Identification du connectome de l'aire 24 du cortex cingulaire antérieur dans le contexte du développement de phénotypes de type anxio-dépressif chez la souris : implication de la voie amygdalo-cingulaire

Clémentine Fillinger

▶ **To cite this version:**

Clémentine Fillinger. Identification du connectome de l'aire 24 du cortex cingulaire antérieur dans le contexte du développement de phénotypes de type anxio-dépressif chez la souris : implication de la voie amygdalo-cingulaire. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ029 . tel-01706970

HAL Id: tel-01706970
https://theses.hal.science/tel-01706970

Submitted on 12 Feb 2018

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.

UNIVERSITE DE STRASBOURG

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée par :

Clémentine Fillinger

Soutenue le 09 juin 2017

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Strasbourg
Spécialité : Neurosciences

Identification du connectome de l'aire 24 du cortex cingulaire antérieur dans le contexte du développement de phénotypes de type anxio-dépressif chez la souris: implication de la voie amygdalocingulaire

---

Thèse dirigée par :

M. Pierre Veinante	Professeur à l'Université de Strasbourg - CNRS UPR 3212

RAPPORTEURS :

Mme Catherine Belzung	Professeur à l'Université François Rabelais de Tours - Inserm U930
M. Cyril Herry	Chargé de recherche – Inserm U1215, Bordeaux

EXAMINATEURS :

Mme A. Pereira de Vasconcelos	Chargée de recherche - CNRS UMR 7364, Strasbourg
M. Luis Garcia-Larrea	Directeur de recherche - Inserm U1028 – CNRS UMR 5292, Lyon

MEMBRE INVITE :

Mme Ipek Yalcin-Christmann	Chargée de recherche - CNRS UPR 3212, Strasbourg

« Pour réussir dans le monde, il faut avoir l'air fou et être sage »

Montesquieu

(1689-1755)

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Monsieur le Professeur Pierre Veinante pour m'avoir fait confiance tout au long de ce travail de thèse. Il m'a permis d'évoluer dans un cadre scientifique idéal et m'a apporté bien plus qu'une simple collaboration professionnelle ne saurait le faire. Il a su faire de moi un embryon de neuroanatomiste, ce qui n'est pas peu dire. Merci pour ta patience, ton investissement, ta simplicité et même ta disponibilité. Merci pour tous ces « yet » corrigés, ces M&M's bâfrés et ces corrections en morse.

Je voudrais également remercier du plus profond de mon cœur Madame le Docteur Ipek Yalcin-Christmann qui a grandement participée à ma formation scientifique. Je tiens à lui montrer ma plus grande reconnaissance pour m'avoir donné la chance de travailler avec elle et de découvrir les joies du comportement. Merci pour toutes ces conversations, scientifiques ou un peu moins, merci pour ta gentillesse, ta joie de vivre, ton humanité. Merci de ne pas m'avoir arrêté au DM lorsque j'avais un besoin viscéral d'acheter des vernis. Merci de m'avoir montré que l'on peut être une femme, une maman et une éminente scientifique.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Michel Barrot de m'avoir accueilli dans son équipe, mais également de m'avoir aidé et permis de continuer à travailler dans cette équipe pour 6 mois de plus. Pour cela, je lui serais toujours reconnaissante.

Je souhaite également remercier Madame le Professeur Marie-José Freund-Mercier pour les conseils et l'aide reçue tout au long de cette thèse. Merci de votre gentillesse au quotidien et de votre disponibilité.

Je désire aussi faire part de ma reconnaissance à Monsieur le Docteur Sylvain Hugel pour les expériences d'électrophysiologie qu'il a gracieusement accepté de réaliser. Je tiens tout particulièrement à le remercier ici pour sa bonté, sa pédagogie et surtout sa patience. Je ne prétends pas maîtriser aujourd'hui le patch-clamp, mais je crois que j'ai enfin compris certains cours reçus en master.

Je souhaite également remercier Madame le Docteur Dominique Massotte pour sa disponibilité et pour les discussions scientifiques que nous avons eu. Je tiens à la remercier pour les connaissances qu'elle m'a apportées.

Je tiens également à montrer toute ma gratitude à Madame Elisabeth Waltisperger, bref à Betty. Merci de tenir cette équipe ensemble et d'embrasser ce rôle si difficile et parfois ingrat de « maman du labo ».

Je tiens à faire part de ma gratitude à Madame le Professeur Catherine Belzung et à Monsieur le Docteur Cyril Herry pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse malgré le travail que cela représente. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je voudrais également remercier très respectueusement Madame le Docteur Anne Pereira de Vasconcelos et Monsieur le Docteur Luis Garcia-Larrea pour leur travail d'examinateur. La présence de scientifiques d'aussi grande qualité dans mon jury de thèse est un honneur.

C'est avec émotion que j'en viens au reste.

J'aimerais commencer par mon Girls Squad Mélanie, Fanny, Coraline, Ipek (oui encore), Alice et (oui désolée) Xavier et Flo. Depuis le début ou plus vers la fin, vous avez représenté mon pilier au laboratoire et en dehors. Nous avons ri, pleuré, eu des conversations étranges, fait des choses bizarres et sommes ainsi devenus des amis. Je ne saurais comment vous remercier d'avoir simplement été vous. Mélanie, je n'oublierais jamais nos vacances, nos découvertes et les ongles taboulé.

Jeune Léa, c'est donc ici que je te passe le flambeau. Sache que tu arrives dans une équipe incroyable, mais ça tu l'auras déjà remarqué. Prends tout ce que l'on t'offrira, c'est inestimable. Tu trouveras ici une famille, une raison de te motiver tous les matins lorsque tu en auras marre de baver dans ce fichu cortex temporal et que tes souris feront tout sauf ce que tu souhaiterais qu'elles fassent. Courage, et visons le Nature !

J'en viens au DocteurS Eric Salvat et à son jeune ex Padawan Baptiste. Merci de votre bonne humeur et de votre éternel sourire. Merci d'apporter de la sagesse et de la zen-attitude, dont j'ai largement profité, dans cette équipe.

Je tiens également à adresser un mot à Pierre-Eric, Alessandro et Lyes. Vous êtes des personnes étonnantes et avez apporté la dose de testostérone qui commençait à manquer dans cette équipe. Je vous souhaite à tous bonne route.

Je souhaite également remercier ici toutes les personnes que j'ai côtoyées dans ce laboratoire et qui ont contribué de près ou de loin à ma vie quotidienne : Florent, Salim, Stéphane, Edouard, Quentin, Elaine, Muris, Valentin, Anil, Jiahao, Muzzeyen, Ines, Dorothée, Nathalie, Benoit, Taddy et Charlotte.

J'en profite également pour remercier du plus profond de mon cœur ma famille, toujours soudée et présente pour moi. Merci de m'avoir soutenu du jour où j'ai décidé de partir à l'Université jusqu'à aujourd'hui et de supporter mes sautes d'humeur. Je vous aime.

J'aimerais conclure ces remerciements déjà bien trop longs en remerciant Monsieur le Docteur Victor Mathis. Merci d'être toi, merci d'être là. Merci de me soutenir, de me pousser, de me raisonner, de me faire rire, de m'accepter, de me comprendre, de m'accompagner. Merci d'avoir accepté mon statut de boulet de 6 mois sans rechigner, de subvenir aux besoins de ta famille nombreuse. Je t'admire et t'aimerais toujours.

Publications et communications

Publications liées aux travaux de thèse:

Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a` and 24b` in the mouse.

Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P

Brain Struct and Funct (2017) 222:1509-1532

Efferents of anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a` and 24b` in the mouse.

Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P

En préparation

Multifaceted role of anterior cingulate cortex: insight from emotional and pain studies.

Yalcin I, **Fillinger C**, Sellmeijer J, Barthas F, Barrot M, Veinante P

En préparation

Communications affichées:

Mapping of inputs-outputs organization of areas 24a/24b of the mouse anterior cingulate cortex.

Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P

Congrès MAPS, From Maps to Circuits: Models and Mechanisms for Generating Neural Connections, Strasbourg, France, Février 2015.

Afferents to the mouse anterior cingulate cortex.

Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P

45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, USA. Octobre 2015.

Efferents of the mouse anterior cingulate cortex.

Veinante P, **Fillinger C**, Yalcin I and Barrot M

45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, USA, Octobre 2015.

Chronic pain: anatomo-functional approach and treatments

Fillinger C, Kremer K, Faivre F

Congrès annuel des étudiants de master, Strasbourg, France, Mai 2014.

Financement de la thèse:

Ma thèse a été financée par un contrat doctoral de l'Université de Strasbourg (concours Ecole Doctorale Vie & Santé, Université de Strasbourg) du 01/10/2013 au 01/10/2016. J'ai été recrutée en tant qu'assistante ingénieure en biologie sur un contrat privée de l'équipe du 01/10/2016 au 14/03/2017.

Bourse et prix obtenus:

- 1er prix concours « PhD Blitz », Neuropole-Strasbourg Neuroscience Federation, Février 2015
- Bourse Tebu-Bio couvrant les frais de déplacement pour la participation au 45ème congrès de la Society for Neuroscience à Chicago (USA), Octobre 2015
- 3ème place finale régionale « Ma thèse en 180s », CNRS-CPU Strasbourg, Mars 2016

Résumé

Clémentine Fillinger

Identification du connectome de l'aire 24 du cortex cingulaire antérieur dans le contexte du développement de phénotypes de type anxio-dépressif chez la souris : implication de la voie amygdalocingulaire

Résumé

Le cortex cingulaire antérieur (CCA) est une région préfrontale située au centre d'un réseau permettant l'échange d'informations cognitives, motrices, limbiques et viscérales, la plaçant ainsi comme un sujet incontournable dans l'étude de pathologies complexes telles que les troubles anxio-dépressifs. Afin de pouvoir aborder ces pathologies chez la souris, nous avons établi par traçage neuronal le connectome complet des différentes aires composant le CCA. Nous avons ainsi montré qu'une grande majorité des structures de ce connectome communique de manière réciproque avec cette région et que, selon les aires cingulaires, des spécificités de densité d'innervation et de topographie peuvent exister. Ceci suggère des fonctions partagées mais également des rôles plus spécifiques à chaque aire. A partir de ce connectome, nous avons ensuite montré, par une approche optogénétique associée à des tests comportementaux, que l'activation répétée de la projection de l'amygdale au CCA est susceptible d'induire des comportements de type anxio-dépressif chez des souris naïves. Ce travail met donc en évidence le rôle d'une partie du connectome du CCA dans l'établissement des troubles de l'humeur.

Mots-clés : cortex cingulaire antérieur, connectome, traçage, anxiété, dépression.

Abstract

The anterior cingulate cortex (ACC) is a prefrontal region located at the center of a network allowing the sharing of cognitive, motor, limbic and visceral information, placing it as an interesting target for the study of complex pathologies like mood disorders. To investigate these diseases in mice, we provided the complete connectome of each ACC areas by a tract-tracing approach. We demonstrated that the majority of structures constituting this connectome are reciprocally connected with the ACC and that some density and topographical connection specificities were observed among cingulate areas. These results potentially suggest some shared functions between cingulate areas, also completed by specific roles inherent to each area. Using this connectome, we demonstrated that the repeated activation of the amygdala projection to the ACC was able to induce anxiodepressive-like behaviors in naïve mice, by using optogenetics combined with behavioral tests. This study highlights for the first time the implication of a portion of the ACC connectome in the establishment of mood disorders.

Key words: anterior cingulate cortex, connectome, tract-tracing, anxiety, depression.

Avant-propos

I. Cadre générale de la thèse

Le cortex cingulaire antérieur (CCA) constitue la partie la plus rostrale du cortex cingulaire et est situé chez le primate entre le sillon supra-callosal et le sillon cingulaire. Même si son identification chez le rongeur remonte aujourd'hui à plusieurs dizaine d'années, les auteurs ne s'accordent pas toujours sur sa délimitation anatomique ni sur sa nomenclature. Cette ambigüité est favorisée d'une part par le concept anatomo-fonctionnel de cortex préfrontal médian (mPFC) regroupant en partie certaines aires du CCA, mais également par l'identification récente du cortex cingulaire médian (CCM) chez le rongeur, région adjacente au CCA longtemps considérée uniquement comme sa partie caudale.

Le CCA est impliqué dans un certain nombre de fonctions exécutives telles que l'attention, la mémoire, l'organisation de séquences comportementales ou encore la prise de décision, mais joue également un rôle majeur dans la douleur, les émotions, et la régulation des états affectifs. Cette dichotomie fonctionnelle s'explique en partie par sa place à la confluence de plusieurs grands circuits sous-tendant l'apprentissage, la peur ou la douleur. La position centrale du CCA au sein de ces réseaux en fait également une cible de choix dans l'étude de pathologies complexes telles que les troubles de l'humeur, alliant des symptômes d'ordre affectif et cognitif.

De nombreuses études cliniques ont montré l'implication du CCA dans les troubles anxieux et dépressifs. Les études menées chez le rongeur tendent également à confirmer ce rôle majeur du CCA dans les troubles anxio-dépressifs. Notre équipe a ainsi récemment mis en évidence le rôle fondamental du CCA dans les comportements de type anxio-dépressif développés après induction d'une douleur chronique chez la souris. Ainsi, une lésion excitotoxique du CCA est suffisante à abolir de tels comportements. Cependant, les troubles de l'humeur seraient basés non pas sur l'altération d'une structure unique, mais sur un réseau de structures dans lequel le CCA tient une place centrale. Il est donc nécessaire d'établir précisément la connectivité du CCA chez le rongeur afin de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant les troubles de l'humeur.

II. Objectifs de la thèse

Le connectome du CCA, et plus particulièrement de l'une de ses aires, l'aire 24, a été mis en évidence chez le primate et le rat, mais aucune donnée complète n'existe à ce jour chez la souris, modèle animal pourtant largement utilisé en recherche clinique.

Afin d'optimiser la comparaison des résultats obtenus chez la souris avec la littérature du primate, l'objectif premier de cette thèse a donc été de mettre en évidence l'ensemble des afférences et des efférences des aires 24a et 24b du CCA, en prenant également en considération leurs étendues rostro-caudales. Nous avons réalisé une analyse similaire dans les aires 24a` et 24b` du CCM afin d'établir deux connectomes distincts permettant une comparaison entre ces deux régions cingulaires. Nous avons ainsi mis en évidence un patron de connexions commun au CCA et au CCM, ainsi que certaines différences de densité et de topographie. Ceci pourrait donc suggérer des fonctions communes à ces deux régions mais également des rôles plus spécifiques à chacune.

Nous avons ensuite cherché à explorer l'implication fonctionnelle de ce réseau dans les troubles de l'humeur, en étudiant le rôle de la projection de l'amygdale basolatérale, structure largement impliquée dans les émotions, dans le CCA. Nous avons ainsi mis en évidence qu'une stimulation répétée de la projection du noyau basolatéral de l'amygdale vers l'aire 24 par optogénétique était suffisante à induire des comportements de type anxio-dépressif chez une souris naïve.

III. Structure du manuscrit

Cette thèse, structurée en partie sur la base d'articles parus ou en préparation, suivra le cheminement suivant : dans une partie introductive, je présenterais d'abord l'organisation anatomique du cortex cingulaire chez le rongeur, comparée à celle du primate, au travers d'une revue de la littérature qui comportera une perspective historique. Puis, je détaillerais plus précisément l'histologie, la neurochimie et les connexions connues du CCA. Enfin, je présenterais les rôles principaux du CCA chez le rongeur et son implication dans certaines pathologies comme les troubles de l'humeur et la douleur chronique.

Après une revue des matériels et méthodes utilisés lors de cette thèse, la contribution expérimentale sera présentée dans une troisième partie. Les résultats de l'analyse connectomique des aires 24a/24b du CCA et 24a`/24b` du CCM seront tout d'abord présentés sous la forme d'un article publié en 2017 pour les afférences de ces aires sous forme d'un manuscrit en préparation pour les efférences. La suite sera consacrée à l'étude fonctionnelle de la projection du BLA dans le CCA par stimulation optogénétique. Une brève introduction relative à la description des troubles anxieux et dépressifs sera faite et contiendra également une description de l'organisation anatomique et des fonctions du BLA, ainsi qu'une brève revue du rôle de la connexion BLA-CCA en conditions physiologique et pathologique. Les résultats de la stimulation optogénétique de la voie BLA-CCA seront ensuite présentés, suivis de la discussion technique de cette étude.

Pour finir, je discuterais des résultats de cette thèse, en commençant par considérer les aspects techniques de l'étude du connectome du CCA et du CCM. J'aborderais ensuite l'implication anatomo-fonctionnelle potentielle du réseau de connexions ainsi mis en évidence, en considérant également les spécificités inhérentes à chaque aire ou région. Je reviendrais ensuite sur les résultats de la stimulation optogénétique de la voie BLA-CCA et discuterai des possibles acteurs et mécanismes locaux recrutés par les terminaisons du BLA dans le CCA. Je finirais par proposer une hypothèse mécanistique de l'implication de cette voie dans les troubles de l'humeur.

Une conclusion générale sera alors énoncée et les perspectives qui permettront de compléter et de continuer ces travaux seront alors proposées.

Sommaire

Introduction générale 1
I. Avant-propos 2
II. Organisation anatomique du cortex cingulaire 3
1) Evolution du modèle cingulaire à quatre régions chez le primate 3
a) Le cortex cingulaire antérieur 4
b) Le cortex cingulaire médian 5
c) Le cortex cingulaire postérieur 6
d) Le cortex rétrosplenial 7
2) Organisation du cortex cingulaire chez le rongeur 7
a) Modélisation du cortex cingulaire : une approche historique 8
b) Cortex cingulaire et cortex préfrontal : deux concepts différents pour un même territoire anatomique ? 11
c) Modèle actuel du cortex cingulaire : comparaison rongeur/singe 14
III. Le cortex cingulaire antérieur chez le rongeur: définitions histologique et neurochimique 16
1) Identité cytoarchitecturale et neurochimique du CCA 16
a) Cytoarchitecture 16
b) Types cellulaires 17
c) Chimioarchitecture 19
2) Les connexions du CCA 20
a) Connexions intracingulaires 20
b) Connexions de 24a/24b 21
Cortex cérébral 21
Thalamus 22
Télencéphale sous-cortical et hypothalamus 23
Tronc cérébral 24
c) Connexions de 25 et 32 : comparaison avec 24 25
d) Connexions de 24a`/24b` 27
IV. Les rôles du CCA 29
1) Rôles physiologiques 29
a) Processus attentionnels, apprentissage et mémoire 29
b) Stratégies comportementales et prise de décision 30
c) Emotions 31
2) Les pathologies impliquant le CCA 32
a) Trouble dépressif majeur 33
b) Anxiété généralisée 35
c) Douleur chronique 36
Matériels et méthodes 39
I. Animaux 40
1) Caractéristiques 40
2) Répartition des animaux 40

3) Ethique 40
II. Chirurgie stéréotaxique et procédures d'injection 40
1) Anesthésiques 41
2) Chirurgie stéréotaxique 41
3) Injection iontophorétique des traceurs 42
a) Procédure 42
b) Traceurs 42
Fluorogold® 42
Sous-unité beta de la toxine cholérique 43
Leucoagglutinine de Phasolus vulgaris 44
Biotine dextran amine 44
4) Injection par pression des virus 45
a) Procédure 45
b) Virus pour optogénétique 45
5) Implantation des fibres optiques 46
6) Prélèvement des tissus et coupe 47
a) Tissus frais 47
b) Tissus fixés 47
Perfusion 47
Coupe 48
III. Révélations histochimiques et analyse 48
1) Techniques de révélation histochimique 48
a) Immunohistochimie 48
b) Immunofluorescence 49
c) Histochimie 49
2) Analyse du marquage 50
a) Sites d'injection 50
b) Analyse semiquantitative du traçage 50
Traçage rétrograde 50
Traçage antérograde 51
c) Quantification de c-Fos 51
3) Reconstruction 52
IV. Induction et mesure des comportements de type anxio-dépressif 52
1) Dispositif et protocole de stimulation 52
2) Evaluation des comportements de type anxio-dépressif 53
Test d'hyponéophagie (Figure 5) 53
Test d'enfouissement de billes (Figure 6) 54
Test de pulvérisation d'eau sucrée (Figure 7) 54
Test de préférence au sucre (Figure 8) 55
Test de construction de nid (Figure 9 et 10) 55
3) Expériences contrôles 56

a) Activité spontanée 56
b) Test d'évitement actif (Figure 11) 56
V. Statistiques 57
Résultats 58
Partie I 59
Article 1 62
Article 2 63
Partie II 106
A. Introduction 108
I. Trouble dépressif majeur et anxiété généralisée 108
1) Définition et rappel 108
2) Pathologies de circuits 108
II. Connexion amygdalo-cingulaire : organisation et implication potentielle dans les troubles anxio-dépressifs chez le rongeur 109
1) Le BLA : organisation anatomique 109
2) Implication fonctionnelle de la connexion BLA-CCA 111
a) Rôle physiologique 111
b) Implication dans les troubles de l'humeur 112
B. Résultats 114
I. Validation de l'expression de la channelrhodopsine dans la voie BLA-CCA et du protocole de stimulation optogénétique 114
1) Validation anatomique 114
2) Validation fonctionnelle 114
II. Conséquences de l'activation répétée de la projection BLA-CCA sur les comportements de type anxieux et dépressif 115
C. Discussion 118
I. Considérations méthodologiques 118
1) Spécificité de l'infection virale et expression de la ChR2 118
2) Efficacité et spécificité de la stimulation optogénétique 119
a) Protocole de stimulation 119
b) Validation de la réponse des neurones du CCA à la stimulation 119
c) Spécificité de la stimulation lumineuse 120
II. Analyse des résultats 121
1) Interprétation de l'effet itératif-dépendant de la stimulation optogénétique 121
2) Test d'enfouissement de billes : un cas particulier ? 122
D. Conclusions 124
Discussion générale 125
I. Considérations méthodologiques 126
1) Les traceurs 126
2) Précision anatomique des sites d'injection 127
3) Analyse de la densité des marquages 128

II. Spécificités anatomo-fonctionnelles des aires cingulaires 130
1) CCA (24a/24b) *versus* CCM (24a`/24b`) 130
2) Aires dorsales (24b/24b`) *versus* aires ventrales (24a/24a`) 131
a) Régions dorsales 132
b) Régions ventrales 133
III. CCA et réseau médian 135
IV. Projection du BLA dans le CCA : implication dans les comportements de type anxio-dépressif chez la souris naïve 137
1) BLA et phénotype anxio-dépressif : état de la question 137
2) Quels sont les acteurs et processus mis en jeu dans le CCA ? 138
a) Circuits locaux recrutés par le BLA 139
b) Hypothèse mécanistique 140
3) Conclusion 140
Conclusion générale et perspectives 142
Références 146

Introduction générale

I. Avant-propos

Le cortex cingulaire est un gyrus situé chez l'Homme entre les sillons supracallosal et cingulaire (Figure 1). Il se divise en quatre régions distinctes selon l'axe rostro-caudal: une région antérieure, moyenne, postérieure et une région rétrospléniale en position dorso-ventrale. Au laboratoire, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la région antérieure du cortex cingulaire antérieur, que nous appellerons CCA par la suite, devenu depuis plusieurs années une structure d'intérêt majeur dans l'étude des processus émotionnels et cognitifs.

En 1878, Broca décrivait le gyrus cingulaire comme un composant du système limbique, groupe de structures impliqué entre autre dans la régulation des émotions et modulateur des fonctions autonomes (Broca 1878). Depuis, grâce notamment à l'évolution des techniques d'imagerie cérébrale, la compréhension du rôle du CCA a évolué. Il a ainsi été décrit comme participant à un certain nombre de fonctions limbiques comme les émotions, la douleur ou la régulation des fonctions autonomes, mais semble également jouer un rôle dans la cognition, avec une implication dans l'attention, la mémoire ou encore la prise de décision. Le CCA apparait aujourd'hui comme un acteur majeur dans de nombreuses pathologies telles que la douleur chronique, l'anxiété ou la dépression. Ceci semble lié à sa position d'interface fonctionnelle et anatomique au sein de réseaux fonctionnels différents.

Le large panel des fonctions du CCA explique en partie les débats contradictoires rencontrés dans la littérature. Ainsi, plusieurs auteurs ont montré une ségrégation anatomique des différentes fonctions décrites ci-dessus, alors que d'autres restent plus sceptiques (Etkin et al. 2011; Palomero-Gallagher et al. 2015; Shackman et al. 2011; Yu et al. 2011a). Plus précisément, certaines études ont avancé l'hypothèse d'une partie dorsale du CCA impliquée uniquement dans des aspects cognitifs alors que la région ventrale s'apparenterait plus à des informations d'ordre émotionnel (Bush et al. 2000; Margulies et al. 2007). Parallèlement, il fut avancé que la région antérieure du CCA serait une région « exécutive » alors que la partie postérieure servirait plutôt de centre évaluatif (Vogt et al. 1992).

Pour comprendre l'origine de ces débats, il faut se pencher sur l'anatomie du cortex cingulaire et la complexité de son organisation et de ses connexions, ainsi que sur la comparaison possible d'une telle région chez le primate et chez le rongeur, principal modèle d'étude en laboratoire.

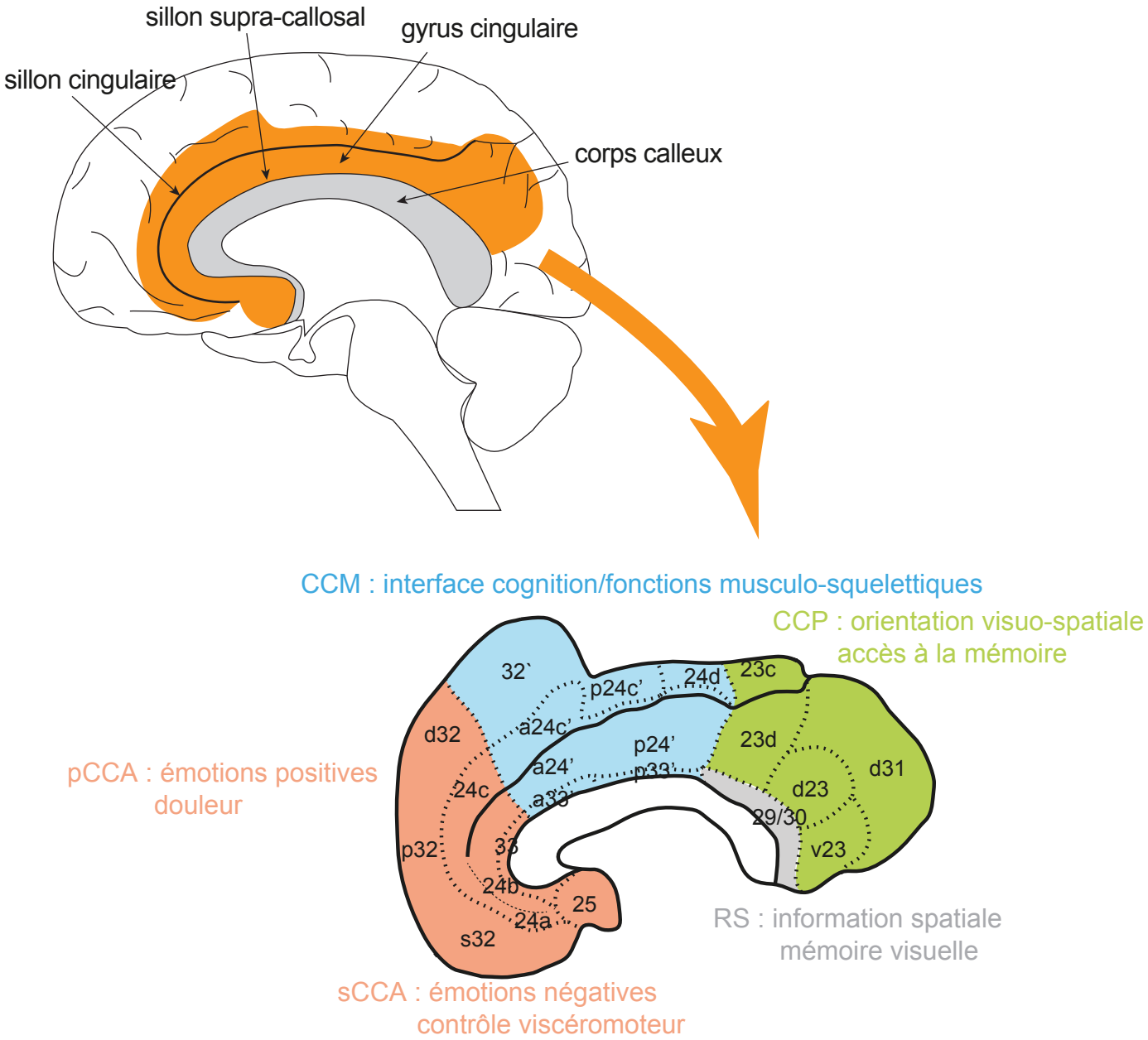


Figure 1 : Gyrus cingulaire chez l'Homme, localisation et fonctions *(adapté de Vogt, 2009)*
Schéma du haut: représentation de la localisation du gyrus cingulaire, indiqué en orange, situé entre le sillon supra-callosal et le sillon cingulaire chez l'Homme. Schéma du bas: le gyrus ou cortex cingulaire est divisé en quatre régions selon l'axe antéro-postérieur: le CCA en rouge, subdivisé en sCCA le plus rostral et pCCA le plus caudal, le CCM en bleu, le CCP en vert et le RS en gris. Chacune de ces régions sous-tend des fonctions spécifiques.
Abréviations: CCA: cortex cingulaire antérieur; CCM: cortex cingulaire moyen; CCP: cortex cingulaire postérieur; pCCA: partie prégénuale du CCA; RS: cortex rétrosplénial; sCCA: partie subgénuale du CCA.

II. Organisation anatomique du cortex cingulaire

Le cortex cingulaire s'organise chez le primate en quatre régions selon l'axe antéro-postérieur : le cortex cingulaire antérieur (CCA), le cortex cingulaire médian (CCM), le cortex cingulaire postérieur (CCP) et le cortex rétrosplenial (RS) (Vogt et al. 1995; Vogt and Paxinos 2014; Vogt et al. 2005) (Figure 1). Cette division anatomique, aujourd'hui acceptée car étayée par de nombreuses études cytoarchitecturales, connectomiques, ou encore fonctionnelles, n'est pourtant apparue que tardivement par rapport à l'identification fonctionnelle du cortex cingulaire. En effet, Papez en 1937 et MacLean en 1954 décrivaient alors le cortex cingulaire comme « une entité fonctionnelle unique » avec un rôle dans le traitement des émotions (McLean 1954; Papez 1937). A cette époque, les données anatomiques de Brodmann (1909) décrivaient un gyrus cingulaire simplement divisé en une partie antérieure et une partie postérieure. Il y a donc eu une avancée majeure dans notre compréhension tant fonctionnelle qu'anatomique de cette région, et tout particulièrement du CCA. Ce consensus sur l'organisation du cortex cingulaire s'est fait en parallèle chez le primate et chez le rongeur.

1) Evolution du modèle cingulaire à quatre régions chez le primate

Les premières études cytoarchitecturales du gyrus cingulaire firent suite aux travaux de Broca (1878) et de Brodmann (1909) et permirent d'établir les bases anatomiques nécessaires à l'étude d'une région aussi complexe (Smith 1907; Vogt and Vogt 1919; von Economo and Koskinas 1925). Cependant, il est vite apparu évident que la seule identification cytoarchitecturale n'était pas suffisante pour définir une région corticale, certains territoires pouvant partager certaines analogies anatomiques sans pour autant être considérés comme homologues. L'un des premiers modèles basé sur les connexions du cortex cingulaire chez le singe fut illustré par Baleydier et Mauguiere (1980). Ils décrivirent, en se basant sur leurs études de connexion et sur les travaux de Brodmann et de Broca, un cortex cingulaire divisé en deux parties : une région antérieure correspondant à l'aire 24 et décrite comme un cortex agranulaire frontal, et une région postérieure constituée de l'aire 23 définie comme granulaire. L'étude de la connectivité des aires cingulaires 25 et 29/30 adjacentes quelques années plus tard montrait déjà les limites de ce modèle à deux régions et mettait ainsi en place les bases du futur modèle cingulaire à quatre

régions (Vogt and Pandya 1987; Vogt et al. 1987). Ce sont donc principalement l'analyse des afférences ainsi que les études fonctionnelle chez le primate qui ont permis l'établissement de ce modèle (Vogt 2005; Vogt and Palomero-Gallagher 2012; Vogt et al. 1997; Yu et al. 2011a).

a) Le cortex cingulaire antérieur

Le CCA est constitué des aires 25 et 32 ainsi que de la partie rostrale de l'aire 24 (Figure 1). Celle-ci, la plus développée, est subdivisée en sous-régions selon les axes dorso-ventral, où 24a correspond à la région la plus ventrale et 24d la plus dorsale, et rostro-caudal, où a24 définit la région antérieure et p24 la région postérieure. L'une des premières clés donnée pour différencier le CCA du reste du gyrus cingulaire est sa connexion exclusive et réciproque avec l'amygdale, structure sous-corticale largement impliquée dans les émotions, et tout particulièrement la peur (LeDoux 2000). L'analyse chez le singe par traçage rétrograde des afférences du gyrus cingulaire menée par Vogt et Pandya (1987) montre en effet une densité de marquage importante des fibres en provenance de noyau basolatéral de l'amygdale et ce uniquement dans les aires 24, 25 et 32. Cette spécificité de connectivité suggère déjà un traitement préférentiel des émotions par le CCA, spécificité validée par plusieurs études démontrant un impact conséquent de la stimulation électrique du CCA sur les fonctions autonomes (Hurley-Gius and Neafsey 1986; Kaada 1951; Reiner 1990). La partie antérieure du gyrus cingulaire peut également être différenciée par ses connexions avec le thalamus, décrites comme prédominantes depuis les noyaux de la ligne médiane, alors que la région postérieure reçoit des entrées majoritairement depuis les noyaux thalamiques antérieurs (Baleydier and Mauguiere 1980; Vogt et al. 1979).

Le CCA peut également être subdivisé chez l'homme en une région subgénuale, située sous le genou du corps calleux et constituée des aires 25, s24 et s32, et une région prégénuale située en avant du genou du corps calleux et composée des aires 24a-c, p32 et d32 (Carmichael and Price 1994; Vogt 2009; Vogt et al. 1995; Vogt et al. 2005). Cette différentiation anatomique du CCA est également observable d'un point de vue fonctionnel et connectomique. En effet, des études d'imagerie fonctionnelle ont mis en évidence une implication du CCA subgénual dans les émotions négatives comme la tristesse ou la colère ainsi que dans les états

dépressifs (Drevets et al. 1997; George et al. 1995; Kross et al. 2009; Mayberg et al. 1999). Ces émotions sont sous-tendues par une connexion privilégiée de cette région avec certains centres contrôlant les fonctions autonomes comme le noyau central de l'amygdale, le noyau parabrachial ou encore la substance grise périaqueductale (Neafsey et al. 1993). Même si le CCA prégénual semble, quant à lui, impliqué dans les émotions plutôt positives (Rolls et al. 2008; Vogt 2005), son rôle dans la douleur et notamment dans le codage de son intensité est également bien documenté (Kulkarni et al. 2005; Ploner et al. 2002; Vogt 2005; Vogt et al. 1996). Les connexions du CCA prégénual sont globalement similaires à celles du CCA subgénual, hormis les afférences en provenance de l'amygdale vers la région prégénuale privilégiées depuis les noyaux basaux latéral et accessoire (Vogt 2005).

b) Le cortex cingulaire médian

Quand Brodmann définit en 1909 les différentes régions du gyrus cingulaire chez l'homme, il n'identifie pas le CCM qui fut donc considéré pendant longtemps uniquement comme la région dorsale du CCA (Vogt 2016). Toutefois, certaines études tendaient déjà à l'époque à montrer l'existence d'une région différente sur le plan anatomique et cytoarchitectural (Smith 1907; Vogt and Vogt 1919). Il faudra tout de même attendre plusieurs dizaines d'années pour que le CCM soit officiellement défini comme une région à part entière du gyrus cingulaire du primate (Vogt et al. 1995) (Figure 1). Le CCM, composé des aires 24a`, 24b`et 24c`chez le primate, est également subdivisé en une partie antérieure (aCCM) et une partie postérieure (pCCM) (Smith 1907; Vogt 2016; Vogt et al. 1995; Vogt et al. 2005; Vogt and Vogt 1919). Grâce à des études de connectivité et fonctionnelles, l'identification du CCM est aujourd'hui totalement acceptée. Le CCM partage des connexions réciproques topographiquement organisées avec les cortex pariétal postérieur et moteur, les noyaux thalamiques de la ligne médiane et intralaminaires et le noyau médiodorsal (MD), ainsi que la moelle épinière (Hatanaka et al. 2003; Morecraft et al. 2004; Vogt 2016; Vogt et al. 1987; Vogt et al. 1997), sous-tendant ainsi les fonctions musculo-squelettiques du CCM. En effet, cette structure possède chez le primate deux régions particulières que sont les aires cingulaires motrices, connectées aux cortex moteur et pré-moteur, et qui contiennent les neurones de projections vers la moelle épinière (Biber et al. 1978; Dum and Strick 1991; Luppino et al. 1991; Morecraft and

Van Hoesen 1992; Van Hoesen et al. 1993). Le CCM ne reçoit qu'une modeste entrée de l'amygdale et n'est pas directement impliqué dans la régulation des fonctions autonomes, à l'inverse du CCA (Vogt et al. 1997). La première étude d'imagerie fonctionnelle permettant de différentier clairement le CCA du CCM est celle de Bush et collaborateurs (2000). Ils mettent ainsi en évidence une activation préférentielle du CCM lors d'une tâche cognitive, alors qu'il est désactivé par une tâche émotionnelle. Plus largement, le CCM est décrit comme une interface entre cognition et fonctions musculo-squelettiques, permettant la sélection d'un comportement adapté à la prise de décision (Apps et al. 2013; Bush et al. 2002; Dum and Strick 1991; Morecraft and Van Hoesen 1992; Shima et al. 1991) ainsi que dans l'orientation de la tête et du corps dans l'espace (Huang et al. 2004; Vogt 2009; Vogt and Palomero-Gallagher 2012). Une activation du CCM est également observée lors d'un stimulus nociceptif (Derbyshire et al. 1997; Lenz et al. 1998; Vogt 2016; Vogt et al. 1996).

c) Le cortex cingulaire postérieur

Le CCP est formé par les aires de Brodmann 31 et 23, cette dernière étant également subdivisée en différentes sous-régions selon les axes dorso-ventral et rostro-caudal (Vogt 2005; Vogt et al. 1990; Vogt et al. 2006; Zilles et al. 1986) (Figure 1). Le CCP, à la différence du CCA et du CCM, est une région dysgranulaire, donc pourvue d'une pseudo couche IV (Vogt et al. 2005; Zilles and Amunts 2012). Le CCP reçoit des afférences thalamiques majoritairement depuis les noyaux antérieurs comme les noyaux antéroventral et antérodorsal (Vogt et al. 1979) et partage également des connexions privilégiées avec certaines régions corticales frontales, notamment avec le CCA, temporales et pariétales ainsi qu'avec le RS (Vogt and Pandya 1987; Vogt et al. 1979). Les études analysant l'implication fonctionnelle du CCP mettent en évidence son rôle majeur dans l'orientation visuospatiale (Murray et al. 1989; Olson et al. 1993), ainsi que dans l'accès à la mémoire (Vogt 2005; Vogt et al. 1992; Vogt and Laureys 2009). Il est important de noter que le CCP et le RS sont étroitement liés sur les plans anatomiques et fonctionnels, ce qui a longtemps rendu difficile leur distinction.

d) Le cortex rétrosplenial

Le RS, situé ventralement au CCP, est une région corticale granulaire constituée des aires 29 et 30 de Brodmann (Armstrong et al. 1986; Vogt 1976) (Figure 1). Cette région du cortex cingulaire fut peut-être la plus ardue à identifier tant d'un point de vue anatomique que fonctionnel. En effet, le RS est une petite structure, difficilement visible de part la faible résolution des techniques d'imageries de l'époque, dont une partie est profondément ancrée dans le sillon callosal et enroulée autour du splenium du corps calleux (Kobayashi and Amaral 2000; Morris et al. 1999; Zilles et al. 1986). Toutefois, son organisation laminaire est différente de celles des structures qui lui sont voisines : l'indiseum griseum ne possède que deux couches, le presubiculum est constitué de trois couches et le CCP est une région dysgranulaire (Zilles and Amunts 2012). Les connexions du RS semblent globalement restreintes aux structures qui lui sont anatomiquement proches, comme le CCP et la formation hippocampique, avec toutefois une entrée thalamique observable depuis les noyaux latérodorsal et latéropostérieur (Kobayashi and Amaral 2003; Morris et al. 1999). La complexité d'accessibilité à cette structure a conduit à un nombre assez réduit d'études fonctionnelles. Le RS a été impliqué dans le traitement de l'information spatiale et la mémoire visuelle (Kobayashi and Amaral 2003; Maguire 2001; Nestor et al. 2003; Vogt et al. 1992; Vogt and Laureys 2009). Plus récemment, Suguira et al. (2005) ont démontré que le RS pourrait favoriser l'accès à la mémoire de travail associée à une certaine valence émotionnelle, comme la reconnaissance d'objets familiers.

2) Organisation du cortex cingulaire chez le rongeur

L'identification chez le rongeur d'une région analogue au cortex cingulaire du primate prit du temps. Le caractère lissencéphale de cette espèce ne permet pas une comparaison directe avec le primate gyrencéphale et plusieurs reformulations furent nécessaires avant d'arriver au modèle communément accepté. Cette région corticale peut se définir de trois manières: 1) par sa situation anatomique au dessus du genou du corps calleux, 2) par son identification anatomo-fonctionnelle en temps que cortex limbique, caractérisé par des projections spécifiques des noyaux antérieurs du thalamus et contrôlant des fonctions autonomes liées aux émotions et 3) par son association au cortex préfrontal, défini anatomo-fonctionnellement par une projection

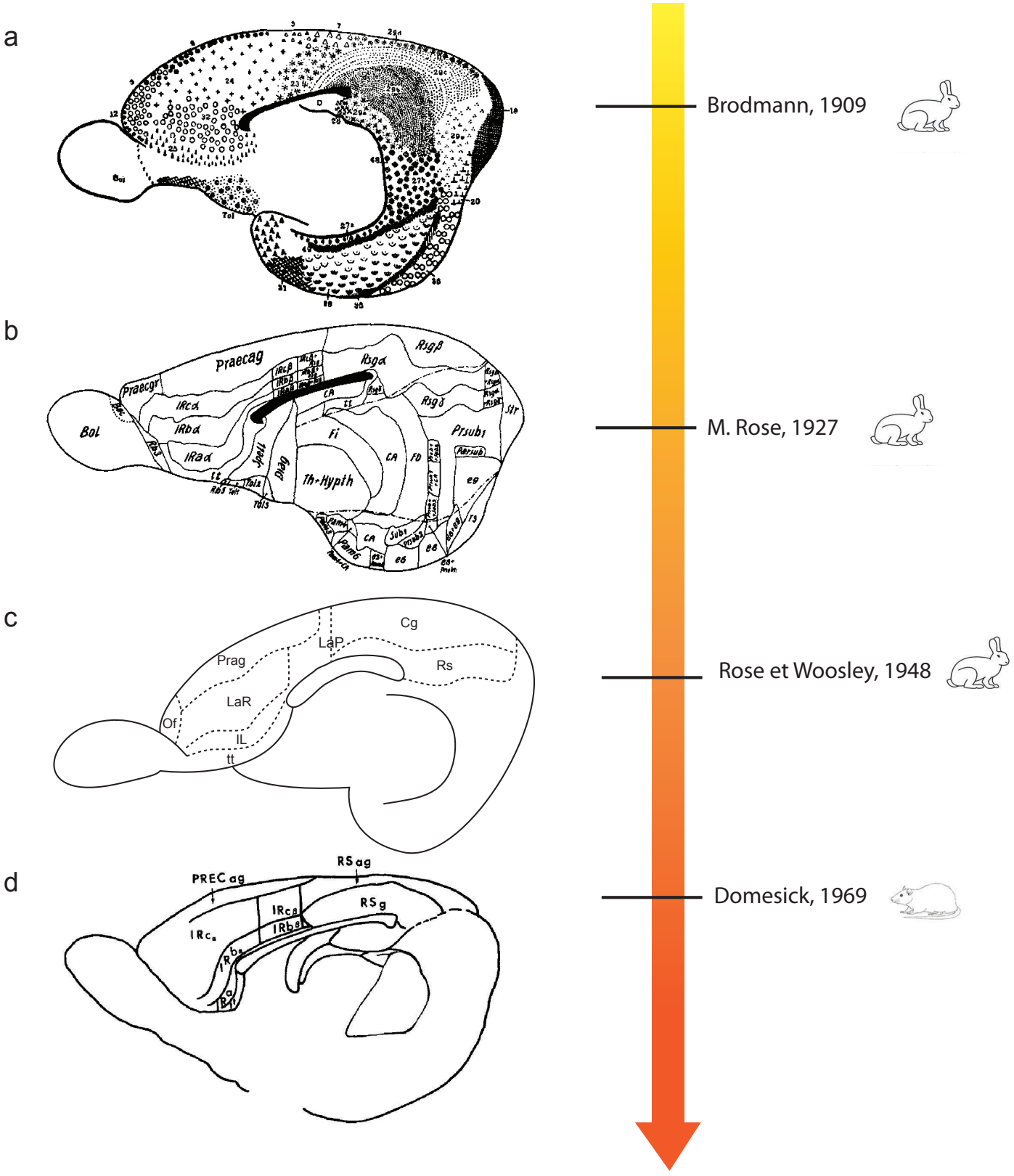


Figure 2 : Evolution historique de la nomenclature du cortex cingulaire

Représentation de l'évolution des nomenclatures du cortex cingulaire employées depuis la première description de ce cortex chez le lapin (Brodmann, 1909), jusqu'à la nomenclature employée à ce jour chez le rongeur (Vogt et Vogt, 2004).

thalamique depuis le MD et sous-tendant des fonctions exécutives complexes. Au fil des années, ces multiples définitions du cortex cingulaire ont compliqué son étude et ont mené à certaines confusions. L'établissement du modèle à trois régions des rongeurs s'appuie sur des données initialement obtenues chez le lapin, bien que ce dernier appartienne à l'ordre des lagomorphes, puis chez le rat et a finalement été appliqué à la souris (Figure 2 ; Table 1).

a) Modélisation du cortex cingulaire : une approche historique

En se basant sur la cytoachitecture et notamment l'absence de couche granulaire, Brodmann définit en 1909 chez le lapin une région limbique au dessus du genou du corps calleux, qu'il divise sur des bases cytoarchitecturales en une partie cingulaire et une partie rétrospléniale (Figure 2, a ; Table 1) (Brodmann 1909). Il instaure déjà à l'époque la notion d'une région cingulaire en deux parties, en distinguant une région antérieure "précingulaire" agranulaire, composée des aires 24, 35 et 32, et une région postérieure "postcingulaire", granulaire, composée de l'aire 23. La partie rétrospléniale correspond, quant à elle, à l'aire 29. Il faut attendre quelques années, en 1927, pour voir ce modèle se complexifier. En reprenant la même dichotomie rostro-caudale, M. Rose (Figure 2, b ; Table 1), va différencier au sein de la région précingulaire agranulaire de Brodmann trois parties différentes : *(1)* « area infraradiata ventralis anterior » (IRaα) correspondant à l'aire 25 de Brodmann ; *(2)* « area infraradiata intermedia anterior » (IRbα) correspondant à l'aire 32 et à la partie ventrale antérieure de l'aire 24 et *(3)* " area infraradiata dorsalis" (IRcα) correspondant à la partie dorsale antérieure de l'aire 24. La région caudale va également être divisée en une région appelée « area infraradiata posterior », subdivisée en trois parties (IRaβ, IRbβ, IRcβ), qui recouvre l'aire 23 de Brodmann, mais aussi la portion la plus postérieure de l'aire 24. M. Rose souligne le fait que cette région est différente de l'aire 23 du primate. Enfin la région retrospléniale appelée « area retrosplenialis granularis » est également délimitée en différentes parties (Rsgα, Rsgβ, Rsgɣ). Ainsi l'introduction de ces multiples subdivisions complexifie largement le schéma de Brodmann.

Cette vision contrastée du cortex cingulaire va subir un nouveau changement près de 20 ans plus tard, lorsque Rose et Woosley (1948b) mettent en avant la nécessité de combiner l'analyse cytoarchitecturale à l'étude des connexions thalamo-corticales

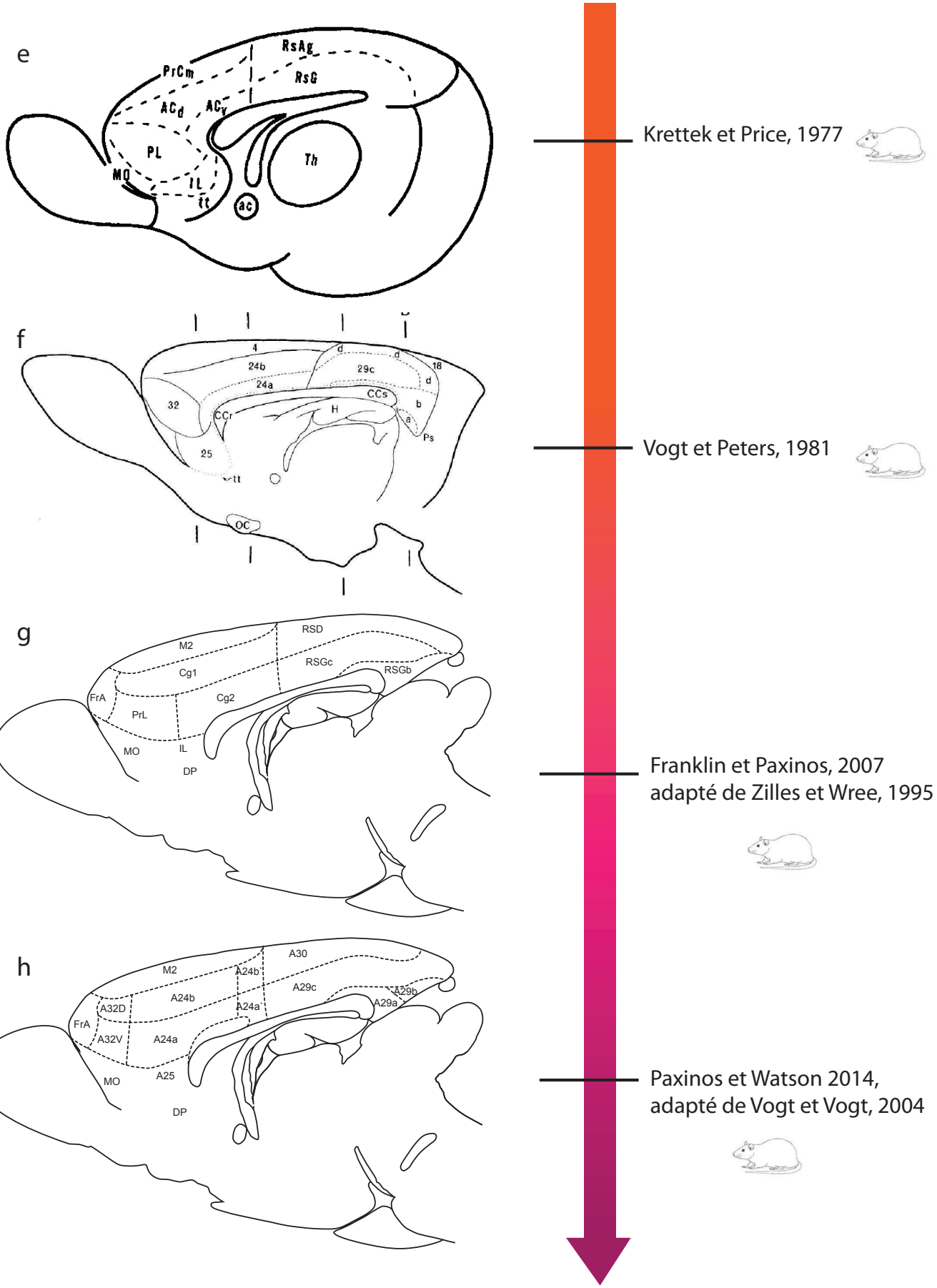


Figure 2 (suite) : Evolution historique de la nomenclature du cortex cingulaire

pour définir des unités fonctionnelles dans le manteau cortical (Figure 2, c ; Table 1). En se basant sur les projections corticales du thalamus antérieur, ces auteurs réorganisent à nouveau la nomenclature et les limites du cortex cingulaire. Grâce à une technique de dégénérescence axonale rétrograde, ils confirment une dichotomie rostro-caudale avec, à l'avant, un cortex cingulaire cible préférentielle des noyaux antéroventral et antéromédian, et à l'arrière, un cortex rétrosplénial recevant des entrées du noyau antérodorsal. Dans cette nomenclature révisée, les IRbα et IRcα de M. Rose sont réunis sous le nom d' "aire limbique antérieure" partie rostrale (LaR), et, là où M. Rose plaçait l'IRaα, Rose et Woosley (1948b) identifient "l'aire infralimbique" (IL). Pour ces auteurs, ce qui était considéré par Brodmann comme l'aire 23 n'est autre que la partie caudale de l'aire limbique antérieure (LaC), correspondant aux IRaβ, IRbβ, IRcβ de M. Rose. Tout comme ce dernier, Rose et Woosley reconnaissent donc qu'il n'existe pas d'équivalence à l'aire 23 du primate chez le lapin. La région rétrospléniale est également divisée selon un axe dorso-ventral en "aire cingulaire" (Cg) et "aire rétrospléniale" (Rs). Il est à noter que Rose et Woolsey préfèrent utiliser le terme "limbique " pour caractériser la région rostrale et réservent le terme cingulaire à une portion de la région caudale. Enfin, en introduisant pour la première fois le terme d'infralimbique, qui signifie en dessous du cortex limbique, ils mettent ainsi en place les bases de la nomenclature la plus utilisée aujourd'hui.

Grâce au développement d'une nouvelle technique d'imprégnation argentique après dégénérescence axonale antérograde (Fink and Heimer 1967), une définition anatomique plus complète, basée sur l'ensemble des projections thalamiques, est proposée chez le rat (Domesick 1969) (Figure 2, d ; Table 1). A partir de la nomenclature plus ancienne de M. Rose, Domesick redéfinit les territoires alloués aux cortex cingulaire et rétrosplénial grâce à l'analyse des efférences corticales vers le thalamus. Elle montre ainsi une projection préférentielle du cortex cingulaire vers le MD du thalamus, alors que le cortex rétrosplénial cible majoritairement les noyaux antéroventral et latérodorsal, ce qui lui permet de simplifier la nomenclature de M. Rose en considérant à nouveau un modèle bipartite constitué d'un cortex cingulaire antérieur et d'un cortex cingulaire postérieur.

Grâce au développement de la technique autoradiographique de traçage par les acides aminés tritiés, Krettek and Price (1977) vont redéfinir chez le rat l'anatomie de

Table 1: Comparaison des nomenclatures du cortex cingulaire dans différentes études

Vogt and Vogt, 2004 (rat)	Zilles and Wree, 1995 (rat)	Vogt and Peters, 1981(rat)	Krettek and Price, 1977 (rat)	Domesick, 1969 (rat)	Rose and Woosley, 1948 (lapin)	M. Rose, 1927 (lapin)	Brodmann, 1909 (lapin)
25	IL	25	IL (+DP)	IRa	IL	IRa α	25
32	PrL	32	PL	IRb α + IRc α	LaR	IRb α + IRc α	32
24b	Cg1	24b	ACd	IRc α	LaR	IRc α	24
24a	Cg2	24a	ACv	IRb α	LaR	IRa α + IRb α	
24b`	Cg1	24b`	ACd	IRc β	LaC	IRc β	23
24a`	Cg2	24a`	ACv	IRc β	LaC	IRa β + IRb β	
29a	RSGb	29a	RsG	RSg	Rs	RSG γ	29a
29b	RSGb	29b	RsG	RSg	Rs	RSG α	29b
29c	RSGc	29c	RsG + Rsag	RSg + RSag	Cg	RSG α	29b
30	RSD	29d	Rsag	RSag	Cg	RSG β	29c + 29d

La nomenclature désignant le cortex cingulaire antérieur ou son équivalent est soulignée en rouge, le cortex cingulaire moyen ou son équivalent en bleu et le cortex rétrosplénial ou son équivalent en gris.

la région cingulaire dans le cadre de l'analyse des projections des noyaux thalamiques, en particulier du MD, vers les régions corticales supra-callosales (Figure 2, e ; Table 1). Ils mettent ainsi en évidence une organisation topographique des projections du MD vers différentes régions définies jusque là en tant que cortex cingulaire. L'analyse de ces projections ainsi que celle des noyaux antérieurs du thalamus permettent aux auteurs de distinguer quatre régions corticales antérieures. On trouve, dans l'ordre ventro-dorsal : 1) l'IL, équivalent à celui de Rose et Woosley (1948b) et correspondant à l'aire 25 de Brodmann, 2) l'aire prélimbique (PL), à l'avant du « cortex limbique », correspondant à une partie de l'IRbα de M. Rose et à l'aire 32 de Brodmann, 3) l'aire antérieure cingulaire divisée en une partie dorsale (ACd) et une ventrale (ACv), désignée comme l'aire 24 par Brodmann et correspondant à l'ensemble IRc, IRbβ et IRaβ de M. Rose, et 4) l'aire précentrale médiane (PrCm) que M. Rose, comme Rose et Woolsey, avaient déjà identifiée dorsalement à l'aire 24. Il est important de noter que cette nomenclature associe une aire plutôt assimilée au cortex moteur (PrCm) à des régions initialement identifiées comme appartenant au cortex cingulaire cingulaire antérieur (IL, PL, AC). De plus, l'aire rétrospléniale, qui apparaît dans la représentation de Krettek et Price (1977) (Figure 2, e), n'est plus associée au cortex cingulaire. Par cette analyse des connexions thalamo-corticales, Krettek et Price montrent que le modèle de Rose et Woosley, basé uniquement sur la projection des noyaux antérieurs, était peut-être trop simplifié, mais surtout, vont associer les régions antérieures du cortex cingulaire à la notion de cortex préfrontal (voir **I. 2)** ***b) Cortex cingulaire et cortex préfrontal : deux concepts différents pour un même territoire anatomique ?***).

Bien que la vision du cortex cingulaire initiée par Krettek et Price (1977) soit la plus utilisée à l'heure actuelle, certains auteurs tendent à conserver une nomenclature plus neutre, basée sur la numérotation des aires de Brodmann. C'est en 1981 qu'apparut la première ébauche de la nomenclature du cortex cingulaire utilisée aujourd'hui (Vogt and Peters 1981) (Figure 2, f ; Table 1). En se basant sur une analyse cytoarchitecturale rigoureuse associée à une étude des morphologies neuronales par marquage de Golgi, ces auteurs raffinent les positions et les délimitations des aires cingulaires, sans prendre parti sur le regroupement de ces aires. En reprenant la même numérotation des aires que Brodmann et en se basant sur la morphologie et la répartition des neurones dans chaque couche corticale, Vogt

et Peters scindent l'aire 24 en 24a et 24b, correspondant respectivement aux ACv et ACd de Krettek et Price (1977). Les aires 25 et 32 restent globalement similaires à celles décrites précédemment sous les termes IL et PL, et les régions rétrospléniales sont redéclinées sous la forme des aires 29 a, b, c et d. Toutefois, cette nouvelle nomenclature ne parvient pas à convaincre et ce sera celle établie par Zilles et Wree (1995) qui sera employée dans les éditions successives des atlas stéréotaxiques du cerveau du rat (Paxinos and Watson 1982; Paxinos and Watson 2007) et de la souris (Franklin and Paxinos 1996; Franklin and Paxinos 2007) (Figure 2, g ; Table 1). Cette nomenclature reprend les termes d'IL et de PL de Krettek et Price, alors que les aires 24b et 24a de Vogt et Peters sont respectivement nommées Cg1 et Cg2.

Pourtant, suite aux nombreux travaux du groupe de B.A. Vogt (Vogt 2009; Vogt and Paxinos 2014; Vogt and Peters 1981; Vogt et al. 2004; Vogt et al. 2001), une nomenclature basée sur les aires de Brodmann a finalement été retenue dans les dernières éditions des atlas stéréotaxiques du cerveau du rat (Paxinos and Watson 2014) et de la souris (Paxinos and Franklin 2012) Celle-ci définit trois régions cingulaires analogues à celles des primates : CCA, CCM et RS (Figure 2, h ; Table 1). Il est important de noter que ce modèle affirme clairement l'absence de CCP chez le rongeur. Les aires 25, 32, 24a et 24b, telles que définies auparavant constituent le CCA. Chez le rat, mais pas la souris, s'ajoute une aire 33 peu développée ventralement à 24a. Le CCM est constitué des aires 24a' et 24b' que Vogt et Vogt (2004) séparent des régions caudales de 24a et 24b. Le RS enfin contient les aires 29 a, b et c ainsi que l'aire 30 qui était auparavant appelée 29d.

Même si le modèle à trois régions du cortex cingulaire est aujourd'hui admis, il existe encore des confusions entre l'appartenance anatomique de l'aire 24 au CCA et son implication fonctionnelle dans le cortex préfrontal médian. Pour clarifier la situation, il faut se pencher plus en avant sur l'émergence parallèle des deux dénominations.

b) Cortex cingulaire et cortex préfrontal : deux concepts différents pour un même territoire anatomique ?

Chez le primate, le cortex préfrontal (PFC) représente un territoire situé dans la région antérieure du lobe frontal, siège des fonctions exécutives, c'est à dire la planification du futur, la prise de décision ou le contrôle des comportements. Le PFC

est défini chez le primate comme un cortex « silencieux » contrairement aux territoires anatomiques moteurs et pré-moteurs plus postérieurs (Preuss 1995). La question de l'existence d'une région homologue chez les mammifères non-primates et notamment les rongeurs s'est rapidement posée, en dépit de l'affirmation de Brodmann que le PFC n'existe que chez le primate (Brodmann 1909). En effet, le lobe frontal du rongeur est typiquement agranulaire, alors que celui du primate est essentiellement granulaire.

Au delà de l'argument cytoarchitectural, le PFC des primates a été associé à une projection massive depuis le MD (Preuss 1995; Rose and Woolsey 1948a; Rose and Woolsey 1949). Il faut attendre les premiers travaux de Rose et Woosley sur les projections corticales du MD (Rose and Woolsey 1948a) pour suggérer l'existence d'une région homologue au PFC du primate chez le lapin, le mouton et le chat. Il est intéressant de constater que les travaux de ces auteurs sur le PFC (Rose and Woolsey 1948a) et le cortex cingulaire dit limbique (Rose and Woolsey 1948b) sont publiés en parallèle, sans qu'aucun lien ne soit vraiment fait entre ces deux régions. L'analyse du PFC et du cortex cingulaire chez le rongeur continuera à se faire indépendamment au fil des années, toujours grâce à l'étude des connexions de ces deux territoires avec le thalamus. Les travaux de Valérie Beller Domesick (Domesick 1969) sur les sorties thalamiques du cortex cingulaire et de Christiana Leonard (Leonard 1969) sur les entrées thalamiques du PFC sont réalisés par les deux jeunes femmes au sein du même laboratoire, l'une assise en face de l'autre, tel que l'évoque Christiana Leonard dans une revue récente (Leonard 2016). L'article de Christiana Leonard sera le premier à associer les mots-clés "préfontal" et "rat". Dès lors, le concept de PFC, favorisé par la nouvelle nomenclature de Krettek and Price (1977), va séduire la communauté scientifique plus que l'idée d'un cortex cingulaire, qui, toujours affilié au cortex limbique de Brodmann, apparait suranné. De cette manière, le cortex cingulaire, tout au moins dans sa partie antérieure va dès lors être "absorbé" par le PFC.

Une dichotomie fonctionnelle latéro-médiane du PFC va être mise en évidence assez rapidement chez le rongeur faisant ainsi émerger le concept de cortex préfrontal médian (mPFC) (Uylings and van Eden 1990). Le mPFC, composé des territoires anatomiques du PL, IL, AC et du cortex moteur secondaire (M2), qui correspond au PrCm de Krettek et Price (1977), est une entité étudiée sur le plan

fonctionnel sans toujours tenir compte des aires individuelles qui le composent. Par exemple, une lésion de l'ensemble du mPFC induit des déficits de mémoire de travail (Kolb et al. 1994; Wikmark et al. 1973), d'attention (Birrell and Brown 2000; Muir et al. 1996; Ragozzino et al. 1999) ou encore de comportements liés à des fonctions motrices complexes (Kolb 1974; Kolb and Whishaw 1983). Preuss (1995), dans une revue discutant de l'existence ou non d'un PFC chez le rongeur, va toutefois émettre l'hypothèse que le PFC du rongeur serait en fait homologue au cortex cingulaire du primate, mais sous-tendrait des fonctions plutôt assurées par le PFC dorso-latéral chez le primate. Il apparait donc important d'être capable d'allouer des fonctions plus spécifiques aux sous-régions du mPFC.

Il faut attendre le début des années 2000 pour que des spécificités fonctionnelles, liées aux différents territoires anatomiques que le mPFC recouvre, soient mises en évidence (Heidbreder and Groenewegen 2003). Il apparait que la partie dorsale, composée du PL dorsal et de l'aire 24, et ventrale, constituée du PL ventral et de l'IL, présentent une dichotomie fonctionnelle : la partie dorsale est principalement impliquée dans la planification dans le temps de différentes séquences comportementales (Gisquet-Verrier et al. 2000; Granon and Poucet 2000; Kesner 2000), alors que la partie ventrale joue un rôle dans l'adaptation comportementale à de nouvelles stratégies, ainsi que dans l'intégration des états physiologiques internes induits permettant ainsi d'adapter le comportement de l'animal à des situations stressantes ou aversives (Jinks and McGregor 1997; Morgan et al. 2003; Quirk et al. 2000; Ragozzino et al. 1999).

