15)} = 1.00$; P n.s./olfactory DH: $F_{(1,16)} = 0.02$; P n.s./tactile EC: $F_{(1,16)} = 0.01$; P n.s./tactile DH: $F_{(1,15)} = 0.10$; P n.s.) and no significant interaction between these factors (olfactory EC: $F_{(3,45)} = 0.40$; P n.s./olfactory DH: $F_{(3,48)} = 0.20$; P n.s./tactile EC: $F_{(3,48)} = 0.28$; P n.s./tactile DH: $F_{(3,45)} = 0.95$; P n.s.) in the DH and EC groups.

These results suggest that lidocaine infusion into the DH or in the EC did not affect reversal learning of unimodal olfactory or tactile tasks. Therefore, the deficit obtained in Task OT3 was unlikely due to impairment in the flexibility processes underlying the reversal learning of odor- or tactile-reward associations.

Histology

At the end of the experiments, position of each cannula was checked and reported on two plates from the Paxinos and Watson atlas (2004; AP -3.60 (DH) and -7.04 (EC)). In the DH group, infusion sites were mostly centered in the CA1 region or close to the limit between the CA1 and the dentate gyrus ($n = 5$) (Fig. 7A). In the EC group, infusion sites were mostly centered in the lateral part of the EC (Fig. 7B). All infused animals were included in the final statistical analyses.

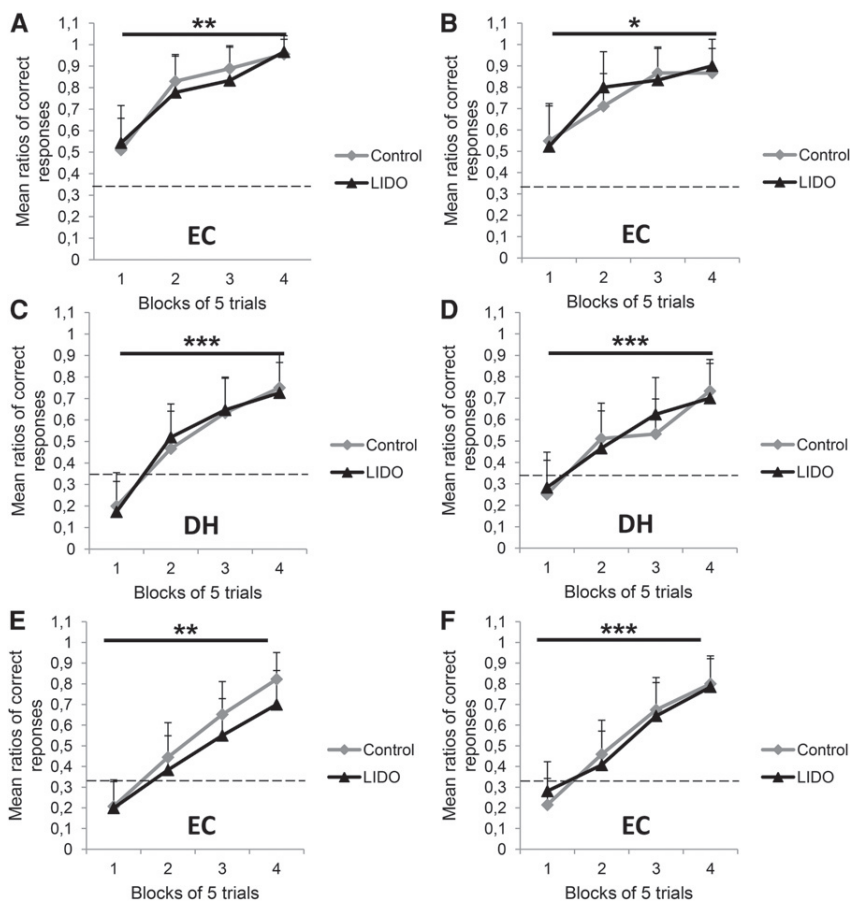


Figure 6. Absence of effect of lidocaine infusion into the DH (left) or the EC (right) during unimodal olfactory and tactile acquisition and reversal tasks. The graphs represent the mean ratios of correct responses \pm SEM calculated in each block of five trials in the olfactory and tactile tasks. The black lines represent the results obtained in the groups infused with lidocaine while the gray lines represent results obtained in the groups infused with aCSF (control). (A,B): Acquisition of unimodal olfactory (A) and tactile (B) tasks in the groups infused in the EC with lidocaine ($n = 6$) and aCSF ($n = 9$). (C,D): Reversal of unimodal olfactory (C) and tactile (D) tasks in the groups infused in the DH with lidocaine (olfactory $n = 10$; tactile $n = 8$) and aCSF (olfactory $n = 8$; tactile $n = 9$). (E,F): Reversal of unimodal olfactory (E) and tactile (F) tasks in the groups infused in the EC with lidocaine (olfactory $n = 8$; tactile $n = 8$) and aCSF (olfactory $n = 9$; tactile $n = 9$). Results indicated that lidocaine infusion in the DH or in the EC did not impair the acquisition nor the reversal of unimodal olfactory and tactile tasks. The dotted line represents the chance level (0.33). (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$ between blocks for each experimental group.

Discussion

The ease with which rats solved acquisition and recombination tasks suggest that it solicited quite behavioral-relevant cognitive functions. In these conditions, the present study shows distinct roles and mechanisms supported by the DH and the EC in the acquisition and recombination of olfactory–tactile associations in the rat. In accordance with a previous study (Boisselier et al. 2014) the results show that the EC plays a critical role in the processes underlying the formation of OT associations. In contrast, the DH does not appear to be involved in the formation of OT associations, but its action appears critical for supporting the flexibility processes underlying recombination of previously learned OT associations. Moreover, we bring information on intra DH and EC mechanisms involved in these processes. Muscarinic blockade in the DH totally disrupted the recombination task while muscarinic blockade in the EC partly impaired acquisition.

Moreover, while DH neural activity is required for the recombination task, it is independent from NMDA receptor activation.

Neither the DH nor the EC were required for unimodal olfactory and unimodal tactile acquisition and reversal unimodal learning. This indicates that the deficit obtained during the cross-modal recombination task was not due to a deficit in sensory processing, to an inability to discriminate between different olfactory or tactile stimuli, or to a general disturbance in behavioral flexibility.

Role of the DH and the EC in the acquisition of OT associations

The present results showed that the DH is not involved in the acquisition of the OT task with new items since neither transitory inactivation nor muscarinic blockade affected performances when compared with control. In addition, DH inactivation did not impair unimodal olfactory and tactile discrimination. This is in contrast with electrophysiological recordings showing that activity increases in the DH during tactile processing (Pereira et al. 2007) and tactile discrimination enhanced coherence between S1 and the DH in parallel with improvement in performances (Grion et al. 2016). However, the later study relied on a task involving spatial component since animals had to indicate their choice with a go right/go left behavioral response. Our unimodal and bimodal tasks included no spatial component. Other studies suggest that the DH could be implicated in disambiguation tasks with overlapping elements (Agster et al. 2002; Newmark et al. 2013). Theoretically, this could be the case in the present study since the same odorant and the same texture were present in two of the three cups. The absence of effect of DH inactivation on the acquisition of cross-modal OT task with new items

could be due to the fact that the task can be solved without taking into account any contextual or sequential information which have been shown to be of importance in hippocampal-dependent disambiguation of overlapping elements (Dees and Kesner 2013; Newmark et al. 2013; Van Hagen et al. 2015).

In the EC, the effect of scopolamine suggests that activation of the cholinergic system originating from the basal forebrain is involved in the formation of memories with novel items. This is agreement with a recent study based on associative eye-blink conditioning (Tanninen et al. 2015) even though the dose of scopolamine required for delaying the acquisition of the eye-blink conditioning was much higher than the one used in the present study ($36 \mu\text{g}$ versus $7.5 \mu\text{g}/\text{EC}$). Since acquisition of new OT pairs requires activation of NMDA receptors in the LEC (Boisselier et al. 2014), we can suspect that this cholinergic modulation is important because of the well-established role of cholinergic modulation of the theta rhythm during exploration, which in turn