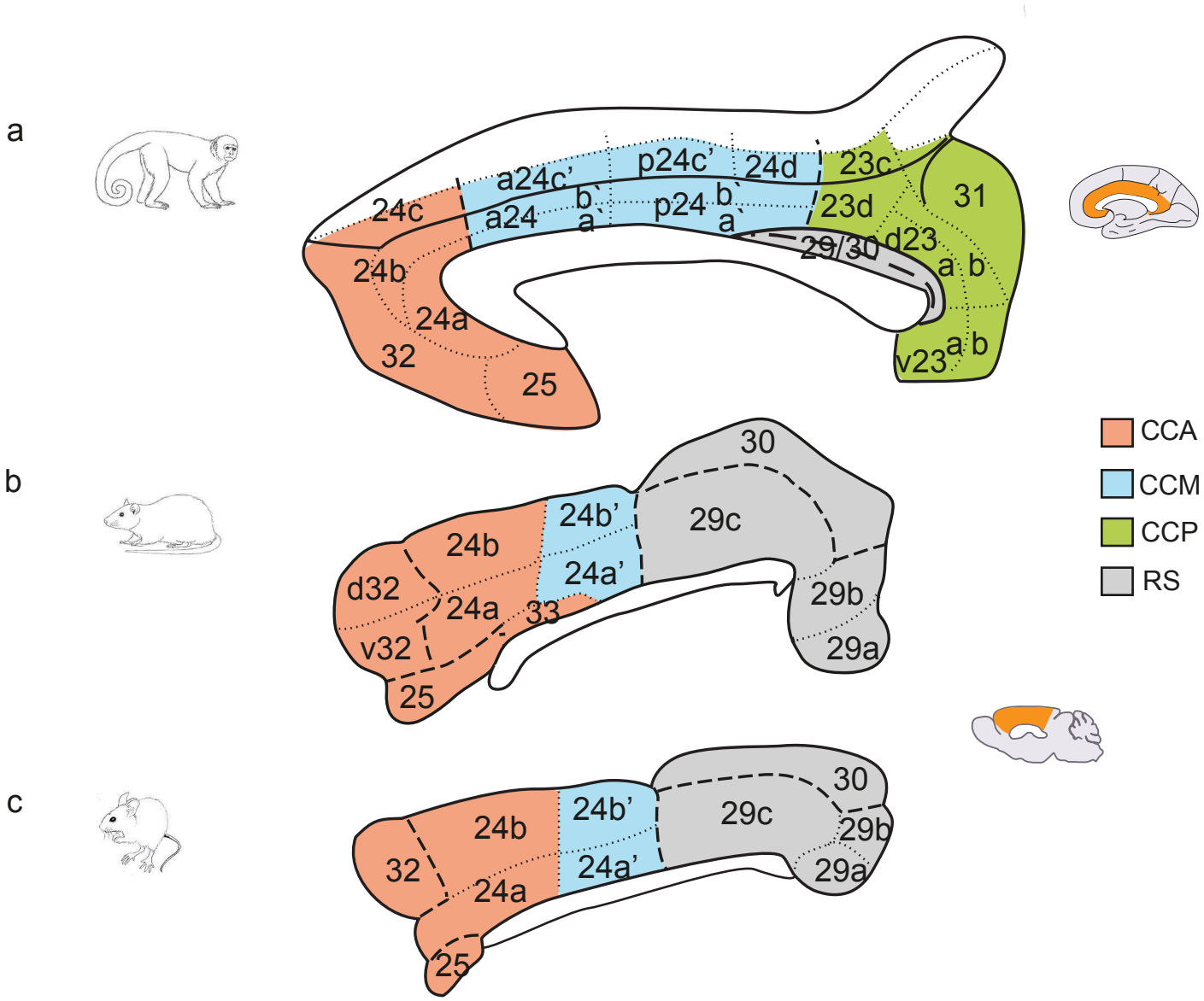
La notion de mPFC, même si elle trouve une validité certaine d'un point de vue fonctionnel, présente un défaut majeur : elle n'identifie dans l'aire antérieure cingulaire que deux parties, ventrale (ACv) et dorsale (ACd), sans distinguer les portions rostrales et caudales, alors que celles-ci correspondent de fait à des régions distinctes: 24a/24b rostralement et 24a`/24b` caudalement. Or ces régions appartiennent respectivement au CCA et au CCM (Vogt et al. 2004). De plus, les aires IL et PL du mPFC perdent toute affiliation au cortex cingulaire, alors que les aires 25 et 32 correspondantes chez le primate en font intégralement partie (voir **I.1) *a). Le cortex cingulaire antérieur***). C'est donc dans cette mouvance de dissociation des fonctions exécutives au sein du mPFC que Vogt réintroduit sa nomenclature du cortex cingulaire ainsi que le concept du CCM correspondant plus fidèlement à

l'organisation anatomique du gyrus cingulaire chez le primate (Vogt et al. 2004). Cette nouvelle nomenclature reste cependant encore très récente et l'essentiel des d'études actuelles portant sur le cortex cingulaire, notamment l'aire 24, emploient encore souvent le concept de mPFC.

c) Modèle actuel du cortex cingulaire : comparaison rongeur/singe

Le modèle à trois régions du rongeur permet donc une comparaison anatomique plus directe avec le gyrus cingulaire du primate. La Figure 3, adaptée de Vogt et Paxinos (2014), résume de manière schématique la concordance des aires cingulaires chez le primate et le rongeur. De part la complexité supérieure du gyrus du primate, l'équivalence n'est pas totale entre les deux espèces. L'exemple le plus évident est l'absence chez le rongeur du CCP, qui correspond chez le primate aux aires 23 et 31. De même, les aires 24c` et 24d formant une partie du CCM du primate n'existent a priori pas chez le rongeur. La localisation anatomique de certaines aires diffère également entre les espèces. L'aire 32, par exemple, est située rostralement à l'aire 24 chez le rongeur, mais se situe dorsalement à l'aire 24 chez le primate. En outre, les aires rétrospléniales 29/30 du primate sont très peu développées et profondément enfouies dans le sillon callosal, alors qu'elles sont situées en surface chez le rongeur et présentent des subdivisions. Deux différences majeures sont à relever entre le cortex cingulaire du rat, a priori plus complexe, et celui de la souris : l'aire 32 chez le rat est divisée en une région dorsale et une ventrale, ce qui n'est pas le cas chez la souris, et l'aire 33 la plus ventrale chez le rat ne possède pas d'équivalence chez la souris. Ces différences anatomiques pourraient être à l'origine d'une redistribution des fonctions et des connexions du cortex cingulaire entre les différentes espèces (Vogt et al. 2004). Pour exemple, l'aire cingulaire motrice constituée par un groupe de neurones cortico-spinaux est située dans le CCM chez le primate (voir **I.1)** ***b) Le cortex cingulaire médian***), alors que la seule projection du cortex cingulaire vers la moelle épinière est localisée dans les aires 32 et 24b du CCA chez le rongeur (Miller 1987; Vogt et al. 2004).

Malgré certaines différences, il est donc possible d'étudier chez le rongeur des régions cingulaires homologues à celles trouvées chez le primate. On sait d'ores et déjà, grâce notamment aux nombreuses études portant sur le mPFC, qu'un grand nombre de fonctions exécutives du CCA du primate sont retrouvées chez le rongeur,



d

Primate	25	32	24a 24b	24c	~	(a,p)24a'	(a,p)24b'	(a,p)24c'	24d	23,31	29	30
Rat	25	v32 d32	24a 24b	~	33	24a'	24b'	~	~	~	29a 29b 29c	30
Souris	25	32	24a 24b	~	~	24a'	24b'	~	~	~	29a 29b 29c	30

Figure 3 :Comparaison du cortex cingulaire chez le primate, le rat et la souris (adapté de Vogt et Paxinos, 2014)

Représentations schématiques du cortex cingulaire chez le singe (a), le rat (b) et la souris (c), et comparaison des nomenclatures respectives (d). Chez chacune des espèces, le CCA est représenté en rouge, le CCM en bleu, le CCP en vert et le RS en gris. De manière générale, le rongeur lissencéphale possède un niveau de complexité du cortex cingulaire inférieur au primate. Ainsi, le rat et la souris ne possèdent pas de CCP, et un nombre inférieur de régions composant le CCM. En revanche, le RS est beaucoup développé chez les espèces rat et souris alors que ces aires sont réduites et enfouies dans le sillon callosal chez le primate. Le rat diffère également de la souris par une subdivision de l'aire 32 en une région dorsale et ventrale, ainsi que par une aire 33 ventrale à 24a, non existante chez la souris.

Abréviations: CCA: cortex cingulaire antérieur; CCM: cortex cingulaire moyen; CCP: cortex cingulaire postérieur; RS: cortex rétrosplénial

Tout comme son implication dans les émotions, certaines pathologies de la douleur et les troubles de l'humeur. La suite de cette introduction sera donc dédiée à la description morphologique, connectomique et fonctionnelle de cette structure chez le rongeur.

III. Le cortex cingulaire antérieur chez le rongeur: définitions histologique et neurochimique

Comme nous l'avons vu précédemment, la définition du CCA chez le rongeur n'est pas toujours identique chez les auteurs. Dans les premiers atlas de rongeur (Franklin and Paxinos 1996; Paxinos and Watson 1982), les aires 24b/24b`et 24a/24a` ont été respectivement appelées Cg1 (dorsale) et Cg2 (ventrale), en accord avec la nomenclature instaurée par Zilles et Wree (1995). Dès lors, le terme « cortex cingulaire antérieur » a souvent été employé pour désigner Cg1 et Cg2, même si les aires 24a`et 24b` appartiennent au CCM, maintenant clairement défini (Vogt et al. 2004). De plus, d'autres termes sont encore utilisés, tels que ACd et, ACv (Jones et al. 2005; Van De Werd et al. 2010; Van De Werd and Uylings 2014), ou encore le terme simple d'AC (Hoover and Vertes 2007). Néanmoins, les données expérimentales obtenues avec ces différentes appellations du CCA sont généralement transférables aux aires 24a et 24b sur lesquelles nous nous focaliserons ici.

1) Identité cytoarchitecturale et neurochimique du CCA

De même que chez le primate, la différentiation des aires 24, 25, 32 et 33 équivalentes aux aires de Brodmann s'est faite en se basant sur des indices cytoarchitecturaux, relatifs à la taille et la densité des neurones ou à l'épaisseur des différentes couches, mais également sur l'analyse neurochimique des différents types cellulaires retrouvés dans cette région corticale.

a) Cytoarchitecture

L'organisation cytoarchitecturale du CCA reste une organisation corticale laminaire classique qui varie de 4 à 5 couches selon l'aire considérée. En effet, tout comme chez le primate, les aires 25, 32, 33 et 24 sont agranulaires donc sans réelle couche IV (Figure 4). Globalement, les couches de l'aire 24 sont plus facilement identifiables que celles des aires 25, 32 et 33 voisines, grâce à leur densité neuronale et leur épaisseur (Van De Werd et al. 2010; Vogt 2015; Vogt and Paxinos 2014). Certaines caractéristiques plus subtiles permettent de délimiter les contours de ces différentes aires. L'aire 24 se différencie de sa voisine caudale 24` par une taille de neurones

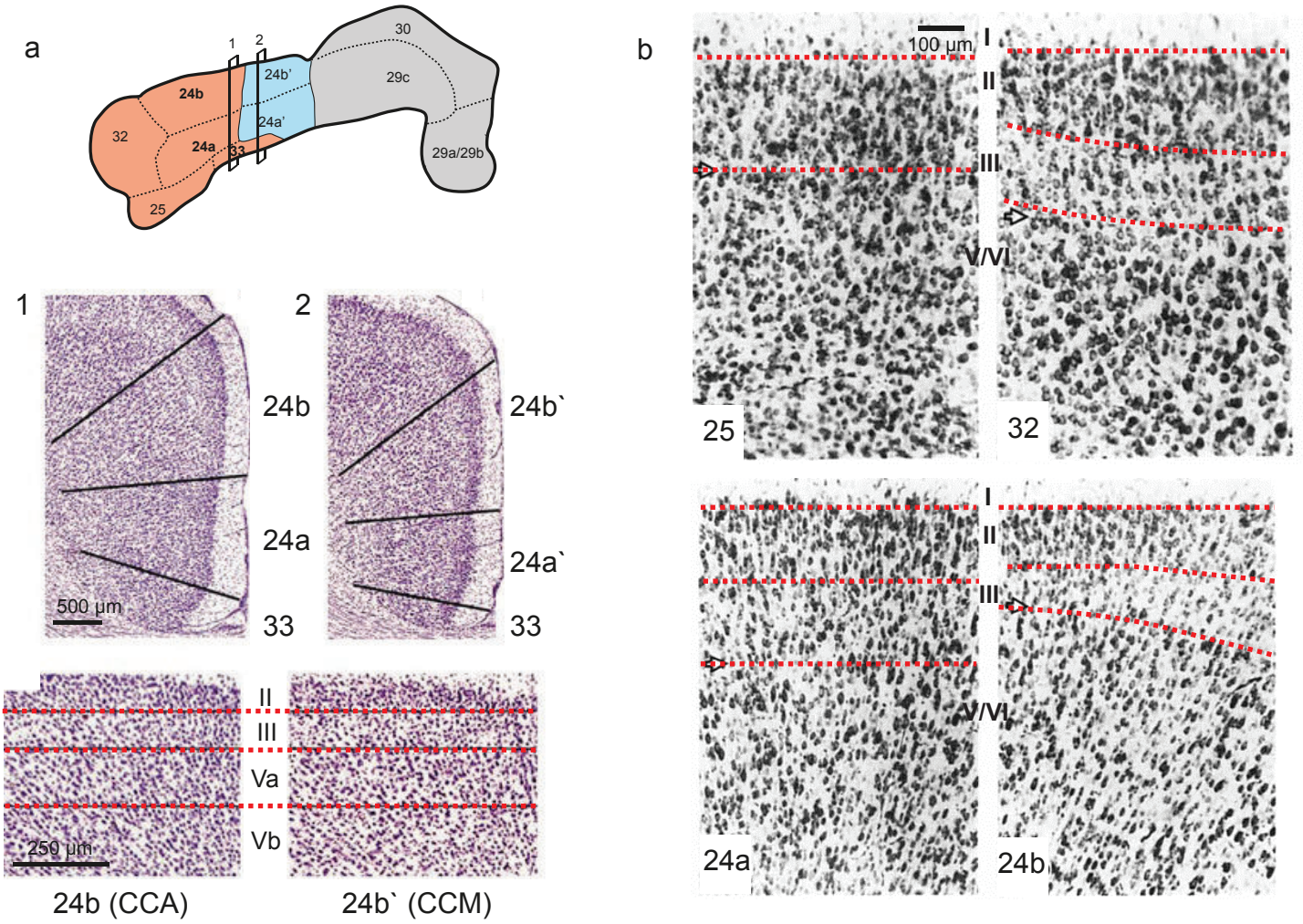


Figure 4 : Cytoarchitecture du CCA *(d'après Vogt et Peters 1981 et Vogt et Paxinos 2014)*
Représentation schématique (a) et microphotographies illustrant les différences d'épaisseur et de densité des couches des aires 24a, 24b et 33 du CCA (a.1) et des aires 24a`, 24b`et 33`du CCM (a.2), ainsi que des aires 25, 32, 24a et 24b (b) chez le rat. Les neurones de 24b sont plus petits que ceux de 24b`, notamment dans la couche V où les neurones de 24b` sont plus larges et denses (a). L'aire 25 présente des couches corticales plus fines et indifférenciées mais des somas plus larges que l'aire 24 (b). L'aire 32 possède une lamina VI plus épaisse que l'aire 24b adjacente ainsi que des neurones plus ronds et larges que 24a. L'aire 24b diffère également de 24a par une lamina III moins dense et mieux différenciable de la lamina II, ainsi qu'une couche V plus large (b).

inférieure à celle trouvée dans 24`, ainsi qu'une couche Va contenant une population neuronale moins large et dense que dans 24` (Vogt 2015; Vogt 2016) (Figure 4, a). Enfin, l'aire 33 qui s'étend ventralement aux aires 24 et 24`est peu différenciée avec toutefois peu de neurones dans la couche V par rapport aux aires adjacentes (Vogt 2015). La partie dorsale 24b est également différentiable de 24a grâce à une couche III moins dense permettant ainsi de la distinguer plus facilement de la couche II, et également grâce à une couche V plus large que celle trouvée en 24a (Vogt 2015; Vogt and Paxinos 2014) (Figure 4, b). L'aire 25 plus antérieure se caractérise, quant à elle, par des somas plus larges que dans les autres aires du CCA, ainsi que des couches plus fines. La cytoarchitecture de l'aire 32 est également légèrement différente de l'aire 24 adjacente, avec une couche VI plus épaisse que celle de 24b et des neurones plus larges et ronds que ceux de 24a (Vogt and Peters 1981) (Figure 4, b). Une différentiation dorso-ventrale est également faite au sein même de l'aire 32, illustrée par des couches corticales plus épaisses et denses ainsi que des neurones de la couche Va plus larges dans d32 que dans v32 (Vogt and Paxinos 2014; Vogt and Peters 1981).

b) Types cellulaires

Les différents types cellulaires du cortex cingulaire sont les mêmes que ceux présents dans le reste du néocortex (Gabbott et al. 1997; Markram et al. 2004; Vogt 2015; Vogt and Peters 1981; Zilles and Amunts 2012). On y retrouve des neurones pyramidaux de différentes morphologies, localisés densément dans les couches III, V et VI et de manière plus éparse dans les couches I-II, ainsi que toutes les classes d'interneurones GABAergiques (Gabbott et al. 1997; Vogt and Peters 1981). On distingue ainsi dans cette région des neurones pyramidaux inversés et multipolaires à plus ou moins large soma, ainsi que des neurones non pyramidaux « bitufted », avec deux pôles d'arborisation dendritique, bipolaires ou multipolaires. La morphologie des cellules pyramidales peut également être indicative de leurs propriétés physiologiques et de leur projections distinctes (Ramaswamy and Markram 2015). La proportion des interneurones GABAergiques représente environ un quart des cellules, proportion identique à celle obtenue dans le reste du néocortex (Zilles and Amunts 2012), et ils sont majoritairement localisés dans les couches III et V (Gabbott et al. 1997; Kubota et al. 1994).

Le marquage des interneurones par les différentes protéines liant le calcium, calrétinine (CR), parvalbumine (PV) et calbindine (CB), met en évidence une proportion équivalente de chaque sous-type par rapport au nombre total d'interneurones, et ce dans chacune des aires du CCA considérée (Gabbott et al. 1997; Vogt 2015). Les interneurones PV+, de morphologie multipolaire, représentent la population d'interneurones la plus importante et sont présents majoritairement dans les couches II à V du CCA, aucun marquage n'ayant été observé dans la couche I. Ces interneurones semblent d'ailleurs jouer un rôle majeur dans la balance inhibition/excitation du CCA. Par exemple, des projections excitatrices directes en provenance du MD (Delevich et al. 2015) et de l'amygdale (Dilgen et al. 2013) sur les interneurones PV+ induisent une inhibition rétroactive (feed-forward) des neurones pyramidaux du CCA, permettant *in fine* une modulation d'un certain nombre de fonctions exécutives. De cette manière, les interneurones PV+ ont été décrits comme jouant un rôle dans les comportements dirigés vers un but (Brown et al. 2015; Pinto and Dan 2015) et les processus attentionnels (Kim et al. 2016a).

Les interneurones CR+ représentent la deuxième population la plus importante, avec une morphologie principalement bipolaire ou « bitufted » et une localisation préférentielle dans la partie supérieure de la couche III. L'étude menée par Kubota et collaborateurs (1994) met en évidence que cette population neuronale colocalise également avec un marquage du polypeptide intestinal vasoactif (VIP) et de la cholécystokinine (CCK). Les interneurones CB+, présents dans les couches profondes V-VI, présentent une morphologie variable et sont les moins représentés dans le CCA. Ils peuvent également être révélés par un marquage de la somatostatine (SOM) et du neuropeptide Y (NPY) (Kubota et al. 1994). Ces différentes populations d'interneurones ont été impliquées dans les comportements dirigés vers un but (Pinto and Dan 2015; Saffari et al. 2016). Les SOM+ ont également été décrits comme pouvant jouer un rôle opposé à celui des PV+ dans la redistribution d'informations obtenues lors d'un paradigme d'observation de peur dans l'aire 24 (Liu et al. 2017). Une proportion de neurones enképhalinergiques a également été mise en évidence dans le cortex préfrontal du rongeur (Loren et al. 1979; Sar et al. 1978), ainsi que d'autres populations neuronales positives au facteur de libération corticotrope (CRF) et à la substance P (SP) (Kubota et al. 1994; Paxinos et al. 2009; Rogers 1992; Swanson et al. 1983; Watson and Paxinos 2010).

c) Chimioarchitecture

Bien que la cytoarchitecture permette de délimiter clairement les différentes régions du cortex cingulaire et notamment du CCA, la chimioarchitecture, c'est-a-dire l'organisation des différents systèmes de neurotransmission, est également un point de repère important. Toutefois, comme les limites définies par la chimioarchitecture ne correspondent pas toujours à celles désignées par la cytoarchitecture, cette dernière est préférée dans la littérature. En revanche, elle doit être prise en considération car elle permet d'organiser des limites d'ordre plus fonctionnel. Une étude très complète réalisée chez l'homme par Palomero-Gallagher et Zilles (2009) a permis de mettre en évidence la localisation des récepteurs des principaux systèmes de neurotransmission du gyrus cingulaire. Ils montrent ainsi une expression différentielle des récepteurs du glutamate dans les aires 25 et 33 et du GABA dans les aires 24 et 32. Les récepteurs muscariniques et sérotoninergiques sont eux présents majoritairement dans l'aire 32. Une différence de densité en fonction des couches est également observée pour chaque aire, avec par exemple une densité de récepteurs $GABA_B$ plus importante dans les couches profondes de 24a en comparaison avec 24b.

Les informations disponibles chez le rongeur sont plus éparses et moins détaillées (Dunn et al. 1996; Santana et al. 2004; Santana et al. 2009; Santana et al. 2013; Sesack and Bunney 1989; Vogt et al. 2001; Zilles et al. 1989). En effet, la distinction entre les différentes aires du CCA n'étant que rarement faite, il devient difficile de pouvoir utiliser la chimioarchitecture comme outil à leur identification. Il apparait toutefois que chez le rat, la densité des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 est plus importante dans l'aire 24 que dans les aires 25 et 32 (Sesack and Bunney 1989). De même, les régions 24a et 24b présentent la densité de récepteurs μ des opioïdes la plus importante du cortex cingulaire (Vogt et al. 2001). Une étude menée par Van de Werd et al. (2010) chez la souris permet toutefois de se rendre compte de la pertinence de l'utilisation de ce type d'architecture par rapport à la cytoarchitecture pour délimiter les limites des différentes aires du CCA chez la souris. Par exemple, l'activité de l'acétylcholinestérase permet de mettre en évidence tout aussi efficacement qu'une coloration de Nissl la limite entre les aires 32 et 24b. De même, un marquage imunohistochimique de la dopamine est suffisant pour visualiser la différence entre 24a et 24b. Les auteurs concluent que leur analyse

chimioarchitecturale ne permet de mettre en évidence que la moitié des limites observables grâce à des paramètres cytoarchitecturaux de densité et morphologie cellulaires, soulignant ainsi que de tels paramètres peuvent être utilisés en complément des indices cytoarchitecturaux classiques mais ne sont pas suffisants pour le moment pour délimiter les différentes aires du CCA.

Le CCA du rongeur, comme celui du primate, est donc une structure anatomiquement complexe dont la compréhension de l'organisation a nécessité beaucoup de temps et de théories. Quoiqu'il en soit, les fonctions du CCA se basent sur une connectivité qui pourra également confirmer la validité des théories d'organisation.

2) Les connexions du CCA

La description suivante, adaptée d'une revue en cours d'écriture, fait état de la littérature disponible sur les principales connexions du CCA chez le rongeur, essentiellement le rat, et permet un comparatif avec le singe. Nous nous focaliserons encore sur les aires 24a et 24b, et mentionnerons plus succinctement les connexions des aires 25 et 32. Les quelques données concernant les connexions du CCM (24a`/24b`) seront également brièvement décrites. En effet, à ce jour l'essentiel de la littérature ne fait pas nécessairement la distinction entre les aires telles qu'elles sont définies ici (24a *vs* 24b ou 24 *vs* 24`). Dans la suite de cette introduction, la nomenclature de B.A. Vogt (25, 32 et 24) sera utilisée pour décrire les différentes aires du CCA, même si une autre nomenclature est trouvée dans les papiers cités.

a) Connexions intracingulaires

L'analyse des connexions intra-cingulaires réalisée chez le rat correspond assez bien à la définition des différentes régions cytoarchitecturales du cortex cingulaire (Jones et al. 2005; Shibata and Naito 2008; Vogt and Miller 1983). L'étude de Jones et al. (2005) analysant les entrées des différentes régions du cortex cingulaire par traçage antérograde met en évidence une hétérogénéité des connexions des aires 24a/24b du CCA et 24a`/24b` du CCM (Figure 5). Ainsi, l'aire 24a projette préférentiellement vers les régions cingulaires plus antérieures, notamment vers les aires 32 et 24b, mais reçoit principalement des afférences des aires les plus

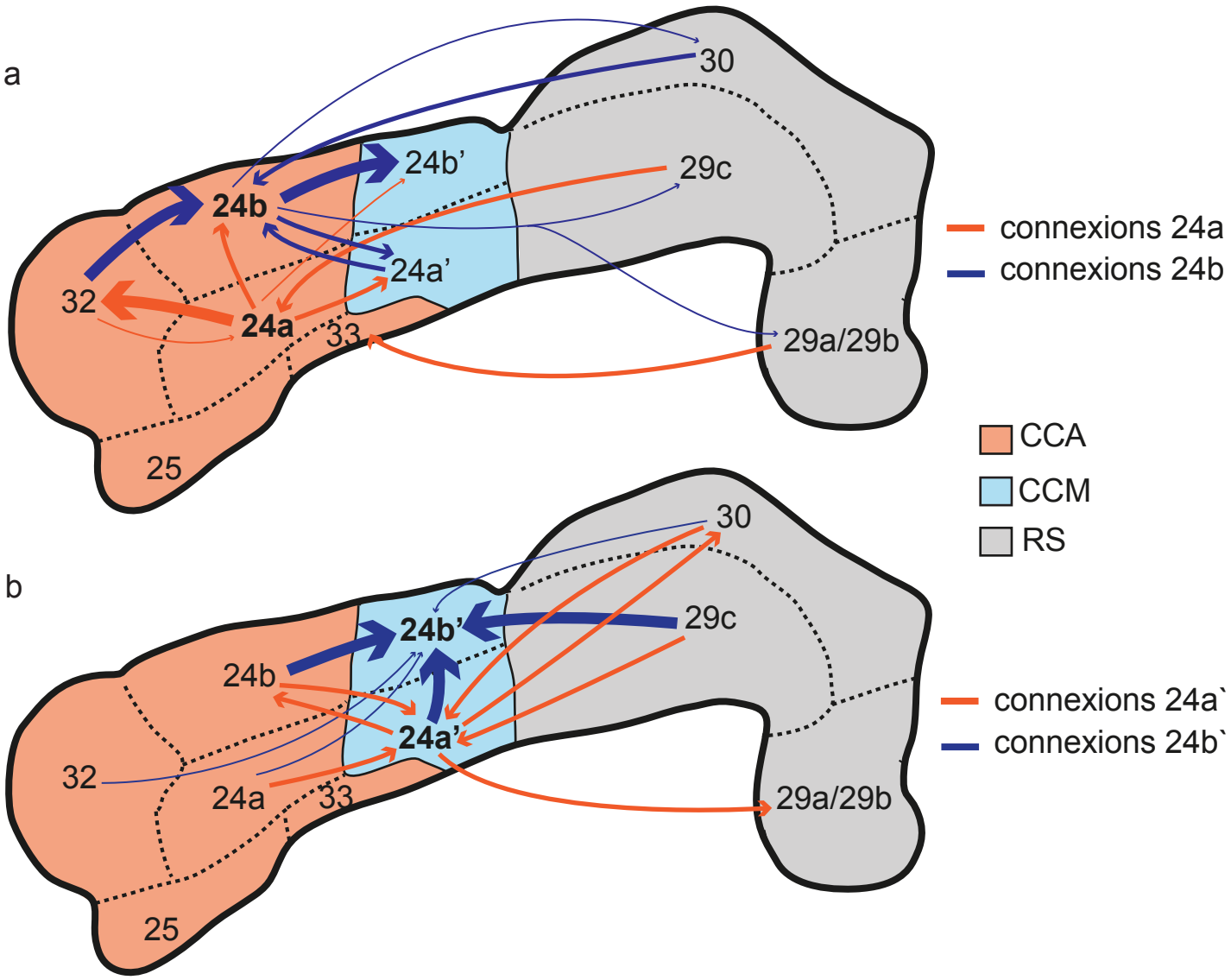


Figure 5 : Connexions intra-cingulaires des aires 24 et 24`*(adapté de Jones et al., 2005)*
Représentation schématique des afférences et des efférences du CCA (a) et du CCM (b) chez le rat. Les connexions de 24a/24a`sont représentées en orange, celles de 24b/24b`en bleu. Le CCA est représenté en rouge, le CCM en bleu et le RS en gris. L'aire 24a projette préférentiellement vers les régions antérieures, notamment l'aire 32, et reçoit des afférences des régions caudales du RS, alors que 24b projette vers les régions caudales et notamment vers 24` et reçoit des informations des régions plus ventrales comme 32 (a). Les aires 24a`et 24b`projettent toutes deux préférentiellement vers le RS et ne reçoivent que peu d'entrées des aires rostrales 25 et 32.
Abréviations: CCA: cortex cingulaire antérieur; CCM: cortex cingulaire moyen; RS: cortex rétrosplénial

caudales du RS. L'aire 24b à l'inverse projette préférentiellement vers les régions plus caudales, avec une projection dense vers 24b`, et plus modérée vers les aires 29/30 du RS, alors qu'elle reçoit sa principale entrée depuis l'aire 32 (Figure 5, a). Les aires 24a`et 24b`projettent toutes deux caudalement vers le RS et reçoivent peu d'information des régions les plus rostrales 25 et 32 (Figure 5, b). De manière intéressante, cette étude chez le rat ne montre aucune projection des aires dorsales 24b et 24b` vers leurs homologues ventraux respectifs 24a et 24a`. Il faut souligner qu'aucune injection dans 24b` n'a été faite dans cette étude de Jones et al. (2005), ceci ne permettant donc pas de cartographier les efférences de cette aire.

b) Connexions de 24a/24b

L'aire 24 du CCA reçoit et envoie des projections vers cinq grandes régions : le cortex cérébral, le thalamus, le télencéphale sous-cortical, l'hypothalamus et le tronc cérébral (Figure 6). Au sein de ces cinq régions, certaines structures communiquent avec l'aire 24 uniquement dans un sens (entrée) ou dans l'autre (sortie), alors que certaines présentent une communication réciproque.

Cortex cérébral

En plus des connexions intra-cingulaires, l'aire 24 reçoit principalement des informations des régions frontales, spécialement des aires 25 et 32 et du cortex orbital, et dans une moindre mesure du cortex insulaire agranulaire chez le rat (Hoover and Vertes 2007; Jones et al. 2005) et le singe (Barbas and Pandya 1989; Morecraft et al. 2012). Plus caudalement, elle reçoit une entrée importante du cortex pariétal associatif et du cortex visuel secondaire (Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Vogt and Miller 1983). Une entrée mineure des aires sensorielles primaires, visuelle et auditive, a également été décrite chez la souris (Zingg et al. 2014), le rat (Conde et al. 1990; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Vogt and Miller 1983) et le singe (Jurgens 1983; Morecraft et al. 2012). La formation hippocampique, notamment CA1 et le subiculum, ainsi que la région parahippocampale, formée des cortex enthorinal et perirhinal, participent également de manière modérée aux entrées de l'aire 24 chez le rongeur (Delatour and Witter 2002; Hoover and Vertes 2007; Zingg et al. 2014) et le singe (Carmichael and Price 1995a; Morecraft et al. 2012).

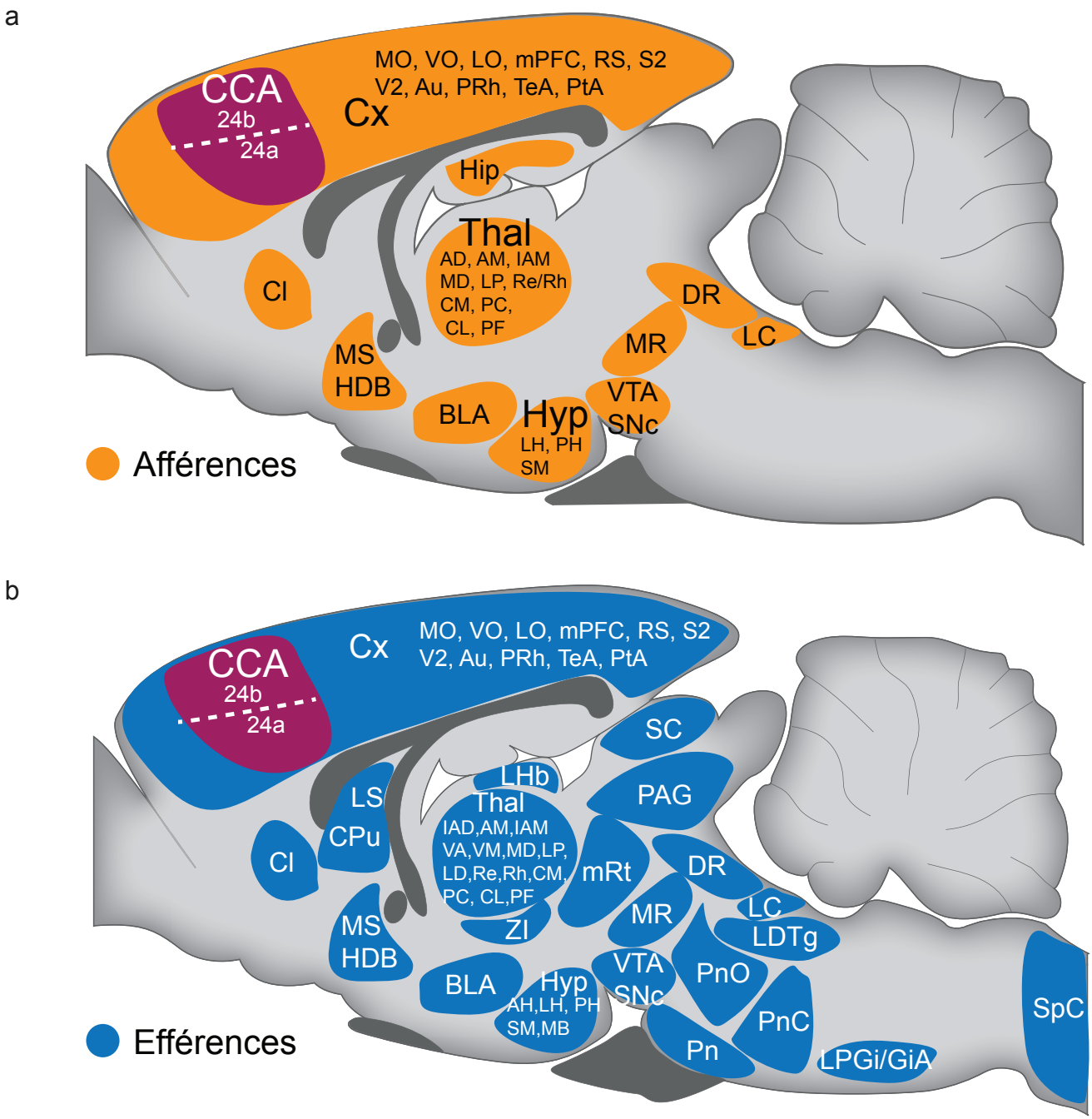


Figure 6 : Afférences et efférences de l'aire 24 du cortex cingulaire antérieur chez le rat
Représentation schématique des afférences en orange (a) et des efférences en bleu (b) des aires 24a et 24b. Voir liste des abréviations.

La majorité des connexions corticales de l'aire 24 sont réciproques. Une projection conséquente de l'aire 24 vers les cortex orbital, sensori-moteur et visuel, ainsi que vers les aires temporales comme les cortex insulaire, piriforme et enthorinal, a été observée chez le rat (Arikuni et al. 1994; Heidbreder and Groenewegen 2003; Sesack et al. 1989; Vogt and Miller 1983). L'hippocampe apparait comme une exception : il ne reçoit, chez le rat, aucune afférence de l'aire 24 (Heidbreder and Groenewegen 2003; Sesack et al. 1989). Chez le singe, une sortie vers les cortex moteur et prémoteur a été décrite (Arikuni et al. 1994; Pandya et al. 1981; Van Hoesen et al. 1993), ainsi que vers le présubiculum et CA1 (Arikuni et al. 1994; Baleydier and Mauguiere 1980). Les connexions corticales de l'aire 24 sont généralement bilatérales avec une prépondérance ipsilatérale (Gabbott et al. ; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Jones et al. 2005; Zingg et al. 2014).

Thalamus

La deuxième entrée majeure de l'aire 24 prend son origine dans le thalamus, principalement des noyaux antérieurs et la partie latérale du MD, mais également des noyaux latéraux, de la ligne médiane et intralaminaire chez le rongeur (Conde et al. 1990; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Matyas et al. 2014; Nakamura et al. 2015; Van der Werf et al. 2002; Vertes and Hoover 2008; Vertes et al. 2006) et le singe (Bachevalier et al. 1997; Carmichael and Price 1995a; Jurgens 1983). Une différence intéressante existe toutefois entre le rongeur et le singe : la projection majeure des noyaux antérieurs, et notamment du noyau antéromédian, observable chez le rongeur, n'est pas retrouvée chez le singe où elle a été décrite comme mineure voir inexistante (Bachevalier et al. 1997; Vogt et al. 1987). La plupart des noyaux intralaminaires et de la ligne médiane contribue modérément à la projection thalamique vers l'aire 24, avec une entrée plus dense des noyaux ventraux de la ligne médiane (reuniens et rhomboïde) que des noyaux dorsaux de la ligne médiane comme les noyaux paraventriculaire et paraténial, chez le rat (Conde et al. 1990; Hoover and Vertes 2007; Horikawa et al. 1988; Van der Werf et al. 2002; Vertes 2006; Vertes and Hoover 2008) et le singe (Bachevalier et al. 1997; Carmichael and Price 1995a; Jurgens 1983).

Ces connexions de l'aire 24 avec le thalamus sont globalement réciproques (Arikuni et al. 1994; Pandya et al. 1981; Van Hoesen et al. 1993). Si la voie thalamo-corticale

est exclusivement ipsilatérale, la voie cortico-thalamique, préférentiellement ipsilatérale, projette également de façon mineure du côté controlatéral. Chez le rat, la projection cingulo-thalamique majeure cible les noyaux antéromédian et interantéromédian, la partie latérale du MD ainsi que les noyaux ventromédian, reuniens et rhomboïde (Gabbott et al. 2005; Matyas et al. 2014; Vertes 2002; Wright et al. 2013). Chez le singe, une projection modérée vers le pulvinar a également été mise en évidence (Carmichael and Price 1995a; Leichnetz and Astruc 1976; Ongur and Price 2000; Romanski et al. 1997; Tanaka 1976).

Télencéphale sous-cortical et hypothalamus

Un certain nombre de structures appartenant au télencéphale basal sous-cortical contribue aux entrées de l'aire 24. Le noyau basolatéral antérieur de l'amygdale (BLA) et le claustrum (Cl) y projettent très densément chez le rongeur et le singe (Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Matyas et al. 2014; McDonald 1987; Smith and Alloway 2014; Van Hoesen et al. 1993; Vogt and Pandya 1987; Zingg et al. 2014), de façon réciproque chez le rat (Cassell and Wright 1986; Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Sesack et al. 1989) et le singe (Baleydier and Mauguiere 1980; Carmichael and Price 1995a; Kunishio and Haber 1994; Ongur and Price 2000; Pandya et al. 1973; Van Hoesen et al. 1993). De manière intéressante, la connexion claustro-cingulaire est bilatérale chez le rat, avec une composante ipsilatérale plus forte, alors qu'elle est décrite comme exclusivement ipsilatérale chez la souris (Li et al. 1986; Smith and Alloway 2014; Zingg et al. 2014). A l'inverse, la projection de l'aire 24 vers le Cl est majoritairement controlatérale chez le rat (Smith and Alloway 2014). Une projection unidirectionnelle de l'aire 24 vers le striatum a également été mise en évidence, notamment vers le striatum dorsal, principalement dans les régions médiane et intermédiaire du caudé-putamen. Une projection mineure vers le striatum ventral a également été observée chez le rat (Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Mailly et al. 2013; Sesack et al. 1989).

Le système cholinergique corticopète, en particulier la bande diagonale de Broca, le septum médian ainsi que le noyau basal participent aux entrées du télencéphale basal dans l'aire 24 chez le rat (Chandler et al. 2013; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007) et le singe (Everitt et al. 1988; Jurgens 1983), et est

également décrit comme une cible des sorties de l'aire 24 (Heidbreder and Groenewegen 2003; Sesack et al. 1989).

Les entrées hypothalamiques vers l'aire 24 sont décrites comme assez modérées, arrivant principalement de l'aire hypothalamique latérale et du noyau supramammillaire chez le rat (Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007) et le singe (Jurgens 1983; Pan and McNaughton 2004). La projection cingulo-hypothalamique est quant à elle majoritairement dirigée vers les régions latérale et postérieure de l'hypothalamus (Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Sesack et al. 1989).

Tronc cérébral

Chez le rat et le singe, l'aire 24 possède des connexions réciproques avec les centres monoaminergiques du tronc cérébral, notamment la substance noire *pars compacta* (SNc), l'aire tegmentale ventrale (VTA), les noyaux dorsal (DR) et médian du raphé ainsi que le locus coeruleus (LC) (Chandler et al. 2013; Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Jurgens 1983; Lewis 1992; Ongur and Price 2000; Sesack et al. 1989; Takada and Hattori 1986). Des entrées plus mineures proviennent des noyaux interpédonculaire et parabrachial, de la formation réticulée mésopontine, de l'aire prérubrale ainsi que de la substance grise périaqueductale chez le rat (Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007) et le singe (Berger et al. 1988; Jurgens 1983; Lewis 1992). A l'inverse, l'aire 24 envoie des projections assez denses vers ces mêmes régions du tronc cérébral, notamment la colonne dorso-latérale de la substance grise périaqueductale et le collicule supérieur (Comoli et al. 2012; Floyd et al. 2000; Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Ongur and Price 2000; Sesack et al. 1989). D'autres efférences ont également été décrites chez le rat vers les noyaux pontins, la formation réticulée mésencéphalique et le noyau du tractus solitaire (Gabbott et al. 2005; Wiesendanger and Wiesendanger 1982), ainsi que vers une structure mésopontique nouvellement définie : la queue de l'aire tegmentale ventrale aussi appelée noyau tegmental rostro-médian (Jhou et al. 2009; Kaufling et al. 2009). Enfin, les neurones de l'aire 24 du CCA projettent aux segments cervicaux et thoraciques de la moelle épinière (Chen et al. 2014; Floyd et al. 2000; Miller 1987).

Chez le singe, des sorties vers des régions du tronc cérébral similaires à celles décrites chez le rat ont été observées, incluant la SNc, la VTA, la région dorso-

latérale de la substance grise périaqueductale, la formation réticulée du mésencéphale, le noyau rouge, le DR et le LC (An et al. 1998; Burman et al. 2000; Frankle et al. 2006; Leichnetz and Astruc 1976; Van Hoesen et al. 1993). Il est important de rappeler que la projection cingulo-spinale originaire du CCA chez le rongeur prend sa source dans le CCM chez le singe (Luppino et al. 1994; Vogt and Paxinos 2014).

c) Connexions de 25 et 32 : comparaison avec 24

Dans la littérature, une distinction tant d'un point de vue fonctionnel que connectomique tend à être faite entre les régions ventrale et dorsale du mPFC du rongeur, qui, dans le contexte du CCA, représentent respectivement les aires 25/32 et 24 (Heidbreder and Groenewegen 2003). Nous indiquerons ici les principales différences de connectivité entre les aires 25 et 32 et l'aire 24 concernant certaines régions corticales, le thalamus et différentes régions limbiques comme l'hippocampe et l'amygdale.

Globalement, les projections corticales des aires 25 et 32 se font de manière très dense vers le cortex insulaire agranulaire et les régions temporales avec des entrées importantes des cortex périrhinal, enthorinal et ectorhinal (Hoover and Vertes 2007; Hurley et al. 1991; Reep and Winans 1982; Sesack et al. 1989; Vertes 2004). A l'inverse de l'aire 24, une connexion dense et réciproque est également établie avec le cortex piriforme (Datiche and Cattarelli 1996; Hoover and Vertes 2007; Hurley et al. 1991). Les cortex rétrosplénial, moteur primaire ainsi que les aires somatosensorielles ne semblent pas ou peu en relation avec les aires 25 et 32, ces dernières favorisant plutôt l'aire 24 (Conde et al. 1995; Jones et al. 2005; Sesack et al. 1989; Van Eden et al. 1992). Les connexions réciproques du CCA avec le thalamus sont également organisées de manière topographique avec un gradient ventro-dorsal dans le CCA correspondant à un gradient médio-latéral dans le thalamus (Heidbreder and Groenewegen 2003). Les aires ventrales 25 et 32 semblent ainsi privilégier des connexions avec les noyaux de la ligne médiane comme les noyaux reuniens, rhomboïde, paraténial et paraventriculaire, ainsi que la partie médiane du MD, là où l'aire 24 privilégie plutôt les noyaux intralaminaires et le segment latéral du MD (Freedman and Cassell 1991; Groenewegen 1988; Hoover and Vertes 2007; Vertes 2002; Vertes 2004). De même, les connexions importantes

que partage l'aire 24 avec les noyaux antérieurs et ventraux sont reportées comme beaucoup plus faibles avec les aires 25 et 32 (Hoover and Vertes 2007).

Les connexions des aires 25 et 32 avec les régions limbiques sont également organisées différemment de celles de l'aire 24. La partie ventrale du CCA, en particulier l'aire 25, semble ainsi favoriser les régions médiane et latérale de l'hypothalamus, là où la partie dorsale cible préférentiellement les aires latérale et postérieure (Floyd et al. 2001; Sesack et al. 1989; Vertes 2004). De même, les relations cingulo-amygdaliennes sont différentes selon les aires du CCA considérées. Là où l'aire 24 partage des connexions réciproques avec le BLA uniquement, l'aire 25 et, dans une moindre mesure l'aire 32, projettent de manière importante à l'ensemble du complexe amygdaloïde, en particulier aux noyaux central, médial, basomédian et cortical de l'amygdale (Hoover and Vertes 2007; Hurley et al. 1991; McDonald 1998; McDonald et al. 1996; Vertes 2004). L'afférence hippocampique vers le CCA apparait également privilégier les aires ventrales, certaines études rapportant une projection en provenance des régions hippocampiques ventrales de CA1 et du subiculum plus denses vers 25 et 32 que vers 24 (Hoover and Vertes 2007; Jay and Witter 1991; Swanson 1981).

Les connexions du CCA avec le télencéphale basal et les ganglions de la base sont également différentes selon les aires considérées. Là où l'aire 24 est principalement connectée avec la branche horizontale de la bande diagonale de Broca, les aires 25 et 32 favorisent les régions médianes du septum et de la branche verticale de la bande diagonale de Broca (Gaykema et al. 1990; Gaykema et al. 1991; Sesack et al. 1989). Une projection assez dense est également décrite depuis l'aire 25 vers certaines structures olfactives comme le noyau olfactif antérieur et le tubercule olfactif (Berendse et al. 1992; Datiche and Cattarelli 1996). Enfin, tandis que l'aire 24 projette fortement au caudé-putamen et plus faiblement au coeur du noyau accumbens, les aires 25 et 32 semblent favoriser la coquille du noyau accumbens (Berendse et al. 1992; Ding et al. 2001; Hurley et al. 1991; Sesack et al. 1989).

Enfin, les connexions des différentes aires du CCA avec le tronc cérébral montrent également quelques spécificités. Par exemple, les afférences de la VTA vers les aires 25 et 32 sont plus denses que celles de la SNc, à l'inverse de celles vers l'aire 24 (Thierry et al. 1973). Plus caudalement, les projections des aires 25 et 32 ciblent de manière importante les centres autonomes du pont et du bulbe rachidien, alors que l'aire 24 projette aux collicules supérieurs ainsi qu'à la moelle épinière, en

particulier dans les colonnes intermédiolatérales (Hurley et al. 1991; Sesack et al. 1989; Van Eden and Buijs 2000). Enfin, si l'ensemble du CCA projette à la PAG, une relation topographique semble également exister, avec une projection plus dense des aires 25 et 32 vers la PAG ventro-médiale alors que l'aire 24 cible plutôt sa région dorso-latérale (Floyd et al. 2000).

d) Connexions de 24a`/24b`

Les données disponibles sur la connectivité des aires 24a`/24b`du CCM sont essentiellement issues de travaux menés chez le singe, abordant les connexions du CCA, voire du gyrus cingulaire. En effet, la notion de CCM reste récente, en particulier chez le rongeur. Il convient alors de se référer aux figures indiquant les sites d'injections pour extraire les données pouvant concerner le CCM, même s'il n'est pas nommément individualisé dans les articles.

De manière globale, il semble que le CCM et le CCA partagent de nombreuses connexions, mais quelques spécificités peuvent être dégagées. Les connexions corticales du CCM semblent privilégier les régions pariétale et temporale. Ainsi, le CCM murin reçoit des afférences du cortex périrhinal et envoie en retour des projections vers les cortex postrhinal et enthorinal médian (Deacon et al. 1983; Jones and Witter 2007). Cette projection réciproque, ainsi qu'une entrée conséquente depuis le cortex insulaire, a également été mise en évidence chez le primate (Morecraft and Van Hoesen 1998; Reser et al. 2016; Vogt and Pandya 1987; Yukie and Shibata 2009). De plus, une entrée des régions parahippocampales du présubiculum et du parasubiculum a été décrite dans le CCM chez le rongeur (Jones and Witter 2007), l'homme (Morecraft and Van Hoesen 1998) et le singe (Yukie and Shibata 2009). Enfin, un certain nombre de régions motrices comme l'aire prémotrice ou le cortex moteur primaire participent aux afférences du CCM chez le primate (Dum and Strick 1991; Morecraft and Van Hoesen 1992; Muakkassa and Strick 1979). Comme le CCA, le CCM est en étroite relation avec les noyaux antérieurs du thalamus, avec une entrée originaire surtout des noyaux antéromédian et antérodorsal et une participation plus mineure du noyau interantéromédian chez le rat et le singe (Horikawa et al. 1988; Shibata 1993; Shibata and Yukie 2009). Les noyaux ventraux sont également en interaction réciproque avec le CCM chez le singe (Hatanaka et al. 2003; McFarland and Haber 2002; Reser et al. 2016; Van

Hoesen et al. 1993; Vogt et al. 1987). Enfin, à l'inverse du CCA, des afférences assez denses des noyaux intralaminaires et de la ligne médiane représentent la deuxième porte d'entrée thalamique du CCM, avec une entrée importante des noyaux centrolatéral et centromédian, ainsi que reuniens et rhomboïde chez le rat (Ohtake and Yamada 1989; Shibata 1993; Vertes et al. 2012) et le primate (Hatanaka et al. 2003; Shibata and Yukie 2009; Vogt et al. 1987).

Au sein du télencéphale, les informations disponibles dans la littérature sont peu nombreuses et concernent uniquement le primate. Une projection assez dense de l'amygdale latérobasale, uniquement vers la région la plus rostrale du CCM a été montrée chez le singe (Vogt and Pandya 1987; Yukie and Shibata 2009). Enfin, comme évoqué précédemment (voir **I. 3)** ***c) Modèle actuel du cortex cingulaire : comparaison rongeur/primate***), la projection cingulo-spinale chez le primate est bilatérale et originaire du CCM (Biber et al. 1978; Dum and Strick 1991; Luppino et al. 1994), alors que chez le rongeur elle prend son origine dans le CCA (Gabbott et al. 2005; Vogt and Paxinos 2014). Aucune donnée n'est disponible concernant d'éventuelles spécificités de connexion du CCM avec le tronc cérébral.

IV. Les rôles du CCA

Les connexions du CCA, en particulier des aires 24a et 24b, le placent au centre d'un réseau à l'interface de régions motrices et sensorielles et de centres émotionnels et cognitifs. Cette région corticale a été impliquée dans une multitude de fonctions en condition physiologique et lors de pathologies. Nous présenterons d'abord brièvement les principales fonctions associées au CCA et détaillerons particulièrement les données relatives à son implication dans les modèles de troubles anxio-dépressifs et de douleur chez le rongeur.

1) Rôles physiologiques

Les différentes études menées chez le rongeur ont pour l'heure associé un grand nombre de fonctions à l'aire 24 murine (Cassaday et al. 2014; Dalley et al. 2004; Deziel et al. 2015; Kesner and Churchwell 2011; Livingston-Thomas et al. 2015). Grâce entre autre à la connaissance et la compréhension anatomique que nous avons aujourd'hui de cette région chez le rongeur, il est devenu possible de raffiner l'étude de ces fonctions en les rattachant à une région cingulaire précise.

a) Processus attentionnels, apprentissage et mémoire

L'aire 24 est impliquée dans les différentes étapes des processus attentionnels, d'apprentissage et de mémoire. Les phénomènes attentionnels, en particulier en relation avec la vision, nécessitent l'intégrité de l'aire 24 (Koike et al. 2016; Totah et al. 2009; Zhang et al. 2014). Ainsi, une lésion excitotoxique de l'aire 24 chez le rat provoque une diminution du nombre de réponses correctes lors d'une tâche de discrimination visuelle à choix multiples (Chudasama et al. 2003b; Newman et al. 2015; Passetti et al. 2002), observable également par une inactivation pharmacologique au muscimol, agoniste GABAergique (Kim et al. 2016b), ou après une inactivation chimiogénétique (Koike et al. 2016). Concernant les fonctions d'apprentissage et de mémoire, l'implication de l'aire 24 semble sélective. Un certain nombre d'études chez le rat et la souris mettent en évidence son rôle dans le rappel d'une mémoire ancienne d'un événement désagréable, un choc électrique, alors qu'aucune implication de l'aire 24 ne semble nécessaire à la mémoire récente, évaluée de quelques heures à quatre jours selon les études (Aceti et al. 2015; Bontempi et al. 1999; Frankland et al. 2004; Goshen et al. 2011; Liu et al. 2009). Son

rôle dans la mémoire associative est également documenté. L'aire 24 est connue pour jouer un rôle dans l'association d'un stimulus conditionnel avec un stimulus inconditionnel, lorsque les stimuli sont distants dans le temps (trace conditioning) mais pas quand les stimuli sont présentés en succession immédiate (delay conditioning) (Bussey et al. 1997b; Connor and Gould 2016; Han et al. 2003). L'association objet/espace implique également l'aire 24 dans des tâches de reconnaissance spatiale (Weible et al. 2012; Weible et al. 2009). Toutefois, aucun effet de la lésion ou de l'inactivation de cette structure n'a été observé dans la mémoire de travail associée à l'apprentissage d'une réponse motrice ou encore de la valeur récompensante d'une nourriture (DeCoteau et al. 1997; Passingham et al. 1988; Ragozzino et al. 1998; St-Laurent et al. 2009).

Les différentes fonctions du CCA peuvent être mises en parallèle à ses connexions avec le reste du cortex cingulaire, les régions pariétales associatives, en particulier visuelles, le claustrum, ainsi que des noyaux thalamiques comme les noyaux antérieurs ou le noyau reuniens (voir **II.2) a) Connexions intracingulaires ; b) Connexions de 24a/24b**).

b) Stratégies comportementales et prise de décision

Le CCA est associé à de nombreuses fonctions exécutives qui semblent toutefois réparties selon ses différentes sous-régions (Dalley et al. 2004; Kesner and Churchwell 2011). L'aire 24 a ainsi été impliquée dans certaines stratégies comportementales et peut sous-tendre l'organisation de différentes séquences comportementales, comme presser sur un levier ou toucher du museau un emplacement précis, nécessaires à l'obtention d'une récompense (Bailey and Mair 2007; Delatour and Gisquet-Verrier 2001; Mogensen and Holm 1994). De même, son implication dans le choix du comportement de l'animal face à la valence d'une récompense ou en fonction du travail nécessaire à l'obtention de cette récompense est bien documenté (Dalley et al. 2004; Hosking et al. 2014; Kesner and Churchwell 2011; Rudebeck et al. 2006). L'inactivation de 24b chez le rat pousse l'animal à préférer une petite récompense immédiate, sans effort à fournir, plutôt qu'une récompense importante nécessitant un effort (Hosking et al. 2014). De plus, l'analyse de l'activité électrophysiologique des neurones du CCA met en évidence leur rôle majeur dans l'encodage du coût/bénéfice de l'information donnée (Wang et al. 2016). De manière intéressante, aucun effet de l'inactivation de cette structure n'a été

observé dans une tâche de prise de décision basée sur l'incertitude de la valeur de la récompense (St Onge and Floresco 2010). Dans plusieurs de ces études, une impulsivité comportementale peut être observée suite à une lésion ou une inactivation de l'aire 24, interprétée par les auteurs comme une impulsivité plutôt d'ordre moteur et non due à une prise de décision non réfléchie (Bussey et al. 1997a; Cardinal et al. 2002; Hosking et al. 2014). Là encore, plusieurs connexions reconnues du CCA sont mises en jeu dans ces fonctions, en particulier celles avec les cortex préfrontal, orbitofrontal et prémoteur et le MD (voir **II. 2)** ***a) Connexions intracingulaires*** **;** ***b) Connexions de 24a/24b***).

c) Emotions

De part ses connexions avec l'amygdale et un certain nombre de structures autonomes comme la substance grise périaqueductale (voir **II. 2)** ***b) Connexions de 24a/24b***), l'aire 24 est également considérée comme une interface majeure des émotions. La peur est l'une des émotions les plus étudiées chez le rongeur car elle peut être évaluée facilement, par des comportements d'immobilité (« freezing ») ou de vocalisation, et dans des paradigmes simples à mettre en place. Par exemple, le conditionnement pavlovien de peur basé sur l'association d'un stimulus conditionnel, un son par exemple, à un stimulus inconditionnel comme un choc électrique, est très largement employé (Connor and Gould 2016; Courtin et al. 2013; Cullen et al. 2015; Goshen et al. 2011; Han et al. 2003; Tang et al. 2005). Ainsi, une augmentation de l'expression du gène précoce *c-fos*, marqueur d'activité cellulaire, est mesurable dans le CCA de rats réexposés à un son au préalable associé à un choc électrique (Smith et al. 1992). Des modifications morphologiques des neurones de l'aire 24 ont également été observées chez des animaux ayant subit un conditionnement pavlovien, comme l'augmentation de la croissance des épines dendritiques (Restivo et al. 2009), mais aussi de leur taille et de leur densité (Vetere et al. 2011). Des expériences modulant l'activité de cette structure montrent également son implication fondamentale dans la formation de la mémoire aversive. Là où son inactivation pharmacologique (Bissiere et al. 2008; Sacchetti et al. 2002; Tang et al. 2005) et génétique (Zhao et al. 2005), réalisées avant l'expérience, bloquent le conditionnement de peur, l'activation de l'aire 24 par un agoniste glutamatergique ou un antagoniste GABAergique potentialise les comportements de peur liés aux indices et au contexte (Bissiere et al. 2008; Tang et al. 2005). Cette observation est

également faite par Johansen et Fields (2004) qui montrent qu'une microinjection d'un agoniste glutamatergique dans l'aire 24 est suffisante à produire une aversion chez un rat dans une expérience de conditionnement de place. Il est important de noter que les autres aires du CCA, sous-tendent des fonctions différentes de l'aire 24. L'aire 32 serait impliquée dans l'expression du conditionnement de peur, alors que l'aire 25 sous-tendrait plutôt la consolidation de la mémoire d'extinction de la peur (Courtin et al. 2013).

Certaines études sont allées plus loin en analysant les comportements développés par un animal face à la souffrance d'un de ses congénères, pouvant être assimilé à l'empathie chez l'homme (Jeon et al. 2010; Sivaselvachandran et al. 2016). Les souris exposées pendant plusieurs minutes à la vue d'un congénère subissant des chocs électriques développent un comportement de « freezing », aboli par l'inactivation du CCA (Jeon et al. 2010; Kim et al. 2014).

D'autres études ont également permis de montrer le rôle du CCA dans divers comportements ou pathologies liés aux fonctions émotionnelles comme la prédiction ou la recherche d'une récompense (Bussey et al. 1997a; Takenouchi et al. 1999), l'expression de comportements de type anxieux et le stress (Albrechet-Souza et al. 2009; Blanco et al. 2009; Radley et al. 2008), ainsi que les interactions sociales et les comportements d'agression dirigés vers un intrus (Ferris et al. 2008; Rudebeck et al. 2007). L'aire 24 est également identifiée comme indispensable à l'aspect affectif désagréable de la douleur chez le rongeur, comme démontré par des expériences d'aversion ou de préférence de place liées à un stimulus nociceptif ou au soulagement d'une douleur (Barthas et al. 2015; Casey 1999; Johansen et al. 2001; Qu et al. 2011; Yalcin et al. 2014; Zhuo 2007).

2) Les pathologies impliquant le CCA

Le rôle majeur du CCA dans les émotions, ainsi que dans un grand nombre de fonctions exécutives telles que l'attention, la mémoire ou la prise de décisions, positionne cette structure comme un acteur clé dans un grand nombre de pathologies dans lesquelles ces différentes fonctions sont altérées. Nous nous focaliserons dans cette partie sur l'implication du CCA dans les troubles anxieux et dépressifs, ainsi que dans la douleur chronique. Il est toutefois important de noter que chez l'homme, des altérations morphologiques et/ou fonctionnelles du CCA ont

également été mises en évidence dans d'autres pathologies psychiatriques telles que les troubles bipolaires (Singh et al. 2012), les troubles obsessionnels compulsifs (Kuhn et al. 2013), le stress post-traumatique (Kitayama et al. 2006; Rauch et al. 2003) ou encore la schizophrénie (Byun et al. 2012; Lee et al. 2013).

a) Trouble dépressif majeur

Chez l'homme, le trouble dépressif majeur (TDM) est une pathologie psychiatrique définie dans le Manuel Diagnostique et Statistique des Troubles Mentaux V (DSM-V) par une liste de neuf symptômes, tels que la diminution ou perte de plaisir, une variation de poids ou des pensées de mort récurrentes. Le TDM peut être associé à des modifications morphologiques du CCA. Un certain nombre d'études d'imagerie fonctionnelle chez l'homme mettent en évidence une diminution de la taille de cette structure (Drevets et al. 1997; Yucel et al. 2008), ainsi qu'une diminution du volume de la substance blanche associée (Wu et al. 2011). Chez le rongeur, des modifications de la morphologie des neurones du CCA ont été décrites dans des modèles animaux de diabète ou de cancer, développant à long terme des symptômes de type dépressif (Castillo-Gomez et al. 2015; Nashed et al. 2015). Les auteurs font état d'une diminution de l'arborisation dendritique, de la longueur des dendrites ou encore de la densité des épines dendritiques observables dans les neurones pyramidaux du CCA et les interneurones GABAergiques. De telles modifications ont également été rapportées chez des animaux ayant subit un stress chronique (Goldwater et al. 2009; Henckens et al. 2015; Lyttle et al. 2015) ou un stress prénatal (Harker et al. 2015).

L'activité globale du CCA semble modifiée lors des TDM. Par mesure du métabolisme du glucose et du flux sanguin au repos, plusieurs études montrent aussi une hyperactivité de la région prégénuale du CCA (aires 32/24), alors que la partie subgénuale (aires 25) serait plutôt inactive (Mayberg et al. 1999; Yoshimura et al. 2010) chez des patients dépressifs. Une augmentation du marqueur d'activité c-Fos dans le CCA a également été mise en évidence chez des souris en condition de défaite sociale présentant des comportements de type dépressif (Yu et al. 2011b). Une altération des systèmes de neurotransmission peut également être observée. Ma et al. (2016) ont ainsi mis en évidence, chez des souris soumises à un stress chronique imprévisible, une diminution de la libération du GABA par les interneurones mais également une diminution de sa recapture. D'autres systèmes de

neurotransmission comme les systèmes sérotoninergique et dopaminergique sont également mis en jeu dans les symptômes de type dépressif chez le rongeur (Albert et al. 2014; Espejo and Minano 1999), et l'homme (Abdallah et al. 2015; Reivich et al. 2004).

Une altération du réseau de connexions du CCA peut également contribuer au développement de cette pathologie. Par exemple, des études d'imagerie fonctionnelles mettent en évidence une diminution de la connectivité fonctionnelle intracingulaire du CCA chez des individus sensibles à l'effet pro-dépressif du stress (Tripp et al. 2012) ou dépressifs (Yoshimura et al. 2017). Les connexions cortico-sous corticales semblent également impactées, avec notamment une augmentation de la connectivité fonctionnelle observable entre la région subgénuale du CCA et l'amygdale chez des patients souffrant de TDM, alors qu'une diminution des connexions avec le cortex insulaire ou encore le reste du cortex cingulaire est mesurée (Ho et al. 2014; Tadayonnejad et al. 2014). Peu d'études chez le rongeur permettent d'établir un parallèle avec les modifications de la connectivité fonctionnelle du CCA observables dans le TDM chez l'homme. Une étude réalisée par Zhen et al. (2012) chez des rats soumis à un protocole de stress chronique imprévisible met en évidence une diminution de la synchronisation des oscillations entre le thalamus et notamment le noyau latérodorsal et l'aire 32. Une telle diminution est également observée entre le CCA et l'hippocampe chez des souris C57Bl/6J ayant subit un stress prénatal (Negron-Oyarzo et al. 2015). Enfin, une étude d'imagerie fonctionnelle menée chez des rats ayant subit un protocole de stress chronique a permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'activité du « default mode network », réseaux de structures comprenant le CCA l'amygdale ou encore l'hippocampe ayant une activité basale au repos (Henckens et al. 2015).

L'ensemble de ces modifications morpho-fonctionnelles met en évidence le rôle fondamental du CCA dans le TDM et représentent des pistes potentielles pour traiter cette pathologie. Un certain nombre d'études chez l'homme montrent une réduction de ces altérations du CCA après un traitement aux antidépresseurs (Drevets et al. 2002; Mayberg et al. 2000), par stimulation profonde ou « deep brain stimulation » (DBS) (Mayberg et al. 2005; Torres-Sanchez et al. 2017) ou suite à une psychothérapie (Goldapple et al. 2004; Yoshimura et al. 2014). Dans un modèle de

souris présentant des comportements de type dépressif induits par une douleur chronique, une lésion de l'aire 24 normalise les performances des animaux dans les tests d'hyponéophagie, de pulvérisation de solution sucrée et de nage forcée (Barthas et al. 2015). D'autres expériences menées chez le rat montrent une amélioration des symptômes dépressifs en manipulant le CCA par stimulation électrique subconvulsive (Gersner et al. 2010), stimulation profonde (Rummel et al. 2016), ou inactivation (Scopinho et al. 2010; Slattery et al. 2011). Enfin, il a également été observé qu'un traitement sous-chronique et chronique par un antidépresseur induisait une diminution de l'expression du gène c-fos dans le CCA de rats naïfs lors d'un test d'hyponéophagie (Bechtholt et al. 2008).

Il est donc possible de retrouver des équivalences chez l'homme et le rongeur de l'implication du CCA dans le TDM grâce à différents modèles de trouble dépressif.

b) Anxiété généralisée

L'anxiété généralisée est un trouble psychiatrique défini par le DSM-V par plusieurs symptômes comme une inquiétude excessive, une irritabilité ou encore des déficits cognitifs (Mineka et al. 1998). La majorité des études d'imagerie fonctionnelle analysant l'activité du CCA chez des patients anxieux rapporte une hypoactivité de cette région, reflétant ainsi un contrôle descendant inadéquat des émotions (Ball et al. 2013; Blair et al. 2012; Mochcovitch et al. 2014; Palm et al. 2011). La diminution de l'activité du CCA des patients est corrélée à un défaut d'adaptation de leurs émotions aux images qui leurs sont présentées, cette diminution d'activité étant également positivement corrélée au degré d'anxiété (Ball et al. 2013). Toutefois, quelques études montrent une hyperactivité du CCA lors de la présentation d'images effrayantes (Blair et al. 2008), ou de l'énonciation de phrases inquiétantes (Paulesu et al. 2010), validant ainsi l'hypothèse d'une mauvaise régulation des fonctions sous-tendues par le CCA. Les études précliniques démontrent plutôt une hyperactivité du CCA associée au phénotype anxieux. Chez le rongeur, une augmentation de l'expression de la protéine c-Fos (Albrechet-Souza et al. 2009; de Andrade et al. 2013) ainsi qu'une hyperexcitabilité des neurones du CCA (Bi et al. 2013) sont observées. De même, l'activation chimique de l'aire 32 induit une augmentation des comportements de type anxieux, mesurés dans un test d'open-field chez des souris naïves (Suzuki et al. 2016), ce qui est également rapporté par Barthas et al. après activation optogénétique de l'aire 24 (Barthas et al. 2015).

Tout comme dans le TDM, une altération de la connectivité du CCA participant aux fonctions cognitives et émotionnelles est également mise en évidence chez des patients présentant un trouble anxieux généralisé. Une diminution du couplage de l'activité du CCA avec un certain nombre de structures comme le cortex insulaire, le striatum ou encore l'amygdale est ainsi reportée (Etkin et al. 2010; Szekely et al. 2016; Tromp et al. 2012). En outre, une étude menée récemment chez la souris met en évidence qu'une stimulation optogénétique de la voie de projection de l'amygdale vers les aires 25/32 est suffisante à induire une diminution du temps passé dans les bras ouverts d'un labyrinthe en croix surélevé ainsi que du temps passé au centre d'un open-field, alors qu'une inhibition de cette même voie provoque un effet anxiolytique (Felix-Ortiz et al. 2016). De manière intéressante, l'inhibition de la projection de l'hippocampe ventral vers la même région du CCA induit des effets comportementaux similaires (Felix-Ortiz et al. 2013; Padilla-Coreano et al. 2016).