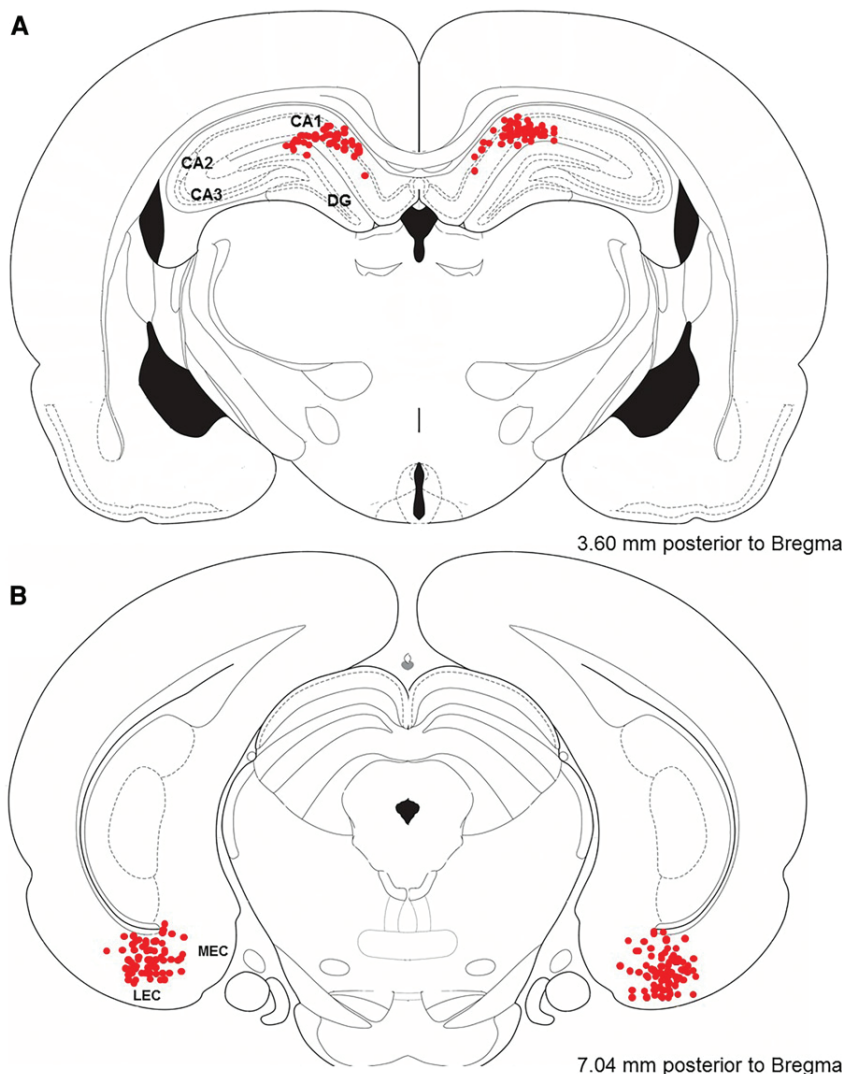


Figure 7. Frontal sections of the brain showing all injection site locations (small solid circles) in the different groups DH (A) and EC (B). The different plates were adapted from Paxinos and Watson (2004).

allows the induction of LTP/LTD NMDA-dependent mechanisms (Leung et al. 2003; Hasselmo 2006).

In accordance with previous studies based on lesion experiments of the lateral EC (Staubli et al. 1984; Ferry et al. 2006), our results confirmed the observation that the EC is not critical for simple olfactory discrimination. Simple associative olfactory learning has been shown to be mediated by structures such as the olfactory bulb (Gray and Freeman 1986; Gervais et al. 1988; Martin et al. 2004), the piriform cortex (Litaudon et al. 1997; Wilson and Sullivan 2011), and the amygdale (Cousens and Otto 1998; Hegoburu et al. 2014). Similarly, we showed that EC inactivation did not impair tactile discrimination and tactile associative learning.

As a whole, our data suggest that the EC is part of the neurobiological substrate underlying the formation of cross-modal associations, and that the role of the EC in this process is modulated by the cholinergic system. However, one may ask whether the EC could also be involved in unimodal associative learning involving two stimuli of the same nature such as tactile–tactile pairs. Also, it remains unclear whether the effects observed in the EC are selec-

tive of the lateral or/and the medial part of the EC. Future experiments based on the effect of selective NMDA system blockade in each part of the EC during our task will help to make that point clear. Recent studies on rodent lateral and medial EC function concluded that in recognition memory paradigms, damage to the lateral EC impairs recognition of the combined information of objects and environmental contexts relevant to the content of an experience whereas damage to medial EC preferentially impairs the recognition of the spatial arrangement of objects relevant to the spatial location of an experience (Wilson et al. 2013; Knierim et al. 2014; Morrissey and Takehara-Nishiuchi 2014). Our results do not fit completely with this interpretation since the EC was found here to be involved in object discrimination with no spatial and contextual cues. This discrepancy could be due to at least two reasons. First, classical object recognition tasks are mainly based on visual cues (shape, color) whereas the olfactory information, which is largely processed in the lateral EC (Schwerdtfeger et al. 1990), is of prime importance in the OT task. Second, in addition to differences in the EC manipulation technique (transient inactivation versus lesion), another important variable could be the difficulty of the task. In the version of novel object recognition rats had to discriminate between “junk” objects presenting fairly different color, texture, shape, and possibly odors and lesion to the lateral EC had no effect (Wilson et al. 2013). In the present study, object recognition was based on olfactory and tactile combinations presenting overlapping elements. This suggests that the role of the EC and presumably more specifically of the lateral EC in object discrimination could depend on

the richness (bimodal, trimodal, quadrimodal), the nature (olfactory versus visual) of information, and/or the degree of similarities (interferences) between the objects that have to be recognized. In this perspective, this is likely by preventing interferences between overlapping elements that the muscarinic modulation (Hasselmo 1999; Hasselmo and McGaughy 2004) of the EC was here found to sustain optimal acquisition of the OT tasks.

Role of the DH and the EC in the recombination task

Solving the recombination task required from the animal at least two cognitive processes: (i) reversal learning leading to inhibit the response previously reinforced olfactory and tactile items; (ii) learning new OT associations in a context of high interference with previously learned items. Control rats solved this task within a single 20 trial learning session showing high cognitive flexibility. A careful observation of our data showed that most of the errors occurring in the first trials corresponded to behavioral perseveration toward previously reinforced odor. This was expressed by scores below the chance level in block 1 (Figs. 3C,D, 4A,B). During the second block of trials, control animals started to

inhibit their response to previously reinforced odors and shift their choice toward newly reinforced OT pair.

Concerning the neural basis supporting this behavioral flexibility, we found that both EC and DH manipulations affected performances through different mechanisms.

At the DH level, lidocaine inactivation or local muscarinic blockade completely abolished the animals' ability to solve the task. This was expressed throughout the trials by a persistency in choosing a previously reinforced odor. Interestingly, persistence toward the previously reinforced tactile cue was rarely observed. The effect of DH inactivation was not resulting from a deficit in reversal process per se since the same treatment did not impair unimodal reversal learning. Similarly, this behavioral perseveration was not resulting from a deficit in the acquisition of OT associations since formation of these associations was shown to be DH independent. This leads us to the conclusion that one critical process altered by DH inactivation or local muscarinic system inhibition is proactive interference in a complex cross-modal associative task. In normal conditions, the action of the DH seems to result in the neglecting of previously learned items allowing for the formation of new ones with familiar and overlapping elements. This is in accordance with several sets of data showing that muscarinic modulation is involved in the learning of new information preventing interference with previously stored memories (Hasselmo 1999, 2006; Hasselmo and McGaughy 2004; Hasselmo and Sarter 2011). These experiments demonstrated that the cholinergic modulation was critical for supporting NMDA-dependent mechanisms for memory storage such as those described in the piriform cortex, for example. However in the present experiment, the recombination critically depends on cholinergic modulation in the DH but was not NMDA-dependent at this level while it is the case at the EC level. The fact that EC inactivation also impaired the recombination task is likely due to the importance of the EC in the formation of any new OT associations. At the DH level, the recombination task did not require the activation of NMDA receptors, while the same treatment into the EC strongly impaired formation of OT associations (Boisselier et al. 2014). While most DH dependent tasks are found to be NMDA-dependent (Morris 2013), it does not seem to be the case for the OT recombination task.

As a whole, the data suggest that during the recombination task, the DH provides critical information to the EC allowing the formation in the EC of NMDA-dependent new cross-modal neural assemblies in the EC in the context of interferences. In this view, the recombination task could critically depend on fine DH–EC interactions under control of the cholinergic system. This hypothesis is supported by recent electrophysiological studies showing fine coordination of neural activity between the DH and the EC during associative olfactory learning (Igarashi et al. 2014; Miao et al. 2015). Olfactory–tactile associative learning could also involve direct reciprocal innervation between the piriform cortex and the barrel cortex (Wang et al. 2015). In this perspective, the behavioral paradigm offers an interesting working model to investigate the neural dynamic which could support in the hippocampal formation and in sensory areas acquisition and recombination of olfactory–tactile associations.

Materials and Methods

Animals

Young adult male Wistar rats ($n = 119$, Charles River, France) weighing 250–300 g were used. Fifty-three animals were subjected to bimodal olfactory–tactile learning and 66 for unimodal olfactory or tactile learning. Animals were housed in a standard home cage (380 mm long \times 380 mm wide \times 160 mm high, $21^\circ\text{C} \pm 1.5^\circ\text{C}$ and $55\% \pm 10\%$ wet) in groups of four or five and

were maintained on a 12–12 h inverted light–dark. After habituation to the housing condition, animals were food deprived to 90% of their free-feeding weight with free access to water. Testing took place during the dark phase of the cycle between 9 a.m. and 2 p.m. All procedures involving animals and their care conformed to the institutional guidelines, which comply with international laws and policies (directive 2010/63/European Community) and have been approved by the ethics committee of the Université Claude Bernard Lyon 1 (C2EA-55), permission references: (DR2014–30-V1).

Apparatus

The experimental cage consisted of a gray polyvinyl chloride (PVC) rectangular box (500 mm long \times 500 mm wide \times 400 mm high). A removable door (500 mm long \times 400 mm high) allowed the experimenter to divide the cage into two compartments: the main one in which three cups were placed and the smaller one as the starting box. To minimize any visual discrimination, the room was lit by a red light (40 W) and no obvious extramaze cues were made available. Cups consisted of PVC cylinders 90 mm high with an outer diameter of 60 mm. Each cup was filled with molten steel and paraffin used as ballast so that the cup would not tip when the rat explored it. All cups were of exactly the same size, shape, and gray color. A grid was placed at the bottom of the cup, just above the paraffin. In the baited cup, a small piece of food pellet (Kellogg's Special K) was placed above the grid. In the other two nonbaited cups, the pellet was placed under the grid so the animals could not reach it. Cups were filled with clean litter and animals could reach the food in one cup only, named the baited cup. The cage was equipped with a video system allowing post-experiment behavioral analysis.

Learning tasks

Generalities

The task has been described in detail in a previous paper (Boisselier et al. 2014). The paradigm is based on the rats' natural digging abilities to find food in its environment, to be attracted by novelty and to explore new environments spontaneously by whisking and sniffing (Dusek and Eichenbaum 1997). In our task, animals are encouraged to dig cups filled with litter to find the hidden food reward accessible in only one of them, basing their choice on specific and well-controlled sensory cues represented by an odor, a texture or an odor–texture combination.

For the cross-modal olfactory–tactile task, each cup was characterized by a specific combination of an olfactory and a tactile cue. Olfactory stimulus was represented by 150 μL of an odorant solution (obtained by diluting a pure solution in mineral oil at one-tenth) dropped on a filter paper placed under the grid of each cup. Four different odorant stimuli were used: anethol (Fluka), limonene (-) (Fluka), geraniol (Sigma-Aldrich), and peppermint (Sigma-Aldrich). The tactile stimuli were represented by 2-cm wide bands of different textures of the same color placed around each cup, 1 cm away from the upper border. Four different textures were used: sandpaper with two different grit sizes (smooth or rough) and bands of grid with two different wire nettings (flexible or tight).

For the unimodal tasks, each of the three cups contained a different odorant (unimodal olfactory task) or was wrapped in a different texture (unimodal tactile task) and only one was baited (contained the accessible reinforcement). For both bimodal and unimodal tasks, the position of each cup changed randomly from trial to trial. Consequently, the task included not spatial component.