Le CCA représente donc une cible importante pour les traitements de l'anxiété. En effet, les drogues anxiolytiques comme les benzodiazépines, agonistes des récepteurs GABA, semblent avoir un effet direct sur le CCA en réduisant son activité (Strawn et al. 2012) ainsi que son métabolisme du glucose (Pifarre et al. 2015). Dans les études chez le rongeur, une inhibition (Kim et al. 2011) ou une lésion (Barthas et al. 2015; Blanco et al. 2009; Jinks and McGregor 1997) du CCA induisent des effets anxiolytiques chez le rat et la souris. De la même manière, une injection bilatérale de midazolam dans l'aire 24a induit une diminution des comportements de type anxieux mesurés dans un labyrinthe en croix surélevé chez des rats naïfs (Albrechet-Souza et al. 2009), tandis qu'un traitement aigu au chlordiazepoxide réduit l'expression de *c-fos* dans le CCA ainsi que le comportement de peur induit par la présentation d'une nourriture nouvelle (Bechtholt et al. 2008).

c) Douleur chronique

La douleur est définie par l'Association Internationale de l'Etude de la Douleur (IASP) comme « une sensation et une expérience émotionnelle désagréables en réponse à une atteinte tissulaire réelle, potentielle, ou décrite en ces termes ». La douleur représente un signal d'alarme nécessaire à l'intégrité du corps et à la survie, mais lorsqu'une chronicité s'installe, la douleur devient pathologique. La douleur est composée par au moins deux dimensions dissociables : la composante sensori-

discriminative, permettant d'évaluer la localisation ou l'intensité de la douleur, et la composante affective-motivationnelle, caractérisée par l'aspect émotionnel désagréable de la douleur. Le CCA est l'une des régions appartenant à la matrice de la douleur, groupe de structures activées lors d'un stimulus nociceptif comprenant le cortex insulaire, l'amygdale ou encore le thalamus (Garcia-Larrea and Peyron 2013). Ces structures interconnectées sont également décrites chez le rongeur comme jouant un rôle majeur dans la douleur (Jurik et al. 2015).

En plus d'être activé suite à des stimuli nociceptifs de différentes natures, par exemple mécanique, thermique, ou électrique, au niveau cutané ou viscéral (Duerden and Albanese 2013; Pogatzki-Zahn et al. 2010; Vandenbergh et al. 2005), le CCA a également été impliqué dans l'attente, l'anticipation, l'attention, l'évaluation, l'empathie, l'apprentissage et la mémoire de la douleur (Bantick et al. 2002; Garcia-Larrea and Peyron 2013; Hsieh et al. 1999; Legrain et al. 2012). Les résultats obtenus chez le rongeur soulignent son rôle fondamental dans la douleur. Une augmentation de l'activité des neurones du CCA est enregistrée après une stimulation nociceptive de la patte d'un rat (Zhang et al. 2011), ainsi qu'une augmentation de la densité de récepteurs AMPA chez des souris présentant une douleur viscérale (Liu et al. 2015). De même, une étude menée récemment par Kang et collaborateurs (2015) montre qu'une activation optogénétique des neurones pyramidaux de l'aire 24 réduit de manière significative le seuil de sensibilité mécanique des animaux testés par les filaments de von Frey, alors qu'une inhibition par stimulation des interneurones PV+ et SOM+ produit un effet analgésique chez les souris soumises à une douleur inflammatoire par une injection d'adjuvant de Freund. Des résultats similaires, obtenus par inactivation optogénétique ou pharmacologique du CCA, ont également été mis en évidence dans le cas de douleurs aiguës (Gu et al. 2015) ou chroniques (Chen et al. 2016).

Le rôle du CCA dans l'aspect émotionnel de la douleur commence à être étudié chez le rongeur depuis quelques années, notamment grâce au test d'aversion de place, laissant le « choix » à l'animal d'aller dans le compartiment sombre du test, associé à un stimulus douloureux, ou dans le compartiment lumineux (Fuchs et al. 2014; LaBuda and Fuchs 2000). Un certain nombre d'études ont permis de montrer une implication du CCA dans l'aversion créée par la douleur. Une lésion de l'aire 24 bloque ainsi le comportement d'évitement de place généré par une injection de formaline (Johansen et al. 2001), de même que la préférence de place induite par

l'administration d'une substance soulageant la douleur neuropathique chez la souris (Barthas et al. 2015; Qu et al. 2011).

Il existe une comorbidité très forte entre la douleur chronique et les troubles anxio-dépressifs, de l'ordre de 50% chez les patients dépressifs (Bair et al. 2003; Maletic and Raison 2009). De par son implication majeure dans les deux types de pathologies, le CCA pourrait être une interface majeure de cette comorbidité et représente une cible thérapeutique intéressante (Yalcin et al. 2014; Zhuo 2016). Une récente étude réalisée au sein de notre équipe a ainsi permis de mettre en évidence le rôle clé de l'aire 24 dans les comportements de type anxio-dépressif induit par une douleur neuropathique (Barthas et al. 2015). En effet, après induction de la neuropathie par la pose d'un manchon de polyéthylène autour de la branche principale du nerf sciatique, une lésion excitotoxique du CCA normalise le comportement des souris neuropathiques dans les tests d'hyponéophagie, de pulvérisation de sucrose et de nage forcée.

Le CCA est donc une structure d'intérêt majeur dans l'étude d'un certain nombre de pathologies associées à des altérations cognitives et émotionnelles. Il semble donc aujourd'hui indispensable de mieux comprendre cette structure complexe et surtout d'étudier sa connectivité afin d'être capable de dissocier, connexion par connexion, les fonctions remplies par chacune d'entre elles. Il serait alors possible de cibler préférentiellement l'un ou l'autre des symptômes de pathologies telles que l'anxiété et la dépression et ainsi de proposer des traitements mieux adaptés à chaque patient.

Matériels et méthodes

I. Animaux

1) Caractéristiques

Les expériences ont été menées sur des souris mâles adultes C57BL/6J, âgées de 7 semaines à leur arrivée à l'animalerie (Chronobiotron, INCI, Strasbourg). Pour les expériences de traçage, les animaux sont répartis en cage de 5 individus et maintenus en cycle jour/nuit de 12 heures (début de la phase lumineuse : 7 h), à température et humidité constantes (22°C et 50±5% humidité). Pour les expériences d'optogénétique, les animaux sont isolés après la pose intracraniale de la fibre optique et maintenus en cycle inversé nuit/jour de 12 h (début de la phase lumineuse : 21 h). La nourriture et l'eau sont disponibles *ad libitum*.

2) Répartition des animaux

Au total, 120 animaux ont été utilisés pour les expériences de traçage et 55 souris pour les expériences d'optogénétique. Parmi les souris injectées avec les différents traceurs, 48 souris injectées au FG ou à la CTb ont été incluses dans l'analyse des entrées du CCA, 38 souris injectées à la BDA ont été utilisées dans l'analyse du traçage réciproque et 34 souris injectées à la PHA-L ou à la BDA ont été incluses dans l'analyse des sorties du CCA. Parmi les animaux utilisés pour les expériences d'optogénétique, seuls 3 animaux ont été exclus des analyses comportementales suite à une mauvaise localisation du site d'injection ou de la fibre optique.

3) Ethique

Les protocoles expérimentaux ont été validés par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS) sous le numéro AL/61/68/02/13 pour les expériences de traçage et sous le numéro A67-2018-38 pour les expériences d'optogénétique.

II. Chirurgie stéréotaxique et procédures d'injection

Toutes les expériences ont nécessité l'utilisation de la chirurgie stéréotaxique pour injecter les virus (étude optogénétique) ou les traceurs (étude de connectivité) et implanter les fibres optiques (étude optogénétique).

1) Anesthésiques

Les chirurgies stéréotaxiques ont été effectuées sous anesthésie générale, induite par injection intra-péritonéale (*i.p.*) d'un mélange kétamine (Imalgène1000®, 87 mg/kg) et xylazine (Rompun®, 13 mg/kg), à raison de 0,17 mL/animal (dilution au 1/5). Tout au long de la procédure chirurgicale, la profondeur de l'anesthésie est vérifiée grâce au réflexe pédal; un tiers de la dose initiale est réinjecté en *i.p.* si nécessaire. A la fin de chaque chirurgie, de la lidocaïne (Xylocaïne®) est injectée en sous-cutané au niveau de la plaie avant sa fermeture. Le vissage ainsi que le dévissage du câble de stimulation optogénétique se font après une anesthésie gazeuse à l'isoflurane d'environ 1 minute (2,5 %,Vetflurane®).

2) Chirurgie stéréotaxique

Avant toute injection de traceurs ou de virus, des tests de repérage de coordonnées en injectant du bleu de pontamine sont réalisés, en utilisant l'atlas stéréotaxique du cerveau de souris (Paxinos and Franklin 2012). Après anesthésie générale (voir **II. 1) Anesthésiques**), le crâne de la souris est tondu et du gel hydratant (Ocryl-gel® ; laboratoire TVM) est déposé régulièrement sur ses yeux. L'animal est ensuite placé dans un cadre stéréotaxique (Kopf® Instruments, modèle 900), sa tête maintenue par des barres de mâchoires et son museau par une barre de gueule. La peau est incisée et le crâne découvert. Les coordonnées antéro-postérieure (AP) et médio-latérale (ML) de la structure visée (Table 2) sont prises à partir du bregma et reportées à la surface du crâne. Une trépanation est ensuite réalisée à l'aide d'une fraise de dentiste à l'endroit indiqué, le cortex découvert et les méninges ouvertes à l'aide d'une aiguille de seringue 26 gauges recourbée. La coordonnée dorso-ventrale (DV) est prise à partir de la surface du cortex. La pipette de verre, pour l'injection iontophorétique (voir **II. 3)** ***a) Procédure***), ou l'aiguille métallique, pour l'injection par pression (voir **II. 4)** ***a) Procédure***), est descendue à la profondeur souhaitée (Table 2). Après injection, les animaux sont retirés du cadre puis de l'anesthésique local (voir **II. 1) Anesthésiques**) est infiltré au niveau de la plaie. L'incision cutanée est refermée par deux agrafes chirurgicales ou suturée selon la chirurgie réalisée, puis l'animal est placé dans une nouvelle cage, sous une lampe chauffante, avec accès à l'eau et aux croquettes. Les animaux sont surveillés jusqu'à leur réveil puis replacés à l'animalerie dans leur cage commune ou en cages individuelles.

Table 2: Coordonnées stéréotaxiques

	Coordonnées			
Structures	AP (mm)	L (mm)	V (mm)	Angle
R24a	+1,3	-0,35	-1,3	0
C24a	+0,5	-0,35	-1,1	0
R24b	+1,3	-0,35	-0,5	0
C24b	+0,5	-0,35	-0,5	0
24a`	-0,6	-0,35	-1,25	0
24b`	-0,6	-0,35	-0,45	0
BLA	-1,4	-3,25	-4,1	0
SNc/VTA	-3,15	-0,8	-4,7	0
HDB	+0,7	-0,8	-4,9	0
LC	-5,15	-0,75	-2,9	0
MnR	-3,85	+1,2	-4,2	-16°
DR	-4,1	+1,2	-2,9	-22°

Table 3: Paramètres d'injection iontophorétique

Substance injectée	Provenance	Concentration	Intensité courant (μA)
FluoroGold®	Molecular Probes	2%, NaCl 0,9 M	+3
Sous-unité β de la toxine cholérique	Sigma	0,25%, TrisHCl 0,1 M et NaCl 0,1%	+3
Biotine dextran amine	Molecular Probes	4%, KAc 0,5 M	+3
Leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris*	Vector laboratories	2,5%, PBS	+1,5

3) Injection iontophorétique des traceurs

Pour réaliser des injections ciblées et être capable de contrôler l'étendue des sites d'injection, les différents traceurs utilisés ont été injectés par iontophorèse. Cette technique permet également d'éviter une injection d'un volume de liquide, réduisant ainsi le risque potentiel d'œdème inhérent à toute injection de liquide dans le cerveau.

a) Procédure

Des pipettes de verre étirées par une étireuse verticale (Narishige®) à partir de capillaires en borosilicate de sodium (Harvard Apparatus®), de 20-30 µm de diamètre externe de pointe, sont utilisées pour injecter les différents traceurs. Un courant positif, dans le cas des traceurs, ou négatif, dans le cas du bleu de pontamine, est appliqué dans la pipette afin de repousser les molécules de même charge du traceur dans la structure d'intérêt (Table 3). Pour cela, un filament d'argent, connecté à l'anode d'une source de courant constant (Midgard™ Precision Current Source, Stoelting), est inséré dans la pipette au contact du traceur. La cathode est attachée à l'arrière de la tête de l'animal, sur la peau du cou. Le courant est appliqué de manière alternative (7 s ON/7 s OFF) pendant 10 min. La pipette est ensuite laissée en place pendant 5 min avant d'être remontée lentement afin d'éviter la remontée du traceur le long de la trajectoire de la pipette. Suite à la chirurgie, les animaux restent 7 jours à l'animalerie, durée de migration moyenne des traceurs, puis sont ensuite mis à mort et leurs cerveaux prélevés.

b) Traceurs

Deux traceurs rétrogrades, le Fluorogold® (FG) et la sous-unité β de la toxine cholérique (CTb) et deux traceurs antérogrades, la biotine dextran amine (BDA) et la leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), sont utilisés pour mettre en évidence les entrées et les sorties du CCA. L'utilisation de deux traceurs permet de s'affranchir d'éventuels marquages non-spécifiques liés aux propriétés intrinsèques à chaque traceur.

Fluorogold®

Le **FG** ou hydroxystilbamidine methanesulfonate (Molecular Probes, 2% dans du NaCl 0,9%) est un composant inorganique utilisé comme traceur rétrograde non transynaptique (Lanciego and Wouterlood 2011). Après injection, le FG est capté par

les terminaisons neuronales par endocytose vésiculaire passive puis est transporté jusqu'au corps cellulaire où les vésicules s'accumulent conduisant à un marquage granulaire du cytoplasme (Schmued and Fallon 1986). Il est également reconnu que le FG peut être recapté par les axones et terminaisons lésés par l'injection, pouvant ainsi conduire à un marquage non spécifique via des fibres de passage (Kobbert et al. 2000). Cependant, ce phénomène s'observe surtout lors d'injections par pression et peut être minimisé par l'injection iontophorétique. Ce traceur rétrograde émet une fluorescence intrinsèque dorée lorsqu'il est excité dans la gamme des ultra-violets (~ 200-380 nm), son pic d'excitation se situant à 323 nm et sa longueur d'onde d'émission à 440 nm. Environ 7 jours sont nécessaires pour qu'il s'accumule suffisamment dans les corps cellulaires et soit visible. Nous avons, dans cette étude, utilisé le FG comme le traceur référent pour l'analyse des entrées du CCA. Bien que la fluorescence du FG puisse être intense, et contrairement à certaines données de la littérature (Lanciego and Wouterlood 2011; Schmued and Fallon 1986), elle s'épuise très rapidement lors de son exposition à la lumière d'excitation. Nous avons donc choisi d'amplifier son signal par immunomarquage (voir **III. 1)** ***a) Immunohistochimie*** et **III. 1)** ***b) Immunofluorescence***).

Sous-unité beta de la toxine cholérique

La **CTb** (Sigma, 0,25% dans du Tris 0,1 M et NaCl 0,1%) est une des sous-unités de la toxine cholérique produite par la bactérie *Vibrio Cholerae*. Cette lectine se lie aux domaines oligosaccharidiques des récepteurs monosialogangliosides GM1 de la membrane cellulaire et entre dans la cellule par endocytose absorptive (Lencer and Tsai 2003). De même que pour le FG, les vésicules contenant la CTb vont remonter vers le corps cellulaire. Environ 7 jours sont nécessaires à la CTb pour s'accumuler et être assez visible. Ce traceur, devenu un traceur rétrograde non-transynaptique de référence dans la littérature (Kobbert et al. 2000; Lanciego and Wouterlood 2011; Trojanowski et al. 1981), est utilisé dans notre étude en deuxième intention, afin de confirmer et compléter les résultats de traçage obtenus avec le FG. En effet, la CTb est moins susceptible d'être captée par les fibres de passage ou lésées, permettant ainsi d'éliminer le marquage non spécifique susceptible d'être obtenu avec le FG. Cependant, elle donne aussi lieu à un transport antérograde difficile à contrôler (Kobbert et al. 2000; Lanciego and Wouterlood 2011). La CTb ne possédant pas de

marqueur intrinsèque, nous l'avons révélée à l'aide d'anticorps spécifiques (voir **III. 1)** ***a) Immunohistochimie*** et **III. 1)** ***b) Immunofluorescence***).

Leucoagglutinine de Phasolus vulgaris

La **PHA-L** (Vector Laboratories, 2,5% dans du PBS) est produite à partir du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*). Celui-ci contient une lectine (sous-unité L) capable d'agglutiner les globules blancs. L'association de 4 sous-unités L permet d'obtenir une lectine stable, la PHA-L, utilisable en traçage neuronal (Lanciego and Wouterlood 2011). Le mode de capture de la PHA-L est mal connu mais ce traceur semble reconnaître les sucres α-D-mannose et β-D-galactose situés à la membrane dendritique des neurones localisés au cœur du site d'injection (Gerfen and Sawchenko 1984; Kobbert et al. 2000). Ce traceur antérograde non-transynaptique est ensuite acheminé à une vitesse d'environ 4-6 mm/jour vers les terminaisons axonales via un transport passif, conduisant à un marquage des fibres et terminaisons (Gerfen and Sawchenko 1984). Nous attendons environ une semaine avant la perfusion des animaux injectés. De plus, la PHA-L étant peu captée par les fibres de passage (Gerfen and Sawchenko 1984), nous l'avons utilisée comme traceur principal dans notre analyse des sorties du CCA. La PHA-L ne possédant pas de marqueur intrinsèque, nous l'avons révélée à l'aide d'anticorps spécifiques (voir **III. 1)** ***a) Immunohistochimie***).

Biotine dextran amine

La **BDA** (Molecular Probes, 2 ou 4% dans du KAc 0,5 M) est composée d'un dextran de poids moléculaire 10 kDa composant le traceur proprement dit, de molécules de biotine permettant une détection directe du traceur par le système avidine-biotine, et de résidus lysine permettant la fixation du traceur au paraformaldéhyde lors de l'étape de perfusion (Lanciego and Wouterlood 2011). La BDA entre dans la cellule au niveau du corps cellulaire et des dendrites par un mécanisme inconnu, puis migre de manière préférentiellement antérograde vers les terminaisons axonales à une vitesse d'environ 2-3 mm/jour (Veenman et al. 1992). Nous attendons environ 7 jours avant de perfuser les animaux et récupérer les cerveaux. Toutefois, il est important de noter que la BDA est susceptible d'être captée par les fibres de passage, pouvant ainsi conduire à un marquage aspécifique. Ici encore, cet effet, ainsi que le transport rétrograde de la BDA, est présent surtout lors d'injections massives, et peut donc être réduit par une injection iontophorétique. Ce marquage est, comme pour la PHA-

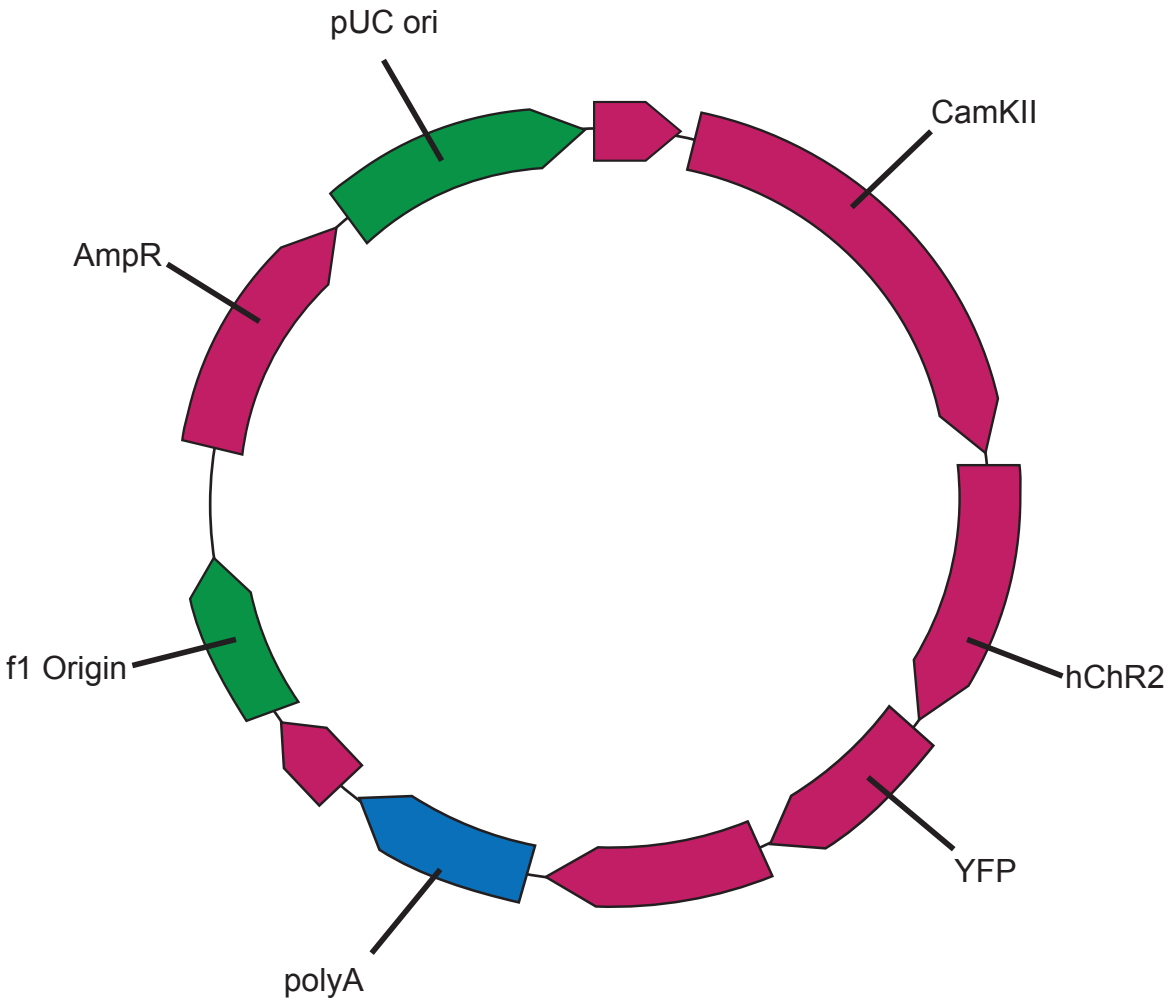


Figure 7 : Construction du virus AAV5.CaMKIIa.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH *(adaptée de https://www.addgene.org)*

Représentation schématique de la construction de l'adénovirus associé vecteur de l'insertion de la ChR2 dans les neurones. L'expression du virus est sous le contrôle du promoteur de la CamKII. La fusion de la protéine fluorescente EYFP avec la ChR2 permet une visualisation de l'expression de la protéine d'intérêt.

Abréviations: AmpR: gène de résistance à l'ampicilline; CamKII: promoteur de la kinase calmoduline de type II; f1 Origine: origine de réplication du phage filamenteux; YFP: gène de la protéine fluorescente jaune; hChR2: gène de la channelrhodopsine; polyA: site de polyadénylation; pUC ori: origine de réplication du plasmide pUC.

L, de type Golgi permettant ainsi une visualisation précise des détails de la cellule (Lanciego and Wouterlood 2011). Grâce à sa révélation très rapide (voir **III. 1)** ***c) Histochimie***) et le contrôle plus aisé de la taille du site d'injection, nous avons donc également utilisé la BDA pour raffiner l'étude des sorties mais également celle des entrées du CCA par traçage réciproque.

4) Injection par pression des virus

Avant de débuter l'expérience d'injection de virus, plusieurs tests de volume d'injection ont été réalisés. Nous avons testé les volumes de 0,5 µL, 1 µL et 1,5 µL. Après analyse, nous avons sélectionné l'injection de 0,5 µL par côté, en accord avec la littérature déjà existante (Felix-Ortiz et al. 2013; Felix-Ortiz and Tye 2014; Tye et al. 2011).

a) Procédure

Une seringue Hamilton de 5 µL équipée d'une aiguille de 33 gauges non biseautée est utilisée pour l'injection par pression. Un volume de 0,5 µL de virus est injecté de manière bilatérale dans le noyau basolatéral antérieur de l'amygdale (BLA ; Table 2) des souris à une vitesse de 0,05 µL/30 s. L'aiguille reste ensuite en place pendant 10 min avant d'être lentement remontée, pour éviter un reflux du virus le long de la trajectoire de la seringue. La seringue est rincée avant et après injection à l'eau distillée, à l'alcool pur puis à l'eau distillée à nouveau, l'alcool étant suffisant à neutraliser le virus.

b) Virus pour optogénétique

Afin d'étudier l'implication de la projection des neurones du BLA vers le CCA, nous avons choisi d'activer cette connexion par optogénétique. Pour cela, le gène de la channelrhodopsine (ChR2), protéine codant un canal cationique photosensible, est introduit dans les neurones de BLA (Boyden et al. 2005). La ChR2, excitée à une longueur d'onde d'environ 470 nm, induit une dépolarisation de la cellule grâce à une entrée massive de Na^+ et donc une excitation de la cellule ChR2+. Ce gène, fusionné à celui d'une protéine fluorescente (Yellow Fluorescent Protein; YFP) pour une observation directe, est sous le contrôle du promoteur de la protéine kinase calcium-calmoduline dépendante de type II (CamKII). Ce promoteur spécifique restreint l'expression du gène de la ChR2 uniquement aux neurones glutamatergiques du

BLA (Rostkowski et al. 2013). Nous avons choisi de stimuler cette connexion en injectant une particule adénovirale associée AAV5.CaMKIIa.hChR2(H134R)-eYFP.WPRE.hGH (Figure 7) délivré à $5x10^{13}$ particules (UNC Gene Therapy Vector Core, Deisseroth, Addgene26969P) de manière bilatérale dans le BLA (Figure 8 a). L'AAV est un virus à ADN simple-brin non enveloppé de la famille des Parvovirus (Murlidharan et al. 2014). Il fait environ 25 nm de diamètre et est caractérisé comme étant un virus helper-dépendant nécessitant l'intervention d'un adénovirus pour finir son cycle de réplication. Il reste ainsi séquestré dans le neurone infecté. L'AAV étant déficient, il est considéré comme un virus de niveau 1 ne nécessitant pas de mesures de sécurité drastiques. L'expérimentateur doit tout de même porter un équipement adapté (blouse, gants, lunettes de protection) et toute la procédure de chirurgie (voir **II. 2) Chirurgie stéréotaxique**) se fait sous un poste de sécurité microbiologique de type II (Faster, PSM Ultrasafe 2125. Série 119).
Dans le cadre de notre étude, l'ensemble des animaux contrôles et stimulés reçoit le même volume de virus de manière bilatérale. Après l'injection du virus, les animaux sont laissés à l'animalerie trois semaines avant l'implantation de la fibre optique dans le CCA, durée nécessaire à l'expression du transgène dans les neurones du BLA.

5) Implantation des fibres optiques

Les animaux sont anesthésiés avec un mélange de kétamine et de xylazine avant d'être placés dans le cadre stéréotaxique comme vu précédemment (voir **II. 2) Chirurgie stéréotaxique**). Un implant métallique contenant une fibre optique en verre de 1,7 mm de longueur, d'un diamètre de 220 µm et d'une ouverture numérique de 0,66 NA (MFC_220/250-0.66_1.7mm_RM3_FLT, Doric Lenses, Quebec, Canada) est descendu dans le CCA gauche, légèrement décalé par rapport à la ligne médiane pour éviter toute lésion du sinus veineux (AP=+0,7 mm ; L=+0,2 mm ; H=+0,2 mm) (Figure 8 b). L'implant est descendu jusqu'à ce que 1,5 mm de la longueur de la fibre soient insérés dans le cortex, permettant ainsi à la lumière émise d'atteindre l'ensemble de la surface du CCA. L'implant est ensuite collé à la surface du crâne de l'animal (superglue liquide, Loctite®). Une fois la colle durcie, un chapeau fait de ciment dentaire (Paladur®) est créé autour de l'implant afin de recouvrir le crâne et de fixer définitivement l'implant au crâne de l'animal. Après avoir laissé sécher le ciment dentaire, de l'anesthésique local (voir **II. 1)**

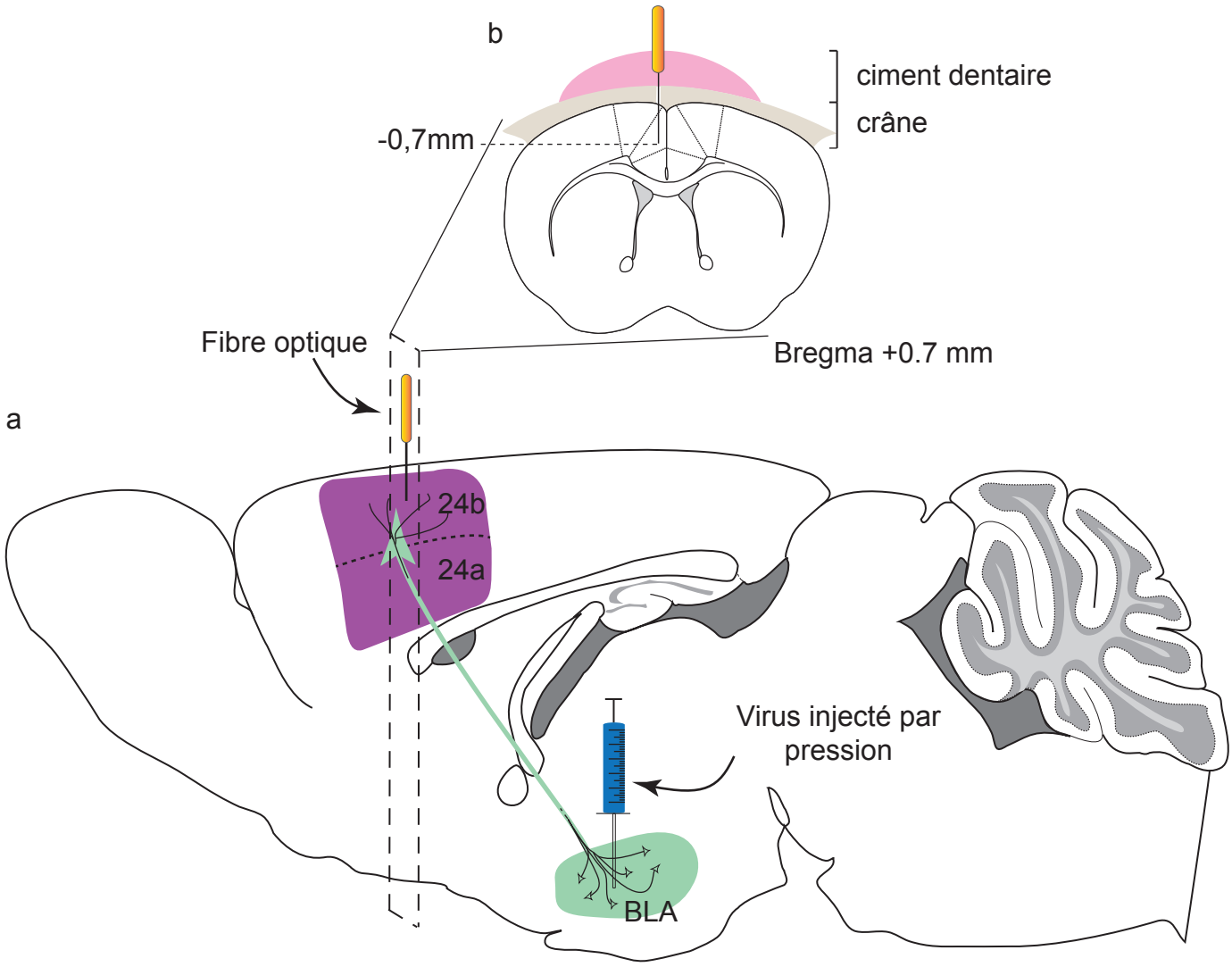


Figure 8 : Injection virale et implantation de la fibre optique

(a) Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de souris indiquant la localisation de l'injection par pression de l'AAV5.CaMKIIa.hChR2 dans le BLA. Après expression du virus dans les terminaisons des neurones du BLA, une fibre optique est implantée dans le CCA afin de stimuler les afférences en provenance du BLA. (b) Représentation schématique d'une coupe frontale de cerveau de souris indiquant la position de la fibre optique. Elle est implantée dans le CCA de telle sorte qu'elle atteigne une profondeur de -0,7 mm par rapport au bregma; du ciment dentaire est ensuite coulé autour de la fibre.

Anesthésiques) est appliqué à la surface du crâne puis la peau est suturée. Les animaux sont ensuite replacés dans l'animalerie et laissés au repos pendant une semaine avant le début des expériences de stimulation optogénétique. Les souris contrôles sont implantées avec le même type de fibre optique, fabriquée dans ce cas au laboratoire, et ne permettant pas la transmission de la lumière.

6) Prélèvement des tissus et coupe

a) Tissus frais

Dans le cas d'un test de coordonnées au bleu de pontamine, l'animal encore anesthésié est immédiatement mis à mort par décapitation après l'injection. Le cerveau frais ainsi prélevé est directement congelé dans de l'isopentane refroidi à -40°C pendant 1 min. Les coupes frontales de 20 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat (Microm HM 560) et récupérées directement sur lames gélatinées pour vérification du positionnement de l'injection.

b) Tissus fixés

Perfusion

Les cerveaux et les moelles épinières des animaux utilisés pour le traçage ainsi que ceux des animaux ayant subi les procédures optogénétiques doivent être fixés de façon à visualiser les marquages ou les sites d'injection de virus. Cette fixation est réalisée par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde.

Une semaine à 10 jours après l'injection de traceurs ou à la fin des expériences de comportement, les animaux sont profondément anésthésiés par une injection de pentobarbitol sodique (273 mg/kg ; 0,15 mL/souris, *i.p*). Après ouverture de l'abdomen et écartement des côtes, le cœur est dégagé et l'oreillette droite incisée. Une perfusion intracardiaque est réalisée dans le ventricule gauche à l'aide d'une pompe péristaltique. Cinq mL de tampon phosphate (PB ; 0,1 M, pH 7,4) sont tout d'abord perfusés pendant 1 min, suivis de 50 mL d'une solution de paraformaldéhyde (4% dans PB) pendant 10 min à un débit d'environ 5 mL/min. Le cerveau est ensuite prélevé et immergé dans le fixateur. Après une post-fixation durant la nuit à 4°C, les cerveaux sont conservés dans du PB salin (PBS 0,1 M ; NaCl 0,9% ; pH 7,4) jusqu'à la coupe. Pour l'étude des sorties du CCA, les dos des souris sont également

prélevés et post-fixés de manière identique, la moelle épinière étant prélevée par la suite après vérifiation de la localisation du site d'injection.

Coupe

Les cerveaux perfusés sont coupés en sections frontales sériées flottantes de 40 µm d'épaisseur au vibratome (VT 1000S, Leica) et récupérées dans des boîtes de 12 puits contenant du PBS. Le côté opposé à l'injection est marqué à l'aide d'une lame de rasoir au niveau du cortex pour différencier la gauche de la droite. Les moelles épinières sont coupées suivant le plan frontal ou le plan horizontal. Les révélations histochimiques sont réalisées en première approche pour une coupe sur quatre. Les coupes restantes sont conservées à 4°C dans du PBS-Azide de sodium (0,02% dans PBS).

III. Révélations histochimiques et analyse

Les traceurs sont révélés soit par immunohistochimie (FG, CTb et PHA-L) ou par histochimie (BDA). Un comarquage par immunofluorescence est utilisé pour étudier la neurochimie des neurones afférents au CCA. Enfin, l'immunohistochimie est également utilisée pour montrer le recrutement cellulaire dans le CCA après stimulation optogénétique par révélation de la protéine c-Fos.

1) Techniques de révélation histochimique

a) Immunohistochimie

Toutes les étapes sont réalisées sous agitation douce et à température ambiante. Les coupes sont lavées au PBS (3x10 min) puis les péroxydases endogènes sont épuisées (H_2O_2 1%, éthanol 50%, 20 min). Les coupes sont ensuite rincées (3x10 min) puis perméabilisées et les sites non-spécifiques saturés au PBS-T (PBS, Triton X-100 0,3%) et sérum d'âne ou de chèvre 5% (45 min). L'anticorps primaire anti-FG, anti-CTb, anti-PHA-L ou anti-c-Fos (Table 4) contenu dans une solution de PBS-T 0,3% et sérum 1% est ensuité ajouté et laissé à incuber durant la nuit. Les coupes sont ensuite rincées (PBS, 3x10 min) et l'anticorps secondaire biotinylé est ajouté (Table 5) dans une solution de PBS-T 0,3% et serum 1% (1h30). Après rinçage (PBS, 3x10 min), l'amplification du signal est effectuée par incubation avec le complexe ABC (Avidin-Biotin-peroxidase Complex, Vector Laboratories, 1/500 dans

Table 4 : Anticorps primaires

Antigène	Immunogène	Type, espèce	Producteur, référence	Dilution
Fluorogold©	Hydroxystilbamidine méthanesulfonate	Polyclonal de lapin	Chemicon, #AB153	1:30 000
Sous-unité ß de la toxine cholérique	Sous-unité ß de la toxine *Vibrio cholera*	Polyclonal de lapin	Sigma, #C3062	1:20 000
Sous-unité ß de la toxine cholérique	Sous-unité ß de la toxine *Vibrio cholera*	Polyclonal de chèvre	List Biological, #703	1:10 000
Tyrosine hydroxylase	TH dénaturée issue de pheochromocytome de rat	Polyclonal de mouton	Chemicon, #AB1542	1:1 000
Choline acétyltransferase	Enzyme placentaire humaine	Polyclonal de chèvre	Chemicon, #AB144	1:500
Sérotonine	5-HT couplé à l'albumine de sérum bovin	Polyclonal de chèvre	Immunostar, #20079	1:5 000
Leucoagglutinine de *Phaseolus vulgaris*	Lectine	Polyclonal de chèvre	Vector lab., AS-2224	1:50 000

Table 5 : Anticorps secondaires

Antigène	Espèce, marqueur	Producteur, référence	Dilution
Anticorps primaire de lapin	Ane, biotinylé	Amersham, #RPN1004V	1:400
Anticorps primaire de chèvre	Chèvre, biotinylé	Vector, #BA-9500	1:400
Anticorps primaire de lapin	Ane, Alexa 488	Molecular Probes, #A21206	1:400
Anticorps primaire de chèvre	Ane, CY3	JacksonImmunoResearch, #705-165-147	1:400
Anticorps primaire de mouton	Ane, CY3	JacksonImmunoResearch, #713-165-147	1:400

du PBS-T) à l'obscurité pendant 1h30. Après rinçage (Tris-HCl 0,05 M ; pH 7,5 ; 3x10 min), la peroxydase est révélée grâce à une solution de diaminobenzidine 3'3 (DAB, 0,05%, H_2O_2 0,009%) dans du tampon Tris-HCl 0,05 M qui produira un précipité brun à l'endroit de la réaction enzymatique. Dans le cas de révélation de la PHA-L, du sulfate de d'ammonium nickel (0,5%) est ajouté à la solution réactive, conduisant à un précipité bleu-noir permettant un meilleur contraste avec le bruit de fond pour l'observation des fibres marquées. La réaction est stoppée au bout de 5 à 10 min par rinçage (Tris-HCl 2x10 min et PBS 2x10 min). Les coupes sont ensuite montées de manière sériée sur des lames gélatinées puis laissées à sécher pendant 24h. Elles sont ensuite déshydratées par des bains d'alcool de concentration croissante (1x70%, 1x90%, 2x100%, 5 min), puis éclaircies dans deux bains de Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Elles sont enfin recouvertes d'une lamelle de verre collée avec de l'Eukitt.

b) Immunofluorescence

Afin de déterminer la nature neurochimique de certaines des afférences du CCA, un double marquage immunofluorescent est réalisé permettant de comarquer les neurones marqués rétrogradement par le FG avec des marqueurs cholinergiques ou monoaminergiques. Les révélations sont effectuées, selon le marqueur recherché, sur une sélection de coupes de télencéphale basal ou de tronc cérébral. Les sections sont traitées avec la solution de saturation comme précédemment, puis incubées durant la nuit avec les deux anticorps primaires (Table 4) dirigés contre le FG et contre la cholineacétyltransférase (ChAT, marqueur des neurones cholinergiques), la tyrosine hydroxylase (TH, marqueur des neurones dopaminergiques et noradrénergiques) ou la 5-hydroxytryptamine (5-HT, marqueur des neurones sérotoninergiques). Le lendemain, les coupes sont incubées avec une solution contenant les deux anticorps secondaires fluorescents adéquats (Table 5) pendant 90 min. Après rinçage au PBS (3x10 min), les sections sont montées sur des lames gélatinées et recouvertes par des lamelles en verre dans du Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

c) Histochimie

La BDA étant déjà biotinylée, elle est donc révélée par histochimie sans nécessité d'anticorps. Après perméabilisation et saturation, les coupes sont rincées au PBS

(3x10 min) puis directement incubées avec le complexe ABC (1/1 dans du PBS-T) pendant la nuit. Après rinçage au Tris-HCl (3x10 min), la révélation de la péroxydase est effectuée dans une solution de Tris-HCl 0,05 M contenant de la DAB 0,025%, du sulfate d'ammonium nickel 0,1%, du chlorure de cobalt 0,025% et de l'H_2O_2 0,0006%. De même que pour la PHA-L, la présence des sels de nickel et de cobalt produit un précipité bleu/noir augmentant le contraste du marquage. L'arrêt de la réaction ainsi que le montage des coupes se fait de la même manière que pour le FG, la CTb et la PHA-L (voir **III. 1)** ***a) Immunohistochimie***).

2) Analyse du marquage

a) Sites d'injection

Les coupes sont analysées sous microscopie optique à transmission (Olympus BH2 ou Nikon 80i) ou à épifluorescence (Nikon 80i, filtres CY3 et FITC). La localisation des sites d'injection des traceurs ou du virus est déterminée par comparaison avec l'atlas de cerveau de souris (Paxinos and Franklin, 2012). Les repères anatomiques tels que les faisceaux de fibres ainsi que le bruit de fond du marquage sont utilisés pour localiser les sites ainsi que le reste du marquage. La limite entre la région rostrale et la région caudale du CCA est prise à AP=0,85 mm par rapport au bregma. Les animaux dont les sites sont hors des aires visées ou débordant sur les régions adjacentes sont éliminés de l'analyse. Pour les injections de virus dans le BLA, seuls sont conservés pour l'analyse les animaux présentant des sites d'injection bilatéraux centrés sur le BLA et donnant lieu à marquage bilatéral de terminaisons dans le CCA.

b) Analyse semiquantitative du traçage

Traçage rétrograde

Parmi les 48 animaux injectés avec succès dans le CCA ou le CCM, 16 cas représentatifs (4x3 cas pour 24a rostral, 24a caudal, 24b rostral, 24b caudal; 2x2 cas 24a`et 24b`) ont été sélectionnés pour effectuer une analyse quantitative de la densité du marquage obtenu. Dans l'ensemble de ces cas, nous avons pris en compte les étendues dorso-ventrale et rostro-caudale des sites d'injection afin de limiter au maximum un recouvrement du marquage entre les différentes sous-régions étudiées.

Pour chaque animal et pour chaque structure contenant des neurones marqués rétrogradement, la quantification est effectuée sur deux coupes consécutives de 40 µm d'épaisseur. Sur chaque coupe et pour chaque structure marquée, le nombre de neurones marqués au sein de un ou deux carrés de 200x200 µm selon l'étendue medio-latérale de la structure est compté. Le comptage est réalisé à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse E600 équipé d'un tube à dessin. Les carrés de comptage sont apposés sur chaque coupe. Dans le cas des structures corticales, nous avons fait le choix de compter séparément les couches supragranulaires et infragranulaires après observation d'une différence de densité neuronale variable entre les deux. Une « heat map » a été créée à partir de cette analyse quantitative (voir Article 2 ; Figure 2).

Traçage antérograde

Parmi les 34 animaux injectés avec succès dans le CCA et le CCM, 19 cas représentatifs (5 cas pour 24a ; 5 cas 24b ; 5 cas 24a` ; 4 cas 24b`) ont été sélectionnés afin d'analyser la localisation et la densité du marquage obtenu. Contrairement à ce qui a été réalisé pour le marquage rétrograde, une véritable évaluation quantitative de la densité du marquage antérograde est difficilement réalisable. Une analyse qualitative a donc été effectuée sur l'ensemble des animaux à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse E600, pour exprimer la densité de terminaisons de manière relative (de sporadique à très dense). Cette analyse a ensuite été présentée sous la forme d'une « heat map ».

c) Quantification de c-Fos

Afin d'évaluer l'effet *in vivo* de la stimulation optogénétique de la voie BLA-CCA, une quantification de l'expression de la protéine c-Fos dans l'aire 24 est réalisée sur deux animaux contrôles et deux animaux stimulés, perfusés 90 min après la stimulation lumineuse. Pour chaque animal, les contours de 24a et de 24b sont redessinés grâce au logiciel Neurolucida 10.0 (MBF Bioscience) avec un microscope Nikon Eclipse 80i. Ce programme permet de visualiser la coupe à l'écran et d'ainsi pouvoir redessiner par superposition sur l'écran les contours de la coupe, les faisceaux de fibres principaux ainsi que l'ensemble des structures corticales et sous-corticales. Comme il permet de prendre en compte l'échelle utilisée pour la reconstruction, il est possible de changer d'objectif et donc d'agrandir ou de réduire

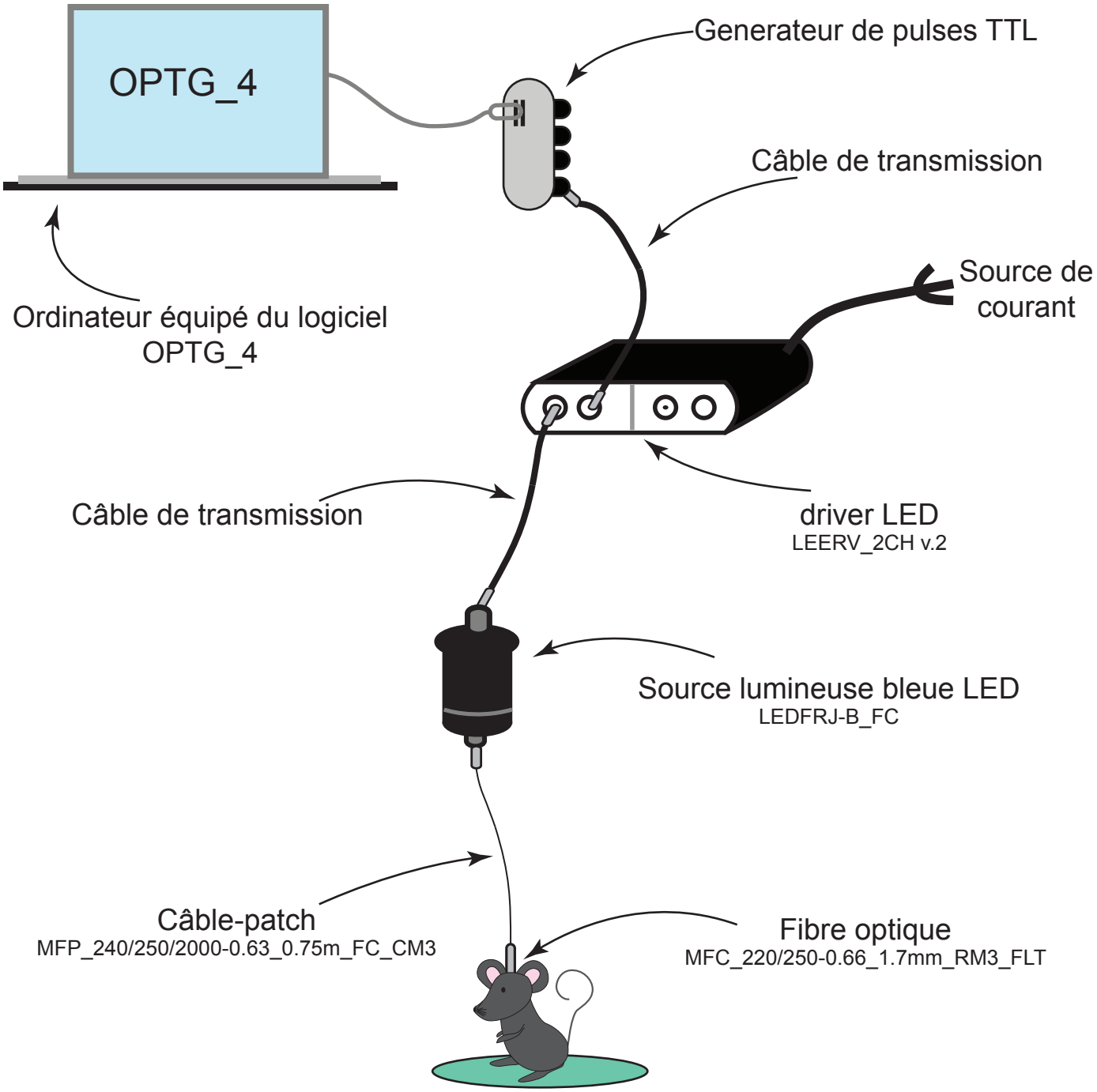


Figure 9 : Circuit de stimulation optogénétique

Représentation schématique du circuit reliant les différents appareils utilisés pour la stimulation optogénétique. La fibre optique implantée dans la tête de l'animal est reliée à la source lumineuse bleue LED via un câble-patch. La lumière est générée par le driver LED relié à la source lumineuse par un câble de transmission. Les pulses de lumière sont générés par un ordinateur équipé du programme OPTG_4 commandant le générateur de pulses TTL.

l'image ainsi que le dessin de reconstruction afin d'apprécier plus amplement les détails. Pour chaque animal, le comptage est effectué sur huit coupes de 40 µm d'épaisseur, espacées de 120 µm chacune, la plus rostrale correspondant au niveau AP= +1,33 mm et la plus caudale au niveau AP= +0,25 mm. Les côtés droit et gauche, ainsi que 24a et 24b sont comptés séparément. Le marquage c-Fos est localisé dans le soma des corps cellulaires.

3) Reconstruction

Afin d'illustrer la localisation des entrées et des sorties du CCA, des coupes de cerveau de souris injectées au FG, à la BDA et à la PHA-L ont été redessinées comme précédemment grâce au programme Neurolucida 10.0 (MBF Bioscience) avec un microscope Nikon Eclipse 80i. Chaque neurone/fibre marqué(e) par le FG, la PHA-L ou la BDA est également dessiné. Dans le cas BDA et PHA-L, les fibres recouvertes de boutons synaptiques correspondant aux terminaisons et non aux fibres de passage uniquement sont reconstruites. Les tracés sont ensuite importés dans Adobe Illustrator CS5 pour produire les figures finales (voir Article 2 ; Figure 3).

IV. Induction et mesure des comportements de type anxio-dépressif

Pour mesurer l'effet de l'activation des terminaisons du BLA dans le CCA, des tests comportementaux permettant d'évaluer les comportements de type anxio-dépressif chez le rongeur ont été réalisés. Ces tests ont été effectués après trois jours de stimulation optogénétique à raison d'une séance de 20 min de stimulation par jour. L'ensemble du protocole (stimulations et tests) est répété les deux semaines suivantes. Les souris sont isolées directement après l'implantation des fibres optiques afin d'éviter qu'elles ne s'abiment mutuellement les implants. Les souris étant en cycle inversé jour/nuit, tous les tests décrits ci-dessous ont été réalisés pendant la phase d'activité sous lumière rouge.

1) Dispositif et protocole de stimulation

La Figure 9 présente le dispositif de stimulation optogénétique. Le CCA est stimulé par une lumière bleue de longueur d'onde 463 nm, émise par une diode LED (LEDFRJ-B_FC, Doric Lenses), sous le contrôle d'un driver LED (LEERV_2CH v.2,

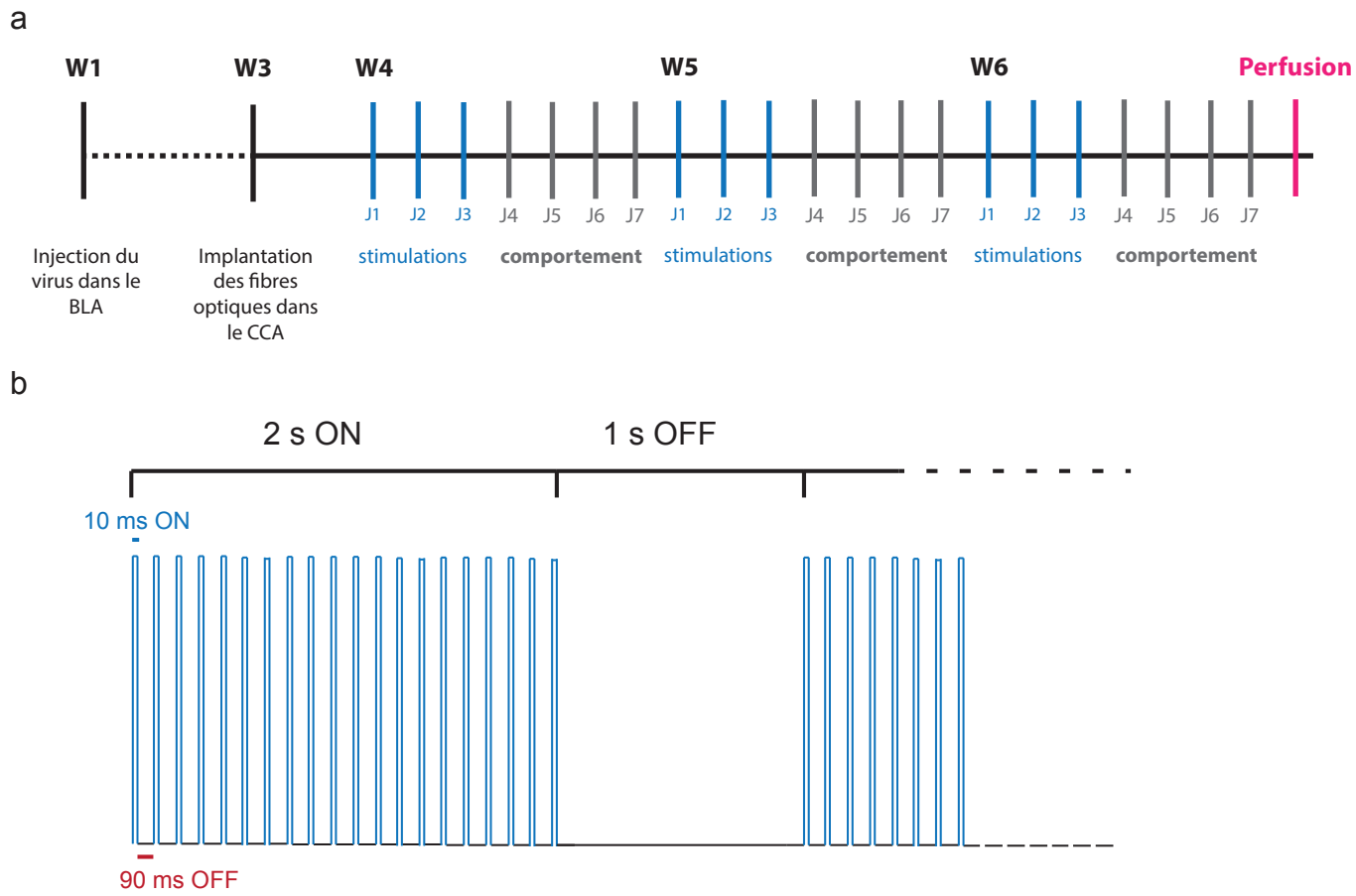


Figure 10 : Planning de l'expériences et protocole de stimulation optogénétique

(a) Planning de l'expérience: 3 semaines après l'injection du virus dans le BLA (W1), les fibres optiques sont implantées dans le CCA (W3). Après une semaine de récupération, les stimulations optogénétiques débutent et vont être réalisées durant 3 semaines consécutives (W4-W6). Le planning s'organise comme suit: au cour d'une semaine, les animaux reçoivent les stimulations optogénétiques à J1, J2 et J3 et les tests comportementaux sont réalisés à J4, J5, J6 et J7. De J1 à J3, les animaux reçoivent une fois le protocole de stimulation par jour.
(b) Protocole de stimulation optogénétique: la durée d'une stimulation est de 20 min au cours desquelles chaque animal reçoit 400 répétitions d'une même séquence constituée de 2 s où les pulses de lumière sont générés (ON) et d'1 s sans pulse (OFF). Les animaux sont stimulés à une fréquence de 10 Hz, chaque pulse durant 10 ms.

Doric Lenses). Les paramètres de la stimulation sont contrôlés par le logiciel OPTG_4 Controller (Doric Lenses) qui, *via* un générateur d'impulsions TTL (OPTG_4, Doric Lenses), impose au driver LED les paramètres d'intensité et de durée. La LED est connectée à l'implant de l'animal via un câble-patch de 0,75 m de longueur et d'ouverture numérique 0,63 (MFP_240/250/2000-0.63_0.75m_FC_CM3, Doric Lenses). Le driver LED est équipé de deux canaux distincts permettant la stimulation simultanée de deux animaux. L'intensité de la lumière émise par chaque fibre optique est mesurée avant implantation en utilisant un photodétecteur (UNO, Gentec) et est comprise entre 3 et 5 mW.

Dans notre protocole, une stimulation optogénétique est constituée d'une répétition pendant 20 min de la séquence suivante : 2 s ON de créneaux d'illumination (10 ms) à 10 Hz, suivies d'1 s OFF (Figure 10 b). Le choix d'1 s de non stimulation permet à l'animal, dans le cas du test d'évitement actif, d'avoir le temps nécessaire pour s'échapper du compartiment associé à la stimulation (voir **IV. 3)** ***b) Effet aversif de la stimulation optogénétique***). La stimulation optogénétique est effectuée durant trois jours consécutifs à la suite desquels sont réalisés les tests comportementaux. Le même protocole est répété les deux semaines suivantes de façon à comparer les comportements dans les tests après 3, 6 et 9 stimulations (Figure 10 a).

Avant de démarrer une séance de stimulation, les animaux stimulés et contrôles sont placés, après anesthésie gazeuse à l'isoflurane et vissage du câble de stimulation sur la fibre optique implantée, dans leur propre cage dans une pièce de test. Les animaux contrôles ne reçoivent aucune lumière. A la fin du protocole de stimulation, les animaux sont anésthésiés de la même manière que précédemment afin de procéder au décablage, ils sont ensuite remis dans leur cage de stabulation. A la fin des expériences, les animaux sont mis à mort et perfusés pour le contrôle histologique des sites d'injection.

2) Evaluation des comportements de type anxio-dépressif

Différents tests comportementaux ont été utilisés pour évaluer les phénotypes anxieux et/ou dépressifs suite à la stimulation optogénétique de la voie BLA-CCA.

Test d'hyponéophagie (Figure 11)

Ce test, aussi appelé novelty suppressed feeding test (NSF), permet d'évaluer la réponse comportementale face au conflit créé par la motivation d'une nourriture

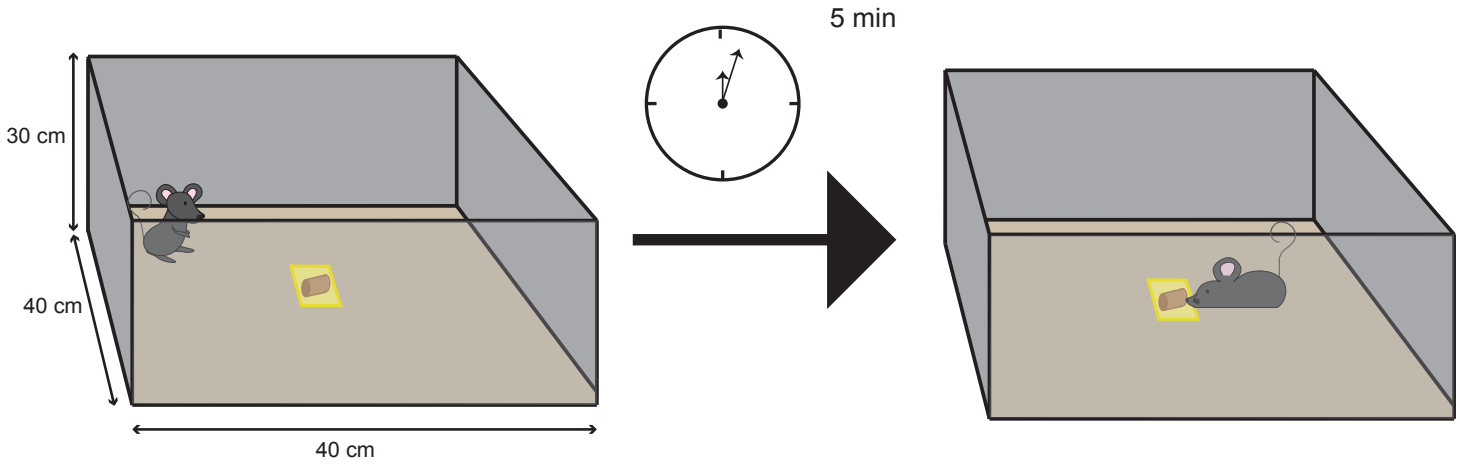


Figure 11 : Test d'hyponéophagie

Après restriction alimentaire, l'animal est placé dans un open-field au milieu duquel une croquette de nourriture, posée sur un post-it, a été déposée. La latence de l'animal à manger la croquette est mesurée. Le test a une durée maximum de 5 min et est arrêté dès que l'animal se nourrit.

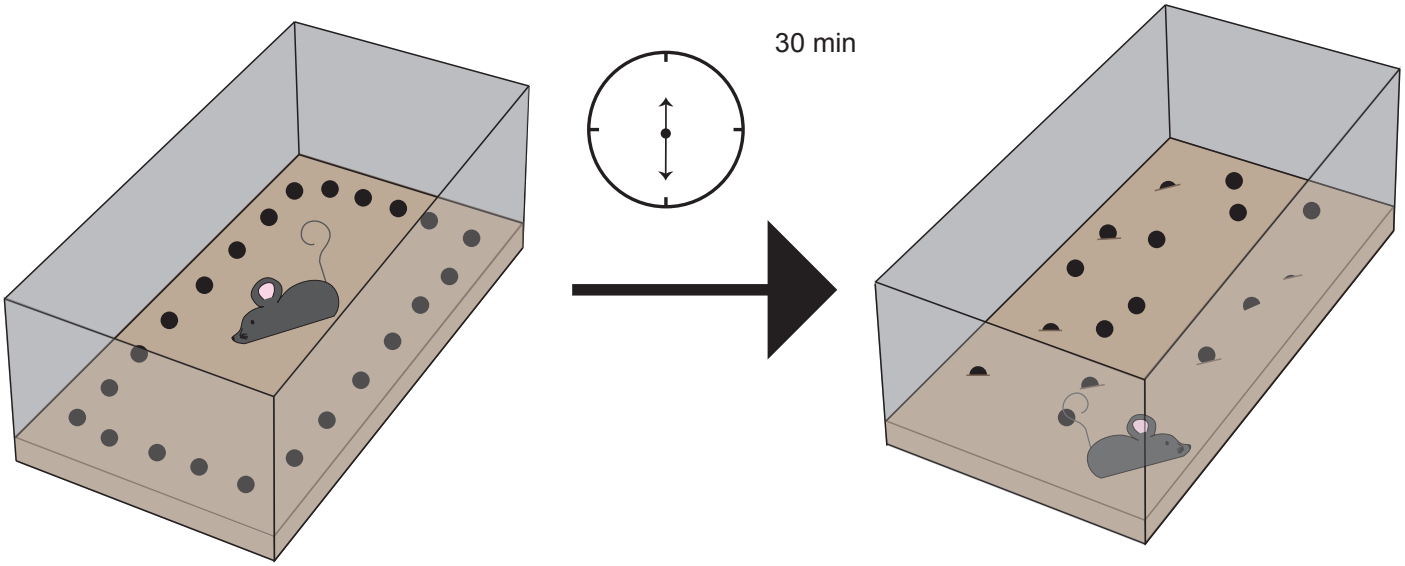


Figure 12 : Test d'enfouissement de billes

Dans une cage identique aux cages d'hébergement des souris testées, 23 billes sont déposées dans la périphérie de la cage sur une couche de sciure d'environ 5 cm. Les billes sont espacées d'environ 1 centimètre. L'animal est placé au centre de la cage et laissé 30 minutes. Les billes enfouies au 2/3 tiers sont ainsi comptabilisées.

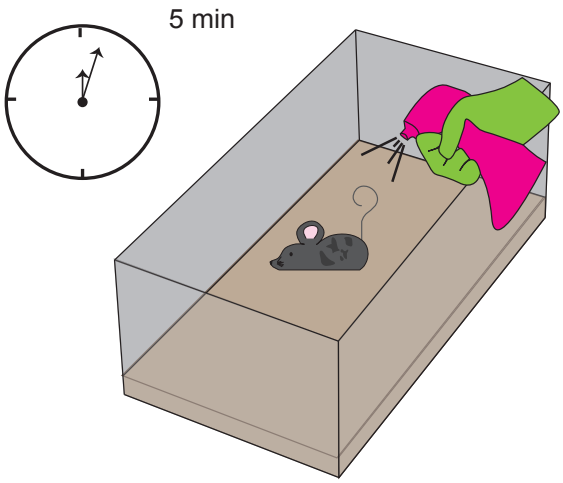


Figure 13 : Test de pulvérisation d'eau sucrée

Dans une cage identique aux cages d'hébergement, une solution d'eau sucrée est pulvérisée sur le dos de la souris. Le test dure 5 minutes pendant lesquelles la durée de toilettage de l'animal est mesurée.

appétente et l'anxiété générée par un environnement ouvert et exposé. C'est donc la latence que met l'animal à se nourrir qui est mesurée. Ce test, sensible aux anxiolytiques et aux antidépresseurs, est largement utilisé dans la littérature pour mesurer les comportements de type anxio-dépressif chez la souris (Bodnoff et al. 1988; Ibarguen-Vargas et al. 2008; Iijima et al. 2012; Wu et al. 2016; Yalcin et al. 2011; Zhang et al. 2016b).

Après 24 h de privation de nourriture, la souris est amenée dans la pièce de test puis déposée dans un open-field en plastique (40x40x30 cm) dont le sol est recouvert de 2 cm de sciure. Une croquette de sa nourriture habituelle a été au préalable déposée au centre de l'open-field sur un post-it pour indiquer l'emplacement de la nourriture. Le temps est mesuré à partir du moment où l'animal est déposé, toujours dans le même coin du test, dans l'open-field. L'expérience est stoppée après une durée maximale de 5 min. Dès que la souris a mangé le test est arrêté, l'animal est remis dans sa cage d'origine avec de la nourriture et l'open-field est nettoyé à l'alcool 10%.

Test d'enfouissement de billes (Figure 12)

Ce test permet de mesurer le comportement défensif de l'animal face à un objet étranger, reflétant ainsi son état anxieux. C'est donc le nombre de billes enfouies aux deux tiers par l'animal qui est mesuré. Ce test, souvent utilisé pour évaluer les comportements obsessionnels compulsifs chez les rongeurs, est également utilisé pour mesurer l'état anxieux car il est sensible aux anxiolytiques (Nicolas et al. 2006; Yalcin et al. 2011; Zhang et al. 2016b).