Pretraining

Pretraining took place over three consecutive days and consisted in training the animals to dig to get the reward after a few trials. In this phase, the cups did not present any olfactory or tactile characteristics.

Discrimination tasks

Bimodal olfactory–tactile (OT) task: acquisition of OT task took place the day after pretraining session and consisted in the presentation of three cups, each presenting a different OT combination and only one of which was baited so that the animal had to learn to associate one out of three specific OT combinations to reach the reinforcement.

For a given animal and for a given task, the same set of stimuli and the same baited cup were used throughout the trials. Importantly, for each task the same odorant (i.e., O1) was presented in two cups and the same texture (i.e., T1) was also presented in two cups. This led to the following combinations: cup 1: O1T1; cup 2: O2T1; cup 3: O1T2. In the case where cup 1 was baited, the rat had to associate selectively the O1T1 combination while avoiding cup 2 and cup 3 each presenting an overlapping element.

Under the same experimental conditions, each rat had to solve successively three different tasks. During Task OT1 and OT2, animals learned to associate one particular OT combination with the reinforcement. Each task used a different set of OT combinations, the choice of the sets being counter-balanced between tasks. In Task OT3 (recombination task), items previously used in Task OT1 and OT2 were recombined to form new OT associations. For Task OT3, two sets of OT recombination were used. Half of the animals were exposed to one and the other half to another (Fig. 1).

Fifty-three animals bilaterally implanted in the DH ($n = 26$) and in the EC ($n = 27$) were microinfused with lidocaine, scopolamine, or artificial cerebrospinal fluid (aCSF, control) 5 min before the first trial of the acquisition of OT2 and OT3 (recombination task). A within-subject pharmacological design was used in order for each animal to receive randomly one of each drug during each task. With this design, each animal received the three drugs during the three tasks, but with a different drug per task.

Unimodal olfactory and tactile tasks: acquisition of the tasks consisted in the presentation of three cups each presenting different odors or textures and only one of which was baited so that the animals had to learn to associate one out of three different olfactory or tactile stimuli to the reinforcement and avoid the other two. The choice of the reinforced stimulus was counter-balanced between animals.

Under the same experimental conditions each rat had to solve successive unimodal olfactory and tactile reversal tasks. This reversal task consisted in teaching the animal to associate one of the two familiar stimuli that were not baited before with the reinforcement. Each animal learned the olfactory and the tactile tasks in a random order and reversed both of these unimodal tasks. The reinforced stimulus was counter-balanced between animals.

According to the results obtained in OT tasks, 66 control animals bilaterally implanted in the EC ($n = 48$) and in the DH ($n = 18$) received microinfusions of lidocaine (LIDO) or aCSF (control) 5 min before the first trial of the acquisition or reversal of unimodal tasks. For unimodal acquisition tasks, half of the animals were injected with lidocaine, and the other half with aCSF. For the reversal tasks, an animal injected with aCSF for the first reversal received lidocaine for the second one and vice versa.

Each daily session included 20 trials and lasted for ~20 min. On each trial the three cups were placed on an equilateral triangle at the opposite end of the door. To avoid any spatial recognition of the cups, the position of each cup was pseudorandomly changed across trials, so that each cup took up one out of the three positions with the same frequency throughout each session. Opening the removable door marked trial onset. The trial ended as soon as the rat dug in one of the cups or after 120 sec when the animal made no choice. Then the rat was gently brought back behind the door and locked.

For each trial, two variables were recorded: the type of cup that was dug in (correct or incorrect) and the response latency (in seconds) corresponding to the time elapsed between the beginning of the trial and the rat's choice. For both bimodal and unimodal tasks, the learning criterion corresponded to four correct responses obtained upon five consecutive trials (ratio of 0.8).

Surgery

All surgical procedures were conducted by authorized personnel under optimal aseptic, analgesic, and ethical animal care conditions (Ferry et al. 2014). Animals were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) infusion (0.2 mL/100 g) of a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and fixed in a stereotaxic frame in the flat skull position. In the group Dorsal Hippocampus (DH, $n = 44$), stainless steel guide cannulas (23 gauge, 7 mm long; CMA/12, CMA) were bilaterally placed 1.5 mm above the DH at the following coordinates: antero-posterior -3.8 mm relative to Bregma, medio-lateral ± 2.5 mm from midline, dorso-ventral -2.2 mm from skull surface. In the group Entorhinal Cortex (EC, $n = 73$): stainless steel cannulas (23 gauge, 12 mm long; CMA/12, CMA) were bilaterally implanted 1.5 mm above the EC at the following coordinates: antero-posterior -7.5 mm relative to Bregma, medio-lateral ± 5.5 mm from midline, dorso-ventral -6.5 mm from skull surface according to the Paxinos and Watson atlas (2004). The cannulas were fixed to the skull with dental acrylic cement and anchored with two surgical screws placed in the skull. Stylets were inserted into the guide cannulas to prevent blockage during the post-surgical recovery period. The animals were allowed 10 d of post-surgical recovery during which they were regularly handled.