Chaque cage de test (27x16x14 cm) est préparée au préalable: 5 cm de sciure tapissent le fond de la cage, sur lesquels 23 billes de verre de 1 cm de diamètre sont déposées en périphérie, chacune espacée d'environ 1 cm. L'animal est déposé au centre de la cage. Le test dure 30 min, puis la souris est remise dans sa cage d'origine.

Test de pulvérisation d'eau sucrée (Figure 13)

Ce test, sensible aux antidépresseurs, permet d'évaluer le comportement naturel de toilettage de l'animal dont la durée est ainsi mesurée. Il est associé au bien-être général et est couramment utilisé dans la littérature comme mesure des comportements de type dépressif chez le rongeur (Santarelli et al. 2003; Yalcin et al. 2011). Ce test permet d'initier un comportement motivé chez l'animal, le comportement de toilettage. La réduction de ce comportement peut être mise en

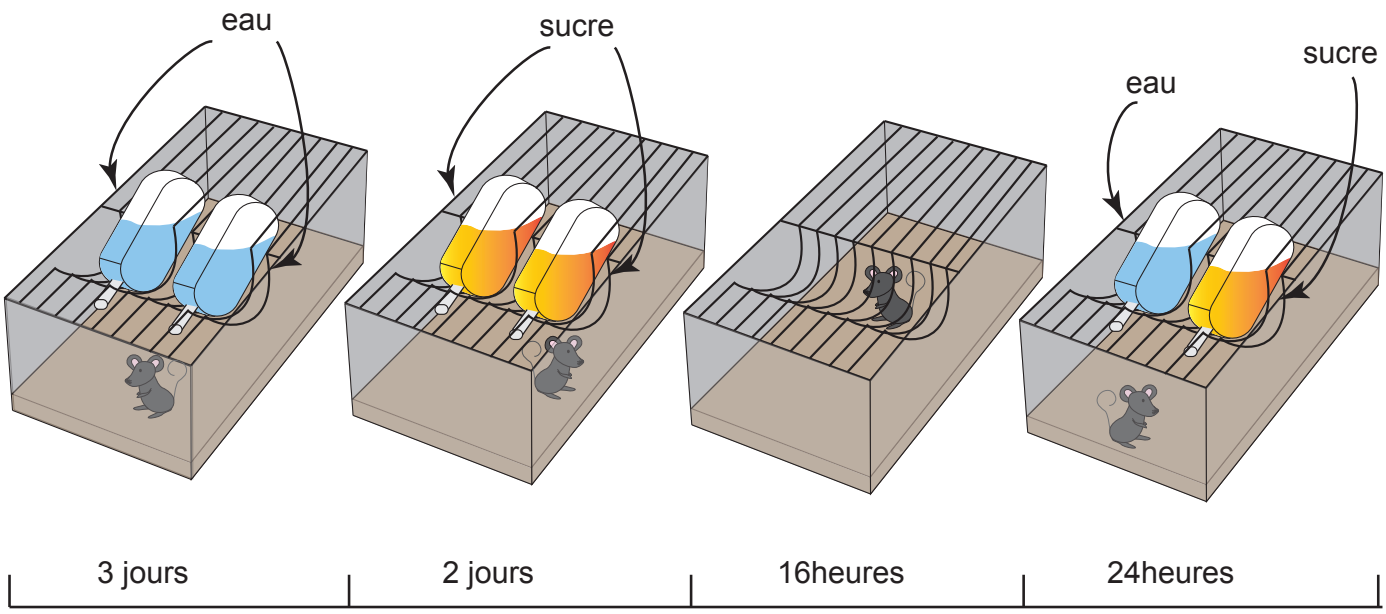


Figure 14 : Test de préférence au sucre

L'animal est habitué pendant 3 jours à la présence de deux biberons d'eau. Il est ensuite habitué à la solution de sucre 2% pendant 2 jours. Après une privation hydrique de 16 heures, l'animal a le choix pendant 24 heures entre un biberon d'eau ou de sucre à 2%. Les biberons sont ensuite pesés. La position du biberon de sucre est randomisée d'un animal à l'autre.

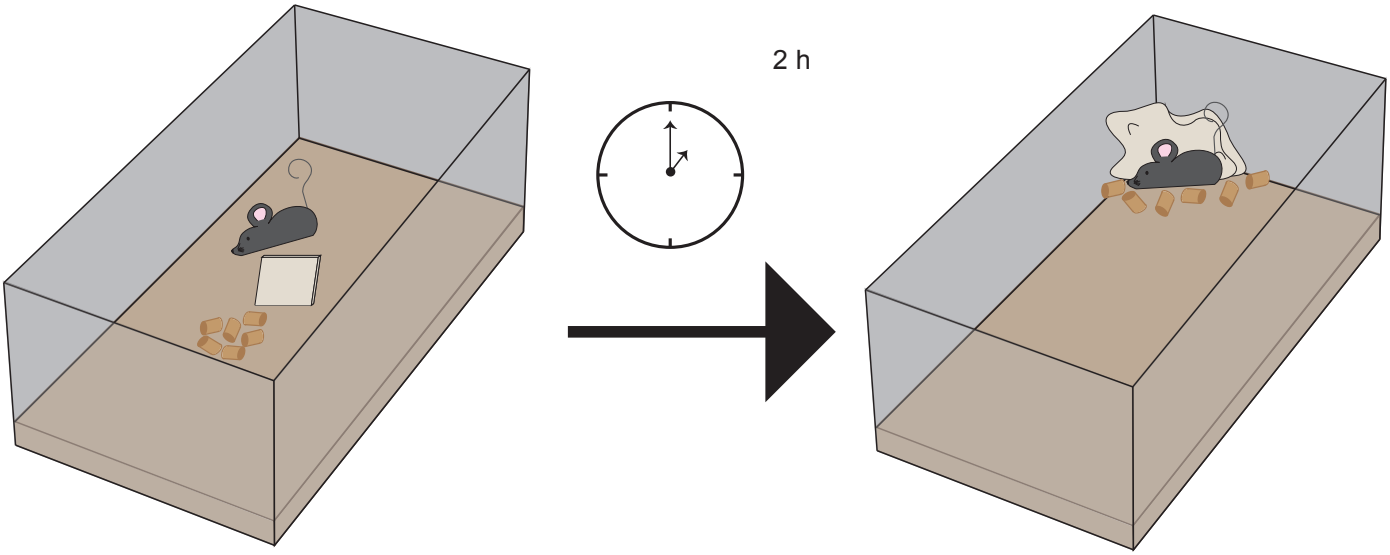


Figure 15 : Test de construction de nid

Un carré de coton est déposé dans la cage d'hébergement de l'animal, ainsi que de nouvelles croquettes. Au bout de 2 heures, l'animal est sorti de la cage et des photos des nids construits sont prises.

parallèle avec l'apathie chez l'homme, l'un des symptômes de la dépression chez les patients (DSM-V).

L'animal est amené dans la pièce de test où il est déposé dans une cage couverte de 2 cm de sciure dans le fond. Une solution d'eau sucrée (Erstein®, 20%) est pulvérisée sur le dos de l'animal. Le temps passé par l'animal à se toiletter est mesuré pendant 5 min puis il est remis dans sa cage d'origine.

Test de préférence au sucre (Figure 14)

Le test de préférence au sucre est basé sur le plaisir procuré par le sucre, plus appétant que l'eau. Les consommations d'eau et d'eau sucrée, disponibles en même temps, sont donc mesurées. Ce test nous permet donc de mesurer, dans le cas d'animaux présentant des troubles de type dépressif, une perte de plaisir encore appelée anhédonie (Liu et al. 2016; Pothion et al. 2004; Romano et al. 2015).

Les animaux sont tout d'abord habitués pendant plusieurs jours avant le test à avoir deux biberons d'eau dans leur cage afin d'éviter un biais de préférence de côté. Les souris ont ensuite accès à deux biberons de sucre (Erstein®, 2%) pendant 48 h, afin de limiter l'hyponéophagie que pourrait induire la nouveauté du sucre, puis les biberons sont échangés avec deux biberons d'eau pour 24 h. A chaque changement, les biberons sont pesés et la préférence de côté est vérifiée. Les biberons sont retirés 16 h avant le test. Après cette privation hydrique, les animaux ont le choix, entre un biberon contenant une solution de sucre 2% ou un biberon contenant de l'eau. La position à droite ou à gauche du biberon de sucre est randomisée selon les résultats de préférence de côté obtenus précédemment. Après 24 h, les biberons sont pesés et un biberon d'eau est remis dans la cage.

Test de construction de nid (Figure 15 et 16)

Le comportement de construction de nid, aussi appelé nest test ou nesting test, est un comportement inné chez le rongeur. Le nid est un environnement sécurisant pour l'animal où il se reproduit, dort, élève ses petits, se protège des prédateurs et qui lui permet de maintenir sa température corporelle (Deacon 2006). Ce comportement est sensible aux antidépresseurs (Svirsky et al. 2016), il est donc utilisé pour évaluer les troubles dépressifs chez le rongeur.

Dans la pièce d'hébergement, chaque souris est placée dans une nouvelle cage contenant un carré de coton placé au centre de la cage et une dizaine de croquettes ainsi qu'un accès à l'eau. Après 2 h, les animaux sont remis dans leur cage d'origine

Score de construction du nid

score 4	Nid construit dans un coin de la cage, en forme de dôme avec un renfoncement en son centre, le carré de coton a entièrement été utilisé	
score 3	Nid construit, dans un coin de la cage, de forme circulaire mais aplatie, le carré de coton a entièrement été utilisé	
score 2	Nid non construit mais organisé au milieu de la cage, le carré de coton a été entièrement utilisé	
score 1	Nid non construit et dispersé, le carré de coton a été entièrement utilisé	
score 0	Nid non construit et dispersé, le carré de coton n'a été que partiellement utilisé et est encore visible	

Figure 16 : Test de construction de nid, évaluation
A chaque nid est attribué un score allant de 0 pour un nid non construit et non organisé jusqu'à 4 pour un nid construit parfaitement.

et des photos du nid construit ainsi que de l'état général de la cage sont prises (Figure 15). Un score est attribué à chaque nid, échelonné de 0 à 4, 0 représentant le score le plus bas attribué à un nid non construit et 4 le score le plus haut attribué à un nid construit complètement (Figure 16).

3) Expériences contrôles

La plupart de nos tests comportementaux comme le test d'hyponéphagie, le test d'enfouissement de billes ou encore le test de construction de nid nécessitent un enchaînement de différentes actions motrices (se déplacer dans l'open-field, enterrer les billes, déplacer les morceaux de nids …). Il nous fallait donc vérifier qu'aucune modification des capacités motrices de nos animaux n'était induite par notre protocole de stimulation. Nous avons donc évalué l'activité spontanée de nos souris. Nous avons également évalué l'effet direct de l'activation de la voie BLA-CCA par un test d'évitement actif.

a) Activité spontanée

Une mesure d'activité spontanée est réalisée après 6 stimulations optogénétiques. Toutes les souris sont amenées dans une pièce noire adjacente à la pièce de test et y sont laissées au minimum 1 h afin de limiter le stress occasionné par leur déplacement (la pièce de test se situe à l'étage inférieur de la pièce de stabulation des animaux). Après cette habituation, les souris sont amenées par vague de 4 dans la pièce de test et placées chacune dans une chambre en Plexiglas (15x24x33 cm) équipée de sept cellules détectrices de mouvement (Imetronic, Pessac, France). Après 30 min, les animaux sont sortis du test, remis dans leur cage d'origine et ramenés à l'animalerie. Le nombre de passage de l'animal d'une cellule détectrice à l'autre permet d'évaluer son activité motrice générale.

b) Test d'évitement actif (Figure 17)

Afin de mesurer l'effet aversif direct de la stimulation optogénétique, nous avons réalisé un test d'évitement actif. Le système de test consiste en deux chambres en Plexiglas (20x20x30 cm) séparées par deux demi-parois de 6 cm d'épaisseur, permettant ainsi à l'animal de passer d'une chambre à l'autre sans être gêné par le câble de connexion optogénétique. Les deux chambres ainsi que les demi-parois

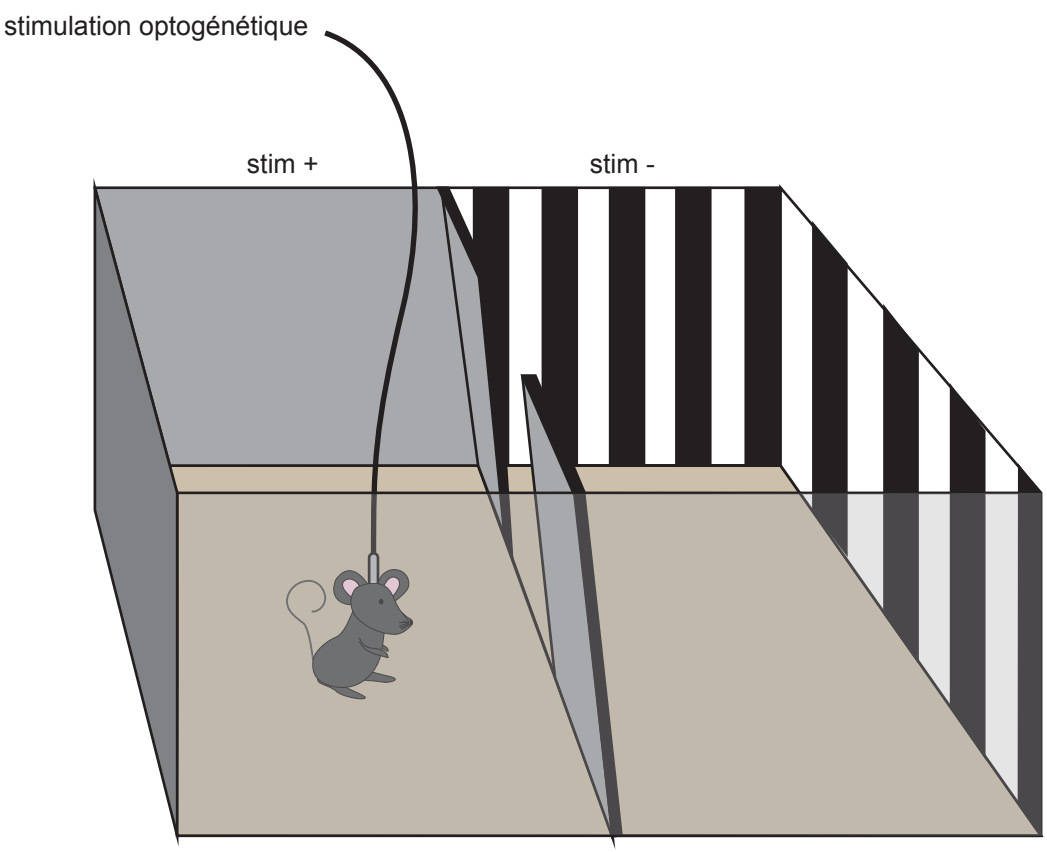


Figure 17 : Test d'évitement actif

Pour ce test, un open-field composé de deux compartiments distinguables par la couleur et les motifs des parois est utilisé. Le passage entre les deux compartiments se faisant par une ouverture de 8 centimètres de large. L'un des compartiments, choisi de manière randomisée, est associé à la stimulation optogénétique. Le test débute lorsque l'animal passe au minimum la tête et les pattes antérieures dans le compartiment associé à la stimulation. L'animal est stimulé pendant toute la durée de sa présence dans ce compartiment. La stimulation s'arrête lorsque l'animal passe au minimum sa tête et ses pattes antérieures dans le compartiment non associé à la stimulation. Le test dure 10 min.

sont différenciées : l'un des côtés est noir, l'autre est rayé noir et blanc. Le sol est recouvert d'environ 2 cm de sciure.

Les animaux sont d'abord familiarisés au test afin de vérifier s'il n'existe aucun biais susceptible d'induire une préférence de côté. Cette phase dure 10 min durant lesquelles le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans chacun des deux compartiments sont comptabilisés. Ce pré-test permet de sélectionner pour chaque animal le compartiment qui sera associé à la stimulation durant la phase de test. Les animaux ne sont pas câblés durant le pré-test. Le jour suivant, chaque animal est amené dans la pièce de test 5 min avant le début de l'expérience. Chaque souris est ensuite anesthésiée (**voir 2.1 Anesthésiques**) puis câblée (voir **6.1 Dispositif et protocole de stimulation**), et déposée au centre de l'enceinte du test, entre les deux demi-parois. L'expérimentateur attend le réveil complet de l'animal puis le test débute. Dès que l'animal passe sa tête ainsi que les deux pattes antérieures dans le compartiment associé à la stimulation, ceci est considéré comme une entrée. Le chronomètre est démarré et la stimulation débute, celle-ci est délivrée pendant toute la durée de présence de l'animal dans ce compartiment. Les paramètres de stimulation optogénétique utilisés sont identiques à ceux utilisés dans les autres tests (voir **6.1 Dispositif et protocole de stimulation).** Le chronomètre et la stimulation sont arrêtés dès que l'animal passe sa tête et ses deux pattes antérieures avant dans le compartiment non associé à la stimulation. Le temps passé dans le compartiment associé à la stimulation est ainsi mesuré.

V. Statistiques

L'ensemble des tests statistiques est réalisé à l'aide du logiciel STATISTICA 7.1 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma). Une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur avec mesures indépendantes est réalisée pour les tests d'hyponéophagie, d'enfouissement de billes, de pulvérisation d'eau sucrée, de construction de nid, dans la mesure d'activité spontanée et le test d'évitement actif. Une ANOVA à deux facteurs est utilisée dans le test de préférence au sucre, avec le type de solution et le groupe d'animaux pour variables. Dans tous les tests statistiques, le seuil de significativité est défini à $p<0,05$. Dans toutes les figures, les barres d'erreur indiquent la moyenne ± S.E.M.

Résultats

Partie I

Analyse du connectome des aires 24a/24b du CCA et 24a`/24b`du CCM chez la souris

Le CCA est une région impliquée dans les émotions, dont le rôle dans les phénotypes de type anxio-dépressif induit par une douleur chronique chez la souris a été récemment démontré par notre équipe. Ces pathologies sont décrites dans la littérature comme des pathologies de circuit : il était donc nécessaire de mettre en évidence le connectome du CCA chez la souris afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces pathologies.

Cette étude a donc eu pour but d'établir le connectome du CCA et du CCM, en prenant en compte leurs étendues rostro-caudale et dorso-ventrale afin de permettre une meilleure comparaison avec l'organisation cingulaire trouvée chez le primate. Pour mettre en évidence les afférences de ces régions, nous avons utilisé une technique de traçage conventionnel comparative consistant à injecter deux traceurs rétrogrades, le FG et la CTb, dans les aires parties rostrale et caudale des aires 24a et 24b du CCA et dans les aires 24a` et 24b` du CCM (Article 1). Pour établir cette fois-ci les efférences de ces aires, nous avons employé la même technique en y injectant deux traceurs antérogrades : la BDA et la PHA-L (Article 2).

L'analyse du CCA et du CCM par traçage rétrograde montre de nombreuses afférences corticales (intracingulaires, rétrospléniales et associatives pariétales) et thalamiques (noyaux antérieurs, latéraux, ventraux, médiodorsal, intralaminaires et de la ligne médiane). De plus, le claustrum et le noyau basolatéral de l'amygdale fournissent une importante entrée télencéphalique. Des afférences plus réduites prennent leur origine dans l'hypothalamus latéral, le noyau rétromamillaire, les régions cholinergiques du télencéphale basal et les centres monoaminergiques du tronc cérébral. Une étude d'immunofluorescence montre que ces dernières afférences ne sont que partiellement issues des neurones cholinergiques et monoaminergiques. De manière générale, les patrons d'innervations des quatre aires cingulaires analysée sont qualitativement semblables mais la densité d'innervation est généralement plus faible pour les aires du CCM que celles du CCA.
L'étude par traçage antérograde montre que la grande majorité des structures projetant au CCA et au CCM en reçoivent également des afférences. Cependant, d'autres régions sont innervées par ces aires sans projection réciproque. C'est le cas du striatum dorsal, le septum latéral, la zona incerta, l'hypothalamus antérieur, la substance grise périaqueducale, le collicule supérieur, la formation réticulée pontomésencéphalique, les noyaux tegmentaux et la moelle épinière. De façon

intéressante, si les patrons d'efférences des quatre aires cingulaires présentent encore de nombreuses similitudes, des différences plus prononcées apparaissent en termes de densité d'innervation et/ou de topographie. Ainsi, si le CCM présente des efférences globalement moins massives que celles du CCA, ses efférences vers le cortex rétrosplénial et les noyaux antérieurs et latéraux du thalamus apparaissent complémentaires de celles du CCA. Au contraire, les aires du CCA innervent de manière presque exclusive le noyau médiolatéral et les noyaux intralaminaires et de la ligne médiane du thalamus. Enfin, les efférences des aires 24a et 24b vers le striatum dorsal, l'hypothalamus et la substance grise périaqueducale apparaissent distinctes.

En plus d'établir pour la première fois la cartographie complète des connexions des aires 24a/24b du CCA et 24a`/24b` du CCM chez la souris, ces travaux laissent envisager un patron de connectivité commun qui pourrait ainsi favoriser une fonctionnalité partagée de ces deux régions. Cependant, les disparités de densité et de topographie observées suggèrent également l'existence de spécificités fonctionnelles.

Article 1

Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a` and 24b` in the mouse

Clémentine Fillinger, Ipek Yalcin, Michel Barrot, Pierre Veinante

Brain Struct Funct 222:1509-1532

Brain Struct Funct (2017) 222:1509–1532
DOI 10.1007/s00429-016-1290-1

ORIGINAL ARTICLE

Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a′ and 24b′ in the mouse

Clémentine Fillinger[1,2] · Ipek Yalcin[1] · Michel Barrot[1] · Pierre Veinante[1,2]

Received: 9 May 2016 / Accepted: 12 August 2016 / Published online: 18 August 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Areas 24a and 24b of the anterior cingulate cortex (ACC) play a major role in cognition, emotion and pain. While their connectivity has been studied in primate and in rat, a complete mapping was still missing in the mouse. Here, we analyzed the afferents to the mouse ACC by injecting retrograde tracers in the ventral and dorsal areas of the ACC (areas 24a/b) and of the midcingulate cortex (MCC; areas 24a′/b′). Our results reveal inputs from five principal groups of structures: (1) cortical areas, mainly the orbital, medial prefrontal, retrosplenial, parietal associative, primary and secondary sensory areas and the hippocampus, (2) basal forebrain, mainly the basolateral amygdaloid nucleus, the claustrum and the horizontal limb of the diagonal band of Broca, (3) the thalamus, mainly the anteromedial, lateral mediodorsal, ventromedial, centrolateral, central medial and reuniens/rhomboid nuclei, (4) the hypothalamus, mainly the lateral and retromammillary areas, and (5) the brainstem, mainly the monoaminergic centers. The neurochemical nature of inputs from the diagonal band of Broca and brainstem centers was also investigated by double-labeling, showing that only a part of these afferents were cholinergic or monoaminergic. Comparisons between the areas indicate that areas 24a and 24b receive qualitatively similar inputs, but with different densities. These differences are more pronounced when comparing the inputs to ACC's areas 24a/24b to the inputs to MCC's areas 24a′/24b′. These results provide a complete analysis of the afferents to the mouse areas 24a/24b and 24a′/24b′, which shows important similarity with the connectivity of homologous areas in rats, and brings the anatomical basis necessary to address the roles of cingulate areas in mice.

Keywords Rodent's cingulate cortex · Prefrontal cortex · Tract-tracing · Connectome

Abbreviations

3n	Oculomotor nerve
5-HT	5-Hydroxytryptamine
ACC	Anterior cingulate cortex
AD	Anterodorsal thalamic N
AH	Anterior hypothalamic area
AI	Agranular insular cortex
AM	Anteromedial thalamic N
Au	Primary auditory cortex
AV	Anteroventral thalamic N
BDA	Biotinylated dextran amine
BL	Basolateral amygdaloid N
BLA	Basolateral amygdaloid N, anterior part
BLP	Basolateral amygdaloid N, posterior part
C	Caudal
CA1	Amon's horn 1
CG	Central gray
Cg1	Anterior cingulate cortex, dorsal
Cg2	Anterior cingulate cortex, ventral
ChAT	Choline acetyltransferase
Cl	Claustrum
CL	Centrolateral thalamic N
CM	Central medial thalamic N

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00429-016-1290-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pierre Veinante
veinantep@inci-cnrs.unistra.fr

[1] Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France

[2] Université de Strasbourg, Strasbourg, France

cp	Cerebral peduncle
CPu	Caudate putamen
CTb	β Subunit of choleric toxin
DI	Dysgranular insular cortex
DR	Dorsal raphe nucleus
ec	External capsula
Ect	Ectorhinal cortex
Ent	Entorhinal cortex
FG	FluoroGold®
fmi	Forceps minor of the corpus callosum
fmj	Forceps major of the corpus callosum
GI	Granular insular cortex
GP	Globus pallidus
HDB	Diagonal band of Broca, horizontal limb
IAD	Interanterodorsal thalamic N
IAM	Interanteromedial thalamic N
ic	Internal capsule
IG	Infragranular
La	Lateral amygdaloid N
LC	Locus coeruleus
LD	Laterodorsal thalamic N
LH	Lateral hypothalamic area
Li	Linear raphe
LO	Lateral orbital cortex
LP	Lateral posterior thalamic N
LPMR	Lateral posterior thalamic N, mediorostral part
M1	Primary motor cortex
M2	Secondary motor cortex
MCC	Midcingulate cortex
MD	Mediodorsal thalamic N
me5	Mesencephalic trigeminal tract
MD	Mediodorsal thalamic N
MDL	Mediodorsal thalamic N, lateral part
ml	Medial lemniscus
MnR	Median raphe N
MO	Medial orbital cortex
mPFC	Medial prefrontal cortex
MS	Medial septal N
N	Nucleus
PaF	Parafascicular thalamic N
PBP	Parabrachial pigmented N of the VTA
PC	Paracentral thalamic N
PH	Posterior hypothalamic N
PLH	Peduncular lateral hypothalamus
pMnR	Paramedian raphe N
Po	Posterior thalamic N group
PRh	Perirhinal cortex
PT	Paratenial thalamic N
PtA	Parietal associative cortex
PV	Paraventricular thalamic N
R	Rostral
Re	Reuniens thalamic N
Rh	Rhomboid thalamic N
RM	Retromamillary N
RS	Retrosplenial cortex
S1	Primary somatosensory cortex
S2	Secondary somatosensory cortex
SG	Supragranular
sm	Stria medullaris
SNc	Substantia nigra, *pars compacta*
SNr	Substantia nigra, *pars reticulata*
TeA	Temporal association cortex
TH	Tyrosine hydroxylase
V1	Primary visual cortex
V2L	Secondary visual cortex, lateral area
V2M	Secondary visual cortex, medial area
VA	Ventral anterior thalamic N
VDB	Diagonal band of Broca, vertical limb
VM	Ventromedial thalamic N
VO	Ventral orbital cortex
VP	Ventral pallidum
VTA	Ventral tegmental area

Introduction

The anterior cingulate cortex (ACC) in human is thought to be involved in a large number of functions, such as decision-making (Bush et al. 2002; Shenhav et al. 2014), attention and memory (Bush et al. 2000; Carlson et al. 2012; Haxby et al. 2000), emotion (Bush et al. 2000; Lindner et al. 2015; Vogt 2005; Whalen et al. 1998) and pain processing (Apkarian et al. 2005; Coghill et al. 2003; Shackman et al. 2011; Vogt 2005; Vogt et al. 1996; Vogt and Sikes 2009).

While similar functions have been experimentally addressed in monkeys and rodents, a major issue concerns what is defined as the "anterior cingulate cortex" in the rodent brain. For decades, the medial bank of the rostral cortex in rodents has been defined as the medial prefrontal cortex (mPFC) (Van Eden and Uylings 1985), with a ventral part which includes the infralimbic and prelimbic areas and a dorsal part comprising the "anterior cingulate areas" (Cg1, dorsal and Cg2, ventral) and the secondary motor cortex (M2) (Heidbreder and Groenewegen 2003; Krettek and Price 1977). However, this nomenclature only partially reflects the organization of the primate's ACC. Rodent cortical regions labeled "anterior cingulate cortex" account for only a subset of areas which form the primate ACC and also include regions that are analogous to primate midcingulate cortex (MCC) rather than to the ACC (Vogt and Paxinos 2014). The recent adoption of areal nomenclature for cingulate areas of the rodent cortex clarifies the organization of these regions. Thus, the rostral parts of Cg1 and Cg2 regions are reassigned to areas 24b and 24a respectively, and the caudal parts of Cg1 and Cg2 are

reassigned to areas 24b′ and 24a′, respectively (Paxinos and Franklin 2012; Paxinos and Watson 2014; Vogt and Paxinos 2014).

Insight regarding the potential roles of areas 24a and 24b of the rodent brain can be extracted from the literature addressing the functions of the "anterior cingulate areas" of the mPFC. Functional studies using lesion or pharmacological inactivation combined with cognitive tests show the critical role of areas 24a/24b in attention, and especially in visual attention (Bussey et al. 1997; Koike et al. 2016; Totah et al. 2013; Zhang et al. 2014), set shifting and cognitive control (Bissonette et al. 2013; Newman et al. 2015), and also in visuomotor guidance and temporal sequencing of behaviors (Brecht et al. 2004; Chaillan et al. 1997; Delatour and Gisquet-Verrier 2001; Passetti et al. 2002; Smith and Alloway 2014). QueryAreas 24a/24b also appear to be widely involved in emotional processing, especially in the paradigm of fear conditioning with a critical role in fear expression, generalization and memory (Courtin et al. 2013; Einarsson and Nader 2012; Einarsson et al. 2015; Frankland et al. 2004; Restivo et al. 2009; Xu and Sudhof 2013). Regarding memory, areas 24a/24b were described to be important more specifically in consolidation and recall of remote memory (Cholvin et al. 2013; Lopez et al. 2012; Teixeira et al. 2006; Weible 2013). On the other hand, a growing number of studies investigating the role of these areas in pain processing in rodents, indicates their preferential involvement in the affective/motivational component rather than somatosensory component of pain (Barthas et al. 2015; Fuchs et al. 2014; Johansen et al. 2001; Qu et al. 2011; Tang et al. 2005; Vogt 2015). Moreover, the ACC seems to be a key element in the development of chronic pain (Koga et al. 2015; Metz et al. 2009; Zhuo 2014), as well as in its anxiodepressive consequences (Barthas et al. 2015; Yalcin and Barrot 2014). Finally, its implication has also been reported in depressive phenotypes induced by social defeat (Yu et al. 2011), knock-out of brain neurotrophic factor (Tripp et al. 2012), or chronic stress (Ito et al. 2010; Radley et al. 2004).

Understanding the multiple roles of these areas in normal and pathological conditions requires a clear picture of their connectome in experimental animals. Afferents to these regions have been reported in monkeys (Carmichael and Price 1995; Frankle et al. 2006; Jurgens 1983; Morecraft et al. 2012; Ongur and Price 2000; Vogt and Pandya 1987; Vogt et al. 1987) and rats (Chandler et al. 2013; Conde et al. 1990; Dilgen et al. 2013; Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007, 2011; Jones et al. 2005; Van der Werf et al. 2002; Vogt and Miller 1983), but a systematic analysis was still lacking in mice. Considering the growing amount of literature concerning the ACC in mice and the possibilities offered by the current genetic toolbox in this species, it is necessary to identify the specific connectivity of areas 24a and 24b. In this present study, we thus determined and analyzed the afferents of areas 24a/24b using retrograde tract-tracing in mice.

Materials and methods

Animals

Forty-eight C57BL/6 J male mice (Charles River, L'Arbresle, France) of 8–20 weeks of age (20–30 g) were used for this study. Animals were housed under standard conditions (22 °C, 12/12-hour light/dark cycle with lights on at 7 a.m.), with food and water available ad libitum. Procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive and approved by the local ethical committee (CREMEAS under reference AL/61/68/02/13).

Retrograde tracing

Analysis of the afferents to areas 24a, 24b, 24a′ and 24b′ was done by iontophoretically injecting retrograde tracers in the rostral (R) and caudal (C) parts of these areas. Hydroxystilbamidine methanesulfonate (FG; FluoroGold®) was used as the main retrograde tracer in this study. However, as FG can be taken by passing fibers, we also used the β subunit of choleric toxin (CTb) to confirm the results obtained with FG (Kobbert et al. 2000). Animals were anesthetized with an intraperitoneal (i.p., 5 mL/kg) injection of ketamine (87 mg/kg) and xylazine (13 mg/kg). Before placing the animal in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA), 0.1 mL of a local anesthetic (2 % lidocaïne; Xylovet) was subcutaneously injected under the scalp. A hydrating gel (Ocryl-gel) was regularly applied on animal's eyes to avoid dehydration. The scalp was incised and a unilateral hole was drilled in the skull above the prefrontal cortex. A glass micropipette (tip diameter 20–30 µm) containing either FG (2 % in 0.9 % NaCl, Molecular Probes®) or CTb (0.25 % in 0.1 M Tris and 0.1 % NaCl, Sigma, France) was lowered in targeted area (Table 1), and the tracer was ejected by iontophoresis using a constant current source (Midgard, +3 µA; 7 s on/off cycles for 10–15 min). After injection, the micropipette was left in place during 5 min and then removed slowly. The incision was closed with two fastenings, lidocaine was infiltrated near the wound, and the animal was left in a clean cage under a warming lamp. Its awakening was supervised by the experimenter, and then, the mouse was placed in its original cage in the animal facility.

Table 1 Stereotaxic coordinates

Structures	Coordinates		
	AP (mm)	*L* (mm)	*V* (mm)
R24a	+1.3	−0.35	−1.3
C24a	+0.5	−0.35	−1.1
R24b	+1.3	−0.35	−0.5
C24b	+0.5	−0.35	−0.5
24a′	−0.6	−0.25	−1.25
24b′	−0.6	−0.25	−0.45

Tissue preparation

7–10 days after the tracer injection, the mice were anesthetized with a lethal pentobarbital injection (273 mg/kg, i.p.), and perfused with 30 mL of 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) followed by 150 mL of 4 % paraformaldehyde solution (PFA) in 0.1 M PB. Brains were removed, postfixed overnight in PFA at 4 °C, and then kept at 4 °C in 0.1 M PB saline (PBS, pH 7.4) until cutting. Coronal sections (40 µm) were obtained with a Vibratome (VT 1000S, Leica, Deerfield, IL) and were serially collected in PBS.

Tissue processing

For the mapping of afferents to ACC and MCC areas, the FG and CTb retrograde labeling was revealed using immunoperoxidase. Additional sections were processed for double immunofluorescence to determine the neurochemical phenotype of retrogradely labeled neurons in the selected regions. All steps were performed under gentle agitation at room temperature. For FG and CTb staining, sections were washed in PBS (3 × 10 min), incubated for 20 min in a 1 % H_2O_2/50 % ethanol solution for peroxidase extinction, washed in PBS (3 × 10 min), and incubated with a blocking solution of PBS with 0.3 % Triton X-100 (PBS-T) and 5 % donkey serum for 45 min. After removing the blocking solution, the sections were incubated overnight in PBS-T containing 1 % donkey serum and the primary antibody (Table 2). After 3 × 10 min washing in PBS, sections were incubated with a biotinylated donkey anti-rabbit secondary antibody (1:400, Amersham, #RPN1004 V) or a horse anti-goat secondary antibody (1:400, Vector, #BA-9500) and 1 % donkey serum for 90 min. After PBS rinsing (3 × 10 min), the biotin system was amplified with the avidin–biotin-peroxidase complex (ABC; ABC Elite, 0.2 % A and 0.2 % B; Vector Laboratories) in PBS during 90 min. Sections were rinsed with 0.05 M Tris–HCl buffer (TB; pH 7.5; 3 × 10 min), and the bound peroxidase was revealed by incubation in 0.025 % 3.3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma), 0.0006 % H_2O_2 (Sigma) in TB for approximately 5 min. The reaction was stopped by 2 × 10 min of TB and 2 × 10 min of PBS washing. Sections were then serially mounted on gelatin-coated slides, air-dried, dehydrated in graded alcohol baths (1 × 70 %, 1 × 95 % and 2 × 100 %), cleared in Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and coverslipped with Eukitt. The brain sections for double immunofluorescence against FG and choline acetyltransferase (ChAT), tyrosine hydroxylase (TH), or 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Table 2) were treated with the blocking solution, incubated overnight with the primary antibodies (Table 2), then 90 min with a donkey anti-rabbit Alexa 488-labeled secondary antibody (1:400, Molecular Probes, #A21206), a donkey anti-goat CY3-labeled secondary antibody (1:400, JacksonImmunoResearch, #705-165-147) or a donkey anti-sheep CY3-labeled secondary antibody (1:400, Jackson ImmunoResearch, #713-165-147). After rinsing with PBS (3 × 10 min), sections were mounted on gelatin-coated slides and coverslipped with Vectashield (Vector, Burlingame, CA).

Data analysis

The localization of FG and CTb injection sites was determined according to the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin 2012). The limit between rostral and caudal 24a/24b was taken at AP = +0.85 mm from bregma. Among 35 successfully injected mice, 16 representative animals injected with FG or CTb in R24a, C24a, R24b, C24b, 24a′

Table 2 Primary antibodies

Antigen	Immunogen	Manufacturer, species, type, catalogue number	Dilution
Fluorogold©	Hydroxystilbamidine methanesulfonate	Chemicon, rabbit polyclonal, #AB153	1:30,000
β Subunit of choleric toxin	*Vibrio cholera* β subunit toxin	Sigma, rabbit polyclonal, #C3062	1:20,000
β Subunit of choleric toxin	*Vibrio cholera* β subunit toxin	List Biological, goat polyclonal, #703	1:10,000
Tyrosine hydroxylase	Denaturized TH from rat pheochromocytoma	Chemicon, sheep polyclonal, #AB1542	1:1000
Choline acetyltransferase	Human placental enzyme	Chemicon, goat polyclonal, #AB144	1:500
Serotonin	5-HT coupled to bovine albumin serum	Immunostar, goat polyclonal, #20079	1:5000

and 24b′ were used to produce Fig. 3. A quantitative analysis was done on two sections (40 µm thick) per structure and per animal, from the beginning of the orbital cortex to the caudal pons. For each animal, the number of retrogradely labeled neurons in a 200 × 200 μm^2 was counted in every projecting structure, using a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with a drawing tube. A heat map was then produced (Fig. 3) using yellow to red colors to semiquantitatively express neuronal density. Sections from additional cases were also examined to confirm the pattern of labeling, especially when a difference was observed between FG and CTb labeling. To illustrate the general pattern of retrograde labeling, an FG-injected animal in R24b was selected for reconstruction. For this, sections were drawn using Neurolucida 10.0 software (MBF Bioscience) with a Nikon Eclipse 80i microscope, and every retrogradely labeled cell was plotted. The resulting reconstructions were then imported in Adobe Illustrator CS5 to produce Fig. 2. The analysis of the immunofluorescent double-labeling was done using a Nikon Eclipse 80i microscope (CY3 and FITC filters) on two animals with an FG injection in R24b, on 6–10 frontal sections per animal containing the diagonal band of Broca, horizontal limb (HDB), the substantia nigra, *pars compacta* (SNc), the median raphe nucleus (MnR), the dorsal raphe nucleus (DR) and the locus coeruleus (LC). For each structure, the total number of FG+ cells and the number of FG+ cells positive for a given marker (ChAT, TH, or 5-HT) were determined. About 20–300 cells per animal were identified, depending on the brain structure considered. Data in the figures are presented as total number of cells analyzed.

Results

We presented the results using the areal nomenclature for cingulate regions from the 4th edition of the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin 2012). The correspondence between this nomenclature and the medial prefrontal cortex nomenclature in previous atlas is the following: area 25 corresponds to infralimbic cortex; area 32 corresponds to prelimbic cortex; areas 24a and 24b correspond to the rostral part of cingulate regions Cg2 and Cg1, respectively; areas 24a′ and 24b′ correspond to the caudal part of cingulate regions Cg2 and Cg1, respectively, and constitute the MCC. Areas 30, 29a, 29b and 29c correspond to the retrosplenial cortex (RS).

FG and CTb injection sites

After microscopic observation, eight animals injected with FG and four with CTb were chosen for analysis, according to their location in R24a, C24a, R24b, or C24b. Four animals injected with FG in 24a′ or 24b′ were added to compare the afferents of 24a/24b with those of the MCC. The selected FG injection sites are composed by a dense core of strongly labeled cells, and the center's site is recognizable by a small necrotic zone (Fig. 1). None of the chosen cases spread to neighboring areas. The four selected CTb injection sites were equivalent to the FG injection sites in terms of size and appearance. In addition to retrograde transport, CTb also led to anterograde labeling, but the distinction between anterogradely labeled axons and retrogradely labeled neurons was sufficiently evident to avoid any misinterpretation of the data.

Analysis of FG retrograde labeling

The semiquantitative analysis in Fig. 3 summarizes the general pattern of 24a, 24b, 24a′ and 24b′ inputs and the potential density differences between subdivisions in ipsilateral and controlateral staining. Since FG injection in R24b led to the denser labeling, case M14-012 with an injection restricted to R24b (Fig. 1a) has been selected to provide a full representation of the FG labeling pattern (Fig. 2).

Cerebral cortex

FG injection into areas 24 (Fig. 2b) led to a dense bilateral staining in cortical areas, with an overall ipsilateral preference. Rostrally, frontal areas such as the orbital cortex and other components of the mPFC, namely areas 25, 32, and M2 cortex, contained FG+ cells (Fig. 2a–c) with a general lower density after injections in MCC areas than in 24a/24b (Fig. 4a, c). The retrograde labeling revealed a pattern of specific interconnections in area 24. While FG+ cells were found bilaterally in 24a, 24b, 24a′ and 24b′ for all injection sites, preferential labeling was observed in ipsilateral homonymous subdivisions. For example, injection sites in R24b led to stronger labeling in the whole extent of 24b than in 24a. The controlateral labeling respected the same topography but with a lower density. The RS, corresponding to areas 29 and 30, also presented a specific pattern of connections, with moderate to high staining density found in 29b, 29c and 30 after an FG injection in 24b and 24b′ and a lighter density after injections in 24a and 24a′ (Figs. 2g–j, 4d–i). In more posterior regions, labeling was observed in primary and associative sensory areas such as somatosensory (S1, S2), visual (V1), auditory (Au), medial secondary visual (V2M) and parietal associative (PtA) cortices (Fig. 2f–l). V2M displayed the strongest labeling among these areas (Fig. 4d, g). Temporal areas such as the ectorhinal (Ect)

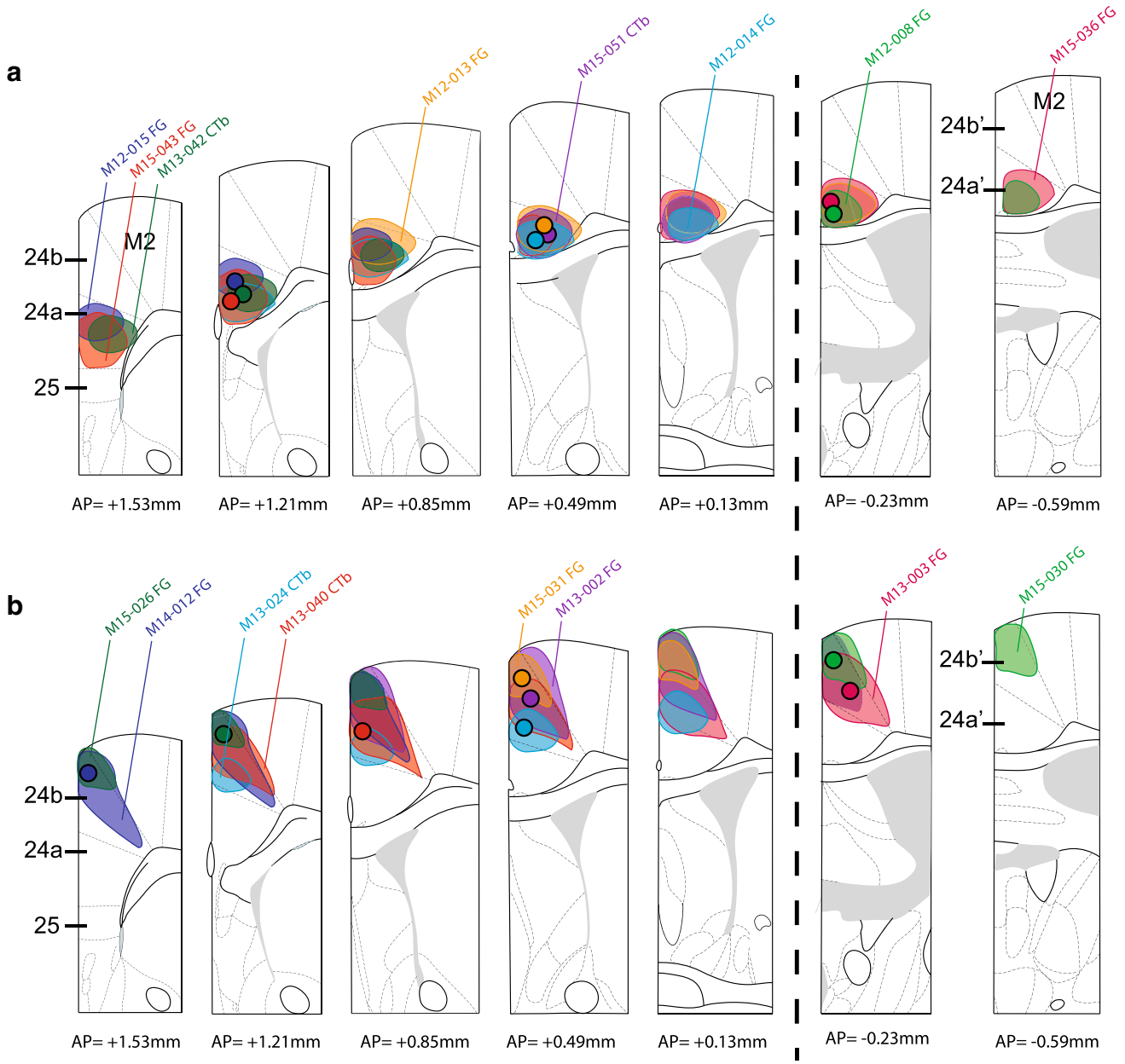


Fig. 1 FG and CTb injection sites. Schematic diagrams based on plates from Paxinos and Franklin (2012) showing the localization of representative FG and CTb injection sites in areas 24a, 24a′ (**a**), 24b and 24b′ (**b**). The center of each injection site is indicated by a *colored circle* and limits along the anteroposterior axis are represented with a similar colored background. The code name of each case is indicated with the *same color*. Level from the bregma is given below each *plate*. See list for abbreviations

and perirhinal (PRh) cortices were weakly to moderately labeled (Fig. 2h–l). In the hippocampal formation, a light density of FG + cells was found in the Amon's horn 1 (CA1) and the ventral subiculum (Fig. 2k, l).

Non-cortical forebrain

The claustrum (Cl) displayed a strong density of FG+ cells, mostly at its rostral level, especially when injection sites were in 24b (Fig. 2a–e). The basolateral amygdaloid nucleus (BL) also contained a high density of FG+ cells which is restricted to its anterior part (BLA; Fig. 2i, j). This density was slightly reduced when injections were done in 24a′ and 24b′. In both cases, the labeling was observed bilaterally with a large ipsilateral preference. Also, a notable density of FG+ cells was found in the cholinergic regions of the basal forebrain. The medial septum (MS) and the vertical limb of Broca's diagonal band (VDB) displayed FG+ neurons bilaterally with a moderate density (Fig. 2c), but the labeling in ipsilateral HDB reached a

strong density with FG injection in 24b (Fig. 2d, e). Also, scattered FG+ neurons were always observed in the ipsilateral globus pallidus (GP), ventral pallidum (VP) and, in few cases, in the internal capsule (Fig. 2e).

Thalamus

Retrograde labeling in the thalamus was exclusively ipsilateral, excepted for midline regions. The anterior nuclei accounted for a large part of the retrogradely labeled neurons, especially the anteromedial (AM) and interanterodorsal (IAD) nuclei, while the interanteromedial nucleus (IAM) was moderately labeled (Figs. 2f, g and 5). The labeling pattern in anterodorsal (AD) and anteroventral (AV) nuclei revealed differences in afferents to area 24. While the density of FG+ cells was light in AV after injections in 24a, 24a′ and 24b′, FG injection in 24b did not produce any labeling (Fig. 5). Similarly, the labeling density in AD was strong after 24a′ and 24b′ FG injections, but light after injection in 24a and absent after injection in 24b (Figs. 2f, 5). In the ventral group, the ventral anterior nucleus (VA) contained FG+ cells, at its limit with the AM, with a moderate density after injections in 24b/24b′ but lighter after injections in 24a/24a′ (Fig. 2g), while a dense labeling was observed in the ventromedial nucleus (VM; Fig. 2g–i). Among the lateral group, FG+ cells were observed mainly in the lateral posterior nucleus (LP), especially in its mediorostral part (LPMR), as well as in the lateral dorsal nucleus (LD; Fig. 2g–i). The mediodorsal nucleus (MD) displayed a strong density of FG+ neurons, essentially in its lateral part (MDL; Fig. 2g–i). A moderate concentration of retrogradely labeled neurons could also be observed in the posterior nucleus (Po; Fig. 2h, i), after injections in C24a and 24b. The midline nuclei contained FG+ neurons, with a moderate density in the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei, while a sporadic labeling occurred in the paraventricular (PV) and paratenial (PT) nuclei with FG injections in 24a and 24b but not 24a′ and 24b′ (Fig. 2f–i). Finally, among the intralaminar group, the density of FG+ cells was usually stronger after FG injection in 24a and 24b than 24a′ and 24b′. The FG+ density was strong in the centrolateral nucleus (CL), moderate to strong in paracentral nucleus (PC) and the rostral part of the central medial nucleus (CM), and light in the parafascicular nucleus (PaF; Fig. 2g–i).

Hypothalamus

A moderate concentration of FG+ cells was observed in the lateral hypothalamic area (LH), especially in its peduncular part (Fig. 2f–i). A sporadic to moderate FG staining was found in the anterior (AH) and posterior hypothalamic (PH) areas (Fig. 2j). Finally, the retromammillary nucleus (RM) contained a moderate to dense FG labeling (Fig. 2k).

Brainstem

Brainstem FG staining was located almost exclusively in monoaminergic centers. The ventromedial region of SNc displayed densely packed FG+ cells, with an ipsilateral preference, while the ipsilateral ventral tegmental area (VTA) contained a more moderate labeling (Fig. 2k, l). More caudally, the DR, MnR, and paramedian raphe (pMnR), as well as the rostral linear nucleus (Li) were moderately labeled (Fig. 2m). Finally, in the pons, a moderate number of FG+ cells was found in the ipsilateral LC, and a few sporadic FG+ neurons were observed in the pontine central gray (CG; Fig. 2n).

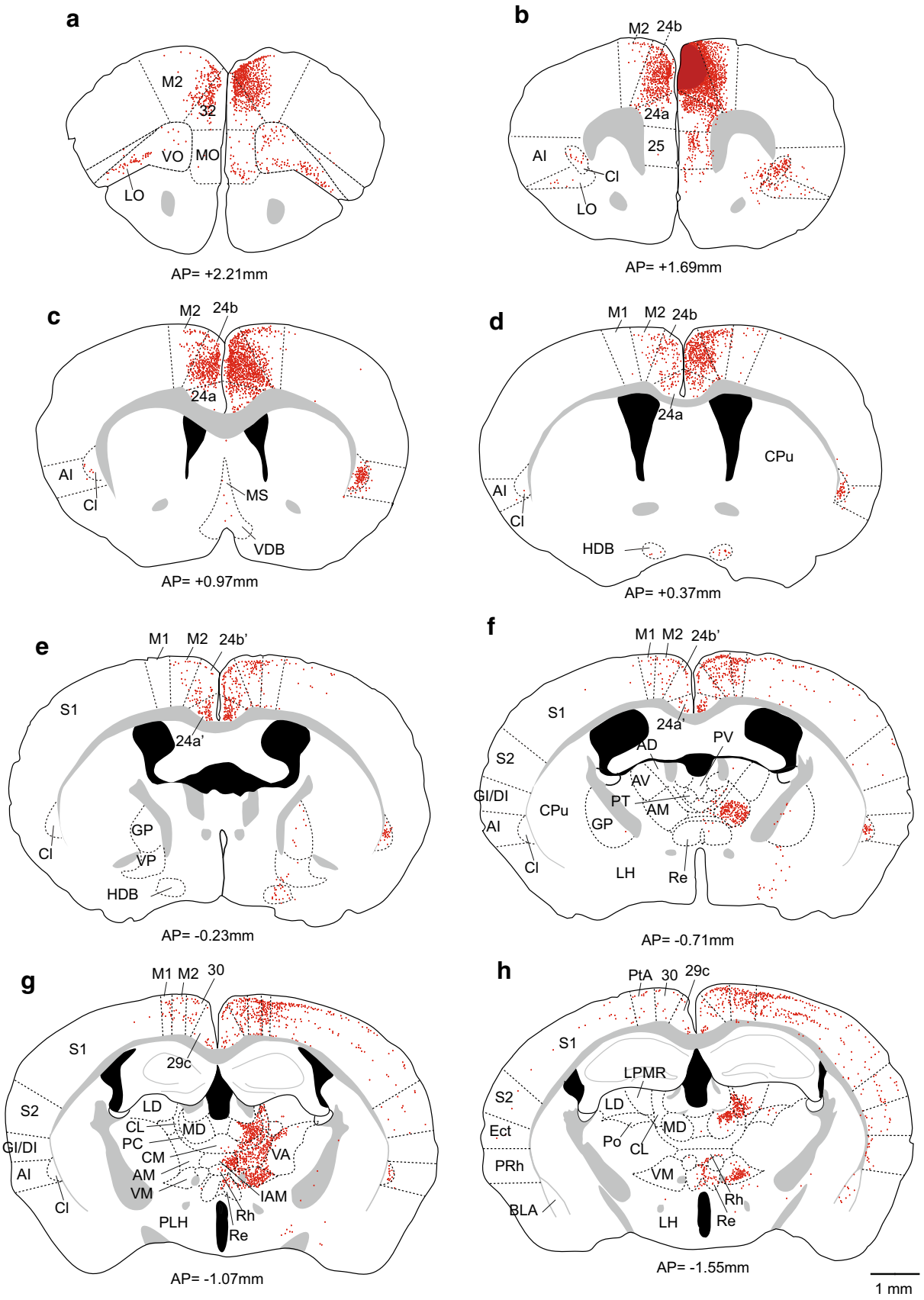
Confirmation by analysis of CTb retrograde labeling

The analysis of the CTb retrograde staining confirmed, in a qualitative manner, the results obtained with FG injections in areas 24a and 24b. Indeed, the localization of retrogradely CTb-labeled cells was similar to the one of FG+ cells with an overall comparable density (Fig. 3). This can be observed, for example, in prefrontal cortex (Fig. 4), in BLA and in PtA (Fig. 6c, d, g, h). In the thalamus, the two tracers also revealed a comparable pattern of retrograde labeling, with respect to the location of the injection sites (Fig. 5c, g). Yet, some structures showed quantitative differences between the two tracers. In most of these cases, such as in LO and areas 29c and 30, the differences in the density of retrogradely labeled cells were only minor, favoring either FG or CTb, and were not observed for all the cingulate areas (Fig. 3). However, more profound differences were observed in the neuromodulatory cholinergic centers of the basal forebrain and monoaminergic regions of the brainstem. Indeed, the HDB, SNc, VTA, raphe nuclei and LC constantly displayed a much lighter CTb staining compared to FG after injections in R24a, C24a, R24b and C24b (Figs. 3, 6). For example, while the density of FG+ cells was moderate in the SNc with clusters of densely packed cells, CTb injections led at best to a sporadic labeling of just a few cells (Fig. 6e, f).

To confirm that these structures were actual afferents to anterior cingulate areas, we injected into these structures the antrograde tracer biotin dextran amine (BDA) and, indeed, found anterogradely labeled axons in areas 24a and 24b (see Online resource 1).

Neurochemical characterization

The vast majority of the afferents to cingulate areas that we described arise from cortical area and thalamic nuclei


a
M2
32
VO
MO
LO
AP= +2.21mm
b
M2
24b
24a
25
AI
Cl
LO
AP= +1.69mm
c
M2
24b
24a
AI
Cl
MS
VDB
AP= +0.97mm
d
M1
M2
24b
24a
CPu
AI
Cl
HDB
AP= +0.37mm
e
M1
M2
24b'
S1
24a'
GP
Cl
VP
HDB
AP= -0.23mm
f
M1
M2
24b'
S1
24a'
AD
PV
S2
AV
GI/DI
PT
AM
CPu
GP
AI
Cl
LH
Re
AP= -0.71mm
g
M1
M2
30
S1
29c
S2
LD
CL
MD
GI/DI
PC
CM
VA
AM
AI
VM
IAM
Cl
PLH
Rh
Re
AP= -1.07mm
h
PtA
30
29c
S1
LPMR
S2
LD
Ect
MD
Po
CL
PRh
VM
Rh
BLA
LH
Re
AP= -1.55mm
1 mm

◀**Fig. 2** Distribution of FG retrograde labeling. Camera lucida schematic drawing of the labeling obtained after an FG injection in the right R24b (case M14-012), arranged from rostral to caudal level. The injection site is represented in *dark red* and each *light red point* represents a retrogradely labeled neuron. The approximate AP level from bregma is indicated for each *plate*. See list for abbreviations

where projection neurons are assumed to be glutamatergic. On the other hand, the existence of inputs from cholinergic and monoaminergic centers does not mean that they actually release acetylcholine or monoamines. As the retrograde labeling in these regions was similar after tracer injection in the different cingulate areas, we performed double-fluorescent staining in two animals injected with FG in R24b to analyze the neurochemical nature of retrogradely labeled neurons in the HDB, SNc, MnR, DRi and LC (Fig. 7). For the HDB labeling, we used immunolabeled ChAT, a marker of cholinergic cells (Fig. 7a, b). In the SNc and LC, TH, a marker of dopaminergic and noradrenergic cell was used (Fig. 7d–e, k–m). Serotonergic cells of the MnR and DR/Li were labeled by targeting 5-HT (Fig. 7g–i). In the HDB, only a third (35 %) of FG+ cells was co-labeled by the ChAT antibody (Fig. 7c), whereas the number of double-labeled cells was smaller in the VDB (11 %, data not shown) and inexistent in the MS (data not shown). In the SNc, the proportion of FG+ neurons co-labeled with TH represented more than 60 % of

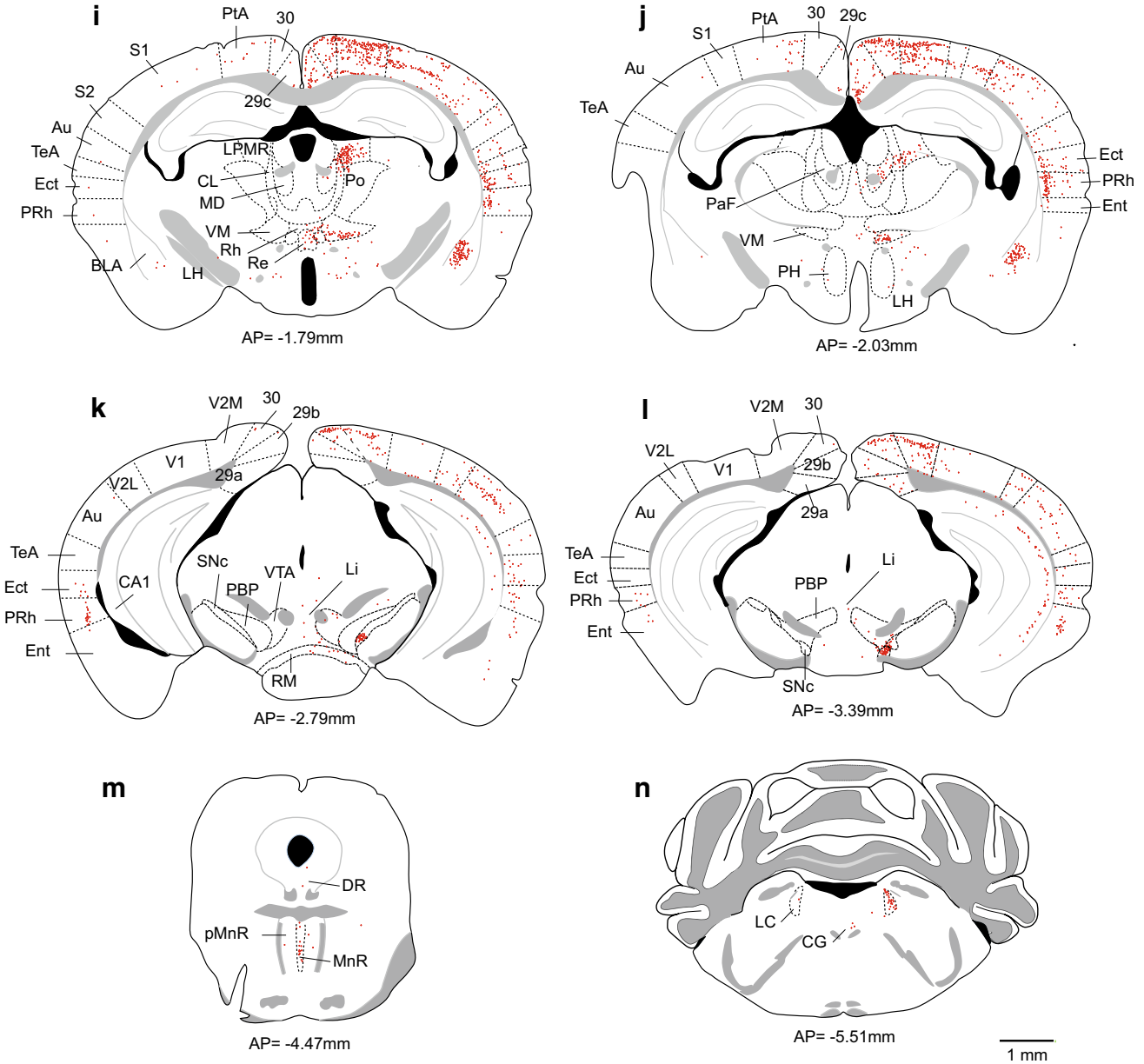
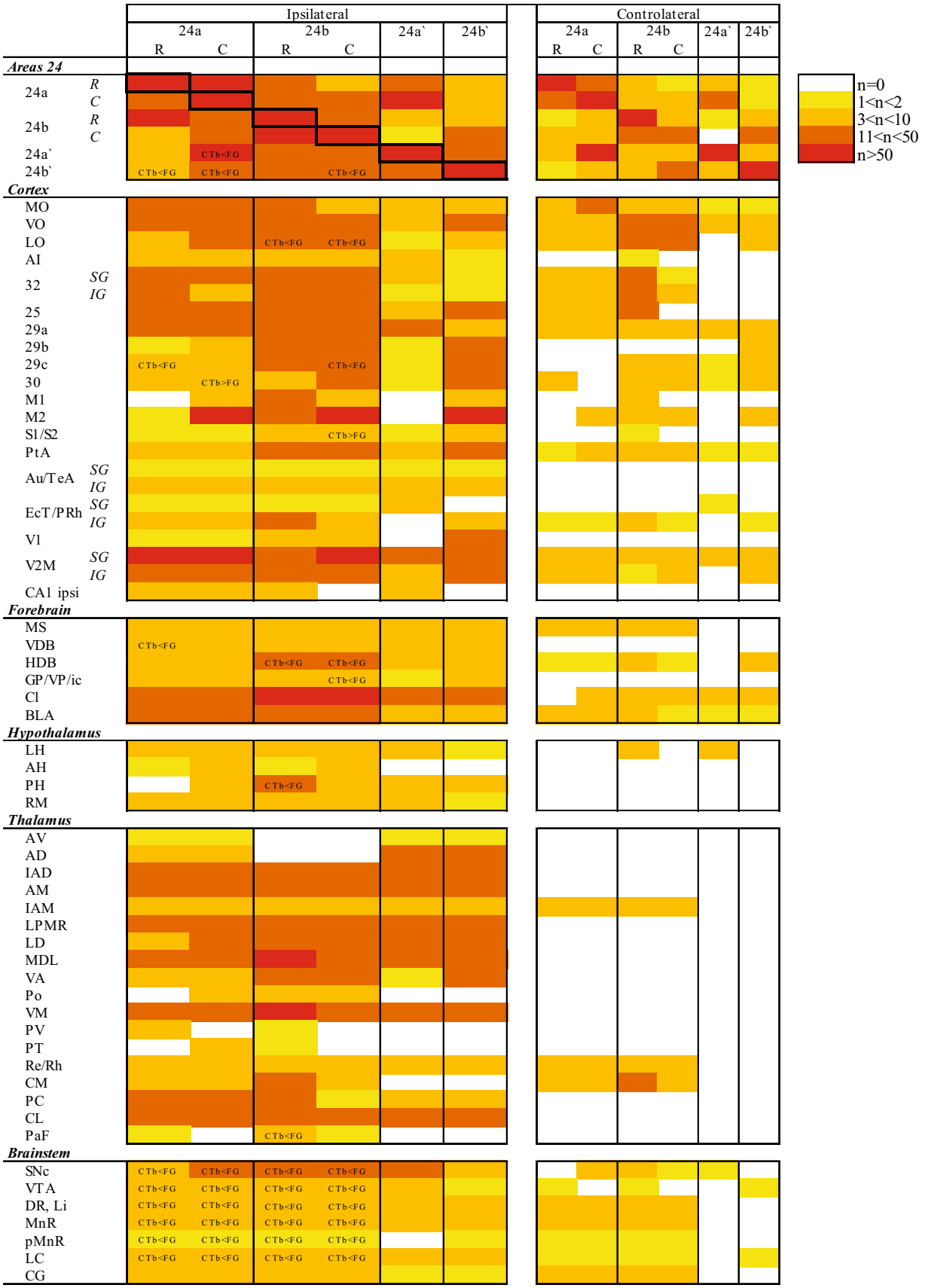


Fig. 2 continued


Ipsilateral
Controlateral
24a
24b
24a`
24b`
R
C
n=0
1<n<2
3<n<10
11<n<50
n>50
Areas 24
Cortex
Forebrain
Hypothalamus
Thalamus
Brainstem
CTb<FG
CTb>FG

◀**Fig. 3** Heat map of the general pattern of inputs to areas 24a, 24b, 24a′ and 24b′. The density of retrogradely labeled neurons in each structure is indicated by a *color code*, based on the quantification per 200 µm × 200 µm^2, for injection sites in rostral (*R*) or caudal (*C*) parts of area 24a and 24b and in areas 24a′ and 24b′ (see materials and methods). For some cortical regions, density is indicated specifically for supragranular (*SG*) and infragranular (*IG*) when differences were observed. Differences in labeling density between FG and CTb cases are indicated. See list for abbreviations

the total of retrogradely labeled cells (Fig. 7f). In the raphe nuclei, the number of FG+ cells positive for 5-HT was more important in the DR/Li (59 %) than in the MnR (30 %) (Fig. 7j). Finally, a consequent number of FG+ cells were TH-positive in the LC (74 %) (Fig. 7n). These findings indicate the notable presence of non-monoaminergic inputs to cingulate cortex arising from the various "monoaminergic" nuclei.

Discussion

In this study, we provide a detailed analysis of the inputs to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a′ and 24b′ in mice. These afferents belong to five groups of structures, arising mainly from the cortical mantle and the thalamus, with a smaller contribution of the basal forebrain, the hypothalamus and the brainstem (Fig. 8). While qualitatively comparable, the afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b from the cerebral cortex and from the thalamus appear generally denser than those to midcingulate areas 24a′ and 24b′. Our neurochemical study also showed that afferents from the basal forebrain and the brainstem were, in part, cholinergic and monoaminergic, respectively, but non-cholinergic and non-monoaminergic projections were also observed.

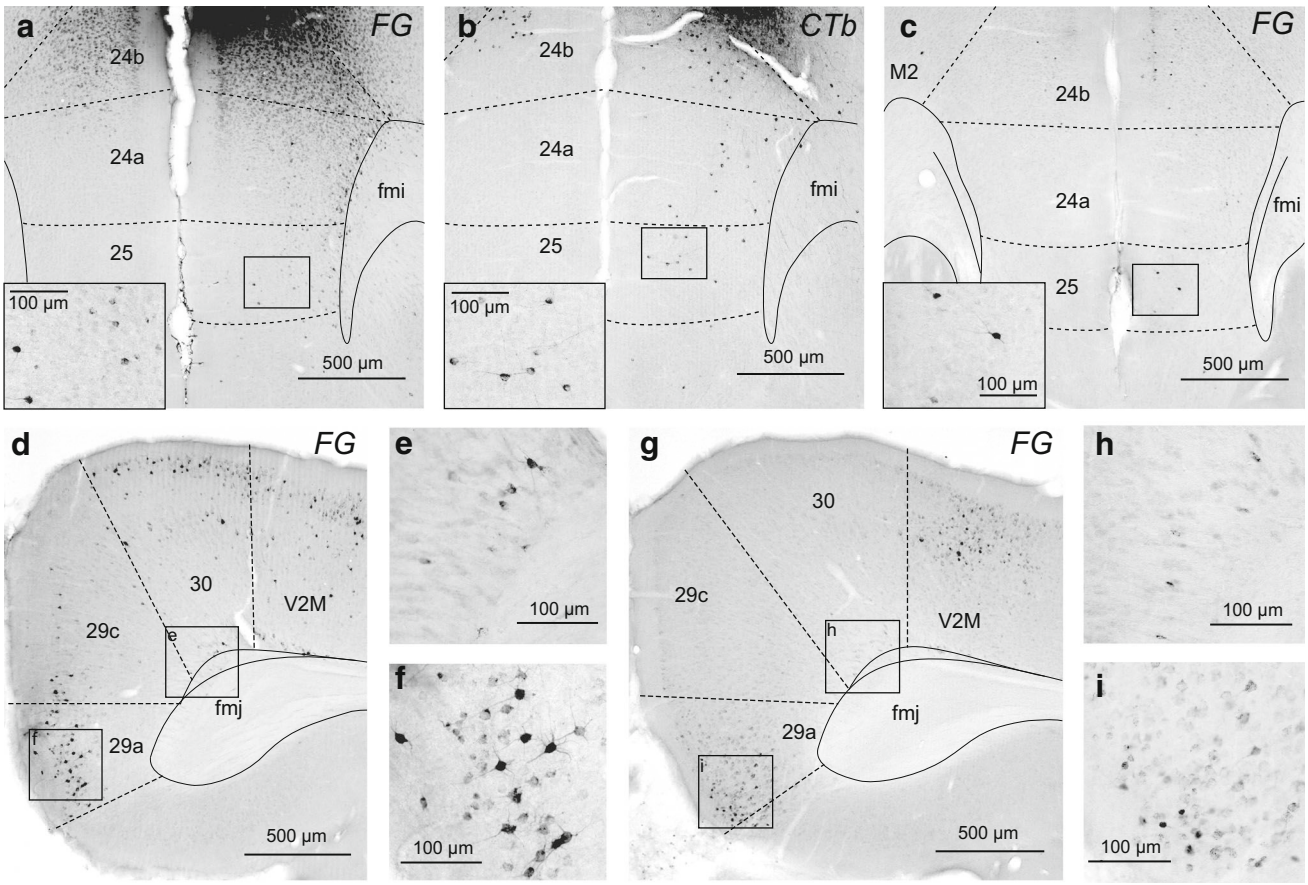
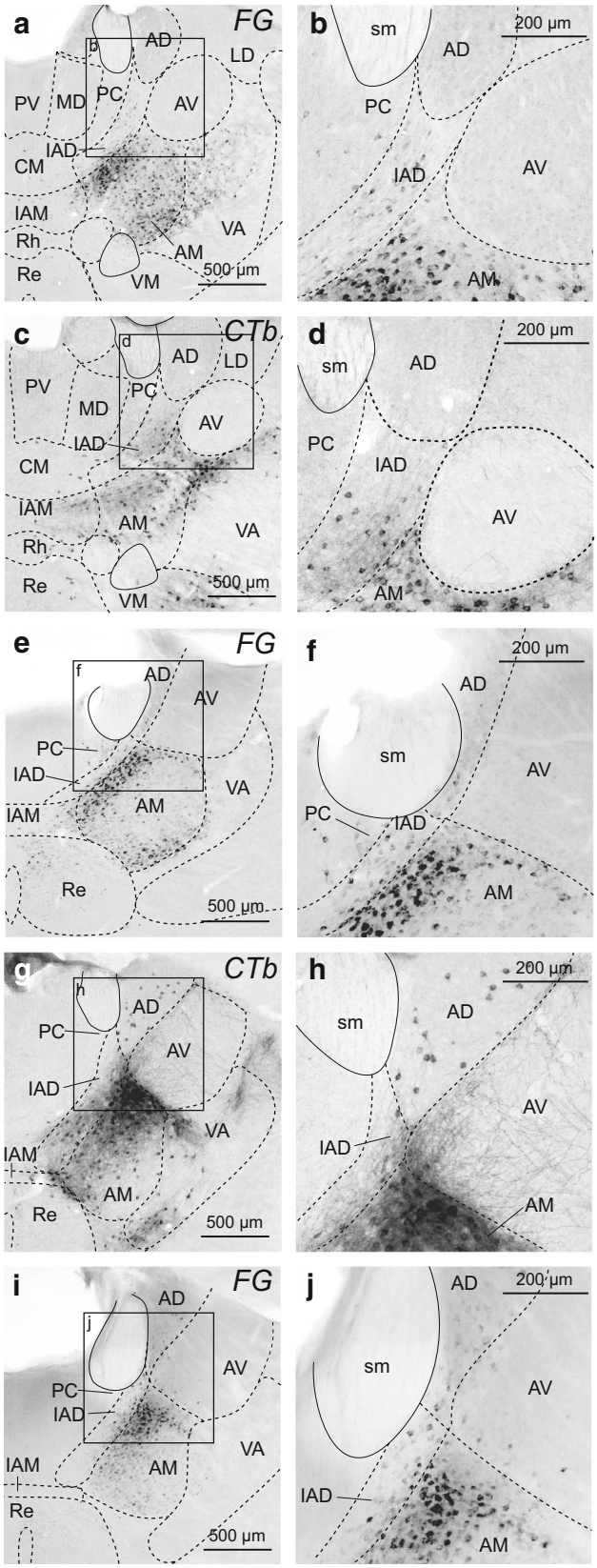


Fig. 4 Retrograde labeling in the cortex. Microphotographs of the retrograde labeling in the medial prefrontal (mPFC; +1.53 mm from Bregma; **a**–**c**) and the retrosplenial (RS; −2.79 mm from Bregma; **d**–**i**) cortices. Following FG injection, a consequent number of FG+ cells are found in areas 32 and 25, more important after injection in R24b (**a**) than in 24b′ (**c**). A similar distribution and density of retrogradely labeled cells is found after CTb injection in R24b (**b**). Inserts on the *bottom left* in **a**–**c** show enlarged views of area 25. The RS displays a variable staining density depending on the injection site. The labeling obtained in areas 29c and 30 was dense with an injection in R24b (**d**, **e**) and light after an injection in 24a′ (**g**, **h**), while it remains identical in area 29a (**f**, **i**). See list for abbreviations



◀**Fig. 5** FG retrograde labeling in the thalamus. Microphotographs of the retrograde labeling in the anterior thalamus after FG injections in R24b (**a**, **b**), C24a (**e**, **f**) and 24a′ (**i**, **j**) and CTb injections in R24b (**c**, **d**) and C24a (**g**, **h**). No retrogradely labeled cell is found in the anteroventral (AV) and anterodorsal (AD) nuclei after an FG (**a**, **b**) or CTb (**c**, **d**) injection in R24b. An injection in C24a leads to a light staining in these nuclei (FG: **e**, **f**; CTb: **g**, **h**), whereas FG in 24a′ produces a moderate labeling in the AD (**i**, **j**). The anteromedial (AM) nucleus is heavily stained in every case with both FG and CTb, but the localization of the labeled cells is more centered after an R24b injection (**a**, **c**) than C24a and 24a′ injections (**e**, **g**, **i**). See list for abbreviations

Nomenclature

Since the introduction of the four-regions model of the cingulate gyrus (Vogt 1993), the primate's ACC is defined as the region covering Brodmann's areas 24, 25, 32 and 33. These areas are further subdivided depending on their relative position to the cingulate sulcus. In rodents, the medial bank of the rostral cortex displays a cytoarchitectural organization comparable to the one found in human areas 24a, 24b, 25, v32 and 33, but no rodent counterpart seems to exist for human sulcal areas d32, 24c or 24d (Vogt 2015). For about 30 years, this region of the rodent cortex has been defined as the mPFC (Van Eden and Uylings 1985). The ventral mPFC includes the infralimbic and the prelimbic areas which correspond to primate Brodmann's areas 25 and 32, respectively, and the dorsal mPFC comprising the "anterior cingulate areas" (Cg1 and Cg2) and the M2 (Heidbreder and Groenewegen 2003; Krettek and Price 1977). While invaluable anatomical and functional data regarding the mPFC have been acquired over the years, the use of this scheme has two major drawbacks. First, the term "anterior cingulate cortex" or ACC is used in rodents to refer only to the Cg1 and Cg2 parts of the mPFC, even though the primate equivalents of prelimbic and infralimbic cortices (areas v32 and 25) are actually integral parts of the primate ACC. Second, the rodent "anterior cingulate cortex" is usually considered to extend caudally up to the RS. However, cytoarchitectural analysis in rats and mice indicates that, whereas the rostral halves of Cg1 and Cg2 areas are homologous to primate areas 24b and 24a, respectively, their caudal halves are actually comparable to primate areas 24b′ and 24a′, respectively, which do not belong to the ACC but constitute the MCC (Vogt and Paxinos 2014). Thus, the concept of mPFC introduced a bias in potential comparisons between rodents and primates. In an effort to standardize the nomenclatures and facilitate comparative studies, the latest editions of the mouse (Paxinos and Franklin 2012) and rat brain atlases (Paxinos and Watson 2014) adopted the areal nomenclature

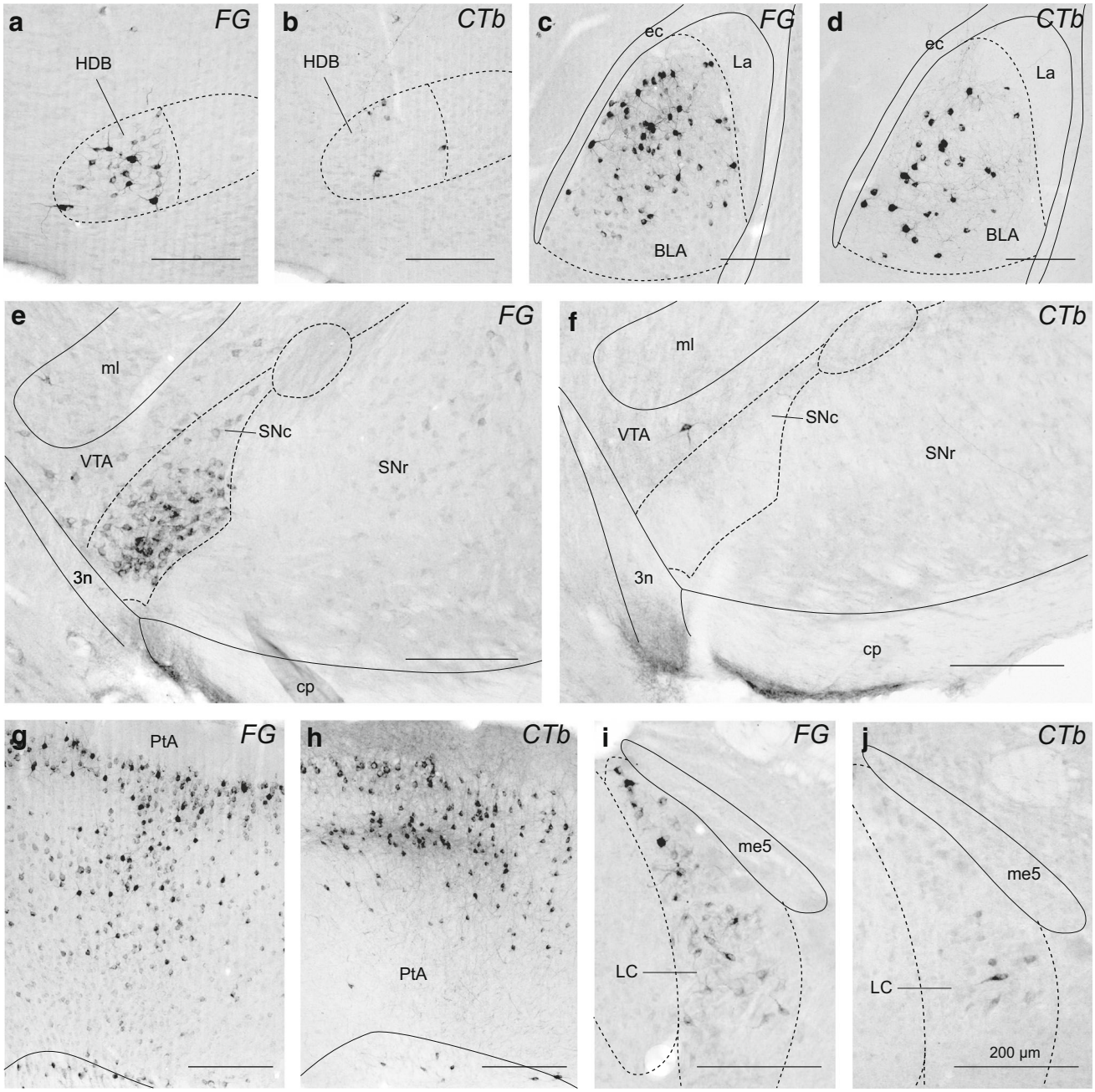
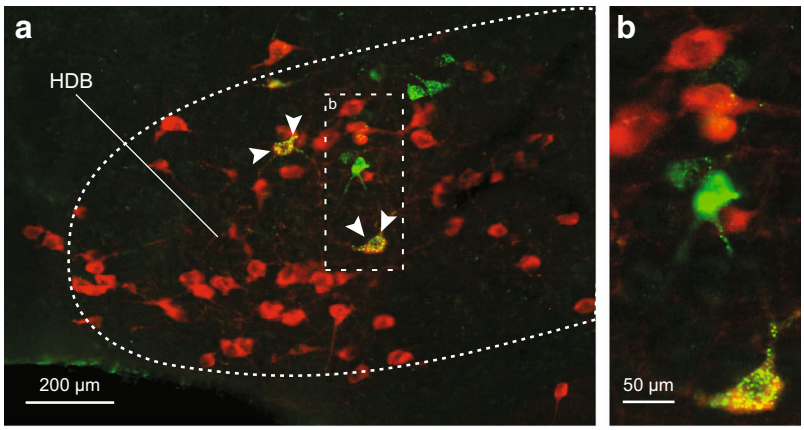


Fig. 6 Comparison between FG and CTb labeling. Distribution of retrogradely labeled cells in the horizontal limb of the diagonal band of Broca (HDB; **a**, **b**), the basolateral nucleus of the amygdala (BLA; **c**, **d**), the substantia nigra, *pars compacta* (SNc; **e**, **f**), the parietal associative cortex (PtA; **g**, **h**) and the locus coeruleus (LC; **i**, **j**) after FG (**a**, **c**, **e**, **g**, **i**) or CTb (**b**, **d**, **f**, **h**, **j**) injection in R24b. In BLA (**c**, **d**) and PtA (**g**, **h**), the distribution and density of retrogradely labeled cells is largely comparable between FG and CTb injections. However, in HDB (**a**, **b**), SNc (**e**, **f**) and LC (**i**, **j**), the density of CTb+ cells is drastically reduced compared to the one of FG+ cells. See list for abbreviations

for cingulate areas that we used in this article. Beyond a simple change of denomination, this nomenclature better defines the organization of rodent cingulate regions. Thus, we analyzed the connections of specific subregions, namely areas 24a and 24b, which makes sense in a perspective of comparative neuroanatomy.

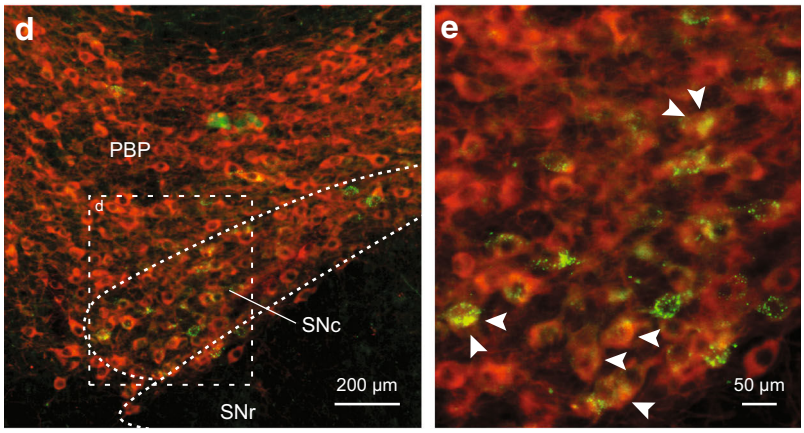
Comparison of retrograde labeling with FG and CTb

An important issue in neuronal tracing is to avoid non-specific uptake and transport of the tracers. The analysis of the brain labeling obtained with the two retrograde tracers,



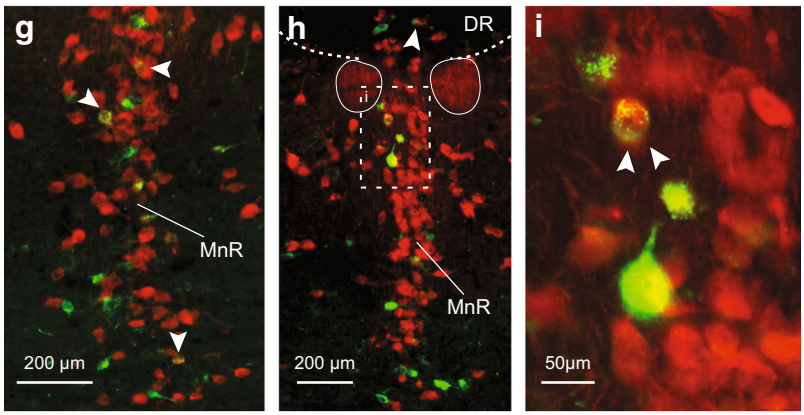
c Diagonal band of Broca, horizontal limb

FG+ cells	ChAT +	ChAT -
213	74	139
	35%	65%



f Substantia nigra, *pars compacta*

FG+ cells	TH +	TH -
383	232	151
	82%	18%

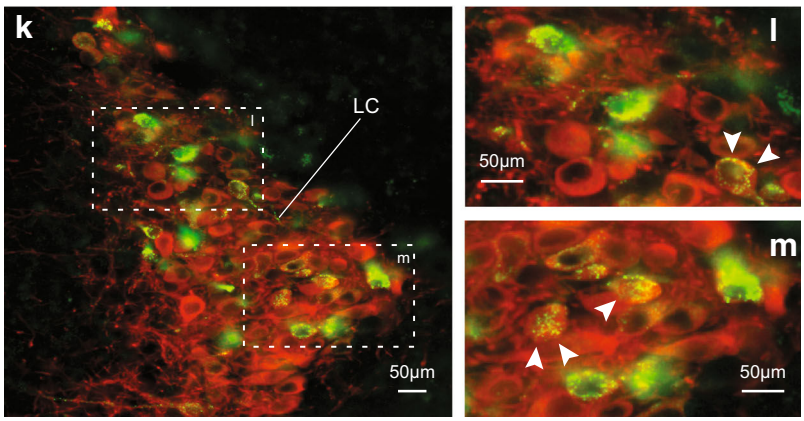


j Median raphe nucleus

FG+ cells	5-HT +	5-HT -
134	40	94
	30%	70%

Dorsal raphe nucleus

FG+ cells	5-HT +	5-HT -
94	55	39
	59%	31%



n Locus coeruleus

FG+ cells	TH +	TH -
232	171	61
	82%	18%

◀**Fig. 7** Neurochemical identification of afferents to areas 24a and 24b. Merged microphotographs of double-labeling in the diagonal band of Broca, horizontal limb (HDB; **a**, **b**), the substantia nigra, pars compacta (SNc; **d**, **e**), the raphe nuclei (**g**–**i**) and the locus coeruleus (LC; **k**–**m**). The double-labeling was done on two animals using an anti-FG antibody (*green*) and an anti-choline acetyltransferase (ChAT, *red*) antibody for the HDB or an anti-tyrosine hydroxylase (TH, *red*) antibody for the SNc and the LC or an anti-serotonin (5-HT, *red*) antibody for the raphe nuclei, after injection of FG in R24b. The quantification of ChAT, TH and 5-HT labeling in FG+ cells was done in the HDB (**c**), the SNc (**f**), the median (MnR) and dorsal (DR) raphe nuclei (**j**), and the LC (**n**). In the HDB (**a**–**c**), one-third of the FG+ cells were cholinergic, compared to the SNc (**d**–**f**), where more than 80 % of the FG+ neurons co-localized the TH staining. In the raphe nuclei (**g**–**j**), a larger proportion of the FG+ neurons were serotonergic in the DR than in the MnR. The LC (**k**–**n**) displayed an important proportion of FG+ cells co-localized with the TH staining. See list for abbreviations

the FG and the CTb, led to similar qualitative results. Quantitatively, a few minor differences were observed in some cortical and thalamic regions, which could be due to the characteristics of the tracers (Fig. 3). Indeed, these light discrepancies were restricted to only a few areas and were not present for all the targeted cingulate areas. In this case, while a minimal capture of FG by fibers of passage is possible, it can be considered as negligible since CTb still gave a consistent retrograde labeling. The variability in the density of CTb+ versus FG+ cells would be, thus, more related to the diffusion of the tracers at the injection site, which will lead to variable capture in the different cortical layers. However, significant differences were observed in cholinergic and monoaminergic centers, where the density of CTb+ cells was always inferior to the one of FG+ cells (Fig. 6). These differences can be explained by the mode of capture inherent to each tracer. Indeed, the FG enters passively in the cell and can be taken up by passing fibers in the case of large injections (Kobbert et al. 2000), while the CTb is actively taken up by binding to the GM1-gangliosides present at the synapse (Baldauf et al. 2015; Kobbert et al. 2000). Despite this mismatch between FG and CTb retrograde labeling, several facts argue that these modulatory afferents to ACC/MCC exist. First, our reciprocal anterograde analysis (Online ressource 1) confirms the existence of inputs from the HDB, SNc, MnR and LC to areas 24a/24b. Second, consistent inputs from cholinergic, dopaminergic, serotonergic and noradrenergic centers have already been described in rats (Chandler et al. 2013; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007). Third, it has been shown that acetylcholine and monoamines can be released by both synaptic and extrasynaptic mechanisms (Fernandez-Pastor and Meana 2002; Fortin et al. 2006; Johnson and Pilar 1980; Trueta and De-Miguel 2012; Trueta et al. 2003). Thus, considering the CTb exclusive mode of capture by presynaptic elements, this tracer would only enter afferent axons using a synaptic release and not those using extrasynaptic release such as acetylcholine and monoamines.

Comparison with previous studies

The connectome of areas 24a/24b and 24a′/24b′ had not yet been investigated in mice as thoroughly as in rats and primates. A few studies addressed specific connections such as the BLA and the thalamus (Delevich et al. 2015; Matyas et al. 2014), and global anatomical data, obtained with conventional or viral tracers injections in the cortex, are available online on the Mouse Connectome Project (http://www.mouseconnectome.org) and the Allen Mouse Brain Connectivity Atlas (http://www.connectivity.brain-map.org) with two conceptual publications based on these resources (Oh et al. 2014; Zingg et al. 2014). However, these works concern the general cortical connectivity and do not detail the specific connections of areas 24a/24b. On the other hand, numerous data exist regarding the connections of the "anterior cingulate areas" in the rat. Here, we will compare the results we obtained in mice with those in rats by translating the mPFC scheme into areal nomenclature as much as possible.

Cerebral cortex

The cerebral cortex represents a main source of afferents to areas 24a/24b. Regarding intracingulate connections, while all injection sites resulted in retrograde labeling in the rest of area 24, we observed a preferential crosstalk with 24a and 24b. Similarly, preferential interconnections seem to occur in MCC regions. Regarding the interactions between areas 24a/24b and MCC, areas 24a′ and 24b′ project strongly to area 24b and to C24a, but less to R24a, while the strongest input to MCC arise from C24a and 24b, respectively. Despite some differences in the density of connections, these results are comparable to those described in rats by Jones et al. (2005).

Our results showed a dense projection to area 24 coming from prefrontal regions, especially from the orbital cortex, areas 32, 25 and M2, as shown in rats (Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007, 2011; Jones et al. 2005; Morecraft et al. 2012; Vogt and Miller 1983). These prefrontal afferents include, in both rats and mice, a lighter but qualitatively similar controlateral contribution (Hoover and Vertes 2007, 2011; Jones et al. 2005; Morecraft et al. 2012; Ongur and Price 2000; Zingg et al. 2014). These prefrontal inputs may bring the necessary associations between sensory information and their potential outcomes to attribute a value to the stimuli and globally participate in executive functions (Dalley et al. 2004;

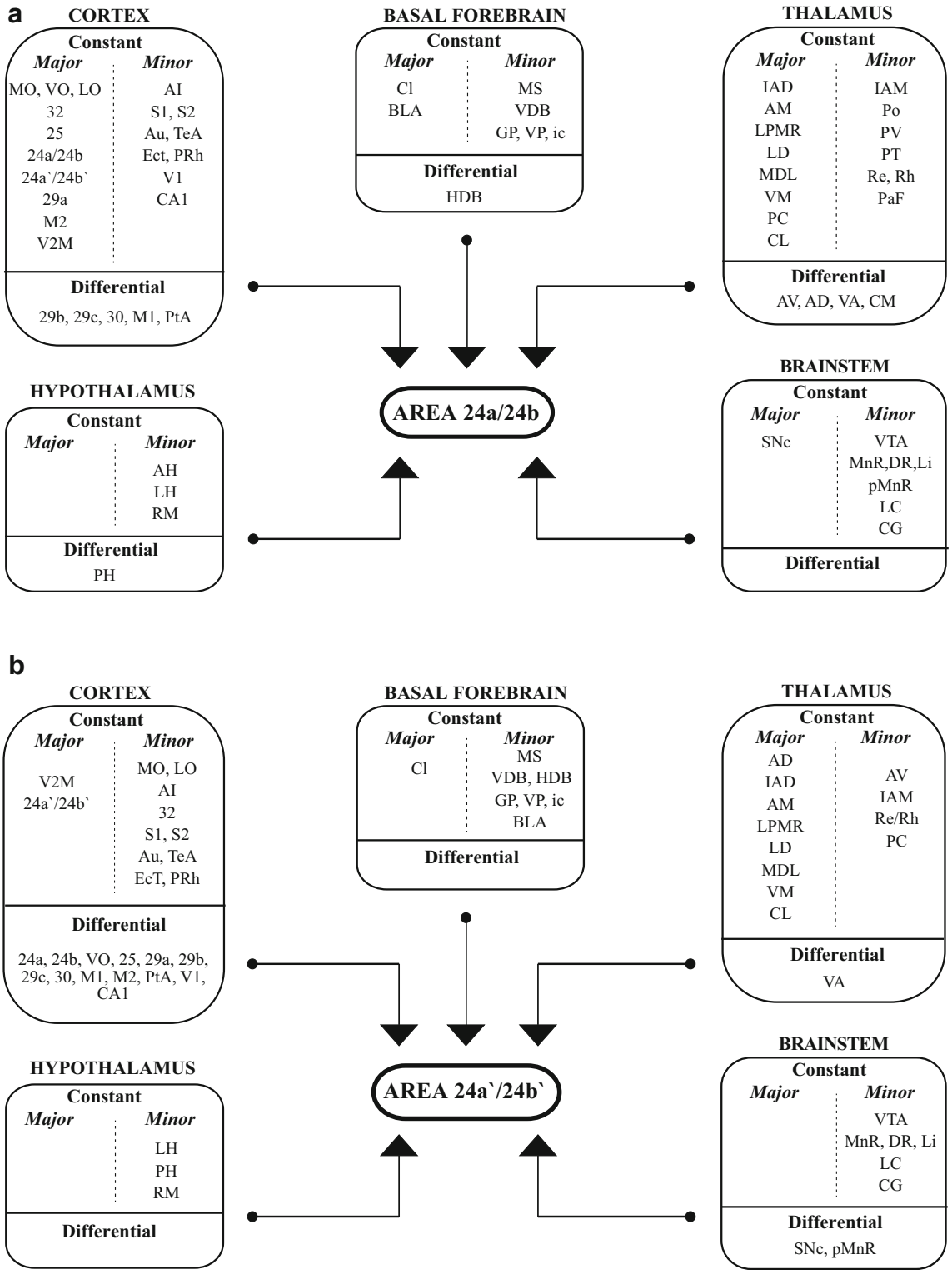


Fig. 8 Summary of the afferents to areas 24a/24b and 24a′/24b′. Schematic representation of inputs to 24a/24b (**a**) and to 24a′/24b′ (**b**) originating in the cerebral cortex, the basal forebrain, the thalamus, the hypothalamus and the brainstem. For each group, structures providing major or minor inputs to both 24a and 24b (**a**) or to both 24a‘and 24b′ (**b**) are indicated as “constant” and structures projecting with different density to 24a and 24b (**a**) or to 24a′ and 24b′ (**b**) are indicated as “differential”. For this figure, the rostral and caudal dimensions of 24a/24b were not taken into account. See list for abbreviations

Hoover and Vertes 2011; Kesner and Churchwell 2011; Schoenbaum and Esber 2010; Shenhav et al. 2013).

More caudally, strong afferents arose from the RS, the PtA and V2M, with an overall stronger input to 24b and 24b′ than to 24a and 24a′. These afferents have already been reported in mice (Zingg et al. 2014) and rats (Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Jones et al. 2005; Vogt and Miller 1983). While RS is largely involved in spatial navigation, in relation with the extended hippocampal circuit (Czajkowski et al. 2014; Miller et al. 2014), the PtA is a high-order association area integrating visual, auditory and somatosensory information (Chandler et al. 1992; Cipolloni and Pandya 1999; Reep et al. 1994; Torrealba and Valdes 2008). Finally, the light inputs from primary sensory areas, such as the S1, V1, and Au cortices are consistent with rats' studies (Hoover and Vertes 2007). Globally, these inputs then provide highly processed multimodal information to areas 24a/24b.

Finally, the hippocampal formation and parahippocampal region provide a light to moderate projection, in accordance with the work of Zingg et al. (2014) in mice, and with data reported in rats (Delatour and Witter 2002; Hoover and Vertes 2007). In this present study, afferents from CA1 were moderate to areas 24a, 24a′ and R24b, but totally absent to C24b and 24b′. This is in good agreement with observations in rats (Hoover and Vertes 2007), showing a progressive increase in hippocampal inputs from dorsal to ventral regions of the mPFC.

Thalamus

The second region providing a major input to areas 24a/24b is the thalamus, mainly from the anterior, mediodorsal, midline and intralaminar nuclei, which is consistent with previous studies in mice and rats (Conde et al. 1990; Hoover and Vertes 2007; Oh et al. 2014; Van der Werf et al. 2002; Vertes and Hoover 2008; Vertes et al. 2006). Among the anterior nuclei, the AM and the IAD represent the main source of projection to areas 24a/24b and 24a′/24b′, with a more modest contribution of the IAM. These thalamic nuclei, in association with hippocampal regions CA1, ventral subiculum, enthorinal (Ent) and Ect, and with the RS form the "extended hippocampal circuit", which is largely involved in spatial navigation and spatial learning (Aggleton and Nelson 2015; Jankowski et al. 2013), but also in the control of attention to task-relevant stimuli (Wright et al. 2015). Inputs from AV and AD were more specific. Indeed, AV projected sparsely to 24a and 24a′/24b′, and AD projected lightly to 24a and moderately to 24a′/24b′, but these two nuclei obviously avoided 24b. This is consistent with the reported data in rats (Hoover and Vertes 2007; Horikawa et al. 1988; Shibata 1993; Vogt and Paxinos 2014). Another study in mice (Oh et al. 2014) reported a dense projection from the AV and no projection from the AD to the "anterior cingulate cortex", but they differentiate neither 24a and 24b, nor ACC and MCC.

In addition to the anterior nuclei, the LD and the LP also provide moderate afferents to areas 24a/24b, as described in rats (Conde et al. 1990; Heidbreder and Groenewegen 2003; Jurgens 1983; Nakamura et al. 2015). In mice, Oh et al. (2014) identified an input from LD, but not from LP. While the LD is functionally associated to the anterior nuclei in the spatial navigation circuit (Aggleton and Nelson 2015), the LP is considered as the visual associative thalamus, and is comparable to the primate's pulvinar (Benarroch 2015; Fosse and Fonnum 1987).

Our results indicate that strong afferents arose from the MDL, as previously described in rats (Conde et al. 1990; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Krettek and Price 1977). A similar observation has been recently reported in mice (Matyas et al. 2014), describing a specific input from the MDL to areas 24a and 24b, while area 32 receives inputs originating mainly from the central and the medial MD. This projection can serve several functions, including working memory, decision-making and fear conditioning (Courtin et al. 2013; Matyas et al. 2014; Mitchell 2015; Tang et al. 2005; Weible 2013; Wolff et al. 2015). The MD has also been proposed to be one of the principal relays for nociceptive transmission to areas 24a/24b by activating pyramidal neurons in layers II-III and V (Yang et al. 2006). However, in addition to a direct input to the pyramidal cells, it has been suggested that the MD sends a glutamatergic projection to the parvalbumine interneurons of the ACC, thus leading to an inhibition of deeper pyramidal neurons (Delevich et al. 2015). In the ventral group of thalamic nuclei, the VA and the VM send inputs which favor dorsal regions (24b/24b′) rather than ventral regions (24a/24a′), comparable to what was observed in rats (Conde et al. 1990; Deniau et al. 1994; Hoover and Vertes 2007). Beside the well-described role of ventral thalamus in motor functions, the VM was also shown to contain nociceptive neurons (Monconduit et al. 2003; Monconduit and Villanueva 2005). These afferents could participate in the role of area 24b in periocular/eye movements and nose movements (Brecht et al. 2004), but also in motor programming necessary to escape from nociceptive stimulus (Pastoriza et al. 1996; Vogt 2015).

Among the intralaminar and midline nuclei, Oh et al. (2014) observed a projection to the mouse ACC coming from the Re, but did not mention other intralaminar or midline nuclei inputs. We observed a light to moderate labeling, preferentially found in the CM, the PC, and the CL, and in the midline nuclei with a stronger labeling in the Re and Rh than in the PV and the PT, as shown in rats (Conde et al. 1990; Hoover and Vertes 2007; Van der Werf et al. 2002; Vertes and Hoover 2008; Vertes et al. 2006).

Most of these medial thalamic nuclei have been shown to contain nociceptive neurons and to contribute to nociceptive processing in the rodent ACC (Dong et al. 1978; Peschanski et al. 1981; Shyu and Vogt 2009; Yang et al. 2006). Interestingly, the Re and Rh have been emphasized as important relays between the mPFC and the hippocampal formation, supporting high cognitive functions such as learning and memory consolidation (Cassel et al. 2013; Cholvin et al. 2013; Dumont and Aggleton 2013; Hallock et al. 2013; Loureiro et al. 2012; Marchand et al. 2014).

Non-cortical forebrain and hypothalamus

While areas 24a/24b received a rather modest hypothalamic input, arising mainly from LH and RM as described in rats (Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Pan and McNaughton 2004), two conspicuous telencephalic structures, the Cl and the BLA, provide a dense input. The claustrocingulate projection has already been identified in rats (Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Mathur et al. 2009; Smith and Alloway 2014; White et al. 2016) and mice (Zingg et al. 2014). In this latter paper, the authors claim that the Cl projection to the cerebral cortex is exclusively ipsilateral; however, we constantly observed a moderate controlateral input as reported in rats (Li et al. 1986; Smith and Alloway 2014). Even if the function of the Cl remains elusive, its reciprocal connections with the cortical mantle have been proposed to synchronize sensory, cognitive and motor information (Crick and Koch 2005). An emerging hypothesis also suggests a role of the Cl in attention, in relation with the ACC (Goll et al. 2015; Mathur et al. 2009). The consequent amygdaloid projection we observed from the BLA has also been described in rats and mice (Gabbott et al. 2006; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Matyas et al. 2014; McDonald 1987). The projection from the BLA displays a topographic arrangement in rodent's mPFC, with denser projections to ventral areas (32 and 25) than to dorsal areas (24a, 24b and M2). In addition, ventral areas seem to be preferentially innervated by the posterior basolateral nucleus, while areas 24a/24b are targeted by the BLA (Gabbott et al. 2006; Matyas et al. 2014; Reppucci and Petrovich 2016). Anatomical and functional evidence suggest that the BLA, largely involved in emotional processing, especially in the fear conditioning paradigm, but also in pain (Abiri et al. 2014; Erlich et al. 2012; Hasanein et al. 2007; Orsini et al. 2015; Rana and Parker 2008; Veinante et al. 2013), establishes contacts with cortical pyramidal neurons but may also influence feed-forward inhibition by contacting local parvalbumin inhibitory interneurons (Dilgen et al. 2013; Gabbott et al. 2012, 2006; Ji et al. 2010).

The rest of the afferents from the basal forebrain belong to the cholinergic corticopetal system. Our study showed moderate inputs mainly from the HDB, the VDB, the MS, and from a population loosely spread through the pallidum (VP, GP) and the internal capsule, that can be associated to the nucleus basalis as proposed in rats (Chandler et al. 2013; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007). This projection, which may be involved in attentional processing (Everitt et al. 1987; McGaughy et al. 1996; Sarter et al. 2001), appeared to be only in part cholinergic, as previously described in rats (Chandler et al. 2013). Indeed, only one-third of the projecting cells in the HDB were found to be cholinergic. It is, therefore, possible that an important proportion of our retrogradely labeled neurons in these regions were in fact GABAergic, since several studies described a significant corticopetal GABAergic population originating from the basal forebrain (Gracia-Llanes et al. 2010; McKenna et al. 2013; Roland and Savage 2009), potentially involved in attentional processes (Burk and Sarter 2001).

Brainstem

In the brainstem, the neurons projecting to area 24 were restricted to monoaminergic centers, mainly the SNc, VTA, MnR, DR and LC, the sole exception being a light input coming from the CG. Afferents from these nuclei have been largely demonstrated in rats (Chandler et al. 2013; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007), but other brainstem inputs have also been reported from the interpeduncular nucleus, the parabrachial nucleus, the central linear nucleus and the nucleus incertus (Chandler et al. 2013; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007). Regarding dopaminergic regions, inputs from the SNc receive relatively less attention than the one originating from the VTA, but this projection has been previously described in rat (Hoover and Vertes 2007; Takada and Hattori 1986). In rats, the most sizeable dopaminergic input comes from the VTA (Chandler et al. 2013; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Yetnikoff et al. 2014). Our neurochemical characterization showed that more than 80 % of ACC-projecting cells in the SNc were dopaminergic. The rest of the SNc cell population needs to be identified, but a GABAergic population of neurons has already been described in guinea pigs (Yung et al. 1991) and rats (Oertel et al. 1982). In the VTA, GABAergic and glutamatergic neurons have been reported (Root et al. 2014; Sanchez-Catalan et al. 2014; Yetnikoff et al. 2014). In rats, several groups showed that described mPFC-projecting neurons are preferentially glutamatergic rather than dopaminergic (Gorelova et al. 2012; Yamaguchi et al. 2011). Interestingly, Hnasko et al. (2012) described a potential inversed situation in mice.

Finally, we found that inputs from serotonergic and noradrenergic centers were light. Our results agree with Chandler et al. (2013), who also suggested that among all areas of the mPFC, area 24 received the lightest serotonergic and noradrenergic innervations. We also showed that 30–60 % of areas 24a/24b-projecting raphe neurons in mice were serotonergic and 82 % of LC neurons were noradrenergic. There are several reports of an existing GABAergic cell population in the raphe, as well as neuropeptidergic, glutamatergic and even dopaminergic neurons (Clements et al. 1987; Nanopoulos et al. 1982; Ochi and Shimizu 1978; Trulson et al. 1985; Uhl et al. 1979a, b). A small proportion of cholinergic neurons has been reported in the LC, as well as several neuropeptides such as galanine, neurotensin or neuropeptide Y (Sutin and Jacobowitz 1991).

Concluding remarks

Our analysis of afferents to areas 24a and 24b in mice show that these areas receive qualitatively similar inputs from the same regions. However, some differences can be suggested in terms of density (Fig. 8). In general, area 24b appears to receive denser inputs than area 24a, especially from cortical and thalamic regions, with the exception of AD and AV which only target 24a. A similar observation can be made for areas 24a′/24b′ with a stronger cortical input to dorsal MCC than to ventral MCC. Regarding the rostrocaudal extent, afferents to areas 24a and 24b appear relatively homogeneous, even if the inputs to R24b seem slightly larger than those to C24b. Finally, when comparing afferents to 24a/24b to those to 24a′/24b′ (Fig. 8), it appears that, while the sources of inputs are globally the same, ACC areas receive denser inputs than MCC areas. This is especially true for prefrontal cortical afferents and for BLA afferents. In the thalamus, the intralaminar and midline afferents to 24a′/24b′ are also much more restricted than those to 24a/24b. Thus, the source of afferents to areas 24a, 24b, 24a′ and 24b′ do not dramatically differ, but it does not preclude different modes of integration in specific circuits. It is, thus, necessary to analyze the outputs of these areas in mice.

Using the areal nomenclature, our work enables the precise analysis of these cortical regions, whereas data from the literature do not usually distinguish between dorsal and ventral part, or between ACC and MCC. Despite these drawbacks, the comparison of our results with rat studies shows a striking similarity in the afferents to areas 24a/24b between the two species, suggesting a common general connectivity plan. However, the comparison with the connection of the primate ACC is more problematic. When taking into account only areas 24a and 24b, the main cortical, thalamic and amygdaloid afferents we describe in mice are globally comparable to those of primates (Bachevalier et al. 1997; Barbas and Pandya 1989; Berger et al. 1988; Carmichael and Price 1995; Jurgens 1983; Lewis 1992; Morecraft et al. 2012; Ongur and Price 2000; Vogt et al. 1987). Still, important variations due to anatomical differences can be observed. For example, while AM provides a dense input to rodent areas 24a/24b, this input is minor to the analogous areas in primates, but appears important to area 23 of the primate's posterior cingulate cortex, which does not exist in rodents (Carmichael and Price 1995; Vogt et al. 1987). Similarly, the absence of sulcal areas in the rodent brain implies that at least some afferents to the primate sulcal area 24c could directly reach areas 24a/24b in rodents (Vogt and Pandya 1987; Vogt et al. 1987).

The wide array of inputs integrated in areas 24a/24b establishes them as a hub for multisensory, emotional and motivational integration, underlying their suggested roles in attentional mechanisms and goal-directed behaviors (Bissonette et al. 2008; Courtin et al. 2013; Dalley et al. 2004; Fuchs et al. 2014; Heidbreder and Groenewegen 2003; Weible 2013). However, the identification of specific ACC subcircuits involved in pathological situations remains challenging, especially in chronic pain and mood disorders. The important comorbidity between chronic pain and depressive states observed in human (Bair et al. 2003; Gustorff et al. 2008) and also in rodents preclinical studies (Alba-Delgado et al. 2013; Yalcin and Barrot 2014; Yalcin et al. 2011; Zeng et al. 2008), suggests a possible shared circuitry between these two pathologies. Recently, our group highlighted the areas 24a/24b as key structures in neuropathic pain induced-depression in mice (Barthas et al. 2015), as selective lesions of these areas prevent the anxiodepressive consequences of sciatic nerve cuffing, while optogenetic stimulation is sufficient to induce an anxiodepressive phenotype in naïve mice. Thus, understanding the connectome of areas 24a/24b is a necessary step to address their roles in normal and pathological conditions. Such fundamental progress would have a high impact in the field and be seminal, opening future functional studies.

Acknowledgments This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (contract UPR3212), the University of Strasbourg, and by a NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation. The authors thank Dr. R. A. Ceredig for reading the paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Abiri D, Douglas CE, Calakos KC, Barbayannis G, Roberts A, Bauer EP (2014) Fear extinction learning can be impaired or enhanced by modulation of the CRF system in the basolateral nucleus of the amygdala. Behav Brain Res 271:234–239

Aggleton JP, Nelson AJ (2015) Why do lesions in the rodent anterior thalamic nuclei cause such severe spatial deficits? Neurosci Biobehav Rev 54:131–144

Alba-Delgado C, Llorca-Torralba M, Horrillo I, Ortega JE, Mico JA, Sanchez-Blazquez P, Meana JJ, Berrocoso E (2013) Chronic pain leads to concomitant noradrenergic impairment and mood disorders. Biol Psychiatry 73:54–62

Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. Eur J Pain 9:463–484

Bachevalier J, Meunier M, Lu MX, Ungerleider LG (1997) Thalamic and temporal cortex input to medial prefrontal cortex in rhesus monkeys. Exp Brain Res 115:430–444

Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K (2003) Depression and pain comorbidity: a literature review. Arch Intern Med 163:2433–2445

Baldauf KJ, Royal JM, Hamorsky KT, Matoba N (2015) Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications. Toxins (Basel) 7:974–996

Barbas H, Pandya DN (1989) Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. J Comp Neurol 286:353–375

Barthas F, Sellmeijer J, Hugel S, Waltisperger E, Barrot M, Yalcin I (2015) The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression. Biol Psychiatry 77:236–245

Benarroch EE (2015) Pulvinar: associative role in cortical function and clinical correlations. Neurology 84:738–747

Berger B, Trottier S, Verney C, Gaspar P, Alvarez C (1988) Regional and laminar distribution of the dopamine and serotonin innervation in the macaque cerebral cortex: a radioautographic study. J Comp Neurol 273:99–119

Bissonette GB, Martins GJ, Franz TM, Harper ES, Schoenbaum G, Powell EM (2008) Double dissociation of the effects of medial and orbital prefrontal cortical lesions on attentional and affective shifts in mice. J Neurosci 28:11124–11130

Bissonette GB, Powell EM, Roesch MR (2013) Neural structures underlying set-shifting: roles of medial prefrontal cortex and anterior cingulate cortex. Behav Brain Res 250:91–101

Brecht M, Krauss A, Muhammad S, Sinai-Esfahani L, Bellanca S, Margrie TW (2004) Organization of rat vibrissa motor cortex and adjacent areas according to cytoarchitectonics, microstimulation, and intracellular stimulation of identified cells. J Comp Neurol 479:360–373

Burk JA, Sarter M (2001) Dissociation between the attentional functions mediated via basal forebrain cholinergic and GABAergic neurons. Neuroscience 105:899–909

Bush G, Luu P, Posner MI (2000) Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. Trends Cogn Sci 4:215–222

Bush G, Vogt BA, Holmes J, Dale AM, Greve D, Jenike MA, Rosen BR (2002) Dorsal anterior cingulate cortex: a role in reward-based decision making. Proc Natl Acad Sci USA 99:523–528

Bussey TJ, Muir JL, Everitt BJ, Robbins TW (1997) Triple dissociation of anterior cingulate, posterior cingulate, and medial frontal cortices on visual discrimination tasks using a touchscreen testing procedure for the rat. Behav Neurosci 111:920–936

Carlson JM, Beacher F, Reinke KS, Habib R, Harmon-Jones E, Mujica-Parodi LR, Hajcak G (2012) Nonconscious attention bias to threat is correlated with anterior cingulate cortex gray matter volume: a voxel-based morphometry result and replication. Neuroimage 59:1713–1718

Carmichael ST, Price JL (1995) Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. J Comp Neurol 363:615–641

Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A, Loureiro M, Cholvin T, Dalrymple-Alford JC, Vertes RP (2013) The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. Prog Neurobiol 111:34–52

Chaillan FA, Marchetti E, Delfosse F, Roman FS, Soumireu-Mourat B (1997) Opposite effects depending on learning and memory demands in dorsomedial prefrontal cortex lesioned rats performing an olfactory task. Behav Brain Res 82:203–212

Chandler HC, King V, Corwin JV, Reep RL (1992) Thalamocortical connections of rat posterior parietal cortex. Neurosci Lett 143:237–242

Chandler DJ, Lamperski CS, Waterhouse BD (2013) Identification and distribution of projections from monoaminergic and cholinergic nuclei to functionally differentiated subregions of prefrontal cortex. Brain Res 1522:38–58

Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2013) The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. J Neurosci 33:8772–8783

Cipolloni PB, Pandya DN (1999) Cortical connections of the frontoparietal opercular areas in the rhesus monkey. J Comp Neurol 403:431–458

Clements JR, Madl JE, Johnson RL, Larson AA, Beitz AJ (1987) Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. Exp Brain Res 67:594–602

Coghill RC, McHaffie JG, Yen YF (2003) Neural correlates of interindividual differences in the subjective experience of pain. Proc Natl Acad Sci USA 100:8538–8542

Conde F, Audinat E, Maire-Lepoivre E, Crepel F (1990) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes I. Thalamic afferents. Brain Res Bull 24:341–354

Courtin J, Bienvenu TC, Einarsson EO, Herry C (2013) Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. Neuroscience 240:219–242

Crick FC, Koch C (2005) What is the function of the claustrum? Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 360:1271–1279

Czajkowski R, Jayaprakash B, Wiltgen B, Rogerson T, Guzman-Karlsson MC, Barth AL, Trachtenberg JT, Silva AJ (2014) Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. Proc Natl Acad Sci USA 111:8661–8666

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. Neurosci Biobehav Rev 28:771–784

Delatour B, Gisquet-Verrier P (2001) Involvement of the dorsal anterior cingulate cortex in temporal behavioral sequencing: subregional analysis of the medial prefrontal cortex in rat. Behav Brain Res 126:105–114

Delatour B, Witter MP (2002) Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat: evidence of multiple pathways. Eur J Neurosci 15:1400–1407

Delevich K, Tucciarone J, Huang ZJ, Li B (2015) The mediodorsal thalamus drives feedforward inhibition in the anterior cingulate cortex via parvalbumin interneurons. J Neurosci 35:5743–5753

Deniau JM, Menetrey A, Thierry AM (1994) Indirect nucleus accumbens input to the prefrontal cortex via the substantia nigra pars reticulata: a combined anatomical and electrophysiological study in the rat. Neuroscience 61:533–545

Dilgen J, Tejeda HA, O'Donnell P (2013) Amygdala inputs drive feedforward inhibition in the medial prefrontal cortex. J Neurophysiol 110:221–229

Dong WK, Ryu H, Wagman IH (1978) Nociceptive responses of neurons in medial thalamus and their relationship to spinothalamic pathways. J Neurophysiol 41:1592–1613

Dumont JR, Aggleton JP (2013) Dissociation of recognition and recency memory judgments after anterior thalamic nuclei lesions in rats. Behav Neurosci 127:415–431

Einarsson EO, Nader K (2012) Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. Learn Mem 19:449–452

Einarsson EO, Pors J, Nader K (2015) Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. Neuropsychopharmacology 40:480–487

Erlich JC, Bush DE, Ledoux JE (2012) The role of the lateral amygdala in the retrieval and maintenance of fear-memories formed by repeated probabilistic reinforcement. Front Behav Neurosci 6:16

Everitt BJ, Robbins TW, Evenden JL, Marston HM, Jones GH, Sirkia TE (1987) The effects of excitotoxic lesions of the substantia innominata, ventral and dorsal globus pallidus on the acquisition and retention of a conditional visual discrimination: implications for cholinergic hypotheses of learning and memory. Neuroscience 22:441–469

Fernandez-Pastor B, Meana JJ (2002) In vivo tonic modulation of the noradrenaline release in the rat cortex by locus coeruleus somatodendritic alpha(2)-adrenoceptors. Eur J Pharmacol 442:225–229

Fortin GD, Desrosiers CC, Yamaguchi N, Trudeau LE (2006) Basal somatodendritic dopamine release requires snare proteins. J Neurochem 96:1740–1749

Fosse VM, Fonnum F (1987) Biochemical evidence for glutamate and/or aspartate as neurotransmitters in fibers from the visual cortex to the lateral posterior thalamic nucleus (pulvinar) in rats. Brain Res 400:219–224

Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. Science 304:881–883

Frankle WG, Laruelle M, Haber SN (2006) Prefrontal cortical projections to the midbrain in primates: evidence for a sparse connection. Neuropsychopharmacology 31:1627–1636

Fuchs PN, Peng YB, Boyette-Davis JA, Uhelski ML (2014) The anterior cingulate cortex and pain processing. Front Integr Neurosci 8:35

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. J Comp Neurol 492:145–177

Gabbott PL, Warner TA, Busby SJ (2006) Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. Neuroscience 139:1039–1048

Gabbott P, Warner TA, Brown J, Salway P, Gabbott T, Busby S (2012) Amygdala afferents monosynaptically innervate corticospinal neurons in rat medial prefrontal cortex. J Comp Neurol 520:2440–2458

Goll Y, Atlan G, Citri A (2015) Attention: the claustrum. Trends Neurosci 38:486–495

Gorelova N, Mulholland PJ, Chandler LJ, Seamans JK (2012) The glutamatergic component of the mesocortical pathway emanating from different subregions of the ventral midbrain. Cereb Cortex 22:327–336

Gracia-Llanes FJ, Crespo C, Blasco-Ibanez JM, Nacher J, Varea E, Rovira-Esteban L, Martinez-Guijarro FJ (2010) GABAergic basal forebrain afferents innervate selectively GABAergic targets in the main olfactory bulb. Neuroscience 170:913–922

Gustorff B, Dorner T, Likar R, Grisold W, Lawrence K, Schwarz F, Rieder A (2008) Prevalence of self-reported neuropathic pain and impact on quality of life: a prospective representative survey. Acta Anaesthesiol Scand 52:132–136

Hallock HL, Wang A, Shaw CL, Griffin AL (2013) Transient inactivation of the thalamic nucleus reuniens and rhomboid nucleus produces deficits of a working-memory dependent tactile-visual conditional discrimination task. Behav Neurosci 127:860–866

Hasanein P, Parviz M, Keshavarz M, Javanmardi K (2007) CB1 receptor activation in the basolateral amygdala produces antinociception in animal models of acute and tonic nociception. Clin Exp Pharmacol Physiol 34:439–449

Haxby JV, Petit L, Ungerleider LG, Courtney SM (2000) Distinguishing the functional roles of multiple regions in distributed neural systems for visual working memory. Neuroimage 11:380–391

Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev 27:555–579

Hnasko TS, Hjelmstad GO, Fields HL, Edwards RH (2012) Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. J Neurosci 32:15076–15085

Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. Brain Struct Funct 212:149–179

Hoover WB, Vertes RP (2011) Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. J Comp Neurol 519:3766–3801

Horikawa K, Kinjo N, Stanley LC, Powell EW (1988) Topographic organization and collateralization of the projections of the anterior and laterodorsal thalamic nuclei to cingulate areas 24 and 29 in the rat. Neurosci Res 6:31–44

Ito H, Nagano M, Suzuki H, Murakoshi T (2010) Chronic stress enhances synaptic plasticity due to disinhibition in the anterior cingulate cortex and induces hyper-locomotion in mice. Neuropharmacology 58:746–757

Jankowski MM, Ronnqvist KC, Tsanov M, Vann SD, Wright NF, Erichsen JT, Aggleton JP, O'Mara SM (2013) The anterior thalamus provides a subcortical circuit supporting memory and spatial navigation. Front Syst Neurosci 7:45

Ji G, Sun H, Fu Y, Li Z, Pais-Vieira M, Galhardo V, Neugebauer V (2010) Cognitive impairment in pain through amygdala-driven prefrontal cortical deactivation. J Neurosci 30:5451–5464

Johansen JP, Fields HL, Manning BH (2001) The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. Proc Natl Acad Sci USA 98:8077–8082

Johnson DA, Pilar G (1980) The release of acetylcholine from postganglionic cell bodies in response to depolarization. J Physiol 299:605–619

Jones BF, Groenewegen HJ, Witter MP (2005) Intrinsic connections of the cingulate cortex in the rat suggest the existence of multiple functionally segregated networks. Neuroscience 133:193–207

Jurgens U (1983) Afferent fibers to the cingular vocalization region in the squirrel monkey. Exp Neurol 80:395–409

Kesner RP, Churchwell JC (2011) An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. Neurobiol Learn Mem 96:417–431

Kobbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. Prog Neurobiol 62:327–351

Koga K, Descalzi G, Chen T, Ko HG, Lu J, Li S, Son J, Kim T, Kwak C, Huganir RL, Zhao MG, Kaang BK, Collingridge GL, Zhuo M (2015) Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. Neuron 85:377–389

Koike H, Demars MP, Short JA, Nabel EM, Akbarian S, Baxter MG, Morishita H (2016) Chemogenetic inactivation of dorsal anterior

cingulate cortex neurons disrupts attentional behavior in mouse. Neuropsychopharmacology 41:1014–1023
Krettek JE, Price JL (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J Comp Neurol 171:157–191
Lewis DA (1992) The catecholaminergic innervation of primate prefrontal cortex. J Neural Transm Suppl 36:179–200
Li ZK, Takada M, Hattori T (1986) Topographic organization and collateralization of claustrocortical projections in the rat. Brain Res Bull 17:529–532
Lindner K, Neubert J, Pfannmoller J, Lotze M, Hamm AO, Wendt J (2015) Fear-potentiated startle processing in humans: parallel fMRI and orbicularis EMG assessment during cue conditioning and extinction. Int J Psychophysiol 98:535–545
Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel JC, de Vasconcelos AP (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. Hippocampus 22:827–841
Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A (2012) The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. J Neurosci 32:9947–9959
Marchand A, Faugere A, Coutureau E, Wolff M (2014) A role for anterior thalamic nuclei in contextual fear memory. Brain Struct Funct 219:1575–1586
Mathur BN, Caprioli RM, Deutch AY (2009) Proteomic analysis illuminates a novel structural definition of the claustrum and insula. Cereb Cortex 19:2372–2379
Matyas F, Lee J, Shin HS, Acsady L (2014) The fear circuit of the mouse forebrain: connections between the mediodorsal thalamus, frontal cortices and basolateral amygdala. Eur J Neurosci 39:1810–1823
McDonald AJ (1987) Organization of amygdaloid projections to the mediodorsal thalamus and prefrontal cortex: a fluorescence retrograde transport study in the rat. J Comp Neurol 262:46–58
McGaughy J, Kaiser T, Sarter M (1996) Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density. Behav Neurosci 110:247–265
McKenna JT, Yang C, Franciosi S, Winston S, Abarr KK, Rigby MS, Yanagawa Y, McCarley RW, Brown RE (2013) Distribution and intrinsic membrane properties of basal forebrain GABAergic and parvalbumin neurons in the mouse. J Comp Neurol 521:1225–1250
Metz AE, Yau HJ, Centeno MV, Apkarian AV, Martina M (2009) Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. Proc Natl Acad Sci USA 106:2423–2428
Miller AM, Vedder LC, Law LM, Smith DM (2014) Cues, context, and long-term memory: the role of the retrosplenial cortex in spatial cognition. Front Hum Neurosci 8:586
Mitchell AS (2015) The mediodorsal thalamus as a higher order thalamic relay nucleus important for learning and decision-making. Neurosci Biobehav Rev 54:76–88
Monconduit L, Villanueva L (2005) The lateral ventromedial thalamic nucleus spreads nociceptive signals from the whole body surface to layer I of the frontal cortex. Eur J Neurosci 21:3395–3402
Monconduit L, Bourgeais L, Bernard JF, Villanueva L (2003) Convergence of cutaneous, muscular and visceral noxious inputs onto ventromedial thalamic neurons in the rat. Pain 103:83–91
Morecraft RJ, Stilwell-Morecraft KS, Cipolloni PB, Ge J, McNeal DW, Pandya DN (2012) Cytoarchitecture and cortical connections of the anterior cingulate and adjacent somatomotor fields in the rhesus monkey. Brain Res Bull 87:457–497
Nakamura H, Hioki H, Furuta T, Kaneko T (2015) Different cortical projections from three subdivisions of the rat lateral posterior thalamic nucleus: a single-neuron tracing study with viral vectors. Eur J Neurosci 41:1294–1310
Nanopoulos D, Belin MF, Maitre M, Vincendon G, Pujol JF (1982) Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurons in the nucleus raphe dorsalis. Possible existence of neurons containing serotonin and GABA. Brain Res 232:375–389
Newman LA, Creer DJ, McGaughy JA (2015) Cognitive control and the anterior cingulate cortex: how conflicting stimuli affect attentional control in the rat. J Physiol Paris 109:95–103
Ochi J, Shimizu K (1978) Occurrence of dopamine-containing neurons in the midbrain raphe nuclei of the rat. Neurosci Lett 8:317–320
Oertel WH, Tappaz ML, Berod A, Mugnaini E (1982) Two-color immunohistochemistry for dopamine and GABA neurons in rat substantia nigra and zona incerta. Brain Res Bull 9:463–474
Oh SW, Harris JA, Ng L, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, Kuan L, Henry AM, Mortrud MT, Ouellette B, Nguyen TN, Sorensen SA, Slaughterbeck CR, Wakeman W, Li Y, Feng D, Ho A, Nicholas E, Hirokawa KE, Bohn P, Joines KM, Peng H, Hawrylycz MJ, Phillips JW, Hohmann JG, Wohnoutka P, Gerfen CR, Koch C, Bernard A, Dang C, Jones AR, Zeng H (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. Nature 508:207–214
Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. Cereb Cortex 10:206–219
Orsini CA, Trotta RT, Bizon JL, Setlow B (2015) Dissociable roles for the basolateral amygdala and orbitofrontal cortex in decision-making under risk of punishment. J Neurosci 35:1368–1379
Pan WX, McNaughton N (2004) The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. Prog Neurobiol 74:127–166
Passetti F, Chudasama Y, Robbins TW (2002) The frontal cortex of the rat and visual attentional performance: dissociable functions of distinct medial prefrontal subregions. Cereb Cortex 12:1254–1268
Pastoriza LN, Morrow TJ, Casey KL (1996) Medial frontal cortex lesions selectively attenuate the hot plate response: possible nocifensive apraxia in the rat. Pain 64:11–17
Paxinos G, Franklin KBJ (2012) Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates, 4th edn. Academic Press, Waltham
Paxinos G, Watson C (2014) Paxinos and Watson's the rat brain in stereotaxic coordinates, 7th edn. Academic Press, Waltham
Peschanski M, Guilbaud G, Gautron M (1981) Posterior intralaminar region in rat: neuronal responses to noxious and nonnoxious cutaneous stimuli. Exp Neurol 72:226–238
Qu C, King T, Okun A, Lai J, Fields HL, Porreca F (2011) Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. Pain 152:1641–1648
Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2004) Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. Neuroscience 125:1–6
Rana SA, Parker LA (2008) Differential effects of neurotoxin-induced lesions of the basolateral amygdala and central nucleus of the amygdala on lithium-induced conditioned disgust reactions and conditioned taste avoidance. Behav Brain Res 189:284–297
Reep RL, Chandler HC, King V, Corwin JV (1994) Rat posterior parietal cortex: topography of corticocortical and thalamic connections. Exp Brain Res 100:67–84

Reppucci CJ, Petrovich GD (2016) Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: a single and double retrograde tracing study in rats. Brain Struct Funct 221:2937–2962

Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M (2009) The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. J Neurosci 29:8206–8214

Roland JJ, Savage LM (2009) The role of cholinergic and GABAergic medial septal/diagonal band cell populations in the emergence of diencephalic amnesia. Neuroscience 160:32–41

Root DH, Mejias-Aponte CA, Qi J, Morales M (2014) Role of glutamatergic projections from ventral tegmental area to lateral habenula in aversive conditioning. J Neurosci 34:13906–13910

Sanchez-Catalan MJ, Kaufling J, Georges F, Veinante P, Barrot M (2014) The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. Neuroscience 282C:198–216

Sarter M, Givens B, Bruno JP (2001) The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up. Brain Res Rev 35:146–160

Schoenbaum G, Esber GR (2010) How do you (estimate you will) like them apples? Integration as a defining trait of orbitofrontal function. Curr Opin Neurobiol 20:205–211

Shackman AJ, Salomons TV, Slagter HA, Fox AS, Winter JJ, Davidson RJ (2011) The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. Nat Rev Neurosci 12:154–167

Shenhav A, Botvinick MM, Cohen JD (2013) The expected value of control: an integrative theory of anterior cingulate cortex function. Neuron 79:217–240

Shenhav A, Straccia MA, Cohen JD, Botvinick MM (2014) Anterior cingulate engagement in a foraging context reflects choice difficulty, not foraging value. Nat Neurosci 17:1249–1254

Shibata H (1993) Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to the cingulate cortex in the rat. J Comp Neurol 330:533–542

Shyu BC, Vogt BA (2009) Short-term synaptic plasticity in the nociceptive thalamic-anterior cingulate pathway. Mol Pain 5:51

Smith JB, Alloway KD (2014) Interhemispheric claustral circuits coordinate sensory and motor cortical areas that regulate exploratory behaviors. Front Syst Neurosci 8:93

Sutin EL, Jacobowitz DM (1991) Neurochemicals in the dorsal pontine tegmentum. Prog Brain Res 88:3–14

Takada M, Hattori T (1986) Collateral projections from the substantia nigra to the cingulate cortex and striatum in the rat. Brain Res 380:331–335

Tang J, Ko S, Ding HK, Qiu CS, Calejesan AA, Zhuo M (2005) Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. Mol Pain 1:6

Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, Frankland PW (2006) Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. J Neurosci 26:7555–7564

Torrealba F, Valdes JL (2008) The parietal association cortex of the rat. Biol Res 41:369–377

Totah NK, Jackson ME, Moghaddam B (2013) Preparatory attention relies on dynamic interactions between prelimbic cortex and anterior cingulate cortex. Cereb Cortex 23:729–738

Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, Sibille E (2012) Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. Am J Psychiatry 169:1194–1202

Trueta C, De-Miguel FF (2012) Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. Front Physiol 3:319

Trueta C, Mendez B, De-Miguel FF (2003) Somatic exocytosis of serotonin mediated by L-type calcium channels in cultured leech neurones. J Physiol 547:405–416

Trulson ME, Cannon MS, Raese JD (1985) Identification of dopamine-containing cell bodies in the dorsal and median raphe nuclei of the rat brain using tyrosine hydroxylase immunochemistry. Brain Res Bull 15:229–234

Uhl GR, Goodman RR, Kuhar MJ, Childers SR, Snyder SH (1979a) Immunohistochemical mapping of enkephalin containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat. Brain Res 166:75–94

Uhl GR, Goodman RR, Snyder SH (1979b) Neurotensin-containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat: immunohistochemical mapping. Brain Res 167:77–91

Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. Brain Res Rev 39:107–140

Van Eden CG, Uylings HB (1985) Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. J Comp Neurol 241:253–267

Veinante P, Yalcin I, Barrot M (2013) The amygdala between sensation and affect: a role in pain. J Mol Psychiatry 1:9

Vertes RP, Hoover WB (2008) Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. J Comp Neurol 508:212–237

Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ (2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. J Comp Neurol 499:768–796

Vogt BA (1993) Structural organization of cingulate cortex: areas, neurons, and somatodendritic transmitter receptors. In: Vogt BA, Gabriel M (eds) Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus. Birkhaüser Boston Inc, Boston, pp 19–70

Vogt BA (2005) Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. Nat Rev Neurosci 6:533–544

Vogt BA (2015) Cingulate cortex and pain architecture. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system, 4th edn. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 575–599

Vogt BA, Miller MW (1983) Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. J Comp Neurol 216:192–210

Vogt BA, Pandya DN (1987) Cingulate cortex of the rhesus monkey: II. Cortical afferents. J Comp Neurol 262:271–289

Vogt BA, Paxinos G (2014) Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. Brain Struct Funct 219:185–192

Vogt BA, Sikes RW (2009) Cingulate nociceptive circuitry and roles in pain processing: the cingulate premotor pain model. In: Vogt BA (ed) Cingulate neurobiology and disease. Oxford University Press, New York, pp 312–339

Vogt BA, Pandya DN, Rosene DL (1987) Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. J Comp Neurol 262:256–270

Vogt BA, Derbyshire S, Jones AK (1996) Pain processing in four regions of human cingulate cortex localized with co-registered PET and MR imaging. Eur J Neurosci 8:1461–1473

Weible AP (2013) Remembering to attend: the anterior cingulate cortex and remote memory. Behav Brain Res 245:63–75

Whalen PJ, Bush G, McNally RJ, Wilhelm S, McInerney SC, Jenike MA, Rauch SL (1998) The emotional counting Stroop paradigm: a functional magnetic resonance imaging probe of the anterior cingulate affective division. Biol Psychiatry 44:1219–1228

White MG, Cody PA, Bubser M, Wang HD, Deutch AY, Mathur BN (2016) Cortical hierarchy governs rat claustrocortical circuit organization. J Comp Neurol. doi:10.1002/cne.23970

Wolff M, Faugere A, Desfosses E, Coutureau E, Marchand AR (2015) Mediodorsal but not anterior thalamic nuclei lesions impair acquisition of a conditional discrimination task. Neurobiol Learn Mem 125:80–84

Wright NF, Vann SD, Aggleton JP, Nelson AJ (2015) A critical role for the anterior thalamus in directing attention to task-relevant stimuli. J Neurosci 35:5480–5488

Xu W, Sudhof TC (2013) A neural circuit for memory specificity and generalization. Science 339:1290–1295

Yalcin I, Barrot M (2014) The anxiodepressive comorbidity in chronic pain. Curr Opin Anaesthesiol 27:520–527

Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin JC, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2011) A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. Biol Psychiatry 70:946–953

Yamaguchi T, Wang HL, Li X, Ng TH, Morales M (2011) Mesocorticolimbic glutamatergic pathway. J Neurosci 31:8476–8490

Yang JW, Shih HC, Shyu BC (2006) Intracortical circuits in rat anterior cingulate cortex are activated by nociceptive inputs mediated by medial thalamus. J Neurophysiol 96:3409–3422

Yetnikoff L, Lavezzi HN, Reichard RA, Zahm DS (2014) An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. Neuroscience 282:23–48

Yu T, Guo M, Garza J, Rendon S, Sun XL, Zhang W, Lu XY (2011) Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. Int J Neuropsychopharmacol 14:303–317

Yung WH, Hausser MA, Jack JJ (1991) Electrophysiology of dopaminergic and non-dopaminergic neurones of the guinea-pig substantia nigra pars compacta in vitro. J Physiol 436:643–667

Zeng Q, Wang S, Lim G, Yang L, Mao J, Sung B, Chang Y, Lim JA, Guo G (2008) Exacerbated mechanical allodynia in rats with depression-like behavior. Brain Res 1200:27–38

Zhang S, Xu M, Kamigaki T, Hoang Do JP, Chang WC, Jenvay S, Miyamichi K, Luo L, Dan Y (2014) Selective attention. Long-range and local circuits for top-down modulation of visual cortex processing. Science 345:660–665

Zhuo M (2014) Long-term potentiation in the anterior cingulate cortex and chronic pain. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 369:20130146

Zingg B, Hintiryan H, Gou L, Song MY, Bay M, Bienkowski MS, Foster NN, Yamashita S, Bowman I, Toga AW, Dong HW (2014) Neural networks of the mouse neocortex. Cell 156:1096–1111

Brain Structure and Function

Online Resource 1

Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a′ and 24b′ in the mouse

Clémentine Fillinger [1,2], Ipek Yalcin[1], Michel Barrot[1], Pierre Veinante*[1,2]

[1]Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France.