Microinfusions

Implanted animals received bilateral microinfusions as follows: while gently handled, infusion needles (30 gauge) were inserted to a depth of 1.5 mm beyond the tips of the guide cannula and connected via polyethylene tubing to a 10 μ L Hamilton syringe driven by an automated syringe pump.

Animals in DH group were divided in three subgroups according to the type of drug they received. Animals of the DH LIDO group were infused with 16 μ g of monohydrate hydrochloride lidocaine (Sigma; $n = 8$ for Task OT2 and $n = 9$ for Task OT3) dissolved in 0.4 μ L sterile artificial cerebrospinal fluid (aCSF). Animals of the DH SCOPO group (Sigma; $n = 8$ for Tasks OT2 and OT3) were infused with 3 μ g of hydrobromide scopolamine dissolved in 0.4 μ L sterile aCSF and animals of the DH control group received 0.4 μ L sterile aCSF (Sigma; $n = 10$ for Task OT2 and $n = 8$ for Task OT3). All infusions were delivered over a period of 60 sec. Drug concentrations were chosen according to previous data (Packard and McGaugh 1996).

Animals in the EC group were divided in three subgroups according to the type of drug they received. Animals of the EC LIDO group ($n = 8$ for Tasks OT2 and OT3) and EC SCOPO group ($n = 9$ for Tasks OT2 and OT3) were infused with 24 μ g of monohydrate hydrochloride lidocaine and 7.5 μ g of hydrobromide scopolamine, respectively, dissolved in 0.6 μ L aCSF. Animals in the EC control group were infused with 0.6 μ L aCSF ($n = 9$ for Task OT2 and $n = 8$ for Task OT3). Infusions were delivered over a period of 60 sec.

The infusion needle was then left in place at the infusion site for an additional 60 sec. After the end of the infusion procedure, each animal was gently placed in the experimental cage and the trial started. Repeated infusions in the same animal were separated by 48 h.

Control of experimental bias

Ten days after surgery, animals performed an OT1 reacquisition session without any infusion (OT1r control) to ensure anesthesia and post-operative recovery period did not alter performances.

The cups presented the same visual characteristics and the experimental room was lit with red light. To control incidental olfactory bias (scent left by the rat on the baited cup) by which animals could localize the baited cup, all cups were regularly cleaned with alcohol 70%, the litter was changed every four trials and each cup was similarly manipulated by the experimenter between each trial. Also, the nonbaited cups contained a piece of cereal similar to this used for reinforcement but placed under the grid so the animals could not reach it. Probe tests where the cup with the correct OT combination procured no reward were randomly inserted between standard trials. Importantly, a piece of cereal was still

present into the two nonbaited cups. When the rat showed a correct response the reward was manually given after the trial.

Histology

A week after the end of the experiment, animals were given an overdose of sodium pentobarbital (100 mg/kg; i.p. injection) and were transcardially perfused with 50 mL of 0.9% saline (w/v) solution (4°C) followed by 50 mL of phosphate-buffered 4% paraformaldehyde (pH 7.4; 4°C). Brains were then extracted, post-fixed for 4 h in the same fixative (4°C) and transferred into a 0.1 M phosphate-buffered 20% sucrose (w/v) solution for ~36 h (4°C) for cryoprotection. All brains were then frozen using isopentane (−40°C) and 20 μm coronal sections were cut on a freezing microtome (−23°C) and collected onto gelatine-coated slides. These sections were dried at room temperature and stained with cresyl violet. A microscopic inspection was then performed to determine the location of the cannulas track placement.

Statistical analysis

All analyses were performed with Systat 12.0. Variables “Mean ratios of correct responses” and “Mean response latencies” were averaged in four blocks of five successive trials. Data obtained in OT1 acquisition were analyzed with a two-way repeated-measures ANOVA (Systat 12.0) with Day as the between-subjects factor and Block as the within-subjects factor, followed by one-way ANOVAs and post hoc Bonferroni tests for pairwise intragroup comparisons. Data obtained in OT1 recall, OT2 and OT3 acquisition were analyzed with a two-way repeated-measures ANOVA (Systat 12.0) with Drug as the between-subjects factor and Block as the within-subjects factor, followed by one-way ANOVAs and post hoc Bonferroni tests for pairwise intragroup and intergroup comparisons. The “First approach” variable was analyzed with one-way ANOVA. Data obtained with probe tests were compared to standard trials with independent *t*-tests. Homogeneity of variances has been tested by a Levene’s test for factor Drug and for factor Block for the results obtained for OT2 and OT3. A probability level of <0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the contribution of Ounsa Jelassi-Ben-Hellal for animal care and Anna Andrea Obe-Gervais for proofreading. Grant sponsor: LABEX CORTEX of Universite de Lyon; Grant No. ANR-11-LABX-0042; Grant sponsor: “Investissements d’Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR); Grant No. ANR-11-IDEX-0007.

References

Agster K-L, Fortin N, Eichenbaum H. 2002. The hippocampus and disambiguation of overlapping sequences. *J Neurosci* **22**: 5760–5768.

Boisselier L, Ferry B, Gervais R. 2014. Involvement of the lateral entorhinal cortex for the formation of cross-modal olfactory-tactile associations in the rat. *Hippocampus* **24**: 877–891.

Bunsey M, Eichenbaum H. 1996. Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature* **379**: 255–257.