[2]Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

*__Corresponding author__:

Pierre Veinante

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR3212, 5 rue Blaise Pascal, 67084, Strasbourg, France

Tel: +33 388 456 609

E-mail: veinantep@inci-cnrs.unistra.fr

Anterograde tracing

We injected the anterograde tracer biotinylated dextran amine (BDA) in putative afferent structures where a mismatch occurred between FG and CTb labeling: the horizontal limb of the Broca's diagonal band (HDB), the substantia nigra, *pars compacta* (SNc), the median raphe (MnR) and the locus coeruleus (LC).

experimental procedures

Thirty mice were injected by iontophoresis with BDA (MW 10 000; 2% in 0.5 M KCl, Molecular Probes®) as done with retrograde tracers (see Materials and methods). Coordinates of targeted structures are listed in Supplementary Table 1.

Seven to ten days after the tracer injection, the mice were anesthetized, perfused with paraformaldehyde, and their brain removed as done with retrograde tracing (see Materials and methods).

For BDA histochemical revelation, vibratome frontal sections (40 µm) were washed in 0.1M phosphate buffer saline (PBS; 3x10 min), incubated for 20 min in a 1% H_2O_2 / 50% ethanol solution for peroxidase extinction, washed in PBS (3x10 min), and incubated with a blocking solution of PBS with 0.3% Triton X100 (PBS-T) and 5% donkey serum for 45 min. After removing the blocking solution, sections were incubated with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; ABC Elite, 0.2% A and 0.2% B; Vector Laboratories) in PBS during 90 min. Sections were rinsed with 0.05 M Tris-HCl buffer (TB; pH 7.5; 3x10 min) and the bound peroxidase was revealed by incubation in 0.025% 3.3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma), 0.0006% H_2O_2 (Sigma), 0.1% nickel ammonium sulfate (Sigma) and 0.025% cobalt chloride (Sigma) in TB for approximately 5 min. The reaction was stopped by 2x10 min of TB and 2x10 min of PBS washing. Sections were then serially mounted on gelatin-coated slides, air-dried, dehydrated in graded alcohols baths (1x 70%, 1x 95% and 2x 100%), cleared in Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and coverslipped with Eukitt.

The qualitative analysis of anterogradely labeled fibers in the areas 24a and 24b after a BDA injection in the HDB, SNc, MnR, DR and LC was performed on a Nikon Eclipse E600 microscope on two or three animals for each injection site.

Results

BDA injections in HDB, SNc, MnR and LC all resulted in labeled axons in areas 24a/24b (Supplementary Figure 1), thus confirming the retrograde labeling obtained with FG.

HDB (Supplementary Figure 1a-c). The injection site was located at the center of the HDB (AP=+0.14 mm). The same organization of BDA-labeled fibers was found all along the anteroposterior axis of 24a/24b, with a dense cluster of thin varicose axons running tangentially in layer I at the 24a-24b transition. In deeper layers V-VI, the axonal staining appeared more dispersed, with collaterals sometimes reaching more superior layers.

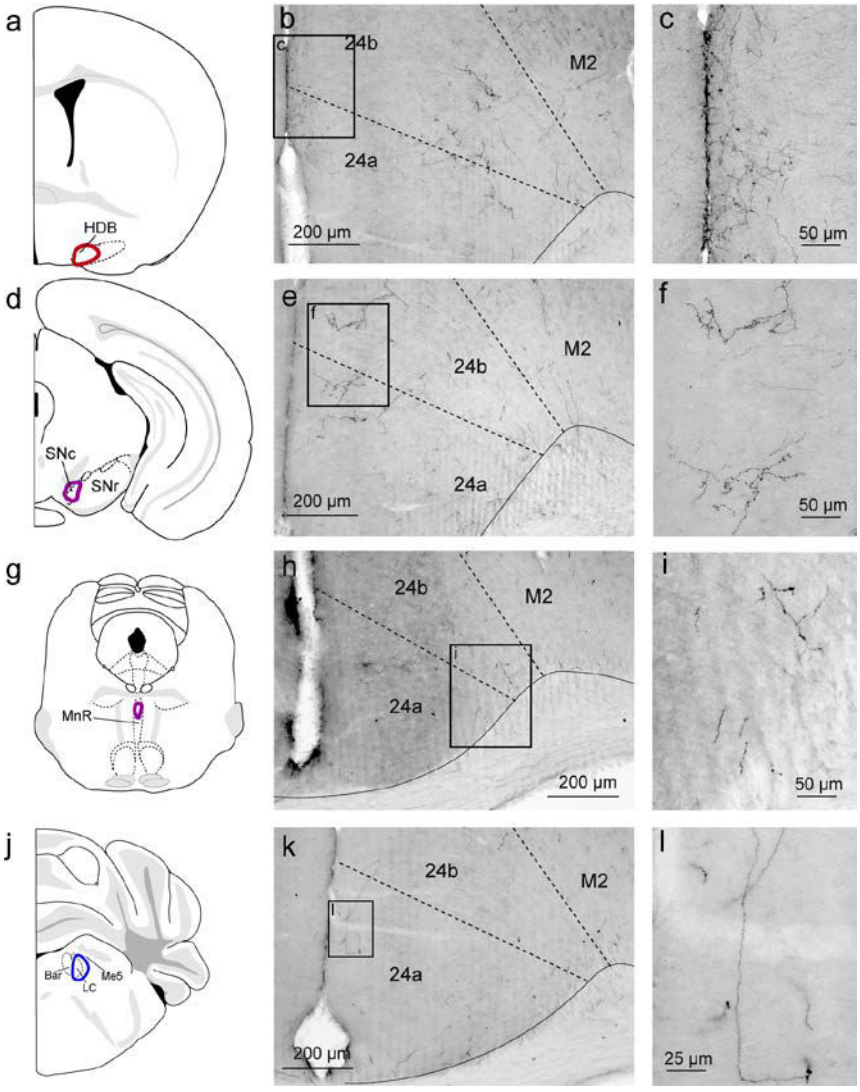
SNc (Supplementary Figure 1d-f). The injection site was located in the ventromedial region of the SNc (AP=-3.28 mm). The organization of BDA-labeled fibers was the same in the rostral and caudal 24a/24b but the density of labeled fibers increased in caudal regions. In superior layers I, II and III, long fibers with collaterals and varicosities appeared parallel to the section plane, especially in 24b. The staining found in deeper layers V-VI was more sporadic with BDA-labeled fibers bearing a few varicosities and running perpendicular to the frontal plane. No staining difference was observed between 24a and 24b.

MnR (Supplementary Figure 1g-i). BDA injections into MnR led to a light labeling in 24a/24b. The obtained fiber staining was bilateral and preferentially located in deep layers V-VI of 24a, but a few dispersed varicose fibers were also observed in layer I in both 24b and 24a.

LC (Supplementary Figure 1j-l). The injection site was centered in the LC (AP=-5.52 mm) with some spread in the Barrington's nucleus and in the mesencephalic trigeminal nucleus. The same axonal labeling was observed in 24a/24b: BDA-stained fibers were in all layers, tangentially to the surface and perpendicular to the frontal plane. All the collaterals were covered with varicosities.

Supplementary Table 1 : stereotaxic coordinates of BDA injections

Structures	Coordinates		
	AP(mm)	L(mm)	V(mm)
Substantia nigra, *pars compacta*	-2.4	-0.7	-4.6
Diagonal band of Broca, horizontal limb	+0.7	-0.8	-4.9
Median raphe	-3.85	+1.2	-4.2
Dorsal raphe	-4.1	+1.2	-2.9
Locus coeruleus	-5.10	-0.85	-2.8



Supplementary Figure 1: Anterograde labeling

Anterograde labeling of afferent to ACC from the horizontal limb of the Broca's diagonal band (HDB; **a-c**), the substantia nigra, *pars compacta* (SNc; **d-f**), the median raphe (MnR; **g-i**) and the locus coeruleus (LC; **j-l**).

Injection sites are schematically illustrated (**a,d,g,j**) and the resulting labeling is figured in micrographs of areas 24a and 24b (**b,e,h,k**) with higher magnifications of labeled axons (**c,f,i,l**)

Bar: Barrington's nucleus; M2: Secondary motor cortex; Me5: mesencephalic trigeminal nucleus; SNr: substantia nigra, *pars reticulata*;

Article 2

Efferents from anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a` and 24b` in the mouse

Clémentine Fillinger, Ipek Yalcin, Michel Barrot, Pierre Veinante

En préparation pour soumission à Brain Struct Funct

Efferents of anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse

Clémentine Fillinger [1,2], Ipek Yalcin[1], Michel Barrot[1], Pierre Veinante*[1,2]

[1]Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France.

[2]Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

***Corresponding author**:

Pierre Veinante

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR3212, 5 rue Blaise Pascal, 67084, Strasbourg, France

Tel: +33 388 456 609

E-mail: veinantep@inci-cnrs.unistra.fr

Abstract:

The anterior cingulate cortex (ACC) is constituted by areas 25, 32, 24a and 24b in rodents and plays a major role in cognition, emotion and pain. In a previous study, we described the afferents of areas 24a and 24b and those of areas 24a` and 24b` of midcingulate cortex (MCC) in mice and highlighted some density differences among cingulate inputs (Fillinger et al., 2017). To complete this connectome, we analyzed here the efferents of ACC and MCC by injecting anterograde tracers in areas 24a/24b of ACC and 24a`/24b` of MCC. Our results reveal a common projections pattern to both ACC and MCC, targeting the cortical mantle (intracingulate, retrosplenial and parietal associative cortex), the non cortical basal forebrain, (dorsal striatum, septum, claustrum, basolateral amygdala), the hypothalamus (anterior, lateral, posterior), the thalamus (anterior, laterodorsal, ventral, mediodorsal, midline and intralaminar nuclei), the brainstem (periaqueductal gray, superior colliculus, pontomesencephalic reticular formation, pontine nuclei, tegmental nuclei) and the spinal cord. In addition to an overall denser ACC projection pattern compared to MCC, our analysis revealed clear differences in the density and topography of efferents between ACC and MCC, as well as between dorsal (24b/24b`) and ventral (24a/24a`) areas, suggesting a common functionality of these two cingulate regions supplemented by specific roles of each area. These results provide a detailed analysis of the efferents of the mouse areas 24a/24b and 24a`/24b` and achieve the description of the cingulate connectome, which shows important similarities with the one reported in rats and bring the anatomical basis necessary to address the roles of ACC and MCC in mice.

Key words:

Rodent's cingulate cortex; prefrontal cortex; tract-tracing; connectome.

Abbrevations

3: 3rd ventricle
4: 4th ventricle
7n: facial nerve
aca: anterior commissure, anterior part
AcbC: accumbens N, core region
AcbSh: accumbens N, shell region
ACC: anterior cingulate cortex
AD: anterodorsal thalamic N
AHC: anterior hypothalamic area, central part
AHP: anterior hypothalamic area, posterior part
AI: agranular insular cortex
AM: anteromedial thalamic N
AOM: anterior olfactory N, medial part
AOP: anterior olfactory N, posterior part
APT: anterior pretectal N
aq: aqueduct
Au: primary auditory cortex
AV: anteroventral thalamic N
Bar: Barrington's N
BLA: basolateral amygdaloid N, anterior part
CA1: field CA1 of the hippocampus
cc: corpus callosum
cg: cingulum
CG: central gray
Cl: claustrum
CL: centrolateral thalamic N
CM: central medial thalamic N
cp: cerebral peduncle
CPu: caudate putamen
dhc: dorsal hippocampal commissure
DLG: dorsal lateral geniculate N
DpG: deep gray layer of the superior colliculus
DR: dorsal raphe nucleus
DS: dorsal subiculum
DTT: dorsal tenia tecta
ec: external capsule
Ect: ectorhinal cortex
eml: external medullary lamina
Ent: enthorinal cortex
f: fornix
fmi: forceps minor of the corpus callosum
fmj: forceps major of the corpus callosum
fr: fasciculus retroflexus
GiA: gigantocellular reticular N, alpha part
GiV: gigantocellular reticular N, ventral part
GP: globus pallidus
HDB: diagonal band of Broca, horizontal limb
IAD: interanterodorsal thalamic N
IAM: interanteromedial thalamic N
ic: internal capsule
IMD: intermediodorsal thalamic N
InG: intermediate gray layer of the superior colliculus
InWh: intermediate white layer of the superior colliculus
IP: interpedoncular N
LAcbSh: lateral accumbens, shell region
LC: locus coeruleus
LD : laterodorsal thalamic N
LDDM: LD, dorsomedial part
LDTg: laterodorsal tegmental N
LDVL: LD, ventrolateral part
LH: lateral hypothalamic area
LHb: lateral habenula
LO: lateral orbital cortex
LP: lateral posterior thalamic N
LPLR: lateral posterior thalamic N, laterorostral part
LPMR: lateral posterior thalamic N, mediorostral part
LPO: lateral preoptic area
LSI: lateral septal N, intermediate part
LV: lateral venricle
M2: secondary motor cortex
MB: mammillary bodies
MCC: midcingulate cortex
MD: mediodorsal thalamic N
MDC: mediodorsal thalamic N, central part
MDL: mediodorsal thalamic N, lateral part
MDM: mediodorsal thalamic N, medial part
me5: mesencephalic trigeminal tract
MHb: medial habenular N
MnR: median raphe N
MO: medial orbital cortex
MPT: medial pretectal N
MRt: mesencephalic reticular formation
MS: medial septal N
mt: mamillotegmental tract
N: nucleus
Op: optic nerve layer of the superior colliculus
opt: optic tract
PaF: parafascicular thalamic N
PAG: periaqueductal gray
PAGdl: periaqueductal gray, dorsolateral part
PAGdm: periaqueductal gray, dorsomedial part
PAGl: periaqueductal gray, lateral part
PAGvl: periaqueductal gray, ventrolateral part
PAGr: periaqueductal gray, rostral part
PC: paracentral thalamic N
PH: posterior hypothalamic N

pm: principal mammillary tract
PMnR: paramedian raphe N
Pn: pontine N
PnC: pontine reticular N, caudal part
PnO: pontine reticular N, oral part
Po: posterior thalamic N group
Post: postsubiculum
PrCnF: precuneiform area
PrG: pregeniculate N of the prethalamus
PR: prerubral field
PRh: perirhinal cortex
PT: paratenial thalamic N
PtA: parietal associative cortex
PTg: pedunculotegmental N
PV: paraventricular thalamic N
PVH: hypothalamic paraventricular N
py: pyramidal tract
Re: reuniens thalamic N
Rh: rhomboid thalamic N
RIP: raphe interpositus N
RM: retromamillary N
RMg: raphe magnus N
RPa: raphe pallidus N
RS: retrosplenial cortex
Rt: reticular N
RVM: ventromedial medulla region
S1: primary somatosensory cortex
SC: superior colliculus
scp: superior cerebellar peduncle
sm: stria medullaris
SNc: substantia nigra, *pars compacta*
SNr: substantia nigra, *pars reticulate*
st: stria terminalis
Sth: subthalamic N
Sub: submedius N
TeA: temporal association cortex
ts: tectospinal tract
Tu: olfactory tubercle
V1: primary visual cortex
V2L: secondary visual cortex, lateral area
V2M: secondary visual cortex, medial area
V2ML: secondary visual cortex, mediolateral area
V2MM: secondary visual cortex, mediomedial area
VA: ventral anterior thalamic N
VDB: diagonal band of Broca, vertical limb
VL: ventrolateral thalamic N
VM: ventromedial thalamic N
VO: ventral orbital cortex
VP: ventral pallidum
VPL: ventral posterolateral thalamic N
VPM: ventral posteromedial thalamic N
VTA: ventral tegmental area
VTg: ventral tegmental N
ZI: zona incerta
ZID: ZI, dorsal part
ZIR: ZI, rostral part
ZIV: ZI, ventral part

Introduction

The anterior cingulate cortex (ACC) is a cortical region receiving a lot of attention in clinical and preclinical studies because of its involvement in a number of different functions such as cognitive processing (Bissonette et al. 2013; Bush et al. 2002; Newman et al. 2015; Shenhav et al. 2014), attention and memory (Bush et al. 2000; Carlson et al. 2012; Cholvin et al. 2013; Kim et al. 2016b; Koike et al. 2016), emotion (Bush et al. 2000; Courtin et al. 2013; Einarsson et al. 2015; Lindner et al. 2015) and pain processing (Apkarian et al. 2005; Barthas et al. 2015; Johansen et al. 2001; Kang et al. 2015; Shackman et al. 2011).

While the organization of the primate cingulate cortex recognized a four regions model, with the anterior (ACC), middle (MCC), posterior (PCC) cingulate cortices and the retrosplenial (RS) cortex (Vogt 1993), the cingulate organization in rodents was less consensual and has been recently reviewed (Vogt and Paxinos 2014). Since the seminal work of Krettek and Price (1977), the ACC is considered as a part of the medial prefrontal cortex (mPFC), along with the infralimbic and prelimbic areas (Heidbreder and Groenewegen 2003; Van Eden and Uylings 1985). Since then, a large number of invaluable studies have addressed the anatomical and functional aspects of the mPFC, mainly focused on infralimbic and prelimbic areas, but with less interest in ACC, especially in mice. In addition, the translation of these results obtained in rodents to human has been hampered by the use of a different organizational scheme. Indeed, the primate ACC is composed of areas 25, 32 and 24, the latter being separated in subareas 24a, 24b, 24c (Vogt 2009; Vogt et al. 1995; Vogt et al. 1987; Vogt and Vogt 2003; Vogt et al. 2005), but the term "anterior cingulate cortex" (abbreviated ACC or AC), or sometimes "cingulate cortex" (abbreviated Cg1/Cg2) as traditionally used in the context of mPFC, only covers the equivalent of area 24 as infralimbic and prelimbic areas correspond to areas 25 and 32, respectively (Vogt and Paxinos 2014). Moreover, the caudal extension of Cg1/Cg2, caudal to the genu of the corpus callosum, has been rarely explored. Recently, the nomenclature of the ACC in rats and mice has been clarified by Vogt and Paxinos (2014) to allow a more precise and anatomically true comparison between primates and rodents. Thus, using the area numbers rather than different names, the rostral parts of Cg1 and Cg2 regions are assigned to areas 24b and 24a respectively, and the caudal parts of Cg1 and Cg2 are assigned to MCC areas 24b`

and 24a`, respectively (Paxinos and Franklin 2012; Paxinos and Watson 2014; Vogt and Paxinos 2014).

Beyond a mere change of nomenclature, this conceptual shift required the identification of the specific connections of areas 24 and 24`. Numerous studies addressed the connections of the rat ACC (Cassell and Wright 1986; Conde et al. 1990; Delatour and Witter 2002; Domesick 1969; Floyd et al. 2000; Floyd et al. 2001; Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Jones et al. 2005; Leonard 1969; Sesack et al. 1989; Vertes 2002; Vogt and Miller 1983; Wyss and Sripanidkulchai 1984), but much less concerning mice (Bota et al. 2015; Matyas et al. 2014; Oh et al. 2014; Zhang et al. 2016a; Zingg et al. 2014). In addition, most of these studies focused on a single rostrocaudal level, rarely took into account the dorsoventral heterogeneity (e.g. 24a *vs* 24b), and none of them acknowledged the MCC (areas 24a` and 24b`) as a separate entity. Using retrograde tract-tracing, we recently characterized the afferents of ACC areas 24a and 24b, and MCC areas 24a`and 24b` in mice (Fillinger et al. 2017). We showed that these areas received a qualitatively similar input from the same regions, but the density of specific connections varied, especially from cortical and thalamic regions. In the present study, we analyzed the efferents from ACC's areas 24a and 24b and MCC's areas 24`and 24b` in mice by injecting anterograde tracers in these four subregions, considering their rostrocaudal extent.

Materials and methods

Animals

C57BL/6J male mice (Charles River, L'Arbresle, France) of 6-20 weeks of age and 20-30 g of weight were used for this study. Animals were housed under standard conditions (22°C, 12/12-hour light/dark cycle with lights on at 7 a.m.), with food and water available *ad libitum*. Procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive and approved by the local ethical committee (CREMEAS under reference AL/61/68/02/13).

Anterograde tracing

The analysis of the efferent projections from areas 24a, 24b, 24a` and 24b` was done by iontophoretically injecting an anterograde tracer along the rostrocaudal extent of these areas. The two tracers *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) and biotin dextran amine (BDA, MW 10,000) were used for each area in order to avoid any bias induced by the specificities of the tracers. All the procedures used were the same as in (Fillinger et al. 2017). Briefly, 34 mice were anesthetized with and intraperitoneal (*ip*, 5 mL/kg) injection of ketamine (87 mg/kg) and xylazine (13 mg/kg), and a local anesthetic (2% lidocaïne; Xylovet) was subcutaneously injected under the scalp. The animals were placed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, CA), the scalp incised and a unilateral hole was drilled at the proper coordinates (Table 1). A glass micropipette (20-30 µm tip diameter) containing either PHA-L (2,5% in phosphate buffer saline PBS, Vector Laboratories®) or BDA (2% in 0.5 M KCl, Molecular Probes®) was lowered in the targeted area and a constant current source (Midgard, +3 µA; 7 s on/7 s off for 10 min) was used to iontophoretically eject the tracer. The micropipette was left in place during 5 min before removing it slowly. The incision was then closed, lidocaïne infiltrated near the wound and the animal was monitored by the experimenter until waking up, before returning in his home cage in the animal facility.

Tissue preparation

Seven to ten days after the tracer injection, the mice were anesthetized with a lethal pentobarbital injection (273 mg/kg, i.p.), and perfused intracardiacally with 30 mL of 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) followed by 150 mL of 4% paraformaldehyde

solution (PFA) in 0.1 M PB. Brains were removed, postfixed overnight in PFA at 4°C, and then kept at 4°C in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) until sectioning. Coronal brain sections (40 µm) were obtained with a Vibratome (VT 1000S, Leica, Deerfield, IL) and were serially collected in PBS. In some cases, the spinal cord was also removed and sectioned following coronal or horizontal planes.

Tissue processing

PHA-L was revealed by immunohistochemistry and BDA by histochemistry. All steps were performed under gentle agitation at room temperature In both cases, sections were rinsed in PBS, incubated for 20 min in a 1% H_2O_2 / 50% ethanol solution for peroxidase extinction, washed again 3x10 min in PBS and incubated with a blocking solution of PBS with 0.3% Triton X-100 (PBS-T) and 5% donkey serum for 45 min. For PHA-L revelation, sections were then incubated overnight in primary antibody (goat anti-PHA-L; 1:50,000, AS-2224, Vector Laboratories; 1% donkey serum in PBS-T). After 3x10 min PBS washing, sections were incubated 90 min in biotinylated horse anti-goat secondary antibody (1:400, #BA-9500, Vector; 1% donkey serum in PBS-T) followed, after rinsing, by 90 min in avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; 0.2% A and 0.2% B in PBS; ABC Elite, Vector Laboratories). Sections were then rinsed with 0.05 M Tris-HCl buffer (TB; pH 7.5; 3x10 min) and the bound peroxidase was revealed by incubation in 0.025% 3.3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma), 0.5% nickel ammonium sulfate (Sigma) and 0.0006% H_2O_2 (Sigma) in TB for approximately 5 min. The reaction was stopped by rinsing sections in TB first, then in PBS. Sections were then serially mounted on gelatin-coated slides, air-dried, dehydrated in graded alcohols baths (1x 70%, 1x 95% and 2x 100%), cleared in Roti-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and coverslipped with Eukitt.

For BDA histochemical revelation, sections were washed, processed for peroxidase activity suppression and blocking as described above, then incubated in an ABC solution for 90 min. Sections were then washed with TB (3x10 min) and peroxidase revelation was obtained by incubation in 0.025% DAB, 0.0006% H_2O_2, 0.1% nickel ammonium sulfate and 0.025% cobalt chloride (Sigma) in TB for approximately 5 min. Subsequent washing and mounting were performed as described above.

Data analysis and iconography

The localization and extent of PHA-L and BDA injection sites was determined according to the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin 2012). Individual cases were included in the study only when the injection site was clearly centered into one of the targeted cingulate area, with no or only minimal spilling of the tracer in adjacent areas. Twenty cases injected with PHA-L or BDA, in areas 24a, 24b, 24a' and 24b', were then selected for analysis. For each case, the sections were carefully examined with a Nikon Eclipse E600 microscope to identify brain structures containing labeled axons. The density of labeled fibers, bearing varicosities or putative terminal buttons, in each of these structures was then evaluated in a semiquantitative manner ranging from sporadic labeling to heavy labeling. Then, the efferent connectome of each cingulate area (*e.g.* 24a, 24b, 24a' or 24b') was obtained by combining the density values of individual cases for a given area. Rather than simply averaging the individual densities, the final value was weighted to take into account the rostrocaudal position of injection sites, their laminar specificity, and the differences between PHA-L and BDA labeling. A heatmap of the outputs of the four cingulate areas was produced in Figure 2 by attributing to each target a color code with an intensity related to the density of innervation. Reconstructions of interconnections between ACC and MCC were obtained by drawing the labeling using Neurolucida 10.0 software (MBF Bioscience) with a Nikon Eclipse 80i microscope, and further modified in Adobe Illustrator CS5. Micrographs were taken using a Nikon Eclipse 80i microscope. Micrographs, obtained with a Microfire camera (Optronics) on a Nikon Eclipse 80i microscope, were processed for contrast and brightness adjustement using Adobe Photoshop CS5 and figures were produced with Adobe Illustrator CS6.

Results

As in our previous work concerning the inputs of cingulate cortex (Fillinger et al. 2017), the results are presented using the areal nomenclature for cingulate regions from the 4th edition of the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin 2012). Briefly, area 25 corresponds to infralimbic area of the medial prefrontal cortex, area 32 to prelimbic area, areas 24a/24b to the rostral part of cingulate regions Cg2/Cg1 while areas 24a`/24b` correspond to the caudal part of Cg2/Cg1 and constitute the MCC. Areas 30, 29a, 29b and 29c correspond to the retrosplenial cortex (RS).

BDA and PHA-L injection sites

After microscopic observation, twelve animals injected with BDA and eight animals injected with PHA-L were selected for analysis, according to their location in 24a (5 BDA, 2 PHA-L), 24b (3 BDA, 2 PHA-L), 24a` (2 BDA, 2 PHA-L) and 24b` (2 BDA, 2 PHA-L). The different injection sites in 24a/24b spanned the rostrocaudal extent of the areas and were analyzed accordingly in order to identify regional specificities. The selected injection sites had no or only minimal encroachment with neighboring regions and BDA and PHA-L sites were comparable in term of size and location (Fig. 1).

Analysis of anterograde labeling

The semiquantitative analysis in Fig. 2 summarizes in a heatmap the general pattern of efferents from 24a, 24b, 24a`and 24b`. The results are detailed below for the ipsilateral side, but the labeling obtained on the controlateral side will be precised when present.

ACC and MCC interconnections

A specific pattern of interconnections was observed between areas 24a and 24b, and areas 24a`and 24b` (Figs. 2a, 3). The rostral ACC areas 25 and 32 contained labeled axons after tracer injections in 24a and 24b, especially their rostral half, but almost none after injection in MCC. Area 25 received only a sporadic to light input, while innervation of area 32 more consequent and mainly originated from 24b (Figs 3, 4). ACC areas 24a and 24b both displayed strong intrinsic projections along their rostrocaudal extent, but only scant interconnections between them. In fact, areas

24a/24b appeared to project preferentially to areas 24a`/24b`, rather than to each other. On the other hand, the MCC areas 24a` and 24b` sent light to moderate efferents to each of the other areas. Thus, a moderate labeling was found in 24a` and 24b` after injections in 24a, while the density of labeled fibers was very weak in 24b. However, injecting in 24a` led to a light to moderate labeling in 24a, 24b and 24b`. In a general manner, the ipsilateral labeling was mirrored by a similar controlateral labeling with a lesser density, excepted for the homonymous area which always displayed a rather dense labeling.

Cerebral cortex

The anterograde labeling obtained in cortical regions was mainly ipsilateral with a weak controlateral component, expected in a few areas specified below (Fig. 2a). In frontal regions, the orbital cortex received cingulate inputs with a variable density depending on orbital and cingulate subregions (Fig. 4). The medial orbital cortex (MO) displayed a moderate to dense labeling after 24a, 24b and 24a` injections but much weaker after 24b` injection. The fibers found in the ventral orbital cortex (VO) originated more specifically from 24a and 24b and only sporadic labeled fibers were found in the lateral orbital cortex (LO). A light labeling was found in the ventral agranular insular cortex (AI) after 24b injections. The secondary motor cortex (M2), lateral to 24b/24b` received a preferential input from these areas, but almost none from 24a/24a`. Caudally, the RS appeared as one the main cortical targets of cingulate areas with a specific pattern of labeling in the different RS areas (Fig. 5). Areas 29c and 30 received a dominant input from the MCC, with a dorsoventral preference, where 24a` and 24b` favored 29c and 30, respectively. Inputs from 24b were very light and reproduced the 24b` preference for area 30. A dense labeling was observed in area 29a after injections in 24a, but none after 24b injections. Inputs from MCC were lighter and also originated only in ventral area 24a`. Finally, the labeling observed in 29b was always weak if none.

Associative areas of the parietal cortex were the second major target of cingulate areas. At middle rostrocaudal level, a projection to the parietal associative area (PtA) was observed, especially strong from 24b and lighter from 24a (Fig. 6). The density of labeling however decreased when injection sites were caudally placed in ACC areas and further in MCC. Caudal to the PtA, the medial secondary visual cortex

(V2M) received a strong input from the four studied cingulate areas, heavier from 24a and 24b than from 24a` and 24b` (Fig. 5). A topographical organization of these projections was observed as the mediolateral position of the labeling in the V2M depended on the location of the injection site in cingulate areas. Thus, 24a and 24a` targeted the medial part of the V2M while 24b and 24b` inputs tended to be found in the more lateral V2M (Fig. 5). We also noted that the rostrocaudal position of the V2M labeling seemed to depend on the injection site, but no clear pattern could be established. More laterally, the primary (V1) and lateral secondary (V2L) visual cortices were moderately to densely labeled after injections in 24b and 24b` whereas the fiber density was at best sporadic after injections in 24a and 24a` (Fig. 6). Other sensory areas, such the primary somatosensory (S1), auditory (Au) and temporal associative (TeA) cortices received much lesser fibers from cingulate areas, arising mainly from area 24b.

Temporal cortical regions like ectorhinal (Ect) and perirhinal (PRh) cortices were lightly targeted by cingulate areas, essentially 24a and 24b. In the case of 24b injections, outputs were bilateral with a controlateral preference (Fig. 7), and axons invaded sporadically the enthorinal cortex (Ent). Finally, efferents to the hippocampal formation were very light and restricted to the postsubiculum (Post), with scattered axons occasionally found in the dorsal subiculum (DS).

Non-cortical forebrain

Principal targets in the non-cortical forebrain were the striatum, the claustrum (Cl), the amygdala, the lateral septum and the cholinergic forebrain (Fig. 2b). In the dorsal striatum, a very strong labeling was found ipsilaterally in the caudate-putamen (CPu), with a sizeable participation of the controlateral component. In an interesting way, this labeling presented a topographical organization depending on the area injected (Fig. 8). Thus, 24a injections produced anterograde labeling in the rostral medialmost region of the CPu, bordering the lateral ventricle, which tapered and disappeared caudally shortly after the anterior commissure (Fig. 8a). However, after an injection in 24b, the area covered by labeled axons in the CPu was larger, located more laterally in the central region, and extended more caudally than after 24a injections (Fig. 8b). From 24a` and 24b`, the efferents were grouped in the medial CPu and appeared less dense, with a stripes-like distribution (Fig. 8c, d). In the ventral striatum, axonal

labeling was light and restricted to the rostral part of the shell (AcbSh) and the core (AcbC) of the accumbens nucleus, essentially after 24a and 24b injections (Fig. 8a1, b1).

Fibers labeling in the Cl was bilateral and observed for each cingulate injection case, but stronger after ACC than MCC injections. Strikingly, the efferents from 24a in the Cl were denser ipsilaterally, while the opposite situation was found after injections in 24b with a stronger input to the controlateral Cl (Fig. 9a, b). This pattern appeared similar from 24a` and 24b` but more tempered. The amygdala was the third target of cingulate areas in term of density and the observed labeling was located only in its anterior basolateral nucleus (BLA; Fig. 9c, d). Area 24b sent a dense bilateral projection, with an ipsilateral preference, while the 24a efferents were purely ipsilateral and found only in rostral injection cases. The topography of ACC efferent to the BLA was also different as 24b seemed to preferentially project to the rostral BLA (Fig. 9d), while 24a appeared to target a more caudal part (Fig. 9c). The outputs of the MCC to the BLA were sporadic and found only after 24b` injection.

Anterograde labeling in the lateral septum was found in the intermediate part (LSI) and was much denser after injections in 24a and 24a` than in 24b and 24b` (Fig. 10). The cholinergic basal forebrain system, including the medial septal nucleus (MS) and the diagonal band of Broca, horizontal (HDB) and vertical (VDB) limbs, were also innervated by cingulate areas with a preferential input from 24a and 24a` areas (Fig. 10). Additional forebrain targets receiving a light input, mostly from 24a and 24b, were the medial (AOM) and posterior (AOP) parts of the anterior olfactory nucleus, the dorsal tenia tecta (DTT), the olfactory tubercle (Tu), the ventral pallidum (VP), the globus pallidus (GP) and the lateral preoptic area (LPO), the latter receiving an almost exclusive 24a input.

Hypothalamus

The efferents to hypothalamic structures were limited but distinctive between cingulate areas (Figs. 2c, 11). Overall, outputs arising from ACC, especially from 24a, were stronger than those from MCC with an almost inexistent output from 24b`. The anterior hypothalamic area, posterior (AHP) and central (AHC) parts, and the mammillary bodies (MB) received moderate to dense efferents almost exclusively from 24a, the other cingulate areas providing only scattered fibers if none. The

projection to the lateral hypothalamic area (LH) was also dense from 24a, lighter from 24b and 24a` and absent from 24b`. Finally, the posterior hypothalamic nucleus (PH) and the retromammillary nucleus (RM) received a dense input from ACC areas and a weaker one from MCC.

Thalamus

Cingulothalamic projections appeared widespread in several group of thalamic nuclei and often displayed a specific topography, along with different densities, with regard to the cingulate area of origin (Figs. 2d, 12, 13). These projections were largely ipsilateral with a small controlateral component restricted to a few nuclei. In the anterior group, the anteromedial nucleus (AM) was the main cingulate target, where all the four areas provided a dense to heavy ipsilateral projection with a lighter controlateral projection (Fig. 12). Following injections in 24a, labeled fibers densely concentrated in the rostral pole of the AM, especially in the dorsomedial border and sometimes extending lightly in the anteroventral nucleus (AV). At middle level of the AM, 24a axons became restricted to the ventromedial and ventrolateral borders with a reduced density, to disappear further caudally. Medially, a moderate number of axons entered the interanteromedial nucleus (IAM). By contrast, after injections in 24b, labeled fibers were rare in the rostral AM, but densely invaded its middle and caudal levels. These axons were less confined to the periphery of the AM than the ones from 24a, but a very dense concentration occurred at the ventrolateral border, continuous with the ventral anterior nucleus (VA). This dense labeling persisted up to the caudal pole of the AM and medially in the IAM. Efferents to AM from 24a` and 24b` were comparable, with a concentration of labeled axons in the dorsomedial edge, continuous dorsally with the AV. These MCC axons appeared in the rostral AM, caudal to 24a axons, but still rostral to 24b axons, and the labeling persisted caudally as well as in the IAM with a decreasing density. As for the rest of anterior nuclei, the anterodorsal nucleus (AD) received a light projection from 24a and 24a`, especially in its rostral part, and the interanterodrosal nucleus (IAD) was innervated mostly by 24b and rostral 24a, with much less axons arising from MCC areas.

Laterally, the laterodorsal (LD) and lateroposterior (LP) nuclei, functionally associated to the anterior nuclei, also received a topographic cingulate input (Figs. 12, 13). The dorsomedial part of the LD (LDDM) and the mediorostral part of the LP (LPMR) were

targeted by the four cingulate areas, while the ventrolateral part of the LD (LDVL) and the laterorostral part of the LP (LPLR) received a preferental input from 24a` and 24b`. Thus, in the LDDM, axons from 24a occupied the rostral pole and remained caudally confined to the dorsomedial edge, while axons from 24b were found more ventromedially. Inputs from 24a` and 24b` both appeared in the core of the LDDM, extending laterally in LDVL. Caudally, a similar pattern was observed in the LPMR with 24a and 24b axons found dorsomedially and ventromedially, respectively. MCC axons were concentrated in the medial third of the LPMR at rostral level and extended laterally at more rosral level. The labeling following 24b` injections tended to be denser ventrally than dorsally, compared to the one obtained after 24a` injection. Finally, a distinctive cluster of MCC axons were labelled in the ventral part of the LPLR, at the ventral border with the posterior nucleus, especially after 24b` injection.

Among ventral nuclei (Fig. 12), efferents from ACC were dense to the ventromedial nucleus (VM), especially from 24b, whereas MCC injections led to a sporadic labeling. Area 24b injection also labeled the VA and ventral lateral (VL) nuclei, adjacent to the AM. Similarly, the mediodorsal nucleus (MD) contained numerous labeled axons in its lateral segment (MDL) after ACC injections, but the labeling was scant after MCC injections (Figs. 12, 13). The input from 24b was dense all along the rostrocaudal extent of MDL, shifting from a ventral position rostrally to a more dorsal portion caudally, whereas the input from 24a appeared much lighter and concentrated rostrally in the dorsal part of the MDL.

Cingulate inputs to the midline and intralaminar nuclei were dominated by ACC, with MCC providing only scattered axons (Figs. 12, 13). In the ventral midline group, the reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei received a moderate to dense innervation from 24a and 24b, with a strongest density when injection sites were made in rostral part of these ACC areas. The dorsal midline nuclei, namely paratenial (PT) and paraventricular (PV) nuclei, where labeled only by tracer injection in rostral 24a. Among the intralaminar nuclei, the centromedial (CM), centrolateral (CL) and paracentral (PC) nuclei received a moderate to dense input from 24a and 24b, while the parafascicular nucleus (PaF) received moderate afferents from 24b and was only sporadically targeted by 24a. In the posterior thalamus, the pregeniculate nucleus (PrG) displayed light labeled.

In addition to the dorsal thalamus, the reticular nucleus (Rt) systematically presented a heavy concentration of axons from the four cingulate areas, packed in its rostrodorsal part (Fig. 12). Similarly, the zona incerta (ZI) was strongly labeled by ACC and MCC, with a heavier density in dorsal (ZID) than in ventral part (ZIV; Fig. 13). In the neighboring subthalamic nucleus (Sth), a dense projection originated in 24b only (Figs. 13, 14). Finally, the lateral habenula (LHb) was moderately labeled by injections located in 24a and 24b (Fig. 14).

Brainstem

The cingulate efferents to the brainstem were mostly ipsilateral and heavily targeted the midbrain (Fig. 2e). At the caudal pole of the thalamus, two systems of axons concentrated dorsally in the pretectal region, mainly in the anterior (APT) and medial pretectal (MPT) nuclei, to reach the superior colliculus (SC) and medially to invade the periaqueductal gray (PAG). The PAG presented a striking topographical organization of cingulate efferents (Fig. 15): areas 24a and 24a` targeted the dorsolateral part (PAGdl), while areas 24b and 24b` projected mostly to the lateral part (PAGl). In addition to these dense terminal fields, a sporadic labeling was found in the dorsomedial part (PAGdm) in every case and the ventrolateral part (PAGvl) appeared weakly labeled by ACC fibers only. The projections from ACC to the PAG seemed denser and spread more caudally than those from MCC, which did not reach the caudal third of the PAG. In addition, axons from 24a` and 24b` remained confined to the periphery of the PAGdl and the PAGl, respectively, and avoided deeper regions close to the aqueduct. A similar pattern was observed in the SC (Fig. 15), with ACC afferents being denser than MCC afferents and covering a larger rostro-caudal extent. The labeled axons were arranged in discontinuous patches in intermediate (SC InG, SC InWh) and deep (SC DpG) but not superficial layers. While the bulk of cingulate axons was mainly found in the medial half of the SC, inputs from 24b extended more laterally than those from 24a. In the ventral midbrain, cingulate inputs to dopaminergic centers, the substantia nigra *pars compacta* (SNc) and the ventral tegmental area (VTA), were light and arose almost exclusively from the ACC. The substantia nigra *pars reticulata* (SNr) also contained a low density of axons from 24b. Additional inputs to the midbrain were found in the interpeduncular nucleus (IP) which received an exclusive projection from 24a in its lateral part only, while all areas

sent a diffuse projection to the mesencephalic reticular formation (MRt), extending into the precuneiform nucleus (PrCnF) for ACC fibers.

In the pons, a moderate to dense output was observed in the median (MnR), paramedian (PMnR) and dorsal (DR) raphe, with a dominance of ACC projections, especially in the DR (Figs. 2e, 16). All areas also densely projected to the pontine nuclei (Pn). The oral part of the pontine reticular formation (PnO) received a predominant input from 24b and to a lesser extent from 24a (Fig. 16). Similarly, the ventral (VTg) and laterodorsal (LDTg) tegmental nuclei were respectively lightly and densely targeted by ACC injections (Fig. 17). In the caudal pons, the pontine central gray (CG) was constantly labeled by ACC and MCC injections (Fig. 17). The cingulate projections to the ipsilateral LDTg and CG were accompanied by a lesser, but still significant, controlateral labeling. At this level, fibers from 24b extended sporadically to the Barrington's nucleus (Bar) and the locus coeruleus (LC). Finally, 24b was the only cingulate area to send outputs caudal to the pontomedullary junction (Fig. 17), in the caudal part on the pontine reticular formation (PnC) and in the ventromedial medulla (RVM), including ventral pontine nucleus, the raphe magnus (RMg), raphe pallidus (RPa), and the anterior and ventral gigantocellular reticular nucleus (GiA, GiV). Finally, a few labeled axons were found, only after 24b injections, in the ipsilateral pyramidal tract (py). Indeed, the cervical and thoracic spinal segments contained labeled fibers, mainly in the deep dorsal horn and the intermediate region.

Discussion

In this study, we provided a detailed analysis of the efferents of ACC areas 24a/24b and MCC areas 24a`/24b` in mice. Roughly, cingulate efferents belong to five groups of structures: the cortical mantle, the thalamus and the brainstem, and to a lesser extent the non-cortical forebrain and the hypothalamus. Obvious differences in ACC and MCC efferents were observed, but we also disclosed several specific connections of dorsal *versus* ventral cingulate regions (Fig. 18).

Summary of the study

We highlighted a distinctive pattern of projections originating in ACC and in MCC. The main discrepancies were found in parietal cortical regions and in the RS, the hypothalamus, the midline and intralaminar thalamic nuclei and the brainstem. Some structures, heavily targeted by ACC areas, did not receive or only sporadically inputs from MCC. On the other hand, in a few regions such as the parietal cortex, CPu, ZI, PAG and SC, the labeling obtained after MCC injections was comparable to the staining induced by ACC injections. In our previous study comparing ACC and MCC inputs (Fillinger et al. 2017), we did not observed such pronounced differences between the two regions, suggesting that the specific functional properties of ACC and MCC might be preferentially mediated by their respective projections. In several regions targeted by ACC and MCC, a distinct topography of cingulate projections could be observed. Thus, our study suggested, beside ACC/MCC rostrocaudal gradient, a dorsoventral gradient (*e.g.* 24b/24b` *vs* 24a/24a`) in the organization of the efferents. We observed that kind of gradient in the LSI, the cholinergic basal forebrain, the dorsomedial CPu and the PAGdl, preferentially targeted by ventral cingulate areas, while the V1 and V2L cortices, the dorsocentral CPu, the PAGl and the SC (lnWh, DpG) were mainly innervated by dorsal cingulate areas. Figure 2 allows comparing the density of efferents between ACC and MCC, and between dorsal and ventral areas.

Intracingulate connections

Many studies have reported interconnections between the different cingulate areas in rats (Fisk and Wyss 1999; Hurley et al. 1991; Jones et al. 2005; 1989; Shibata and Naito 2008; Vogt 2015; Vogt and Miller 1983). Yet, we are the first to directly

compare areas 24a/24b and areas 24a`/24b` outputs to other cingulate areas in mice. We showed that the rostralmost areas 25 and 32 were targeted mainly by 24b, while the MCC did not project to these regions. These results correspond to previous observations showing that in rats, areas 25, 32 and 24b form a group of interconnected regions in the cingulate cortex, poorly connected with the caudal part of cingulate cortex (Fisk and Wyss 1999; Jones et al. 2005). Indeed, the internal connections along the rostrocaudal extent of 24a and of 24b were strong whereas reciprocal connections between 24a and 24b were only sporadic. The same feature can be extended to 24a/24a`and 24b\24b`. This was not reported in other studies (Fisk and Wyss 1999; Jones et al. 2005; Vogt 2015). This apparent discrepancy can be explained by the fact that the MCC and the caudal extension of areas 24a and 24b are rarely taken into account. Finally, our results showed a topographical organization of projections from ACC and MCC to specific areas of the RS. Indeed, RS areas 29a and 29b received a main input from 24a and to a lesser extent from 24a`, while RS areas 29c and 30 were preferentially innervated by 24a` and 24b`, respectively. As an identical organization was previously described it rats (Fisk and Wyss 1999; Jones et al. 2005; Shibata and Naito 2008), it would therefore appear that intracingulate connections in rats and mice are roughly similar.

Major ACC and MCC outputs: comparison with other studies and functional considerations

Cerebral cortex

In frontal cortical regions, the orbital cortex, especially the MO and the VO, received a consequent projection from all cingulate areas, denser from 24a/24b. This organization has been previously described in mice (Bota et al. 2015; Zingg et al. 2014) and rats (Sesack et al. 1989). Moreover, connections between orbital areas and ACC are reciprocal (Fillinger et al. 2017; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2011), and described to underlie decision making and goal-directed behaviors (Furuyashiki and Gallagher 2007; Kolb et al. 2004; Schoenbaum et al. 2009). It has been proposed that this connection allows the association between the valence of stimuli, coded by orbital regions and the choice of the most adapted behavior to obtain the reward, initiated by the medial prefrontal cortex (Hoover and Vertes 2011).

The second main target was the RS, receiving topographic projections from ACC and MCC as discussed above. Along with its strong interconnections with other cingulate regions, the RS shares important reciprocal connections with hippocampal and parahippocampal regions, associative visual cortices and the anterior thalamic nuclei (van Groen and Wyss 1990; van Groen and Wyss 1992; Wilber et al. 2014; Wyss and Van Groen 1992). This particular circuit has been described to play a role in fear memory, visual guided behavior, as well as visuospatial learning and memory (Aggleton and Nelson 2015; Aggleton et al. 2010; Cooper et al. 2001; Corcoran et al. 2016; Hindley et al. 2014; Vann et al. 2003). In our study, the RS represented an important relay between ACC/MCC and the hippocampus, as cingulate projections we observed were light and restricted to the Post and the DS. Indeed, according to other studies (Bota et al. 2015; Li et al. 2015; Sesack et al. 1989), we did not observe any projection to the hippocampus proper, in contrast with the recent study of Rajasethupathy et al. (2015).

In addition, the massive projection to the V2M, as well as the one arising mainly from areas 24b/24b` to V1 and V2L, is able to participate to the visuospatial processing of the cingulate cortex. Indeed, this projection, previously observed in other studies (Bota et al. 2015; Sesack et al. 1989; Vogt and Miller 1983; Zingg et al. 2014), has been involved in the visual perception necessary for selective attention (Zhang et al. 2016a; Zhang et al. 2014). Additionally, the particular projection we observed from the area 24b to the neighboring M2, a subdivision of the mPFC, has also been described in other studies in mice (Bota et al. 2015; Zingg et al. 2014) and rats (Reep et al. 1990; Vogt and Miller 1983) and may be involved in linking multisensory cues to motor action (Barthas and Kwan 2017). The M2 is thought to be homologous to the primate frontal eye field, in association with 24b (Brecht et al. 2004; Smith and Alloway 2014; Vertes 2006). Its stimulation produces head, eyes and vibrissa movements, while its lesion disrupts movement orientation by neglecting visual, auditory and somatosensory stimuli integration (Corwin et al. 1986; Reep et al. 1990). All of this taken together, dorsal cingulate areas (24b/24b`) may possess visumotor-associated properties, leading to the behavioral adaptation to visual stimuli.

Non-cortical forebrain

The striatum, especially its dorsal division, was a major target of all cingulate areas. We observed heavy projections to the CPu, denser from ACC than MCC, while projections to the ACbC and AcbSh were restricted to its rostral pole and appeared much lighter from ACC and almost inexistent from MCC. The strong ACC input to CPu and the density differences between dorsal and ventral striatum projections we saw were also described in rats (Brog et al. 1993; Deng et al. 2015; Gabbott et al. 2005; Mailly et al. 2013). Yet, no information was available concerning MCC projections until now. We also found a topographic organization of cingulate projections to the CPu: the ventral cingulate areas 24a/24a` projected to the medialmost part of the dorsomedial portion of the CPu, while dorsal areas 24b/24b` sent outputs more laterally to the central region of the CPu. A similar organization has been proposed in rats where the mediolateral gradient of projections observed in the CPu corresponded to the ventrodorsal localization of areas in the mPFC (Groenewegen et al. 2017; Heilbronner et al. 2016; Mailly et al. 2013; Voorn et al. 2004). This topographic organization of cingulo-striatal outputs might underlie different functions, since evidences are pointing out a functional specification in the striatum (Groenewegen et al. 2017; Voorn et al. 2004). Indeed, the dorsomedial CPu has been involved in goal-directed behavior such as cost-benefit decision making (Friedman et al. 2015) and instrumental conditioning (Yin et al. 2005), whereas the dorsolateral CPu seems more involved in habitual actions (Yin et al. 2004).

The Cl is a constant target of cingulate areas. We showed that the cingulo-claustral projection was denser from the ACC than from the MCC. In addition, efferents from dorsal areas 24b and 24b` reached preferentially the controlateral Cl, while ventral areas 24a and 24a` projected more to ipsilateral Cl. Our observations match with recent studies of cingulo-claustral connections in mice and rats (Atlan et al. 2017; Smith and Alloway 2014; Wang et al. 2017). Yet, in both of these studies, the projection to the controlateral Cl was attributed to both 24b and 24a. This discrepancy with our results may be due to a different technical approach: a viral pressure injection may produce non specific labeling because of a potential spreading in neighboring areas, while the iontophoretic tracer injection we used allowed a greater precision. This cingulo-claustral projection is reciprocated by a consequent claustro-cingulate projection in rats and mice (Hoover and Vertes 2007; Wang et al. 2017; White et al. 2016) but the function of the Cl is still under debate. Its

connections with a substantial number of cortical regions place it in a privileged position to coordinate far-flug cortical networks, as proposed by studies showing a CI role in the amplification of cortical oscillations underlying consciousness (Smythies et al. 2012; Smythies et al. 2014), but also its involvement in switching between resting state network to a task-associated cortical network in monkey (Reser et al. 2014) or in the segregation of attention (Goll et al. 2015; Mathur 2014).

Finally, our results showed a dense projection from both ACC areas to the BLA. However, while the whole extent of 24b projected to the BLA, 24a efferents originated only from its rostralmost part. MCC projected to the BLA only sporadically, from 24b` only. This projection from ACC is reciprocal and well described in the rat (Fillinger et al. 2017; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Reppucci and Petrovich 2016), yet without discrimination between 24a and 24b (Cassell and Wright 1986; Gabbott et al. 2005; Ottersen 1982; Sesack et al. 1989). Again, no information was available concerning MCC inputs until now. The BLA has been involved in emotion, especially fear, in affect, motivation and cognitive functions such as aversive and appetitive learning (LeDoux 2000; Likhtik and Paz 2015; Olucha-Bordonau et al. 2015). Indeed, the topographic organization of BLA projections to the mPFC is described to underlie different functions. Its input to areas 32 and 24a/24b is involved in the segregation between fear expression and reinforcement (Knapska et al. 2012; Livneh and Paz 2012; Senn et al. 2014; Sierra-Mercado et al. 2011; Sotres-Bayon et al. 2012), while its projection with area 25 could support fear extinction (Amano et al. 2010; Knapska et al. 2012; Senn et al. 2014). This anatomofunctional segregation may underlie the attribution of a positive or negative valence to a stimulus, by the activation of either of these circuits.

Hypothalamus

Our study showed that hypothalamic areas were targeted mainly by ACC, when MCC, especially area 24b`, did not display more than a light projection. More specifically, it seemed that the most important projection to hypothalamic originated in 24a, which is almost the only area significantly targeting the anterior hypothalamus and the MB. Information in the literature concerning cingulo-hypothalamic projections is restricted to studies in rats (Floyd et al. 2001; Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Reppucci and Petrovich 2016; Sesack et al. 1989). Projections

to the anterior, lateral and posterior hypothalamus have been previously described (Floyd et al. 2001; Reppucci and Petrovich 2016; Risold et al. 1997; Sesack et al. 1989), but we did not observe any projection to the mouse dorsal hypothalamic areas, as depicted in the rat (Floyd et al. 2001; Risold et al. 1997; Sesack et al. 1989). The direct projection from the mPFC to the hypothalamus has been doubtful for many years (Cowan and Powell 1956) but represents one of the few cortical entry of this structure (Risold et al. 1997). This cingulo-hypothalamic pathway may correspond to an equivalent of the primate “medial network”, in opposition with the “orbital network” (Carmichael and Price 1996; Ongur et al. 1998), described as a visceromotor system triggering or modulating emotional responses (Floyd et al. 2001; Risold et al. 1997).

Thalamus

The cingulo-thalamic projections we observed in our study were usually more widespread and denser from ACC, excepted for the AM, the LP and the LD where the density of innervation was consequent from both ACC and MCC, but displayed a specific topography. It is important to note that most of the cingulo-thalamic projections reported here are reciprocal to the thalamo-cingulate afferents we recently reported (Fillinger et al. 2017).

Anterior thalamic and adjacent LD and LP nuclei were among the most heavily targeted by cingulate regions, in accordance with previous studies (Mathiasen et al. 2017; Oh et al. 2014; Vertes 2002; Wright et al. 2013). Rostrocaudal and ventromedial gradients seemed to emerge from our study: 24a targeted the rostral part of the AM while 24b reached the caudomedial part of the AM. Similarly, 24a projected to the dorsomedial region of the LD and LP, and 24b targeted the ventrolateral part of the LD and LP. Finally, MCC efferents also targeted a more lateral part of LD and LP. These observations are similar to what has been reported in rats (Conte et al. 2008; Shibata and Naito 2005). The same differences in ACC and MCC differences can be extrapolated from Shibata et al. who showed different patterns between rostral and caudal regions of ACC. In addition these authors also highlighted an identical organization of cingulate projections to the AV, consistent with the consequent projection we found from the MCC. Indeed, in addition to a preferential targeting of the dorsomedial part of the AM, the MCC projection to the AV

was denser than the one originating in the ACC. Anterior thalamic nuclei are classically involved in spatial memory processing and this topographic organization of cingulate projections may underlie different aspects of this function such as learning and memory (Aggleton et al. 1996; Aggleton et al. 1995; van Groen et al. 2002a; van Groen et al. 2002b). Moreover, the AM and the IAM might be involved in a “feed-forward” system, depending on frontal interactions and dealing with cognitive flexibility and executive functions, while the AV along with the AD could belong to a “return-loop” system, regulating hippocampal functions such as navigation, under the control of the RS (Aggleton et al. 2010). In addition, the LP, receiving a consequent innervation from both ACC and MCC, is considered as the rodent equivalent of the pulvinar and the visual associative thalamus. Along with its reciprocal connections with cingulate areas, visual cortex and SC, as well as its afferents from the basal ganglia, the LP is proposed to participate to spatial processing and directed attention (Kamishina et al. 2009; Kuljis and Fernandez 1982; Takada 1992).

In the ventral thalamic nuclei, the ACC was the main source of afferents, especially the area 24b which sent a sizeable input to the VM, VA and VL. This is in accordance with previous studies in rats showing a predominant projection from dorsal cingulate to ventral thalamic nuclei (Heidbreder and Groenewegen 2003; Krettek and Price 1977; McKenna and Vertes 2004; Sesack et al. 1989). It is also consistent with our previous afferents study highlighting a similar dorsoventral pattern of thalamo-cingulate inputs (Fillinger et al. 2017). This projection is in accordance with a role of ACC in motor control, as ventral thalamic nuclei have been involved in eye and ears movements (Brecht et al. 2004) and in nocifensive behaviors (Pastoriza et al. 1996). Finally, our study showed that the MD, lateral part only, was heavily targeted by 24b and that efferents from 24a are lighter and located in a more restricted region. Our results are in accordance with other studies (Cornwall and Phillipson 1988; Matyas et al. 2014; Ray et al. 1992; Sesack et al. 1989). A recent survey, led by Matyas et al. (2014), included the MD, along with the ACC and the BLA, in a three components circuit involved in fear-related behavior. These authors also positioned the MD as a relay between prefrontal sensory integration, preferentially processed in ACC than MCC, and BLA emotional regulation.

Cingulate efferents to midline and intralaminar nuclei originated almost exclusively, in 24a and 24b, in accordance with previous studies in rats and mice (Oh et al. 2014;

Sesack et al. 1989; Vertes 2002). The projection to the PV and the PT arose only from rostral 24a as observed in rats (Chen and Su 1990; Sesack et al. 1989; Van der Werf et al. 2002) and ,as the projection originating in areas 25 and 32, could be involved in limbic functions (Vertes et al. 2015). We found a consequent projection to the Re and Rh, originating largely in areas 24a and 24b and corresponding to previous tracing studies in rats (Herkenham 1978; McKenna and Vertes 2004; Vertes 2002). Among other functions, the Re/Rh are described in the literature as an anatomical and functional relay between the mPFC and the hippocampus (Bota et al. 2015; Hoover and Vertes 2012; McKenna and Vertes 2004; Van der Werf et al. 2002; Varela et al. 2014). Thus, the Re has been involved in executive functions such as learning, memory or goal-directed behavior (Cholvin et al. 2013; Eleore et al. 2011; Hallock et al. 2013; Ito et al. 2015).

In the subthalamus, we found that the ZI was one of the main cingulate targets while the Sth was innervated only by area 24b. Our study highlighted a dorsoventral gradient of cingulate outputs in the ZI: the ZID received a sizeable projection from ACC and MCC, when the ZIV was mainly targeted by the ACC. This particular organization has previously been reported in rats (Kita et al. 2014; Mitrofanis and Mikuletic 1999) and may support somatotopic segregation. Indeed, the ZID, receiving the larger proportion of “limbic” cingulate inputs, is also the region the most heavily connected with brainstem nuclei (Kita et al. 2014; Kolmac et al. 1998; Zilles and Wree 1995). On the contrary, somatosensory and motor cortical areas projections occupy mostly the ZIV, also targeted by basal ganglia and deep layers of the SC (Kita et al. 2014; Kolmac et al. 1998; Nicolelis et al. 1992). The Sth, receiving a consequent projection only from area 24b in our study and in others (Canteras et al. 1990; Kita et al. 2014), may also participate, along with the basal-ganglia circuit, in the involvement of the dorsal ACC in visual attention (Chudasama et al. 2003a; Kolomiets et al. 2001). Finally, we also found a cingulate projection to the LHb, originating mainly in area 24a. This cingulo-habenular projection has previously been described in rats (Greatrex and Phillipson 1982; Kim and Lee 2012). The specific role of this projection still needs to be investigated, but a recent study provided the first evidence of the implication of a prefronto-habenular projection, originating in IL/PL, in working memory process (Mathis et al. 2016).

Brainstem

The extent of cingulate projections to the brainstem is largely dependent of the area considered. Thus, while the midbrain, especially the PAG and the SC, received inputs from both ACC and MCC, the pons appeared preferentially targeted by ACC and the caudal parts of the pons and the medulla received an almost exclusive 24b input.

We highlighted an interesting topography of cingulate projections to the different parts of the PAG: while the PAGdl received afferents from ventral areas 24a and 24a`, the PAGl was targeted by dorsal areas 24b and 24b`. The others PAG regions were only sporadically innervated, mainly by ACC. An identical topography is found in rats, where the PAGdl is primarily targeted by 24b and the PAGl by 24a, while the areas 25 and 32 are the main afferent source of the PAGvl (Floyd et al. 2000; Gabbott et al. 2005; Marchand and Hagino 1983; Sesack et al. 1989). In addition, we revealed a similar dorso-ventral organization of MCC inputs to the PAG in mice. However, the MCC-PAG efferents remain lighter than ACC-PAG ones and do not extent in the caudalmost PAG. Along with specific cingulate projections to the hypothalamus (see above), this prefrontal projection to the specific longitudinal columns of the PAG might participate to the “medial network” mainly implicated in visceromotor functions (Carmichael and Price 1996; Floyd et al. 2001). It is noteworthy that each part of the PAG has specific functions (Bandler and Keay 1996; Bandler et al. 2000; Bandler and Shipley 1994; Carrive 1993). Thus, the dorsal and lateral PAG, under the control of areas 24a and 24b, are involved in an active emotional coping with defensive reactions like freezing, fight or flight, while the PAGvl, receiving inputs from areas 25 and 32, is more involved in a passive emotional coping (Floyd et al. 2001). In addition, the PAGl is major spinorecipient region which is not the case for PAGdl. Thus, it has been suggested that the PAGdl may participate to an active emotional coping following psychological stressors, while the active coping initiated by the PAGl would be triggered by physical stressors (Floyd et al. 2000). The specificity of cingulo-PAG, but also cingulo-hypothalamic, projections we described reinforced this functional dichotomy (Keay and Bandler 2015).

Along with the PAG, the other massive cingulate efferents we found were to the SC, innervating discontinuous patches in intermediate and deep but not optic layers, as previously observed in the rat (Hardy 1986; Sesack et al. 1989; Wyss and

Sripanidkulchai 1984; Zeng and Stuesse 1993). While the cingulate regions do not target the superficial visual layers of the SC, the deeper layers are multimodal and received intracollicular connections (May 2006), allowing the cingulate cortex to indirectly influence motor reactions upon visual stimuli. The cingulo-collicular projection we observed originated mainly in ACC, with a lighter contribution from the MCC. In a very interesting manner, the topography we observed within the cingulo-PAG pathway was quite identical in the SC: areas 24a/24a` innervated almost exclusively the middle part of the SC, overlying the PAGdl, while areas 24b/24b` targeted a more lateral part, above the PAGl. This mediolateral gradient may correspond to a functional segregation, where the medial half of the SC is involved in defensive orienting behaviors while its lateral part underlies approaches (Comoli et al. 2012; Dean et al. 1986; Sahibzada et al. 1986). Moreover, the dorsal part of the PAG and the SC DpG, both heavily innervated by ACC areas, have been proposed to play a role in defensive behaviors in rats like jumping, running or micturition (Vargas et al. 2000).

Projections to dopaminergic centers such as the SNc and the VTA were light and originating mainly from area 24b and to a lesser extent 24a. This light projection, especially to the VTA, is consistent with rat's studies reporting a moderate ACC-VTA projection (Gabbott et al. 2005; Geisler and Zahm 2005; Sesack et al. 1989). This can be put in parallel with our previous paper, also showing a light projection in mice from the VTA to the ACC than in rats (Fillinger et al. 2017). Further anatomical investigation of this projection in mice is needed to allow a better comparison with studies in the rat. In addition, we found dense 24a/24b efferents to serotoninergic regions of the midbrain, mainly to the MnR, the pMnR and the DR, in accordance to previous tracing experiments in the rat (Behzadi et al. 1990; Gabbott et al. 2005; Jankowski and Sesack 2004; Peyron et al. 1998; Sesack et al. 1989). We did not detailed the topography of this specific connectivity, but other studies show that ventral and lateral parts of the DR are innervated by the LO and the MO respectively, the dorsal part by the IL and the rostral lateral part by 24a/24b (Hurley et al. 1991; Peyron et al. 1998; Sesack et al. 1989; Wyss and Sripanidkulchai 1984). Therefore, the frontal cortex reciprocally connected with these dopaminergic and monoaminergic centers (Fillinger et al. 2017; Gabbott et al. 2005; Hoover and Vertes 2007; Sesack et

al. 1989) could play a crucial role in mood regulation as a miscommunication of this loop might lead to pathologies such as mood disorders.

Beside the cingulate contribution to the well-described cortical projections to the pontine nuclei (Wiesendanger and Wiesendanger 1982; Wyss and Sripanidkulchai 1984), two other pontine regions received a significant projection from ACC and MCC. The cholinergic LDTg and the GABAergic CG, also known as nucleus incertus, have been suggested to participate to arousal via multiple ascending projections (Cornwall et al. 1990; Goto et al. 2001; Ryan et al. 2011; Semba and Fibiger 1992). Finally, cingulate inputs to the reticular formation gradually decreased along the rostrocaudal axis. Thus, while all four areas projected to the MRt, inputs to the PnO were dominated by 24b, and less densely by 24a. More caudal regions such as PnC and medullary regions received a light input originating exclusively from 24b. These results suggest a predominant impact on 24b of somatomotor and visceromotor integration in the lower stages of processing. Finally, descending 24b axons were found in the ipsilateral medullary pyramid, extending up to the cervical and thoracic segments of the spinal cord, as also reported in rats (Gabbott et al. 2012; Gabbott et al. 2005).

Conclusions

In this study, we provided for the first time a complete cartography of ACC areas 24a and 24b and MCC areas 24a` and 24b` efferents in mice. The identification of the MCC in rodents is recent (Vogt and Paxinos 2014; Vogt et al. 2004), thus explaining the lack of information about its connectivity and by extension its functionality. Interestingly, despite differences in topography, we observed a cingulate signature of common projections from both ACC and MCC such as strong output to other cingulate regions, the anterior and associated lateral thalamic nuclei and midbrain regions. This circuit we highlighted can by associated with the so called medial network described in rodents (Bota et al. 2015; Floyd et al. 2001; Oh et al. 2014; Zhang et al. 2016a; Zingg et al. 2014) and primates (Carmichael and Price 1995a; Carmichael and Price 1996; Ongur and Price 2000), involved in the selection of the right adaptive behavioral strategy in accordance with sensory and visceral information provided by the parallel orbital network (Price et al. 1996; Zhang et al. 2016a; Zingg et al. 2014).

Additionally, we observed density and topographic differences between ACC and MCC projections, potentially able to underlie functional segregation. Indeed, in accordance with its preferential projections to the RS, the associative visual cortex (V2M, V2L), the associative visual thalamus (AV, AD, LP, LD) and the SC, the MCC might be able to underlie attentional and visuospatial orientation processes necessary for behavioral response selection (Bush 2009; Vogt 2015; Vogt 2016). By a comparable efferent pattern, but with a different topography, the ACC could participate in the same global function. However by their denser and more various other projections, areas 24a and 24b would also be involved in additional specific functions, supported by the dorsoventral gradient we reported in their connectivity. The preferental projections of 24b to premotor and motor regions (M2, CPu, ventral nuclei of the thalamus, ZI, SC, caudal brainstem and spinal cord) may support its implication in the motor aspect of the behavioral response, while the preferred projections of 24a to autonomic and limbic regions (hypothalamus, PV, PT) could underlie the association of an emotional state to an action. It is interesting to note that the dorsoventral specificities we observed among ACC areas, and in a lesser extent among MCC areas, match the dorsoventral connectomic and functional dichotomy described in the mPFC (Bissonette et al. 2013; Christakou et al. 2004; Dalley et al. 2004; Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Morgan and LeDoux 1995; Neafsey et al. 1993; Vertes 2004). It should be noted that, beside their typical cingulate efferent pattern, the areas 24a and 24b, especially their rostral part, but not 24a` and 24b`, sent efferents classically associated to the mPFC, such as to the MD or dopaminergic centers. While it has been largely explored in rat, it would then be necessary to disclose the connectivity of areas 32 and 25 in mice. The elucidation of the connectome of all the areas composing the mouse ACC is required to explore its role of ACC in affective and cognitive functions, as well as in preclinical models of pathologies such as chronic pain, anxiety or depression.

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (contract UPR3212), the University of Strasbourg and by a NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Aggleton JP, Hunt PR, Nagle S, Neave N (1996) The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. Behav Brain Res 81:189-198

Aggleton JP, Neave N, Nagle S, Sahgal A (1995) A comparison of the effects of medial prefrontal, cingulate cortex, and cingulum bundle lesions on tests of spatial memory: evidence of a double dissociation between frontal and cingulum bundle contributions. J Neurosci 15:7270-7281

Aggleton JP, Nelson AJ (2015) Why do lesions in the rodent anterior thalamic nuclei cause such severe spatial deficits? Neurosci Biobehav Rev 54:131-144

Aggleton JP, O'Mara SM, Vann SD, Wright NF, Tsanov M, Erichsen JT (2010) Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. Eur J Neurosci 31:2292-2307

Amano T, Unal CT, Pare D (2010) Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. Nat Neurosci 13:489-494

Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. Eur J Pain 9:463-484

Atlan G, Terem A, Peretz-Rivlin N, Groysman M, Citri A (2017) Mapping synaptic cortico-claustral connectivity in the mouse. J Comp Neurol 525:1381-1402

Bandler R, Keay KA (1996) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. Prog Brain Res 107:285-300

Bandler R, Price JL, Keay KA (2000) Brain mediation of active and passive emotional coping. Prog Brain Res 122:333-349

Bandler R, Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? Trends Neurosci 17:379-389

Barthas F, Kwan AC (2017) Secondary Motor Cortex: Where 'Sensory' Meets 'Motor' in the Rodent Frontal Cortex. Trends Neurosci 40:181-193

Barthas F, Sellmeijer J, Hugel S, Waltisperger E, Barrot M, Yalcin I (2015) The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression. Biol Psychiatry 77:236-245

Behzadi G, Kalen P, Parvopassu F, Wiklund L (1990) Afferents to the median raphe nucleus of the rat: retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish peroxidase tracing, and selective D-[3H]aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs. Neuroscience 37:77-100

Bissonette GB, Powell EM, Roesch MR (2013) Neural structures underlying set-shifting: roles of medial prefrontal cortex and anterior cingulate cortex. Behav Brain Res 250:91-101

Bota M, Sporns O, Swanson LW (2015) Architecture of the cerebral cortical association connectome underlying cognition. Proc Natl Acad Sci U S A 112:E2093-2101

Brecht M, Krauss A, Muhammad S, Sinai-Esfahani L, Bellanca S, Margrie TW (2004) Organization of rat vibrissa motor cortex and adjacent areas according to cytoarchitectonics, microstimulation, and intracellular stimulation of identified cells. J Comp Neurol 479:360-373

Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. J Comp Neurol 338:255-278

Bush G (2009) Dorsal anterior midcingulate cortex : roles in normal cognition and disruption in attebntion-deficit/hyperactivity disorder In: Vogt BA (ed) Neurobiology of cingulate cortex and disease. Oxford University Press, New York, pp 245-274

Bush G, Luu P, Posner MI (2000) Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. Trends Cogn Sci 4:215-222

Bush G, Vogt BA, Holmes J, Dale AM, Greve D, Jenike MA, Rosen BR (2002) Dorsal anterior cingulate cortex: a role in reward-based decision making. Proc Natl Acad Sci U S A 99:523-528

Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. Brain Res 513:43-59

Carlson JM, Beacher F, Reinke KS, Habib R, Harmon-Jones E, Mujica-Parodi LR, Hajcak G (2012) Nonconscious attention bias to threat is correlated with anterior cingulate cortex gray matter volume: a voxel-based morphometry result and replication. Neuroimage 59:1713-1718

Carmichael ST, Price JL (1995) Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. J Comp Neurol 363:615-641

Carmichael ST, Price JL (1996) Connectional networks within the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. J Comp Neurol 371:179-207

Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. Behav Brain Res 58:27-47

Cassell MD, Wright DJ (1986) Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat. Brain Res Bull 17:321-333

Chen S, Su HS (1990) Afferent connections of the thalamic paraventricular and parataenial nuclei in the rat--a retrograde tracing study with iontophoretic application of Fluoro-Gold. Brain Res 522:1-6

Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2013) The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task

requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. J Neurosci 33:8772-8783

Christakou A, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Prefrontal cortical-ventral striatal interactions involved in affective modulation of attentional performance: implications for corticostriatal circuit function. J Neurosci 24:773-780

Chudasama Y, Baunez C, Robbins TW (2003) Functional disconnection of the medial prefrontal cortex and subthalamic nucleus in attentional performance: evidence for corticosubthalamic interaction. J Neurosci 23:5477-5485

Comoli E, Das Neves Favaro P, Vautrelle N, Leriche M, Overton PG, Redgrave P (2012) Segregated anatomical input to sub-regions of the rodent superior colliculus associated with approach and defense. Front Neuroanat 6:9

Conde F, Audinat E, Maire-Lepoivre E, Crepel F (1990) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. Brain Res Bull 24:341-354

Conte WL, Kamishina H, Corwin JV, Reep RL (2008) Topography in the projections of lateral posterior thalamus with cingulate and medial agranular cortex in relation to circuitry for directed attention and neglect. Brain Res 1240:87-95

Cooper BG, Manka TF, Mizumori SJ (2001) Finding your way in the dark: the retrosplenial cortex contributes to spatial memory and navigation without visual cues. Behav Neurosci 115:1012-1028

Corcoran KA, Frick BJ, Radulovic J, Kay LM (2016) Analysis of coherent activity between retrosplenial cortex, hippocampus, thalamus, and anterior cingulate cortex during retrieval of recent and remote context fear memory. Neurobiol Learn Mem 127:93-101

Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. Brain Res Bull 25:271-284

Cornwall J, Phillipson OT (1988) Afferent projections to the dorsal thalamus of the rat as shown by retrograde lectin transport--I. The mediodorsal nucleus. Neuroscience 24:1035-1049

Corwin JV, Kanter S, Watson RT, Heilman KM, Valenstein E, Hashimoto A (1986) Apomorphine has a therapeutic effect on neglect produced by unilateral dorsomedial prefrontal cortex lesions in rats. Exp Neurol 94:683-698

Courtin J, Bienvenu TC, Einarsson EO, Herry C (2013) Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. Neuroscience 240:219-242

Cowan WM, Powell TP (1956) A note on terminal degeneration in the hypothalamus. J Anat 90:188-192

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. Neurosci Biobehav Rev 28:771-784

Dean P, Redgrave P, Sahibzada N, Tsuji K (1986) Head and body movements produced by electrical stimulation of superior colliculus in rats: effects of interruption of crossed tectoreticulospinal pathway. Neuroscience 19:367-380

Delatour B, Witter MP (2002) Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat: evidence of multiple pathways. Eur J Neurosci 15:1400-1407

Deng Y, Lanciego J, Kerkerian-Le-Goff L, Coulon P, Salin P, Kachidian P, Lei W, Del Mar N, Reiner A (2015) Differential organization of cortical inputs to striatal projection neurons of the matrix compartment in rats. Front Syst Neurosci 9:51

Domesick VB (1969) Projections from the cingulate cortex in the rat. Brain Res 12:296-320

Einarsson EO, Pors J, Nader K (2015) Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. Neuropsychopharmacology 40:480-487

Eleore L, Lopez-Ramos JC, Guerra-Narbona R, Delgado-Garcia JM (2011) Role of reuniens nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. PLoS One 6:e23538

Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P (2017) Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse. Brain Struct Funct 222:1509-1532

Fisk GD, Wyss JM (1999) Associational projections of the anterior midline cortex in the rat: intracingulate and retrosplenial connections. Brain Res 825:1-13

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2000) Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. J Comp Neurol 422:556-578

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2001) Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. J Comp Neurol 432:307-328

Friedman A, Homma D, Gibb LG, Amemori K, Rubin SJ, Hood AS, Riad MH, Graybiel AM (2015) A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict. Cell 161:1320-1333

Furuyashiki T, Gallagher M (2007) Neural encoding in the orbitofrontal cortex related to goal-directed behavior. Ann N Y Acad Sci 1121:193-215

Gabbott P, Warner TA, Brown J, Salway P, Gabbott T, Busby S (2012) Amygdala afferents monosynaptically innervate corticospinal neurons in rat medial prefrontal cortex. J Comp Neurol 520:2440-2458

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. J Comp Neurol 492:145-177

Geisler S, Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. J Comp Neurol 490:270-294

Goll Y, Atlan G, Citri A (2015) Attention: the claustrum. Trends Neurosci 38:486-495

Goto M, Swanson LW, Canteras NS (2001) Connections of the nucleus incertus. J Comp Neurol 438:86-122

Greatrex RM, Phillipson OT (1982) Demonstration of synaptic input from prefrontal cortex to the habenula i the rat. Brain Res 238:192-197

Groenewegen HJ, Wouterlood FG, Uylings HBM (2017) Organization of prefrontal-striatal connections. In: Handbook of basal ganglia structure and function. 2 edn. Academic Press, San Diego, pp 423-436

Hallock HL, Wang A, Shaw CL, Griffin AL (2013) Transient inactivation of the thalamic nucleus reuniens and rhomboid nucleus produces deficits of a working-memory dependent tactile-visual conditional discrimination task. Behav Neurosci 127:860-866

Hardy SG (1986) Projections to the midbrain from the medial versus lateral prefrontal cortices of the rat. Neurosci Lett 63:159-164

Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev 27:555-579

Heilbronner SR, Rodriguez-Romaguera J, Quirk GJ, Groenewegen HJ, Haber SN (2016) Circuit-Based Corticostriatal Homologies Between Rat and Primate. Biol Psychiatry 80:509-521

Herkenham M (1978) The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. J Comp Neurol 177:589-610

Hindley EL, Nelson AJ, Aggleton JP, Vann SD (2014) The rat retrosplenial cortex is required when visual cues are used flexibly to determine location. Behav Brain Res 263:98-107

Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. Brain Struct Funct 212:149-179

Hoover WB, Vertes RP (2011) Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. J Comp Neurol 519:3766-3801

Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. Brain Struct Funct 217:191-209

Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. J Comp Neurol 308:249-276

Ito HT, Zhang SJ, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2015) A prefrontal-thalamo-hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. Nature 522:50-55

Jankowski MP, Sesack SR (2004) Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. J Comp Neurol 468:518-529

Johansen JP, Fields HL, Manning BH (2001) The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 98:8077-8082

Jones BF, Groenewegen HJ, Witter MP (2005) Intrinsic connections of the cingulate cortex in the rat suggest the existence of multiple functionally segregated networks. Neuroscience 133:193-207

Kamishina H, Conte WL, Patel SS, Tai RJ, Corwin JV, Reep RL (2009) Cortical connections of the rat lateral posterior thalamic nucleus. Brain Res 1264:39-56

Kang SJ, Kwak C, Lee J, Sim SE, Shim J, Choi T, Collingridge GL, Zhuo M, Kaang BK (2015) Bidirectional modulation of hyperalgesia via the specific control of excitatory and inhibitory neuronal activity in the ACC. Mol Brain 8:81

Keay KA, Bandler R (2015) Periaqueductal gray. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 4 edn. Elsevier, San Diego, pp 207-216

Kim J, Wasserman EA, Castro L, Freeman JH (2016) Anterior cingulate cortex inactivation impairs rodent visual selective attention and prospective memory. Behav Neurosci 130:75-90

Kim U, Lee T (2012) Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat. Eur J Neurosci 35:1253-1269

Kita T, Osten P, Kita H (2014) Rat subthalamic nucleus and zona incerta share extensively overlapped representations of cortical functional territories. J Comp Neurol 522:4043-4056

Knapska E, Macias M, Mikosz M, Nowak A, Owczarek D, Wawrzyniak M, Pieprzyk M, Cymerman IA, Werka T, Sheng M, Maren S, Jaworski J, Kaczmarek L (2012) Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. Proc Natl Acad Sci U S A 109:17093-17098

Koike H, Demars MP, Short JA, Nabel EM, Akbarian S, Baxter MG, Morishita H (2016) Chemogenetic Inactivation of Dorsal Anterior Cingulate Cortex Neurons Disrupts Attentional Behavior in Mouse. Neuropsychopharmacology 41:1014-1023

Kolb B, Pellis S, Robinson TE (2004) Plasticity and functions of the orbital frontal cortex. Brain Cogn 55:104-115

Kolmac CI, Power BD, Mitrofanis J (1998) Patterns of connections between zona incerta and brainstem in rats. J Comp Neurol 396:544-555

Kolomiets BP, Deniau JM, Mailly P, Menetrey A, Glowinski J, Thierry AM (2001) Segregation and convergence of information flow through the cortico-subthalamic pathways. J Neurosci 21:5764-5772

Krettek JE, Price JL (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J Comp Neurol 171:157-191

Kuljis RO, Fernandez V (1982) On the organization of the retino-tecto-thalamo-telencephalic pathways in a Chilean rodent; the Octodon degus. Brain Res 234:189-204

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23:155-184

Leonard CM (1969) The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. Brain Res 12:321-343

Li M, Long C, Yang L (2015) Hippocampal-prefrontal circuit and disrupted functional connectivity in psychiatric and neurodegenerative disorders. Biomed Res Int 2015:810548

Likhtik E, Paz R (2015) Amygdala-prefrontal interactions in (mal)adaptive learning. Trends Neurosci 38:158-166

Lindner K, Neubert J, Pfannmoller J, Lotze M, Hamm AO, Wendt J (2015) Fear-potentiated startle processing in humans: Parallel fMRI and orbicularis EMG assessment during cue conditioning and extinction. Int J Psychophysiol 98:535-545

Livneh U, Paz R (2012) Amygdala-prefrontal synchronization underlies resistance to extinction of aversive memories. Neuron 75:133-142

Mailly P, Aliane V, Groenewegen HJ, Haber SN, Deniau JM (2013) The rat prefrontostriatal system analyzed in 3D: evidence for multiple interacting functional units. J Neurosci 33:5718-5727

Marchand JE, Hagino N (1983) Afferents to the periaqueductal gray in the rat. A horseradish peroxidase study. Neuroscience 9:95-106

Mathiasen ML, Dillingham CM, Kinnavane L, Powell AL, Aggleton JP (2017) Asymmetric cross-hemispheric connections link the rat anterior thalamic nuclei with the cortex and hippocampal formation. Neuroscience 349:128-143

Mathis V, Barbelivien A, Majchrzak M, Mathis C, Cassel JC, Lecourtier L (2016) The Lateral Habenula as a Relay of Cortical Information to Process Working Memory. Cereb Cortex:1-11

Mathur BN (2014) The claustrum in review. Front Syst Neurosci 8:48

Matyas F, Lee J, Shin HS, Acsady L (2014) The fear circuit of the mouse forebrain: connections between the mediodorsal thalamus, frontal cortices and basolateral amygdala. Eur J Neurosci 39:1810-1823

May PJ (2006) The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. Prog Brain Res 151:321-378

McKenna JT, Vertes RP (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. J Comp Neurol 480:115-142

Mitrofanis J, Mikuletic L (1999) Organisation of the cortical projection to the zona incerta of the thalamus. J Comp Neurol 412:173-185

Morgan MA, LeDoux JE (1995) Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. Behav Neurosci 109:681-688

Neafsey EJ, Terreberry RR, Hurley KM, Ruit KG, Frysztak RJ (1993) Anterior cingulate cortex in rodents: connectionn, visceral control functions, and implications for emotion. In: Vogt BA, Gabriel M (eds) Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus: a comprehensive handbook. Boston, pp 206-223

Newman LA, Creer DJ, McGaughy JA (2015) Cognitive control and the anterior cingulate cortex: how conflicting stimuli affect attentional control in the rat. J Physiol Paris 109:95-103

Nicolelis MA, Chapin JK, Lin RC (1992) Somatotopic maps within the zona incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, superior colliculus, and brainstem. Brain Res 577:134-141

Oh SW, Harris JA, Ng L, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, Kuan L, Henry AM, Mortrud MT, Ouellette B, Nguyen TN, Sorensen SA, Slaughterbeck CR, Wakeman W, Li Y, Feng D, Ho A, Nicholas E, Hirokawa KE, Bohn P, Joines KM, Peng H, Hawrylycz MJ, Phillips JW, Hohmann JG, Wohnoutka P, Gerfen CR, Koch C, Bernard A, Dang C, Jones AR, Zeng H (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. Nature 508:207-214

Olucha-Bordonau FE, Fortes-Marco L, Otero-Garcia M, Lanuza E, Martinez-Garcia F (2015) Amygdala:strcture and function. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 4 edn. CA: Academic, San Diego, pp 441-490

Ongur D, An X, Price JL (1998) Prefrontal cortical projections to the hypothalamus in macaque monkeys. J Comp Neurol 401:480-505

Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. Cereb Cortex 10:206-219

Ottersen OP (1982) Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. J Comp Neurol 205:30-48

Pastoriza LN, Morrow TJ, Casey KL (1996) Medial frontal cortex lesions selectively attenuate the hot plate response: possible nocifensive apraxia in the rat. Pain 64:11-17

Paxinos G, Franklin KBJ (2012) Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. 4 edn. Academic Press,

Paxinos G, Watson C (2014) Paxinos and Watson's The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press,

Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. Neuroscience 82:443-468

Price JL, Carmichael ST, Drevets WC (1996) Networks related to the orbital and medial prefrontal cortex; a substrate for emotional behavior? Prog Brain Res 107:523-536

Rajasethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, Berndt A, Ramakrishnan C, Jaffe A, Lo M, Liston C, Deisseroth K (2015) Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. Nature 526:653-659

Ray JP, Russchen FT, Fuller TA, Price JL (1992) Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the mediodorsal nucleus of the thalamus in the rat. J Comp Neurol 320:435-456

Reep RL, Goodwin GS, Corwin JV (1990) Topographic organization in the corticocortical connections of medial agranular cortex in rats. J Comp Neurol 294:262-280

Reppucci CJ, Petrovich GD (2016) Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: a single and double retrograde tracing study in rats. Brain Struct Funct 221:2937-2962

Reser DH, Richardson KE, Montibeller MO, Zhao S, Chan JM, Soares JG, Chaplin TA, Gattass R, Rosa MG (2014) Claustrum projections to prefrontal cortex in the capuchin monkey (Cebus apella). Front Syst Neurosci 8:123

Risold PY, Thompson RH, Swanson LW (1997) The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. Brain Res Brain Res Rev 24:197-254

Ryan PJ, Ma S, Olucha-Bordonau FE, Gundlach AL (2011) Nucleus incertus--an emerging modulatory role in arousal, stress and memory. Neurosci Biobehav Rev 35:1326-1341

Sahibzada N, Dean P, Redgrave P (1986) Movements resembling orientation or avoidance elicited by electrical stimulation of the superior colliculus in rats. J Neurosci 6:723-733

Schoenbaum G, Roesch MR, Stalnaker TA, Takahashi YK (2009) A new perspective on the role of the orbitofrontal cortex in adaptive behaviour. Nat Rev Neurosci 10:885-892

Semba K, Fibiger HC (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. J Comp Neurol 323:387-410

Senn V, Wolff SB, Herry C, Grenier F, Ehrlich I, Grundemann J, Fadok JP, Muller C, Letzkus JJ, Luthi A (2014) Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. Neuron 81:428-437

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. J Comp Neurol 290:213-242

Shackman AJ, Salomons TV, Slagter HA, Fox AS, Winter JJ, Davidson RJ (2011) The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. Nat Rev Neurosci 12:154-167

Shenhav A, Straccia MA, Cohen JD, Botvinick MM (2014) Anterior cingulate engagement in a foraging context reflects choice difficulty, not foraging value. Nat Neurosci 17:1249-1254

Shibata H, Naito J (2005) Organization of anterior cingulate and frontal cortical projections to the anterior and laterodorsal thalamic nuclei in the rat. Brain Res 1059:93-103

Shibata H, Naito J (2008) Organization of anterior cingulate and frontal cortical projections to the retrosplenial cortex in the rat. J Comp Neurol 506:30-45

Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology 36:529-538

Smith JB, Alloway KD (2014) Interhemispheric claustral circuits coordinate sensory and motor cortical areas that regulate exploratory behaviors. Front Syst Neurosci 8:93

Smythies J, Edelstein L, Ramachandran V (2012) Hypotheses relating to the function of the claustrum. Front Integr Neurosci 6:53

Smythies J, Edelstein L, Ramachandran V (2014) Hypotheses relating to the function of the claustrum II: does the claustrum use frequency codes? Front Integr Neurosci 8:7

Sotres-Bayon F, Sierra-Mercado D, Pardilla-Delgado E, Quirk GJ (2012) Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. Neuron 76:804-812

Takada M (1992) The lateroposterior thalamic nucleus and substantia nigra pars lateralis: origin of dual innervation over the visual system and basal ganglia. Neurosci Lett 139:153-156

Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. Brain Res Brain Res Rev 39:107-140

Van Eden CG, Uylings HB (1985) Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. J Comp Neurol 241:253-267

van Groen T, Kadish I, Michael Wyss J (2002a) Role of the anterodorsal and anteroventral nuclei of the thalamus in spatial memory in the rat. Behav Brain Res 132:19-28

van Groen T, Kadish I, Wyss JM (2002b) The role of the laterodorsal nucleus of the thalamus in spatial learning and memory in the rat. Behav Brain Res 136:329-337

van Groen T, Wyss JM (1990) Connections of the retrosplenial granular a cortex in the rat. J Comp Neurol 300:593-606

van Groen T, Wyss JM (1992) Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat. J Comp Neurol 315:200-216

Vann SD, Kristina Wilton LA, Muir JL, Aggleton JP (2003) Testing the importance of the caudal retrosplenial cortex for spatial memory in rats. Behav Brain Res 140:107-118

Varela C, Kumar S, Yang JY, Wilson MA (2014) Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. Brain Struct Funct 219:911-929

Vargas LC, Marques TA, Schenberg LC (2000) Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. Neurosci Lett 280:45-48

Vertes RP (2002) Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. J Comp Neurol 442:163-187

Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse 51:32-58

Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neuroscience 142:1-20

Vertes RP, Linley SB, Hoover WB (2015) Limbic circuitry of the midline thalamus. Neurosci Biobehav Rev 54:89-107

Vogt BA (1993) Structural organization of cingulate cortex: areas, neurons, and somatodendritic transmitter receptors. In: Vogt BA, Gabriel M (eds) Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus. Birkhaüser, Boston,

Vogt BA (2009) Regions and subregions of the cingulate cortex. In: Cingulate neurobiology and disease. Oxford University Press, New York, pp 3-26

Vogt BA (2015) Cingulate cortex and pain architecture. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 4 edn. Elsevier, San Diego, pp 575-596

Vogt BA (2016) Midcingulate cortex: Structure, connections, homologies, functions and diseases. J Chem Neuroanat 74:28-46

Vogt BA, Miller MW (1983) Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. J Comp Neurol 216:192-210

Vogt BA, Nimchinsky EA, Vogt LJ, Hof PR (1995) Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. J Comp Neurol 359:490-506

Vogt BA, Pandya DN, Rosene DL (1987) Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. J Comp Neurol 262:256-270

Vogt BA, Paxinos G (2014) Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. Brain Struct Funct 219:185-192

Vogt BA, Vogt L (2003) Cytology of human dorsal midcingulate and supplementary motor cortices. J Chem Neuroanat 26:301-309

Vogt BA, Vogt L, Farber NB (2004) Cingulate cortex and models of disease. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 3 edn. Elsevier academic press, San Diego, pp 705-727

Vogt BA, Vogt L, Farber NB, Bush G (2005) Architecture and neurocytology of monkey cingulate gyrus. J Comp Neurol 485:218-239

Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. Trends Neurosci 27:468-474

Wang Q, Ng L, Harris JA, Feng D, Li Y, Royall JJ, Oh SW, Bernard A, Sunkin SM, Koch C, Zeng H (2017) Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse. J Comp Neurol 525:1317-1346

White MG, Cody PA, Bubser M, Wang HD, Deutch AY, Mathur BN (2016) Cortical hierarchy governs rat claustrocortical circuit organization. J Comp Neurol

Wiesendanger R, Wiesendanger M (1982) The corticopontine system in the rat. I. Mapping of corticopontine neurons. J Comp Neurol 208:215-226

Wilber AA, Clark BJ, Demecha AJ, Mesina L, Vos JM, McNaughton BL (2014) Cortical connectivity maps reveal anatomically distinct areas in the parietal cortex of the rat. Front Neural Circuits 8:146

Wright NF, Vann SD, Erichsen JT, O'Mara SM, Aggleton JP (2013) Segregation of parallel inputs to the anteromedial and anteroventral thalamic nuclei of the rat. J Comp Neurol 521:2966-2986

Wyss JM, Sripanidkulchai K (1984) The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. Brain Res 293:1-15

Wyss JM, Van Groen T (1992) Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. Hippocampus 2:1-11

Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2004) Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. Eur J Neurosci 19:181-189

Yin HH, Ostlund SB, Knowlton BJ, Balleine BW (2005) The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. Eur J Neurosci 22:513-523

Zeng D, Stuesse SL (1993) Topographic organization of efferent projections of medial frontal cortex. Brain Res Bull 32:195-200

Zhang S, Xu M, Chang WC, Ma C, Hoang Do JP, Jeong D, Lei T, Fan JL, Dan Y (2016) Organization of long-range inputs and outputs of frontal cortex for top-down control. Nat Neurosci 19:1733-1742

Zhang S, Xu M, Kamigaki T, Hoang Do JP, Chang WC, Jenvay S, Miyamichi K, Luo L, Dan Y (2014) Selective attention. Long-range and local circuits for top-down modulation of visual cortex processing. Science 345:660-665

Zilles K, Wree A (1995) Cortex: areal and laminar structure vol 2th edition (Paxinos G, ed). Academic, San Diego

Zingg B, Hintiryan H, Gou L, Song MY, Bay M, Bienkowski MS, Foster NN, Yamashita S, Bowman I, Toga AW, Dong HW (2014) Neural networks of the mouse neocortex. Cell 156:1096-1111

Table 1 Stereotaxic coordinates

	Coordinates		
Structures	AP (mm)	L (mm)	V (mm)
R24a	+1,3	-0,35	-1,3
C24a	+0,5	-0,35	-1,1
R24b	+1,3	-0,35	-0,5
C24b	+0,5	-0,35	-0,5
24a`	-0,6	-0,35	-1,25
24b`	-0,6	-0,35	-0,45

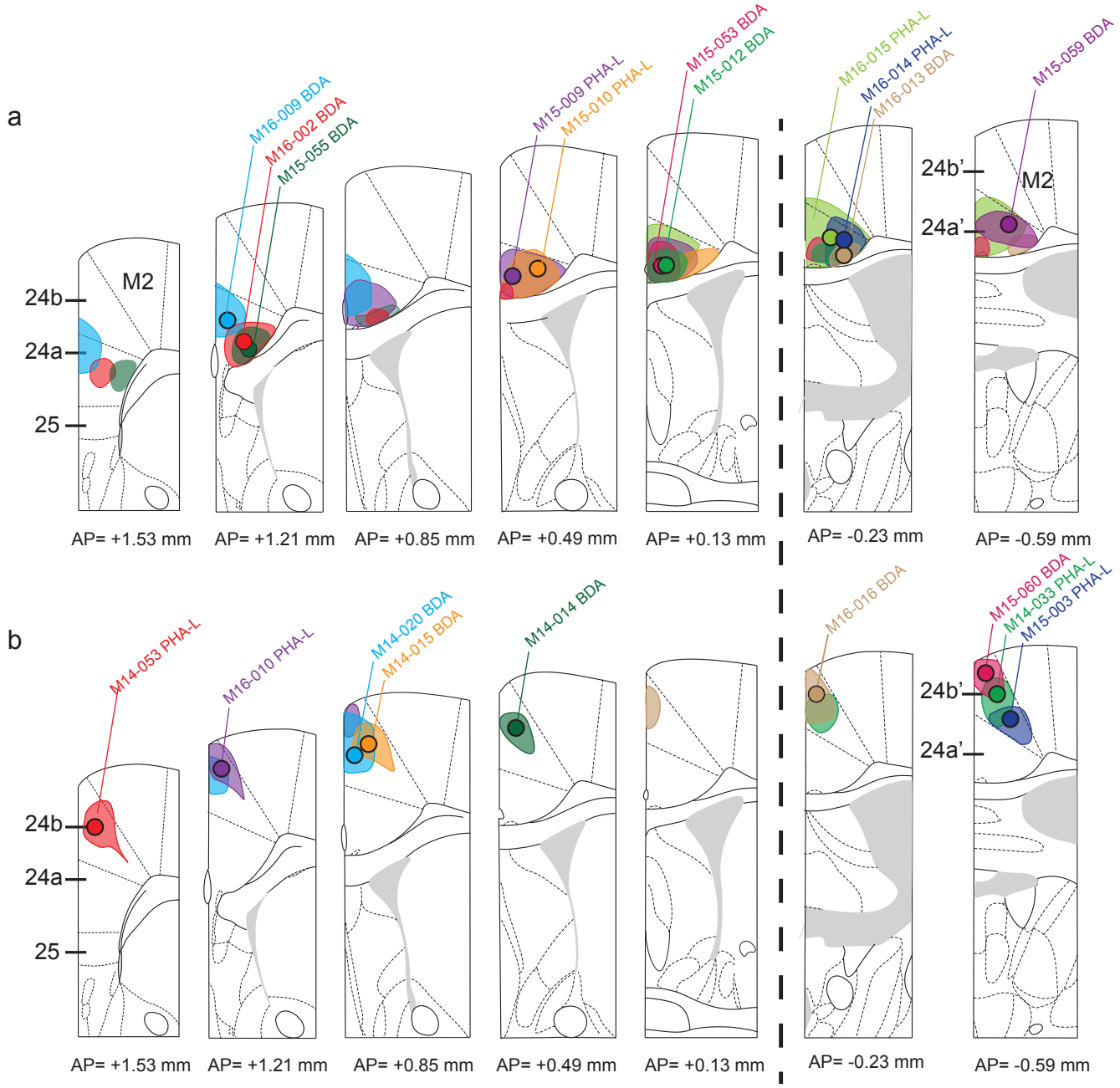


Figure 1 : PHA-L and BDA injections sites

Schematic diagrams based on plates from Paxinos and Franklin (2012) showing the localization of injection sites in areas 24a and 24a` (a) and in 24b and 24b` (b) selected for the analysis. The center of each injection sites is indicated by a colored circle and limits along the rostrocaudal axis are represented with a similar colored background. The code name of each case is indicated with the same color. Level from bregma is given below each plate. See list for abbreviations.

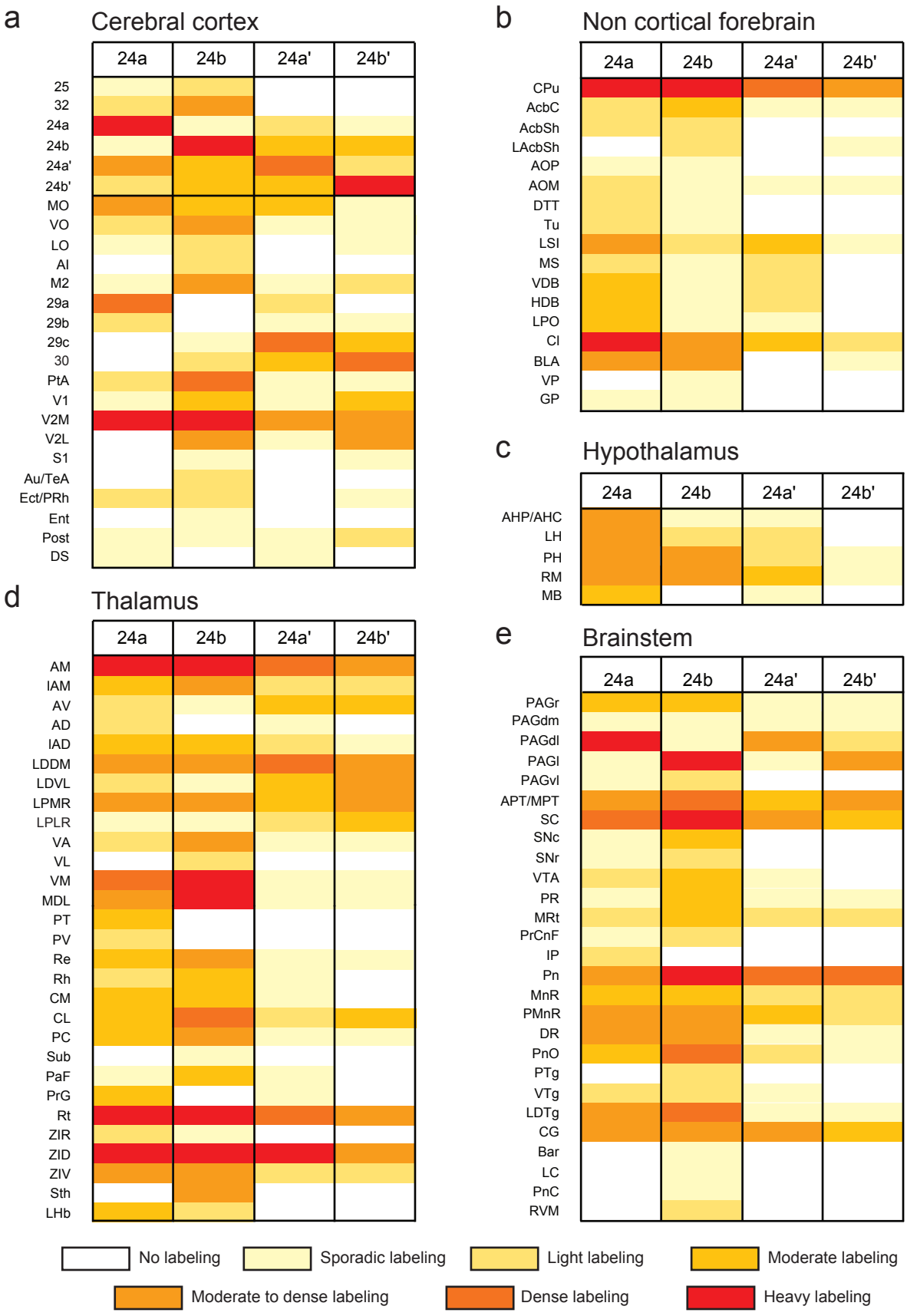


Figure 2 : Heatmap of the general pattern of outputs from areas 24a, 24b, 24a` and 24b`

The density of anterogradely labeled fibers is indicated by a color code, for each ipsilateral cortical (a), non cortical (b), hypothalamic (c), thalamic (d) and brainstem (e) structure targeted by cingulate efferents. The evaluation of the density of projections has been averaged from the semiquantitative analysis of the labeling, based on the 20 selected PHA-L or BDA cases with injection sites in 24a and 24b ACC areas and in 24a` and 24b` MCC areas (see Material and methods). See list for abbreviations.

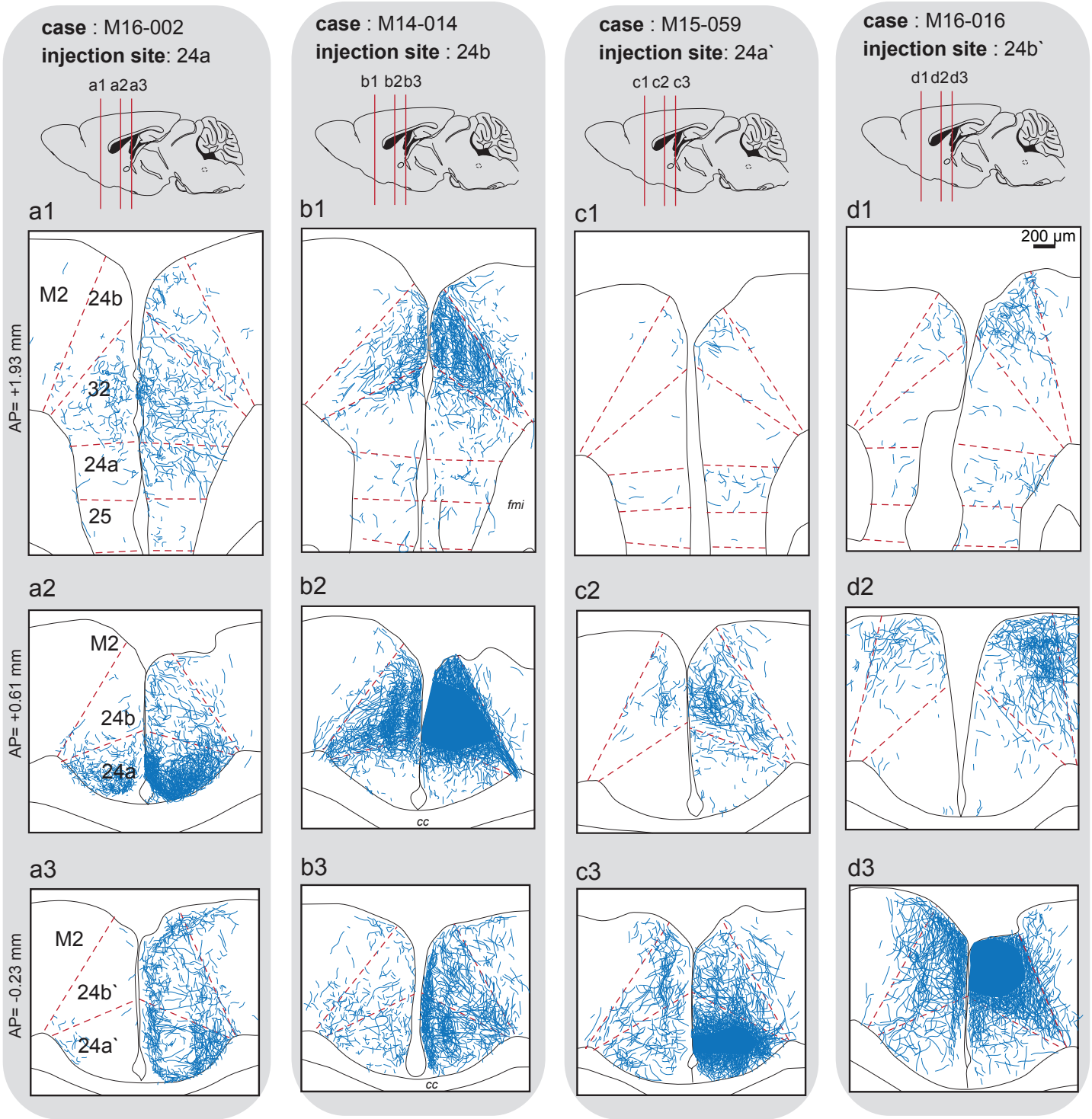


Figure 3 : Intracingulate connections

Reconstruction diagrams showing at three rostrocaudal levels (1, 2, 3) the distribution of BDA-labeled fibers in ACC and MCC after injections in 24a (a), 24b (b), 24a`(c) and 24b`(d). The approximate AP levels from bregma, estimated from Paxinos and Franklin (2012) atlas, are indicated on the left for each line and are reported on a sagittal view for each case on the top. The right side is ispilateral to the injection. When the injection site appears at the reconstructed level, its location is shown with a blue filled area. See list for abbreviations.

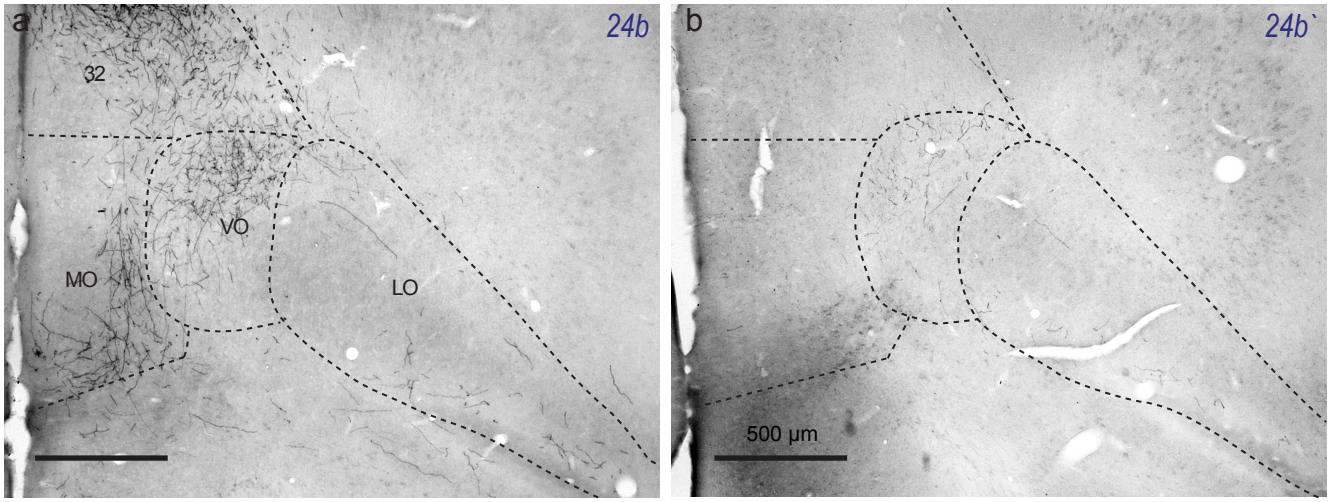


Figure 4 : 24b and 24b` projections to the orbital cortex

Distribution in the frontal cortex of PHA-L labeled fibers produced by an injection in 24b (a) and 24b` (b). The labeling in the medial (MO), ventral (VO) and lateral (LO) orbital cortices and in area 32, observed in a 24b case (a), is much reduced and even absent in area 32, in a 24b`case (b). See list for abbreviations.

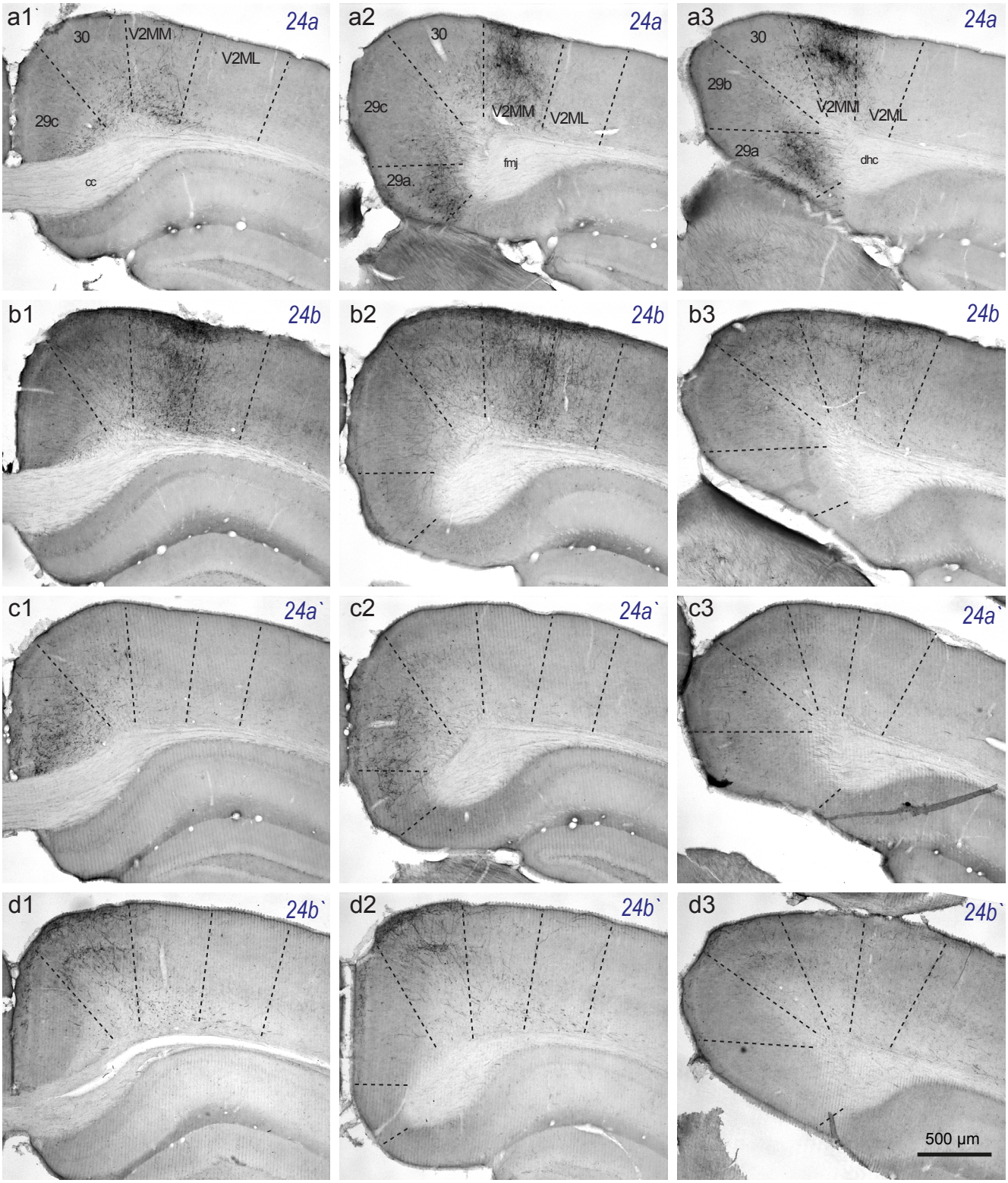


Figure 5 : ACC and MCC projections to the retrosplenial cortex (RS) and the medial secondary visual cortex (V2M)

Distribution of BDA labeled fibers in the RS after tracer injections in 24a (a1-a3), 24b (b1-b3), 24a` (c1-c3) and 24b`(d1-d3), illustrated at three different rostrocaudal levels (a1,b1,c1,d1: AP=-2.87 mm; a2,b2,c2,d2: AP=-2.79 mm; a3,b3,c3,d3: AP=-3.27 mm). The scale bar in d3 applies to all microphotographs. See list for abbreviations.

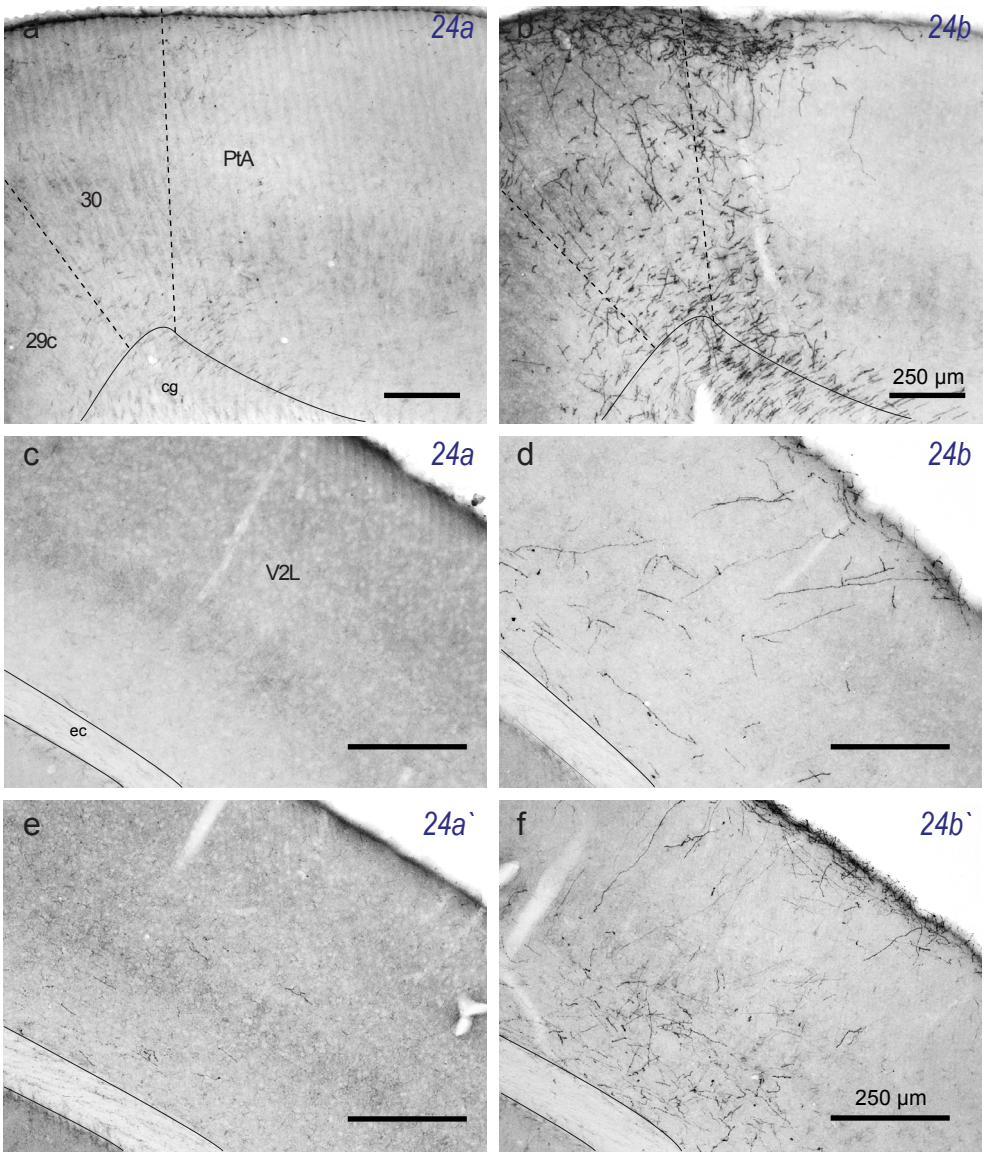


Figure 6 : ACC and MCC projections to the parietal cortex

Distribution of PHA-L labeled fibers in the associative parietal cortex (PtA) after tracer injections in 24a (a) and 24b (b), and in the lateral associative visual cortex (V2L) after injections in 24a (c), 24b (d), 24a` (e) and 24b` (f). The labeling in the PtA and in the RS area 30 is weaker in a 24a case (a) than in a 24b case (b). Similarly, no labeling is obtained after injections in 24a and 24a` (c,e) in the V2L, compared to dense labeling after injections in 24b et 24b`(d,f). See list for abbreviations.

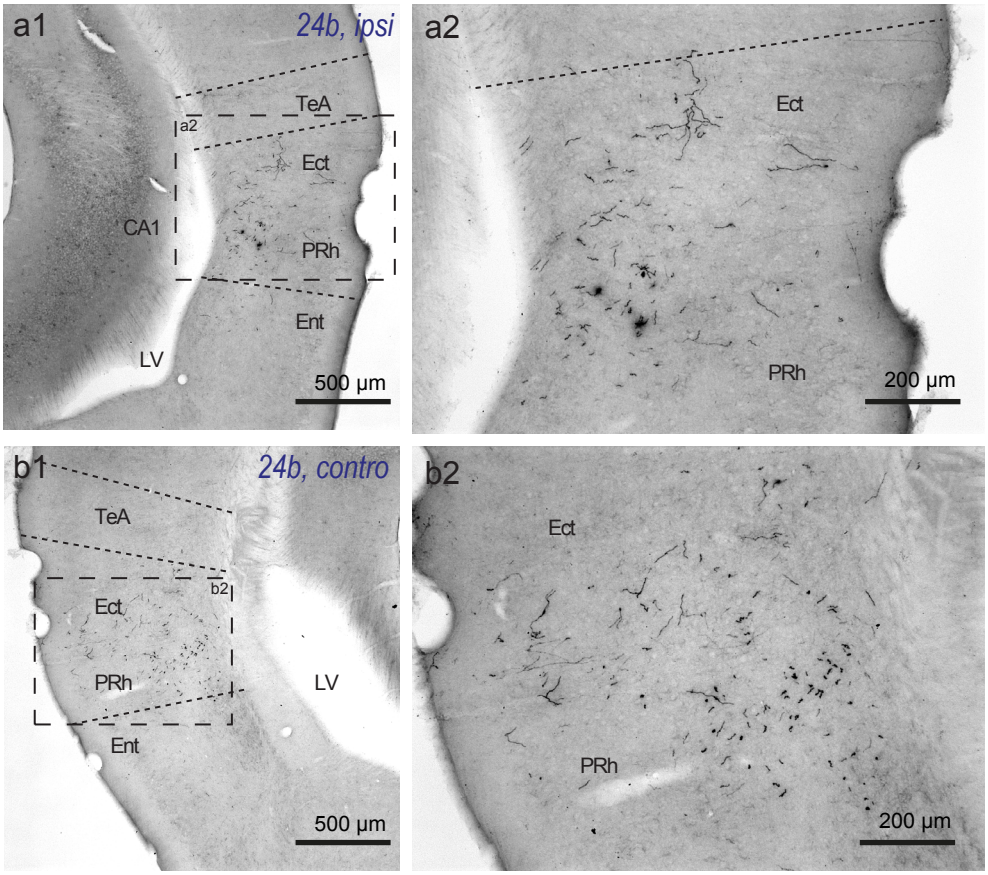


Figure 7 : Bilateral projections from area 24b to the temporal cortex

Distribution in the ipsilateral (a) and controlateral (b) temporal cortex of PHA-L labeled fibers produced by an injection in 24b. Cingulate projections originating in area 24b target the Ect, PRh and in a lesser extent the Ent. These afferents are bilateral, with an overall controlateral preference. See list for abbrevations.

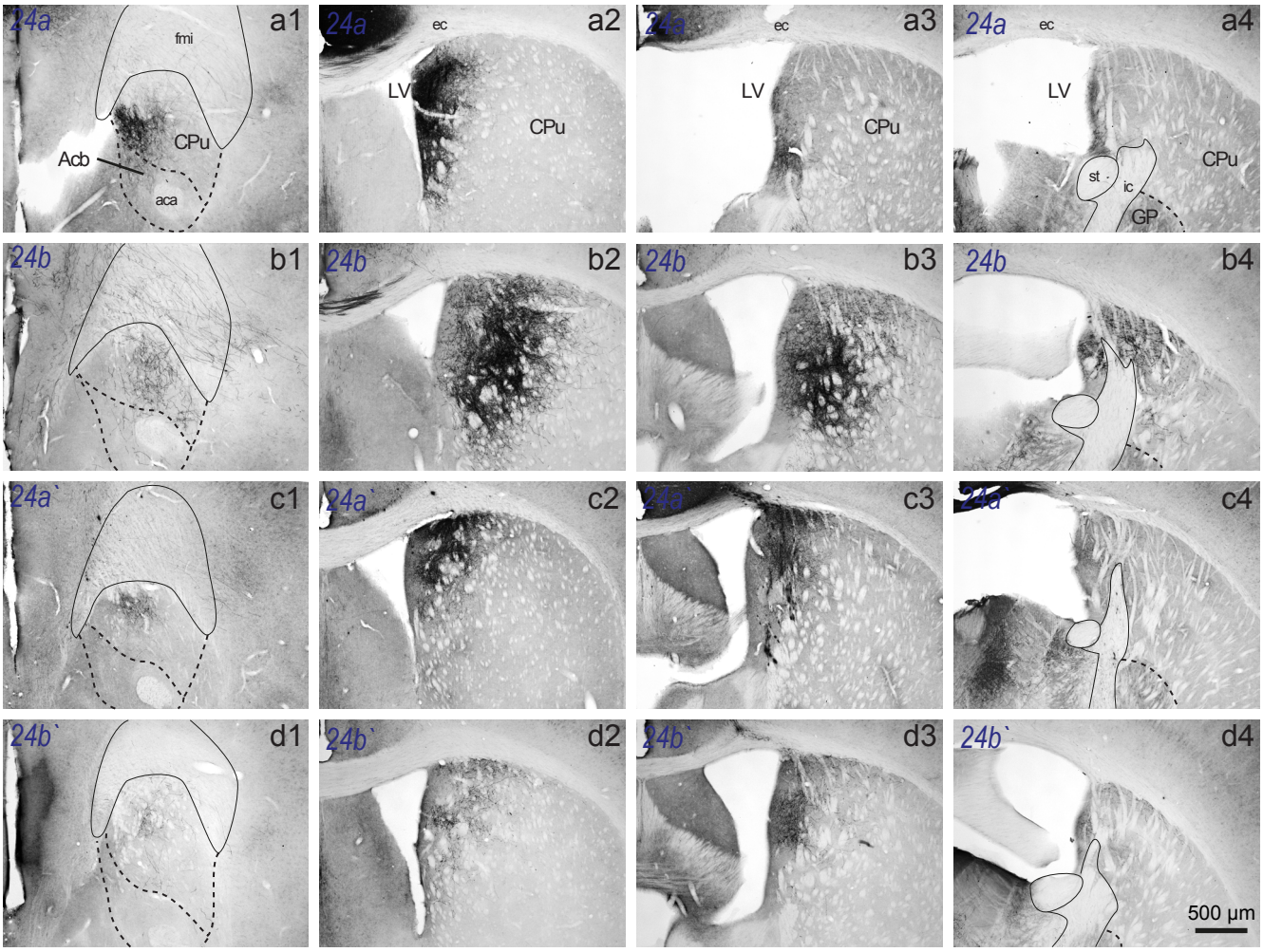


Figure 8 : ACC and MCC projections to the dorsal striatum

Distribution of PHA-L labeled fibers produced by injections in 24a (a), 24b (b), 24a`(c) and 24b`(d), illustrated at four different rostrocaudal levels (a1,b1,c1,d1: AP=+1.7 mm; a2,b2,c2,d2: AP=+0.6 mm; a3,b3,c3,d3: AP=-0.2 mm; a4,b4,c4,d4: AP=-0.6 mm). The scale bar in d4 applies to all microphotographs.See list for abbreviations

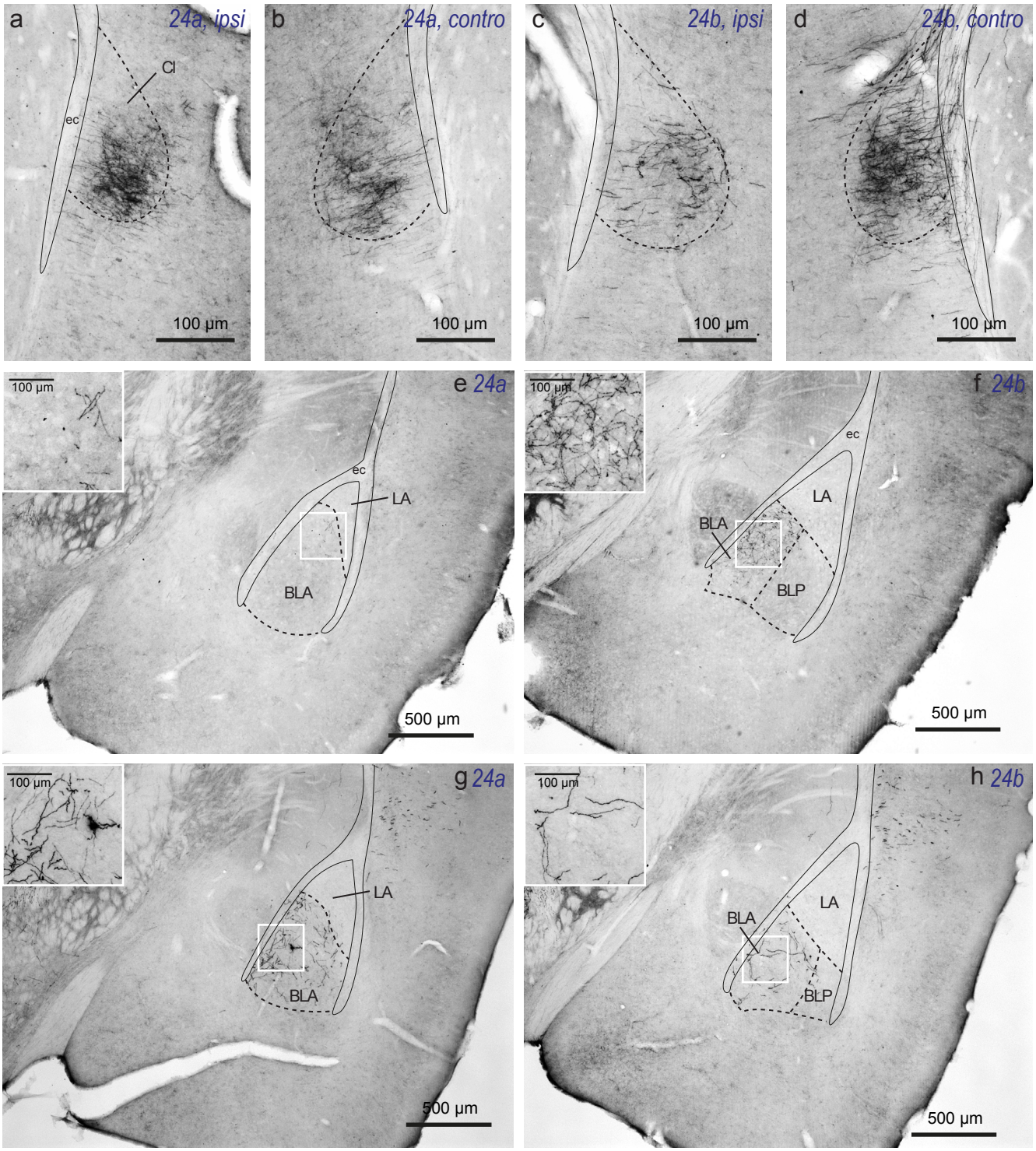


Figure 9 : ACC projection to the claustrum (Cl) and the anterior basolateral nucleus of the amygdala (BLA)
(a-d): Distribution of BDA labeled fibers produced by tracer injections in 24a (a-b) and 24b (c-d) in the ipsilateral (a,c) and the controlateral (b,d) Cl. The labeling obtained in the Cl is bilateral, denser in the ipsilateral Cl in 24a case (a) while a 24b case produces the densest staining in the controlateral Cl (d). (e-h): Distribution of BDA labeled fibers in the rostral (e-f) and caudal (g-h) BLA produced by injections in 24a (e,g) and 24b (f,h). In 24a case, the BLA is more labeled in its caudal part (f) while its rostral part displays the most important labeling after 24b injections (g). Upper left inserts show magnified views of the fibers labeling. See list for abbreviations.

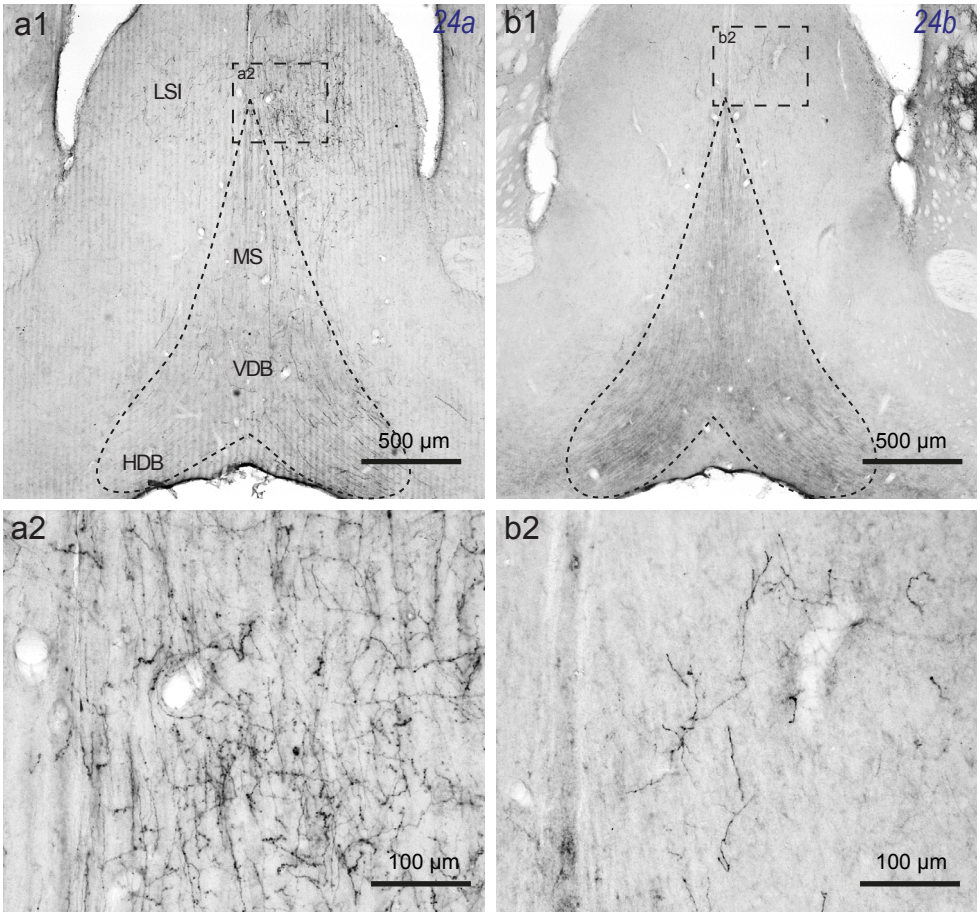


Figure 10 : ACC projection to the septum

Distribution of BDA labeled fibers in the septum produced by tracer injections in 24a (a) and 24b (b). The intermediate part of the lateral septal nucleus (LSI) displays a dense core of BDA labeled axons originating in 24a (a1-a2) compared to the light innervation originating in 24b (b1-b2). Additionally, the staining produced in the medial septum (MS) and the diagonal band of Broca, vertical (VDB) and horizontal (HDB) limbs, is moderate after an injection in 24a (a1) and sporadic after an injection in 24b (b1). See list for abbreviations.