Cousens G, Otto T. 1998. Both pre and post training excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **112**: 1092–1103.

Dees R, Kesner R. 2013. The role of the dorsal dentate gyrus in object and object-context recognition. *Neurobiol Learn Mem* **106**: 112–117.

Diamond M, von Heimendahl M, Knutsen P, Kleinfeld D, Ahissar E. 2008. Where and what in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci* **9**: 601–612.

Dusek J, Eichenbaum H. 1997. The hippocampus and memory for orderly stimulus relations. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 7109–7114.

Easton A, Webster A, Eacott R. 2012. The episodic nature of episodic-like memories. *Learn Mem* **19**: 146–150.

Ferry B, Ferreira G, Trissard N, Majchrak M. 2006. Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* **120**: 1180–1186.

Ferry B, Gervasoni D, Vogt C. 2014. *Stereotaxis neurosurgery in laboratory rodent—Handbook on best practices*. Springer Verlag Intl, New York.

Fortin N, Agster K-L, Eichenbaum H. 2002. Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat Neurosci* **5**: 458–462.

Gaykema R, Luiten P, Nyakas C, Traber J. 1990. Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol* **293**: 103–124.

Gervais R, Holley A, Keever B. 1988. The importance of central noradrenergic influences on the olfactory bulb in the processing of learned olfactory cues. *Chem Senses* **13**: 3–12.

Gilbert P, Kesner RP. 2002. Role of the rodent hippocampus in paired-associate learning involving associations between a stimulus and a spatial location. *Behav Neurosci* **116**: 63–71.

Gray C, Freeman W. 1986. Chemical dependencies of learning in the rabbit olfactory bulb, acquisition of the transient spatial pattern change depends on norepinephrine. *Behav Neurosci* **100**: 585–596.

Grion N, Akrami A, Zuo Y, Stella F, Diamond M. 2016. Coherence between rat sensorimotor system and hippocampus is enhanced during tactile discrimination. *PLoS Biol* **14**: e1002384.

Hasselmo M. 1999. Neuromodulation—acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* **3**: 351–359.

Hasselmo M. 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. *Cur Opin Neurol* **16**: 710–715.

Hasselmo M, McLaughly J. 2004. High acetylcholine circuit dynamics for attention and encoding, Low acetylcholine sets dynamics for consolidation. *Prog Brain Res* **145**: 207–231.

Hasselmo M, Sarter M. 2011. Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. *Neuropsychopharmacology* **36**: 52–73.

Hegoburu C, Parrot S, Ferreira G, Mouly A-M. 2014. Differential involvement of amygdala and cortical NMDA receptors activation upon encoding in odor fear memory. *Learn Mem* **21**: 651–655.

Igarashi K, Colgin L, Moser M-B, Moser E. 2014. Coordination of entorhinal hippocampal ensemble activity during associative learning. *Nature* **510**: 143–147.

Knierim JJ, Neunuebel JO, Deshmukh SS. 2014. Functional correlates of the lateral and medial entorhinal cortex: objects, path integration and local—global reference frames. *Phil Trans R Soc B* **369**: 20130369.

Leung L, Shen B, Rajakumar N, Ma J. 2003. Cholinergic activity enhances hippocampal long-term potentiation in CA1 during walking in rats. *J Neurosci* **23**: 9297–9304.

Litaudon P, Mouly A-M, Sullivan R, Gervais R, Cattarelli M. 1997. Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. *Eur J Neurosci* **9**: 1593–1602.

Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N. 2004. Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb—a correlate of odor recognition. *J Neurosci* **24**: 389–397.

McDonald R, Murphy R, Guarraci F, Gortler J, White N, Baker A. 1997. Systematic comparison of the effects of hippocampal and fornix-fimbria lesions on acquisition of three configural discriminations. *Hippocampus* **7**: 371–388.

Miao C, Cao Q, Ito H, Yamahachi H, Witter M, Moser M-B, Moser E. 2015. Hippocampal remapping after partial inactivation of the medial entorhinal cortex. *Neuron* **88**: 590–603.

Morris RGM. 2013. NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacol* **74**: 32–40.

Morris R, Garrud P, Rawlins J, O’Keefe J. 1982. Place-navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**: 681–683.

Morrisey M, Takehara-Nishiuchi K. 2014. Diversity of mnemonic function within the entorhinal cortex: a meta-analysis of rodent behavioral studies. *Neurobiol Learn Mem* **115**: 95–107.

Newmark R, Schon K, Ross R, Stern C. 2013. Contributions of the hippocampal subfields and entorhinal cortex to disambiguation during working memory. *Hippocampus* **23**: 467–475.

Paxinos G, Watson CR. 2004. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 5th ed., Elsevier Academic, London.

Packard M, McGaugh J. 1996. Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* **65**: 65–72.

Pereira A, Ribeiro S, Wiest M, Moorer L, Pantoja J, Lin S-C, Nicolelis M. 2007. Processing of tactile information by the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 18286–18291.

Phillips R, LeDoux J. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **106**: 274–285.

Schwerdtfeger W, Buhl EH, Germroth P. 1990. Disynaptic olfactory input to the hippocampus mediated by stellate cells in the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* **292**: 163–177.

Slotnick B. 2001. Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends Neurosci* **5**: 216–222.

- Staubli U, Ivy G, Lynch G. 1984. Hippocampal denervation causes rapid forgetting of olfactory information in rats. *Proc Natl Acad Sci* **81**: 5885–5887.
- Tanninen S, Yu X, Giritharan T, Bakir R, Volle J, Morrissey M, Takehara-Nishiuchi K. 2015. Cholinergic, but not NMDA, receptors in the lateral entorhinal cortex mediates acquisition in trace eye conditioning. *Hippocampus* **25**: 1456–1464.
- Van Hagen B, van Goethem N, Lagatta D, Prickaerts J. 2015. The object pattern separation (OPS) task, a behavioral paradigm derived from the object recognition task. *Behav Brain Res* **285**: 44–52.
- Veyrac A, Allerborn M, Gros A, Raguét L, Kenney J, Godinot F, Thevenet M, Garcia S, Messaoudi B, Laroche S, et al. 2015. Memory of occasional events in rats—individual episodic memory profiles, flexibility and neural substrate. *J Neurosci* **35**: 7575–7586.
- Wang H, Hu Y, Tsien J. 2006. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* **79**: 123–135.
- Wang D, Zhao J, Gao Z, Chen NA, Wen B, Lu W, Lei Z, Chen C, Liu Y, Feng J, et al. 2015. Neurons in the barrel cortex turn into processing whisker and odor signals: a cellular mechanism for the storage and retrieval of associative signals. *Front Cell Neurosci* **9**: 1–17.
- Wilson D, Sullivan R. 2011. Cortical processing of odor objects. *Neuron* **72**: 506–519.
- Wilson DIG, Watanabe S, Milner H, James A, Ainge JA. 2013. Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus* **23**: 1280–1290.
- Witter M. 1993. Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* **3**: 33–44.

Received June 24, 2016; accepted in revised form August 17, 2016.

RESUME

L'objectif de cette thèse est d'étudier l'implication de deux structures de la formation hippocampique, le cortex entorhinal latéral (CEL) et l'hippocampe dorsal (DH), dans les processus sous-tendant la formation et la flexibilité d'associations entre deux stimuli de modalités sensorielles différentes : l'olfaction et le toucher. Pour cela, une tâche bimodale olfacto-tactile (OT) est développée chez le rat. Dans celle-ci, l'animal doit apprendre à identifier une combinaison "odeur-texture" spécifique parmi les trois proposées afin d'obtenir un renforcement (ex: O1T1+ O2T1 O1T2, + désignant la combinaison renforcée). Aucun indice spatial ou contextuel n'est pertinent pour résoudre cette tâche. Suite à l'acquisition de deux tâches différentes, les stimuli sont réassociés sous forme de combinaisons inédites dans une troisième tâche appelée « recombinaison ». La manipulation pharmacologique de l'activité du CEL a mis en évidence l'implication des systèmes glutamatergique NMDA et cholinergique de cette structure dans les processus sous-tendant ces deux types de tâche. En revanche, si le DH n'est pas indispensable pour l'acquisition, son système cholinergique est critique pour la recombinaison. En comparaison avec l'acquisition, l'étude électrophysiologique a montré que la recombinaison repose sur un découplage de la synchronisation entre les activités oscillatoires du CEL et celles du DH dans la bande thêta (5-12 Hz). De plus, cet apprentissage est associé à une augmentation de l'amplitude des oscillations bêta (15-45 Hz) dans le CEL. Ces travaux montrent que le CEL et le DH interviennent dans les processus sous-tendant la flexibilité des représentations bimodales.

Mots clés : *Mémoire cross-modale, Olfactif, Tactile, Cortex entorhinal latéral, Hippocampe dorsal, Neuropharmacologie, Dynamique neuronale, Rat*

ABSTRACT

The goal of this thesis is to study the involvement of two structures of the hippocampal formation, the lateral entorhinal cortex (LEC) and the dorsal hippocampus (DH), in the processes underlying the formation and the flexibility of associations of stimuli between two different sensory modalities. To this aim, a new olfactory-tactile (OT) bimodal task has been developed in the rat. To solve the task, animals have to identify one "odor-texture" combination between three in order to obtain a reinforcement (ex: O1T1+ O2T1 O1T2, + for the baited cup). This procedure excludes the use of any spatial or contextual cues for solving the task. After the acquisition of two different tasks, the familiar stimuli used in acquisition were recombined in a third task (called "recombination"). The pharmacological manipulation of the LEC showed that the NMDA glutamatergic and cholinergic system in this structure are involved in the processes underlying the acquisition and the recombination. In contrast, the cholinergic system in the DH is selectively and critically involved in the recombination processes. Compared to acquisition, our electrophysiological data showed that the recombination is based on a desynchronization between the oscillatory activities of the LEC and of the DH in the theta band (5-12 Hz). Moreover, this task is associated with increased amplitude of beta oscillations (15-45 Hz) in the LEC. These data demonstrated that the LEC and the DH are critically involved in the processes underlying the flexibility of bimodal representations.

Key word: *Cross-modal memory, Olfactory, Tactile, Lateral entorhinal cortex, Dorsal hippocampus, Neuropharmacology, Neuronal dynamic, Rat*