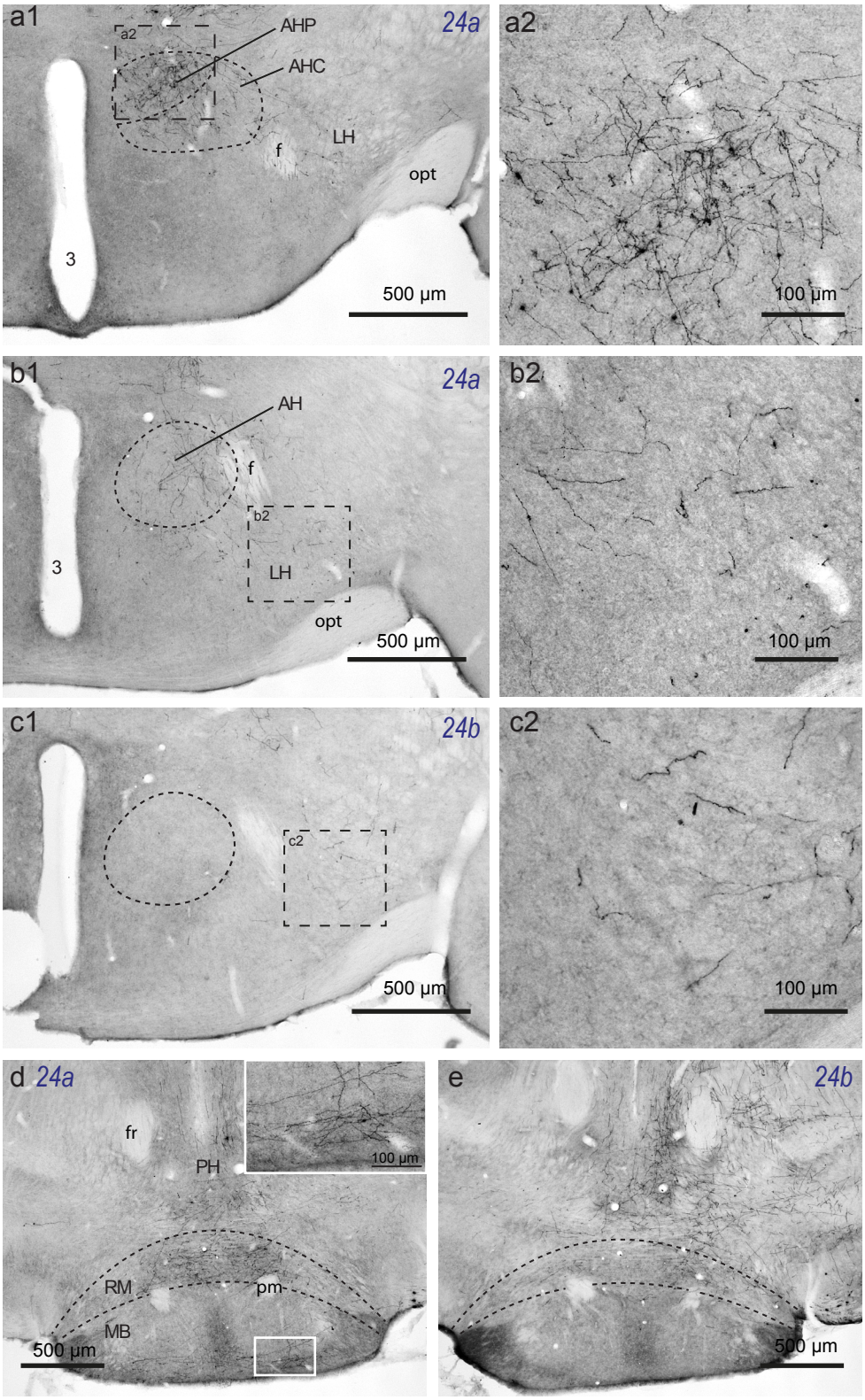


Figure 11 : ACC projection to the hypothalamus

(a-c): Distribution of PHA-L labeled fibers in the anterior (AH) and lateral (LH) hypothalamus produced by tracer injections in 24a (a-b) and 24b (c). The labeling in the AH is mainly obtained in 24a case (a-b; two different rostrocaudal levels) while injections in 24b do not produce any labeling in it (c). LH contains fibers from both 24a and 24b (b-c). (d-e): Distribution of PHA-L labeled fibers in the posterior hypothalamus. The posterior hypothalamic nucleus (PH) and the retro-mammillary nuclei (RM) are labeled in both 24a case (d) and 24b case (e) but the mammillary bodies (MB) display fibers only in 24a case (d; see insert). See list for abbreviations.

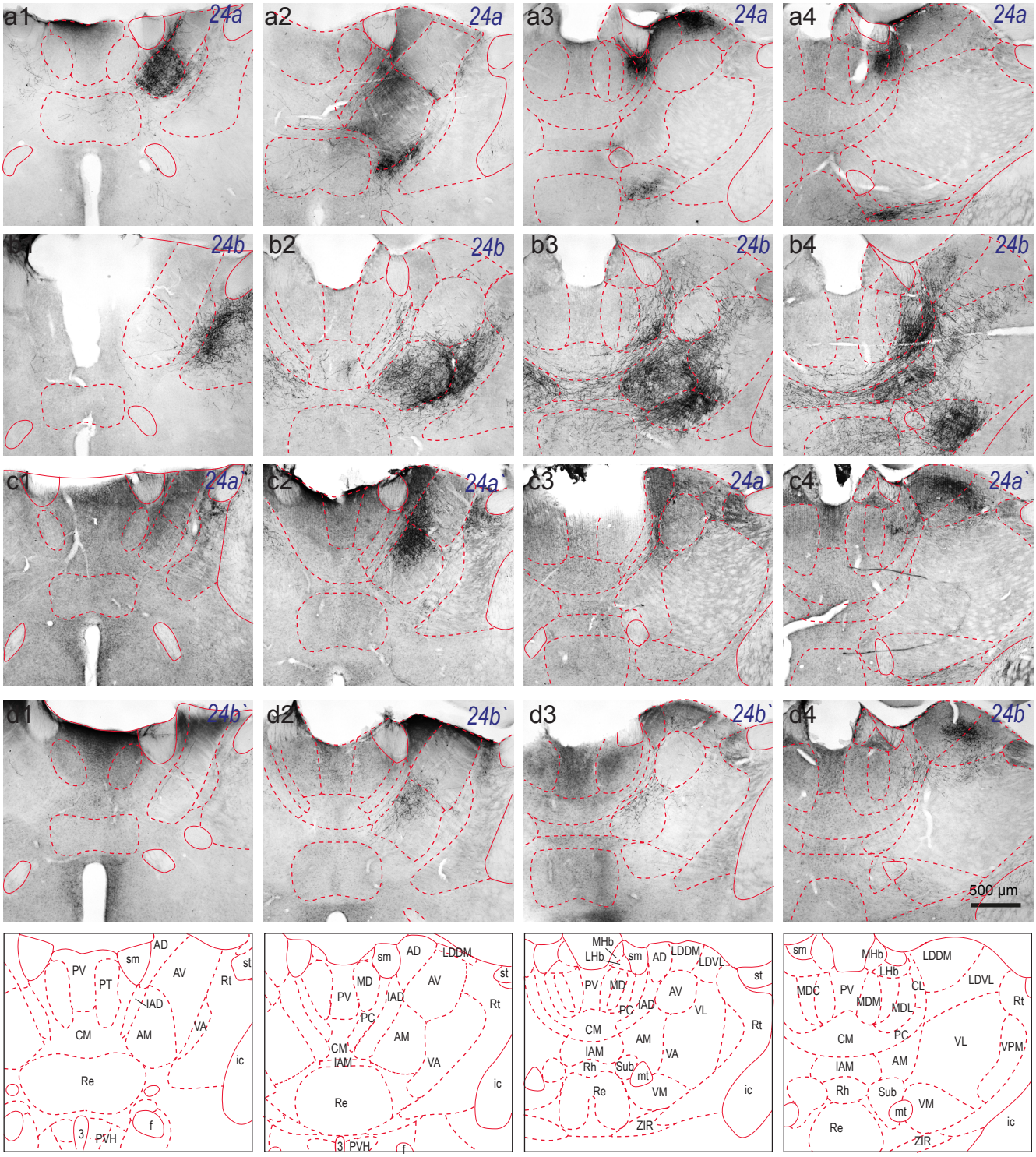


Figure 12 : ACC and MCC projections to the rostral thalamus

Distribution of PHA-L labeled fibers in the rostral thalamus after injections in 24a (a), 24b (b), 24a` (c) and 24b` (d), illustrated at four different rostrocaudal levels (a1,b1,c1,d1: AP=-0.59 mm; a2,b2,c2,d2: AP=-0.83 mm; a3,b3,c3,d3: AP=-0.95 mm; a4,b4,c4,d4: AP=-1.07 mm). The scale bar in d4 applies to all microphotographs. See list for abbreviations.

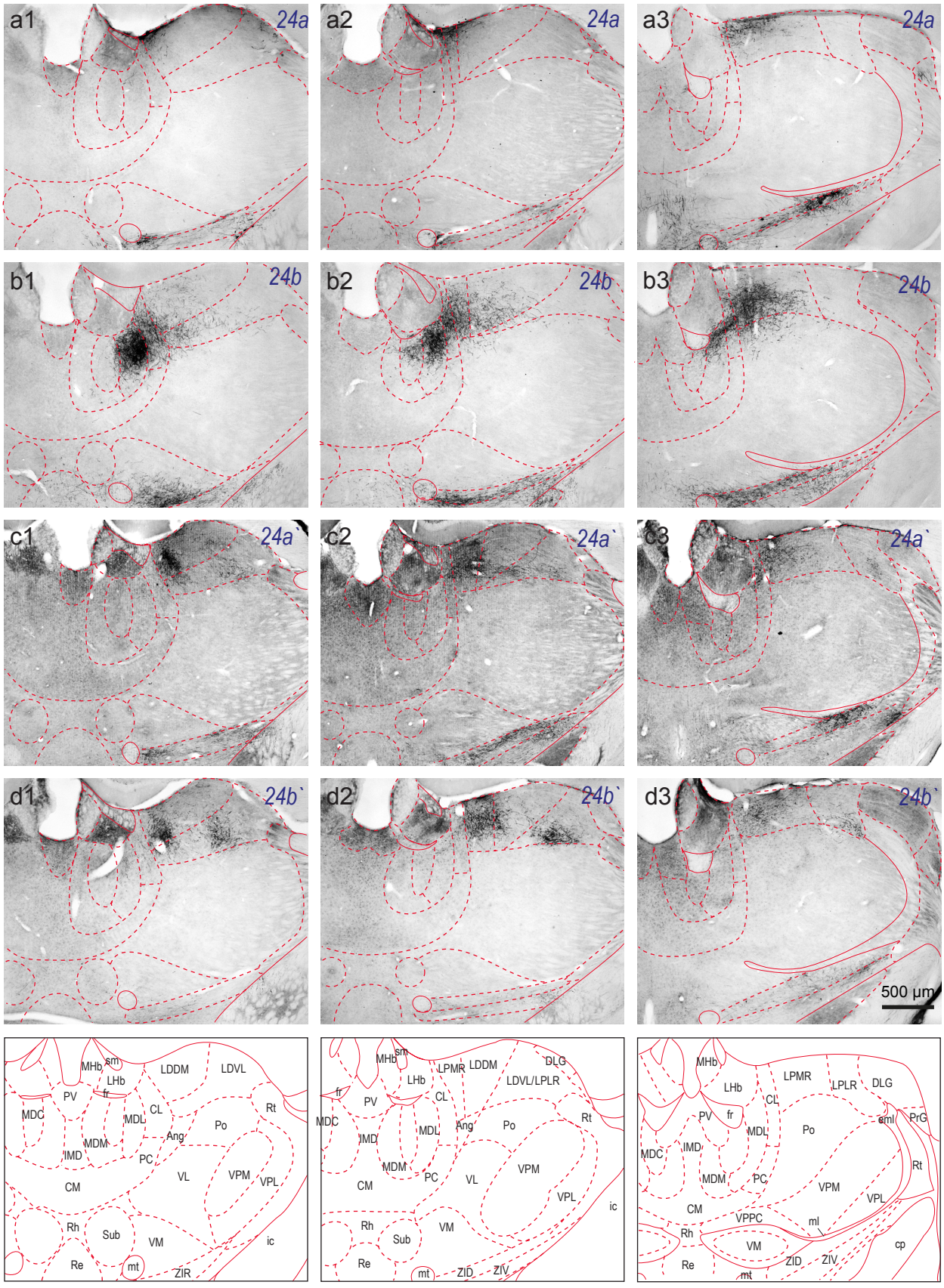


Figure 13 : ACC and MCC projections to the caudal thalamus

Distribution of PHA-L labeled fibers in the caudal thalamus after injections in 24a (a), 24b (b), 24a` (c) and 24b` (d), illustrated at four different rostrocaudal levels (a1,b1,c1: AP=-1.43 mm; a2,b2,c2: AP=-1.55 mm; a3,b3,c3: AP=-1.91 mm).The scale bar in d4 apply to all microphotographs. See list for abbreviations.

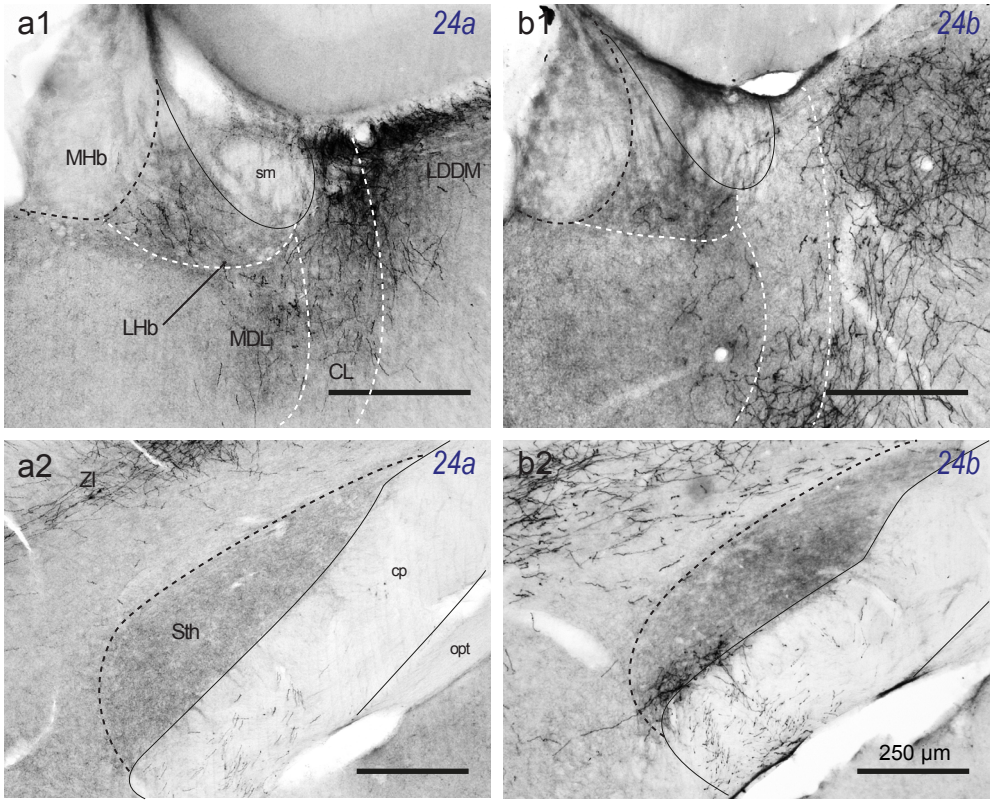


Figure 14 : ACC projections to the lateral habenula (LHb) and the subthalamic nucleus (Sth)

Distribution of PHA-L labeled fibers after tracer injections in 24a (a) and in 24b (b) in the LHb and the Sth. The labeling produced in the LHb is moderate in 24a (a1) and light in 24b (b1) cases. The Sth is labeled only by injections in 24b (b2), no labeling is produced by 24a injection (a2). See list for abbreviations.

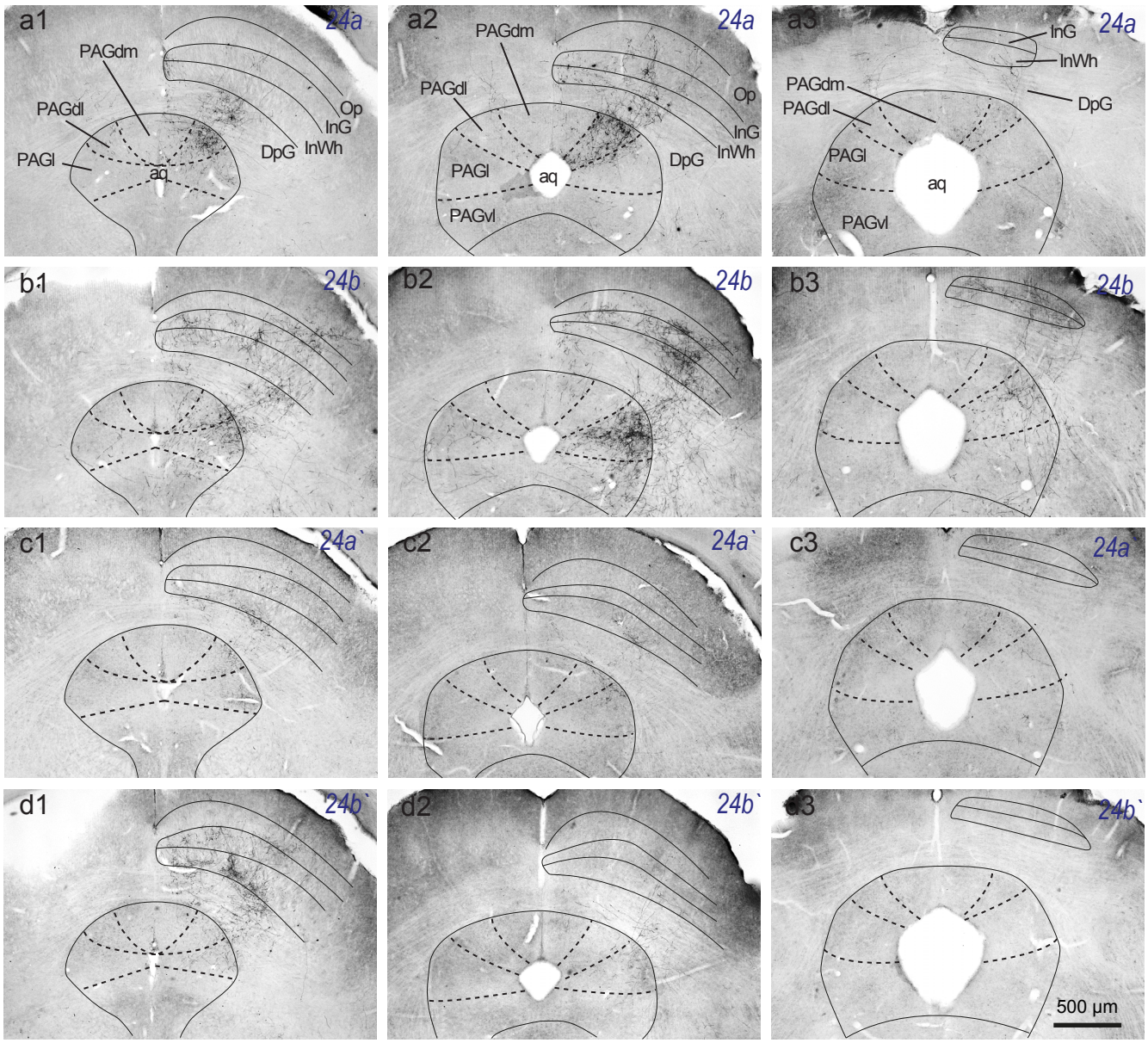


Figure 15 : ACC and MCC projections to periaqueductal gray (PAG) and the superior colliculus (SC)
Distribution of PHA-L labeled fibers in the PAG and the SC after tracer injections in 24a (a), 24b (b), 24a` (c) and 24b` (d), illustrated at three different rostrocaudal levels (a1,b1,c1,d1: AP=-3.63 mm; a2,b2,c2,d2: AP=-4.23 mm; a3,b3,c3,d3: AP=-4.83 mm). The scale bar in d3 applies to all microphotographs. See list for abbreviations.

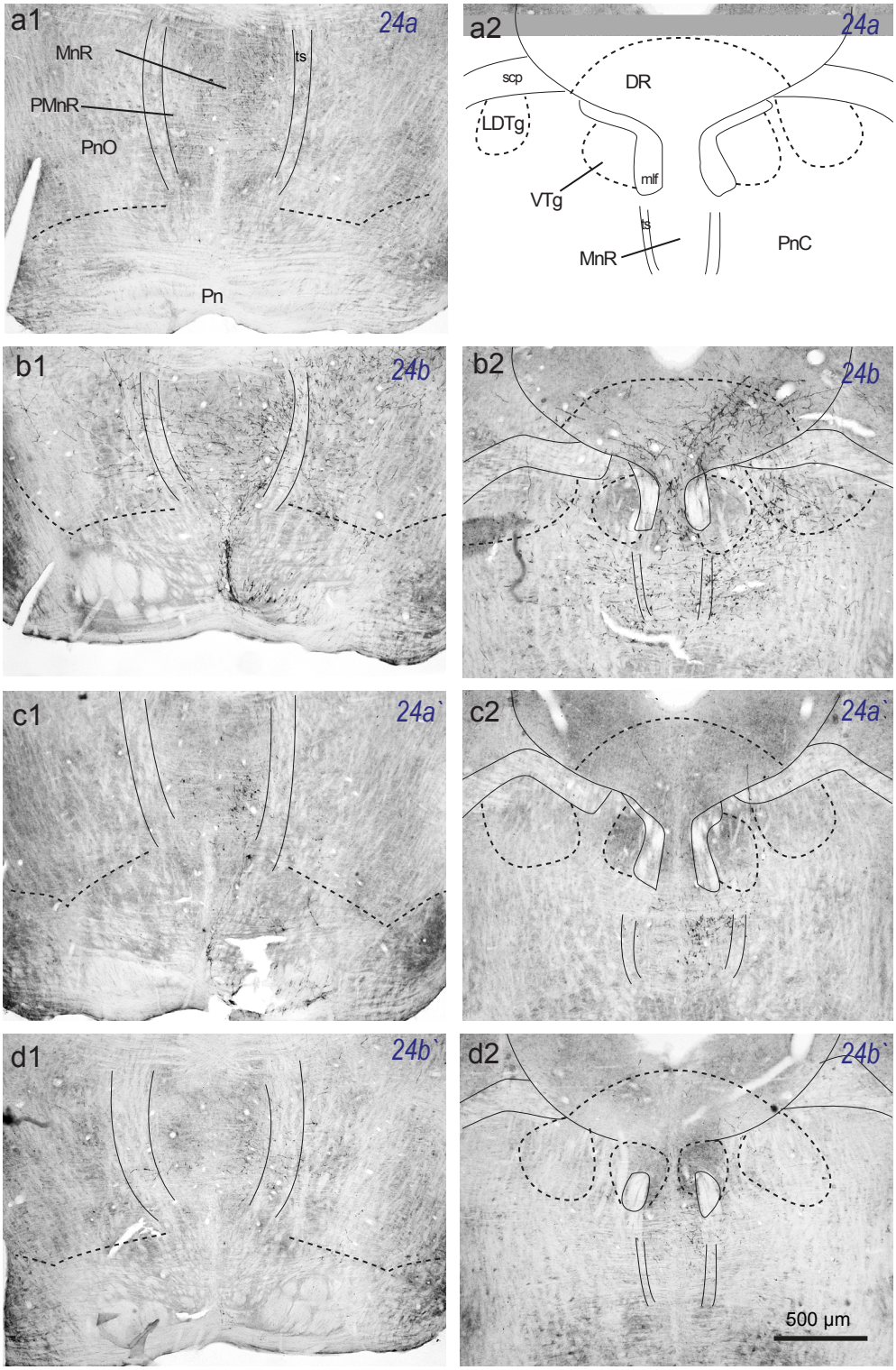


Figure 16 : ACC and MCC projections to the raphe nuclei

Distribution of PHA-L labeled fibers in the median (MnR), the paramedian (PMnR), the dorsal (DR) raphe and in the oral (PnO) and caudal (PnC) pontine nucleus after injections in 24a (a), 24b (b), 24a` (c) and 24b` (d), illustrated at two different rostro-caudal levels (a1,b1,c1,d1: AP=--4.83 mm; a2,b2,c2,d2: AP=-4.23 mm). The scale bar in d2 applies to all microphotographs. See list for abbreviations.

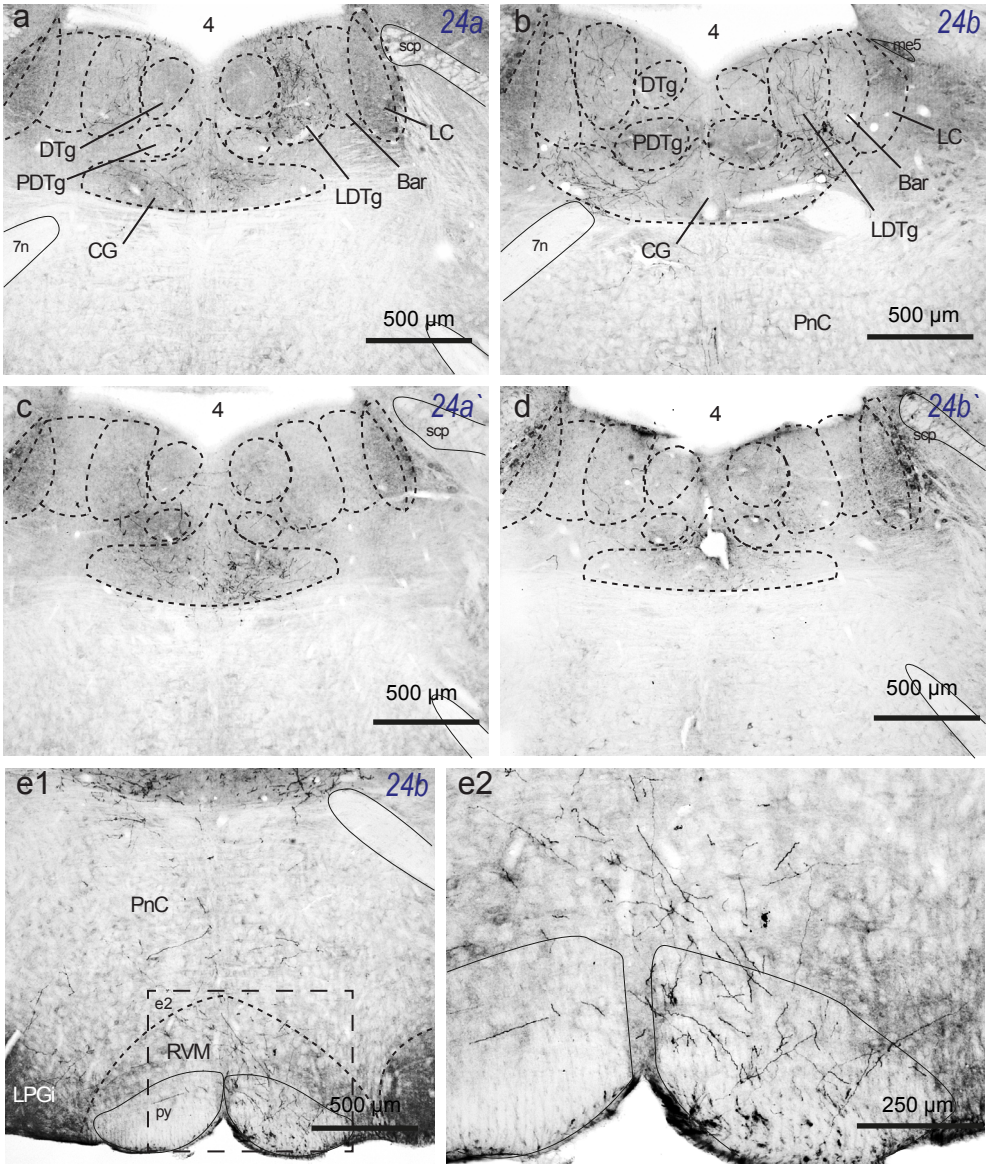


Figure 17 : ACC projection to the caudal pons

Distribution of PHA-L labeled fibers in the caudal pons and the medulla produced by tracer injections in 24a (a), 24b (b, e1, e2), 24a` (c) and 24b`(d). See list for abbreviations.

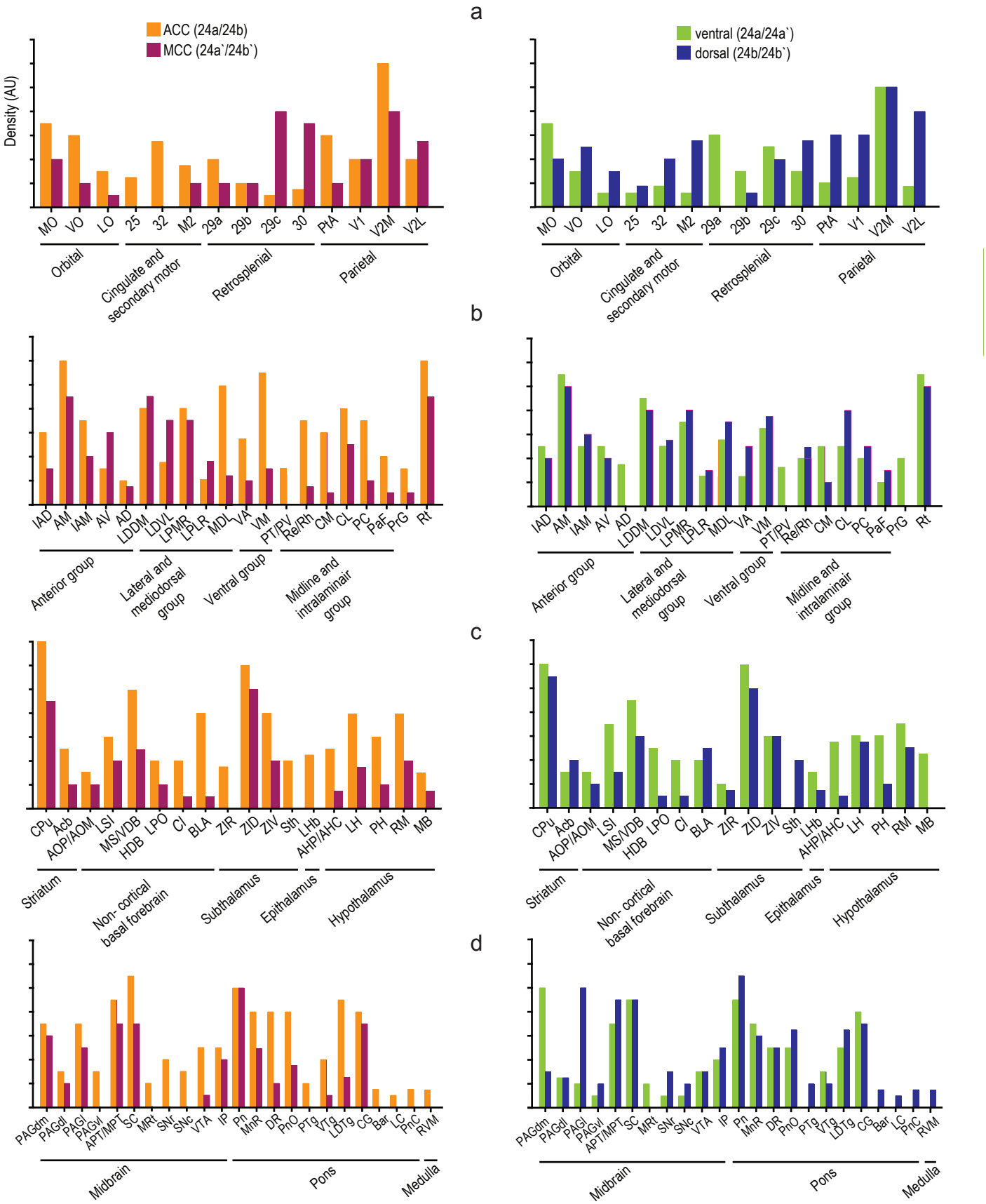


Figure 18 : Summary of ACC *vs* MCC and dorsal *vs* ventral areas efferents

Histrograms comparing the relative density of ACC (areas 24a/24b; orange) and MCC (areas 24a`/24b`; purple) efferents in the left panel, and ventral (24a/24a`; green) and dorsal (24b/24b`; blue) efferents in the right panel to the cortex (a), the thalamus (b), the non cortical forebrain and the hypothalamus (c) and the brainstem (d). Values of density has been obtained by adding for each target structure the individual values of 24a and 24b *vs* 24a` and 24b` (left) and of 24a and 24a` *vs* 24b and 24b` (right). These values area represented in arbitrary unities. See list for abbreviations.

Partie II

Etude fonctionnelle de l'implication de la projection du BLA dans le CCA dans les troubles de l'humeur

L'implication du CCA dans les troubles anxieux et dépressifs a été établie chez l'homme et le rongeur. Ces pathologies sont décrites dans la littérature comme sous-tendues par des réseaux de structures corticales et sous-corticales dont le CCA semble être au centre. Certains composants de ce réseau, jouant également un rôle dans ces pathologies, apparaissent comme de bons candidats pour débuter l'étude de l'implication fonctionnelle de ce réseau.

Ainsi, après avoir mis en évidence le connectome de cette région, nous avons donc débuté cette analyse par l'étude de l'implication de la projection du noyau basolatéral antérieur de l'amygdale (BLA) dans le CCA, en testant l'hypothèse que l'activation spécifique de cette voie pouvait induire des phénotypes de type anxio-dépressif chez des souris naïves. Pour ceci, nous avons fait exprimer la channelrhodopsine (ChR2) par les neurones du BLA, par injection de particules virales adéno-associées (AAV). Nous avons ensuite évalué, après stimulations optogénétique répétitives des terminaisons du BLA dans le CCA, les comportements de type anxieux et dépressif, grâce à plusieurs tests comportementaux. Nous avons ainsi observé un développement progressif de comportements de type anxieux et dépressif, qui semble dépendant de la répétition de la stimulation de la voie BLA-CCA. Des contrôles histologiques (placement des sites d'injection de virus, évaluation de l'expression de la protéine c-Fos), électrophysiologiques (évaluation de l'activation cellulaire suite à la stimulation optogénétique *in vitro* par patch-clamp) et comportementaux (activité motrice, aversion), ont permis de valider l'approche expérimentale.

Cette étude préliminaire, même si elle ne permet pas encore de comprendre les mécanismes cellulaires et électrophysiologiques recrutés, a donc mis en évidence pour la première fois l'implication de la voie BLA-CCA dans les comportements de type anxieux et dépressif.

A. Introduction

I. Trouble dépressif majeur et anxiété généralisée

1) Définition et rappel

Le trouble dépressif majeur (TDM) et l'anxiété généralisée sont décrits de manière détaillée dans l'introduction générale (voir **II. 3)** ***b) Les pathologies impliquant le CCA***). Brièvement, le TDM et l'anxiété généralisée sont définis par plusieurs symptômes répertoriés dans le DSM-V. La perte de plaisir ou des pensées de mort récurrentes sont décrits dans le TDM et une inquiétude excessive ou une irritabilité sont des symptômes de l'anxiété généralisée. Dans les deux pathologies, des déficits cognitifs peuvent également être observés. Il existe un taux de comorbidité important entre ces deux pathologies, ce qui explique la dénomination de troubles ou symptômes de type anxio-dépressif que nous utiliserons dans la suite de cette partie.

2) Pathologies de circuits

Un certain nombre de régions corticales et sous-corticales, comme le cortex préfrontal, l'hippocampe, l'amygdale ou encore certains centres monoaminergiques comme l'aire tegmentale ventrale et le noyau dorsal du raphé, ont été impliquées dans les troubles de l'humeur (Drevets 2001; Liotti and Mayberg 2001; Nestler et al. 2002). La place centrale du CCA au sein de ce réseau et ses connexions réciproques avec la plupart de ces structures (voir **Introduction générale ; II. 2) Les connexions du CCA**) en font un point de départ incontournable dans l'étude mécanistique des troubles de l'humeur. Chez l'homme, une altération fonctionnelle des connexions intracingulaires (Tripp et al. 2012; Yoshimura et al. 2017) ou du CCA avec d'autres structures comme le cortex insulaire, le striatum ou encore l'amygdale (Etkin et al. 2010; Ho et al. 2014; Szekely et al. 2016; Tadayonnejad et al. 2014; Tromp et al. 2012) a été observée chez des patients anxieux et dépressifs. La résolution de ces études chez l'homme ne permet toutefois pas d'étudier un circuit spécifique, c'est pourquoi il est nécessaire de compléter nos connaissances par des études chez l'animal. Aujourd'hui, peu d'études s'emploient cependant à analyser ce réseau de connexions chez le rongeur. Une diminution de la synchronisation du CCA avec le noyau thalamique latérodorsal (Zheng et al. 2012) et l'hippocampe (Negron-Oyarzo et al. 2015) est reportée chez des animaux présentant des comportements

de type dépressif induits par le stress. Ainsi, l'inhibition de la projection hippocampo-cingulaire présente un effet anxiolytique (Felix-Ortiz et al. 2013; Padilla-Coreano et al. 2016). La projection de l'amygdale dans le CCA est également largement impliquée dans les émotions (LeDoux 2000; Veinante et al. 2013) et semble particulièrement pertinente dans notre étude. Une étude menée par Felix-Ortiz et al. a d'ailleurs montré que l'activation de la projection du noyau basolatéral antérieur de l'amygdale (BLA) vers les aires 25 et 32 induisait un effet anxiogène (Felix-Ortiz et al. 2016).

Compte tenu des connexions réciproques entre le BLA et le CCA (voir **Résultats ; Articles 1 et 2;** (Cassell and Wright 1986; Gabbott et al. 2005; Hoover and Vertes 2007; Matyas et al. 2014), la voie liant ces deux structures apparait effectivement comme un candidat pertinent pour débuter l'étude des circuits et mécanismes sous-tendant le développement de troubles de l'humeur.

II. Connexion amygdalo-cingulaire : organisation et implication potentielle dans les troubles anxio-dépressifs chez le rongeur

1) Le BLA : organisation anatomique

L'amygdale est un complexe télencéphalique hétérogène situé dans le lobe temporal des mammifères. Depuis sa description en forme d'amande par Burdach au début du 19ème siècle (Burdach 1819-1822), sa nomenclature a largement évolué. Elle englobe actuellement une douzaine de noyaux regroupés en deux ensembles : l'amygdale corticale, ou palliale, constituée principalement des noyaux latéral, basolatéral, basomédian et superficiel, et l'amygdale étendue ou subpalliale, constituée principalement des noyaux médian et central ainsi que de leur continuité dans les noyaux du lit de la strie terminale (Olucha-Bordonau et al. 2015). Cette distinction entre les deux groupes se base sur les origines embryonnaires, la cytoarchitecture, la neurochimie et les connexions des différents noyaux (Alheid et al. 1995; Olucha-Bordonau et al. 2015; Swanson and Petrovich 1998).

Le noyau basolatéral comporte une division antérieure (BLA) et une division postérieure (BLP). Comme dans le cortex cérébral, les principaux neurones sont glutamatergiques et de type pyramidal ; on trouve également différents types d'interneurones GABAergiques co-exprimant des protéines liant le calcium (parvalbumine, calrétinine) et des neuropeptides (somatostatine, NPY) (Olucha-

Bordonau et al. 2015). Malgré l'hétérogénéité morphofonctionnelle de l'amygdale, ses noyaux sont largement interconnectés. Ainsi le BLA, réciproquement connecté au BLP, reçoit d'importantes afférences de la part du noyau latéral et de l'aire amygdalo-piriforme, et projette aux noyaux superficiels (noyau du tractus olfactif latéral, antérieur cortical et aire amygdalo-hippocampale) ainsi qu'au noyau central (mais voir plus bas) (Olucha-Bordonau et al. 2015; Pitkanen et al. 1997; Savander et al. 1995; Swanson and Petrovich 1998).

La connectivité extrinsèque du BLA est cohérente avec une organisation de type cortical. Il reçoit ainsi de fortes afférences corticales, provenant des cortex insulaire et piriforme, des aires associatives somatosensorielles, auditives et visuelles, mais surtout des régions hippocampiques et parahippocampiques et du cortex préfrontal, dont le cortex orbitofrontal et le CCA (McDonald 1998; Olucha-Bordonau et al. 2015). Les entrées thalamiques proviennent essentiellement des noyaux intralaminaires postérieurs et de la ligne médiane (Turner and Herkenham 1991). Enfin, le BLA est sous un contrôle modulateur cholinergique du télencéphale basal et monoaminergique du tronc cérébral (Olucha-Bordonau et al. 2015). Les efférences du BLA, dirigées essentiellement vers des structures corticales ou striatales, relèvent également d'une organisation de type corticale, malgré l'absence d'une projection significative vers le thalamus (Alheid et al. 1995; Olucha-Bordonau et al. 2015). Ainsi, le BLA projette massivement à l'hippocampe, au cortex périrhinal, au cortex insulaire et au CCA (McDonald 1991a; Olucha-Bordonau et al. 2015). Dans le CCA, il a été montré que les afférences du BLA peuvent contacter des neurones pyramidaux, mais aussi des interneurones PV+ (Gabbott et al. 2012; Gabbott et al. 2006). Le striatum constitue la seconde efférence majeure du BLA qui cible essentiellement le caudé-putamen et le noyau accumbens latéral (McDonald 1991b). Les projections amygdaliennes au noyau accumbens médian et à l'amygdale étendue, dont le noyau central de l'amygdale, sont plus restreintes depuis le BLA et proviennent préférentiellement du BLP (McDonald 1991b). De façon intéressante, les connexions liant le noyau basolatéral (BLA et BLP), le cortex préfrontal (CCA et cortex insulaire), les régions striatales (striatum dorsal, ventral et amygdale étendue) sont organisées de manière topographique. Ainsi, les afférences amygdaliennes projettent à la fois à des aires corticales et à des secteurs striataux spécifiques, eux-mêmes innervés par ces mêmes aires corticales chez le rat (McDonald 1991a; McDonald 1991b) et le singe (Cho et al. 2013).

2) Implication fonctionnelle de la connexion BLA-CCA

Le rôle principal de l'amygdale semble être d'apporter une valence émotionnelle aux stimuli sensoriels et d'initier une réponse adaptée de l'organisme. Une lésion globale de l'amygdale chez le singe est à l'origine du syndrome de Klüver-Bucy dont les symptômes sont principalement une incapacité à reconnaître un objet par la vue ainsi qu'une perte des émotions de colère et de peur (Kluver and Bucy 1937; Weiskrantz 1956), déficits également retrouvés chez des patients (Adolphs et al. 2005; Adolphs et al. 1994). De par ses connexions corticales, intra-amygdaliennes et striatales, le BLA intervient dans des phénomènes associatifs dans le cas d'apprentissages aversifs, mais aussi appétitifs, et influence ainsi les réponses émotionnelles, affectives, motivationnelles et cognitives (LeDoux 2000; Olucha-Bordonau et al. 2015). Bon nombre de ces fonctions s'articulent autour de la voie BLA-CCA.

a) Rôle physiologique

La peur est l'une des émotions les plus étudiées chez le rongeur (voir **Introduction : II. 3)** ***a) Fonctions physiologiques du CCA,*** *Emotions*). Pour rappel, le paradigme classiquement utilisé afin d'évaluer la peur chez l'animal est le conditionnement de peur, basé sur l'association d'un stimulus inconditionnel neutre, comme un son ou une lumière, à un stimulus conditionnel aversif comme des chocs électriques. Après l'association des deux stimuli, la présentation du stimulus conditionnel seul est alors suffisante à induire la même réponse de peur que le stimulus inconditionnel. Ce paradigme a permis de mettre en évidence l'implication de la voie BLA-CCA dans l'encodage et la modulation de la réponse de peur, mais aussi dans le rappel et l'extinction de l'association entre le stimulus conditionnel et inconditionnel (Arruda-Carvalho and Clem 2015; Lalumiere 2014; Likhtik and Paz 2015; Marek et al. 2013; Pape and Pare 2010). Ces différentes fonctions semblent étroitement liées d'une part à l'implication majeure de l'amygdale et du CCA dans les émotions, mais aussi au rôle indiscutable du CCA dans les fonctions exécutives comme la mémoire, l'apprentissage ou l'attention (voir **Introduction : II. 3)** ***a) Fonctions physiologiques du CCA,*** *Fonctions exécutive ; Emotions)*. De manière intéressante, il semble exister une ségrégation anatomique entre l'expression et le renforcement de l'émotion de peur, sous-tendue par la projection du BLA vers les aires 32 et 24 (Knapska et al. 2012; Livneh and Paz 2012; Senn et al. 2014; Sierra-

Mercado et al. 2011; Sotres-Bayon et al. 2012), alors que l'extinction de la peur serait possible grâce à la projection à l'aire 25 (Amano et al. 2010; Knapska et al. 2012; Senn et al. 2014). Ceci peut également suggérer que l'activation de l'une ou l'autre de ces projections lors de l'encodage pourrait représenter un facteur déterminant dans la valence associée au stimulus, « menace » ou « sécurité », en activant soit les aires 32/24 soit l'aire 25 lors du rappel du stimulus conditionnel (Knapska et al. 2012; Likhtik and Paz 2015; Likhtik et al. 2014; Livneh and Paz 2012; Senn et al. 2014; Sotres-Bayon et al. 2012). Il faut garder à l'esprit que le CCA projette également en retour au BLA, cette connexion jouant également un rôle majeur dans la gestion des émotions, leur adaptation au contexte et la mise en place d'un comportement approprié (Likhtik and Paz 2015).

Le rôle majeur de la projection BLA-CCA dans les émotions et notamment les émotions négatives fait de cette connexion un candidat parfait pour débuter l'étude de l'implication fonctionnelle du connectome du CCA dans les troubles de l'humeur. La suite de cette introduction sera dédiée à un résumé rapide de l'état de la littérature sur ce sujet.

b) Implication dans les troubles de l'humeur

En plus de l'implication du CCA dans les troubles de l'humeur (voir **Introduction : II. 3)** ***b) Les pathologies impliquant le CCA***), la connexion BLA-CCA semble également jouer un rôle dans ces pathologies. Chez l'homme, la force de cette connectivité fonctionnelle augmente chez des patients présentant un stress post-traumatique (Brown et al. 2014), tout comme chez des patients présentant un trouble anxieux généralisé après présentation d'un stimulus anxiogène (Makovac et al. 2016). Une hyper-activation de la voie BLA-CCA a également été mise en évidence chez des adolescents présentant un TDM (Connolly et al. 2013; Straub et al. 2017). A cela s'ajoutent des modifications morphologiques dans ces deux régions, notamment une hypertrophie du CCA et de l'amygdale observable chez des patients dépressifs (Drevets et al. 1998; Hastings et al. 2004; Sheline et al. 1998). De manière générale, l'hyperactivité de l'amygdale des patients tant au niveau moléculaire que cellulaire apparait comme une piste sérieuse dans l'étude mécanistique de ces pathologies (Sheline et al. 2001; Siegle et al. 2002).

Chez le rongeur, ce sont principalement les aires 25 et 32 du CCA qui sont étudiées, probablement de par leur rôle antagoniste dans le traitement de certaines

émotions (voir **II. 2)** ***a) Rôle physiologique***). Chez des rats ayant subi un stress juvénile, la quantification de l'expression de la protéine c-Fos montre une altération fonctionnelle de la projection BLA-CCA (Ishikawa et al. 2015). Les auteurs décrivent que chez les animaux stressés, une diminution de l'expression de c-Fos dans l'aire 25 et une augmentation dans le BLA sont corrélées à la durée d'immobilité dans un test d'open-field. Par activation optogénétique chez des souris naïves des terminaisons du BLA dans l'aire 32, d'autres auteurs observent l'induction de comportements de type anxieux, évalués dans un test de labyrinthe en croix surélevé, dans un open-field et dans un test d'interaction sociale (Felix-Ortiz et al. 2016). De manière intéressante, une inhibition de ces mêmes terminaisons s'avère plutôt anxiolytique, en augmentant le temps passé au centre de l'open-field ainsi que le nombre d'interactions sociales des souris (Felix-Ortiz et al. 2016). Enfin, chez des rats naturellement anxieux, une analyse électrophysiologique des neurones de projection du BLA dans l'aire 32 a permis d'établir qu'une altération de leur plasticité synaptique pourrait être à l'origine de ce caractère inné (Fragale et al. 2016).

Les travaux antérieurs de l'équipe ont permis de démontrer que la stimulation optogénétique de l'aire 24 de souris naïves induit des comportements anxio-dépressifs (Barthas et al. 2015) et que les troubles de l'humeur consécutifs à l'induction d'une douleur neuropathique s'accompagnent d'une augmentation de l'activité électrique des neurones de l'aire 24 (thèse de Jim Sellmeijer, 2016). Compte tenu des données exposées ci-dessus, nous avons émis l'hypothèse que la voie BLA-CCA peut participer à la mise en place d'un phénotype anxio-dépressif. Nous avons donc analysé l'effet de l'activation optogénétique des terminaisons du BLA dans l'aire 24 sur le comportement de souris naïves dans des tests évaluant les comportements de type anxieux et dépressif.

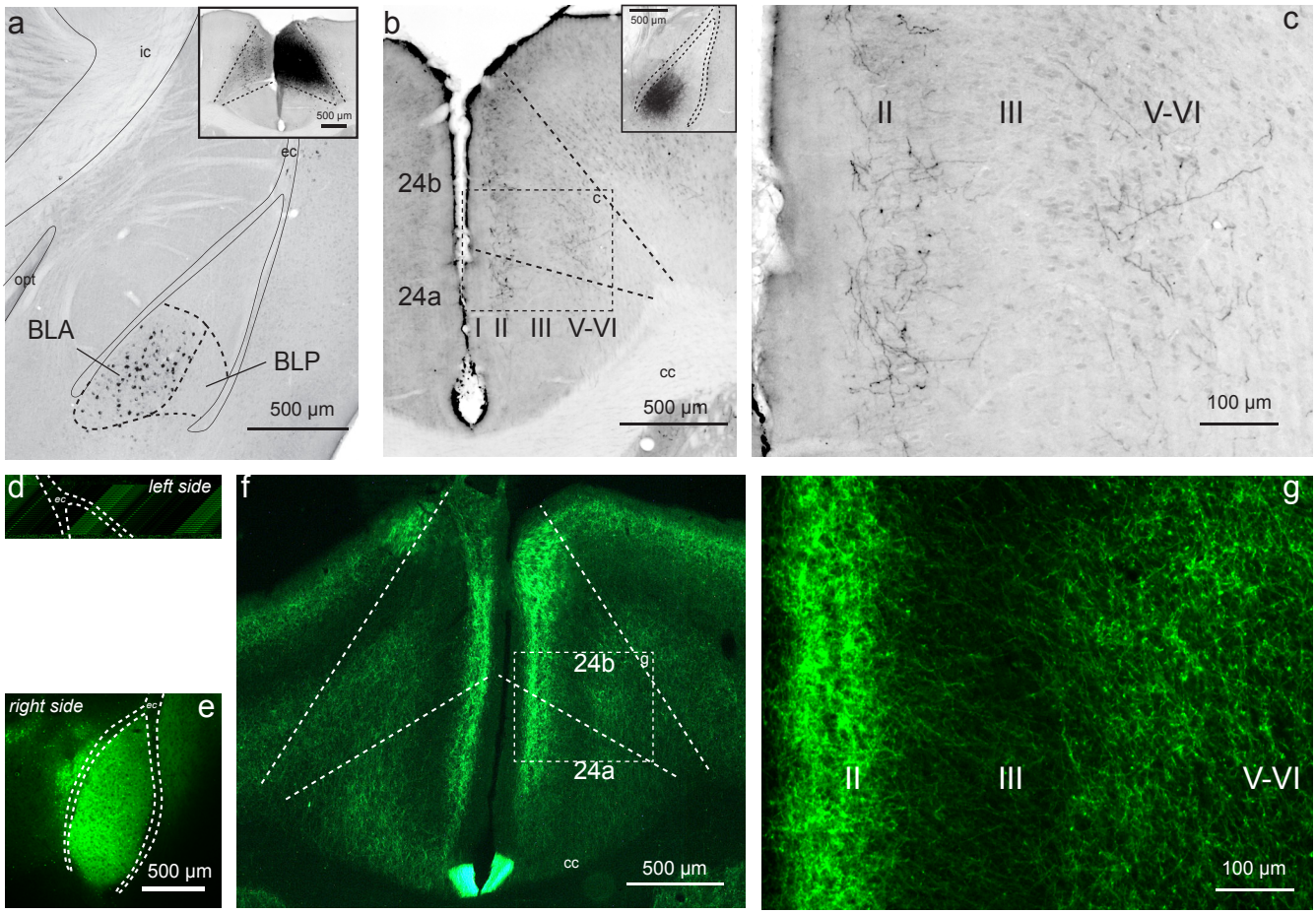


Figure 18 : Validation de l'expression de la ChR2 dans la voie BLA-CCA

Un marquage de corps cellulaires, restreint au BLA, est observable après injection unilatérale de FG dans le CCA (a: site d'injection en encart). Réciproquement, une injection de BDA dans le BLA conduit à un tapis dense de fibres dans la couche II de 24a et 24b, plus épars dans les couches profondes (b,c: site d'injection en encart). L'injection bilatérale du virus AAV5.CaMKIIa.hChR2 dans le BLA (d,e) met en évidence la même organisation laminaire de ses projections dans le CCA (f,g), identique des deux côtés.

Abréviations: BLA: noyau basolatéral antérieur de l'amygdale; BLP: noyau basolatéral postérieur de l'amygdale; cc: corps calleux: ec: capsule externe; ic: capsule interne; opt: tractus optique.

B. Résultats

I. Validation de l'expression de la channelrhodopsine dans la voie BLA-CCA et du protocole de stimulation optogénétique

1) Validation anatomique

Notre étude des afférences de l'aire 24 a montré que l'injection unilatérale de FG, traceur rétrograde, dans le CCA produit un marquage des corps cellulaires dans l'amygdale. Ce marquage bilatéral, avec toutefois une forte dominance ipsilatérale, est localisé uniquement dans le BLA (Figure 18 a). Réciproquement, l'injection unilatérale de BDA, traceur antérograde, dans le BLA permet l'observation d'un tapis de fibres marquées dans la couche II des aires 24a et 24b du CCA, alors qu'un marquage plus dispersé est détecté dans les couches profondes V-VI (Figure 18 b, c). L'injection bilatérale du virus AAV5.CamKIIa.hChR2-eYFP dans le BLA permet, grâce à la fusion de la ChR2 à la protéine fluorescente YFP, d'observer une organisation topographique identique des projections du BLA des deux côtés du CCA (Figure 18 d-g), validant ainsi l'efficacité de la transfection du virus jusqu'aux terminaisons neuronales. Il est à noter qu'aucun corps cellulaire n'exprime la fluorescence YFP dans le CCA, ce qui indique l'absence de capture rétrograde de l'AAV par les neurones de la voie réciproque CCA-BLA. En accord avec ces résultats, les fibres optiques ont été implantées dans la couche II du CCA.

2) Validation fonctionnelle

La validation de l'efficacité de la stimulation optogénétique a été réalisée *in vitro* par le Dr Sylvain Hugel par des enregistrements en patch-clamp, et *in vivo* par la quantification de la protéine c-Fos.

Des enregistrements en configuration cellule entière de neurones pyramidaux du BLA (n=4) et de la couche II du CCA (n=17) ont été obtenus sur des tranches de cerveau (300 µm) provenant de sept souris, entre cinq et neuf semaines après injection du virus. Le protocole de stimulation *in vitro* différait du protocole *in vivo,* et consistait en des stimulations répétées (500 ms) d'intensité lumineuse croissante (de 20% à 100%) (Figure 19 a). Les résultats obtenus montrent qu'une stimulation optogénétique continue induit des courants entrants dans le BLA, dont l'amplitude

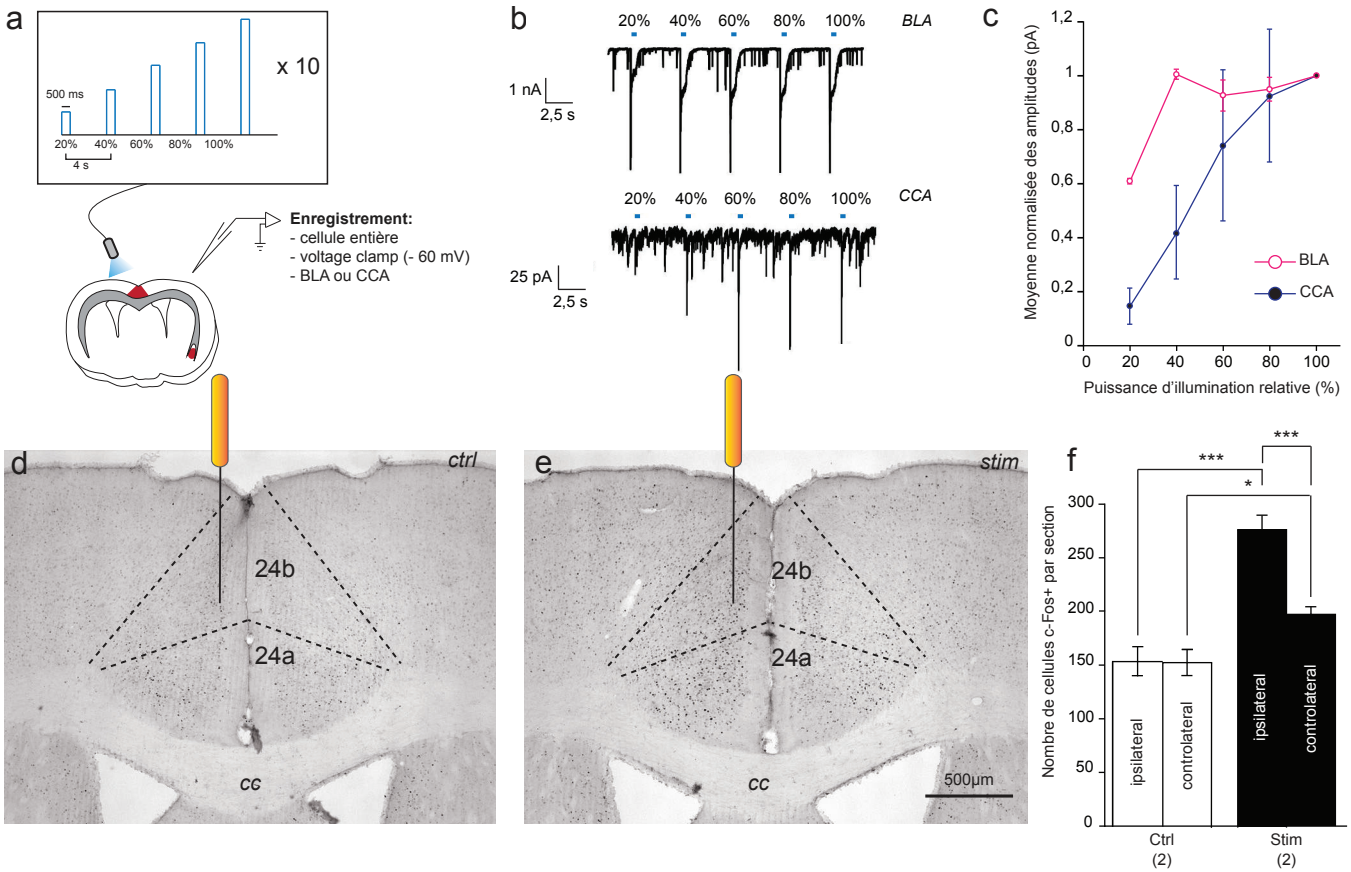


Figure 19 : Validation *in vitro* et *in vivo* de l'effet de la stimulation de la voie BLA-CCA

L'enregistrement par patch-clamp montre que la stimulation continue *in vitro* (a) induit des courants entrants dans les neurones du BLA et du CCA, d'intensité maximale à 40% de la puissance d'illumination pour les neurones du BLA et à 100% pour ceux du CCA (b-c). *In vivo*, la stimulation optogénétique induit une augmentation bilatérale de l'expression de la protéine c-Fos chez les animaux stimulés par rapport aux animaux contrôles (d-f). La quantification des neurones c-Fos positifs montre une augmentation plus forte du côté ipsilatéral à la stimulation chez les animaux stimulés (f). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. *p<0,05, **p<0,01,***p<0,001. Le nombre d'animaux par groupe est indiqué sous la barre des abscisses.

Abréviations: cc: corps calleux.

est maximale dès 40% de la puissance d'illumination bleue (Figure 19 b-c). De même, des courants entrants dans les cellules pyramidales de la couche II du CCA sont évoqués par la stimulation des terminaisons du BLA, courants dont l'amplitude est maximale à 100% d'illumination bleue (Figure 19 b-c). Il est important de noter que 100% des neurones du BLA (4/4) et environ 20% des neurones de la couche II du CCA (4/17) enregistrés répondent à la stimulation. La stimulation lumineuse bleue permet donc bien l'activation de la ChR2 *in vitro* et impacte l'activité des neurones du CCA via les afférences du BLA.

L'effet *in vivo* de la stimulation optogénétique de la voie BLA-CCA, effectuée durant les expériences comportementales a donc été évalué par la quantification de l'expression de la protéine c-Fos dans les cellules des aires 24a et 24b. Quatre souris ayant reçu l'injection de virus ont été utilisées pour cette expérience : deux souris stimulées, ayant reçu neuf séquences de stimulations optogénétiques (voir **Matériel et méthode : IV. 1) Dispositif et protocole de stimulation ; Figure 4**), et deux souris contrôle. Les animaux sont perfusés 90 min après la fin de la stimulation. Une augmentation bilatérale du marquage c-Fos est observée chez les animaux stimulés par rapport au groupe contrôle (ipsilatéral, p=0,000065 ; controlatéral, p=0,010010) (Figure 19 d-f). Il est important de noter qu'il existe également un effet du côté de la stimulation, avec une expression de c-Fos plus importante du côté ipsilatéral que du côté controlatéral (p=0,000139) (Figure 19 f). La stimulation lumineuse bleue du CCA, chez des souris ayant reçu une injection de l'AAV5.CamKIIa.hChR2-eYFP dans le BLA, induit donc bien une activation des cellules dans le CCA, vraisemblablement via l'activation des terminaisons du BLA dans le CCA.

II. Conséquences de l'activation répétée de la projection BLA-CCA sur les comportements de type anxieux et dépressif

L'effet de la stimulation optogénétique répétée des terminaisons du BLA dans l'aire 24 sur les comportements de type anxio-dépressif est évalué après trois, six et neuf stimulations (Figure 20) chez des souris ayant reçu une injection bilatérale d'AAV5.CamKIIa.hChR2-eYFP dans le BLA (voir **Matériel et méthode : IV. 1) Dispositif et protocole de stimulation ; Figure 4**). Après vérification des sites d'injection en fin d'expérience, trois animaux ont été retirés des cohortes, l'analyse finale se faisant donc sur vingt-cinq souris stimulées et vingt-sept souris contrôles.

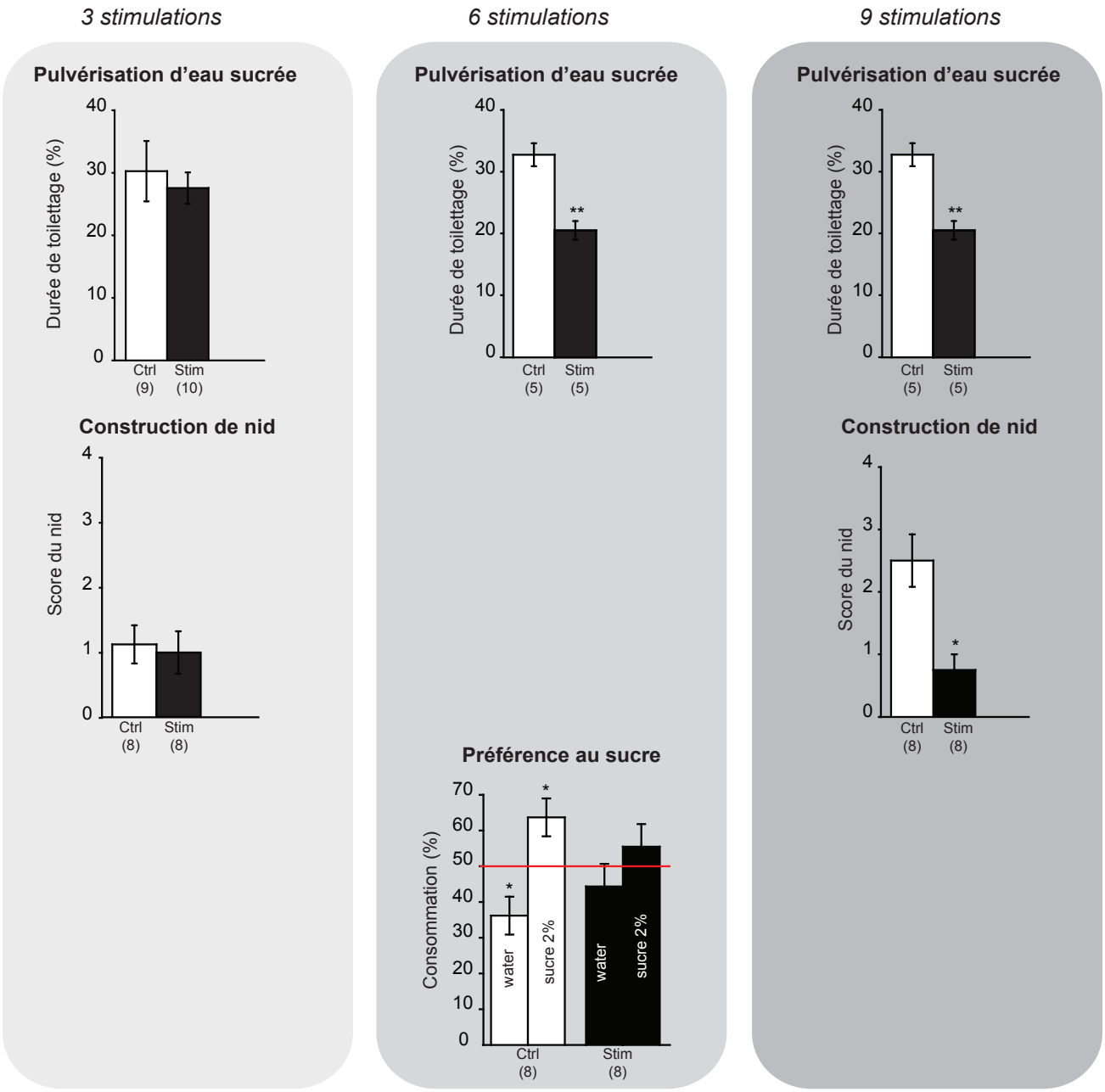


Figure 20: Evolution des comportements de type anxiodépressif après trois, six et neuf stimulations de la voie BLA-CCA (voir aussi la figure suivante)

Le développement de comportements de type anxiodépressif est mis en évidence par la stimulation de la voie BLA-CCA et semble dépendant de la répétition de la stimulation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. *p<0,05, **p<0,01. Le nombre d'animaux par groupe est indiqué sous la barre des abscisses.

Les tests mesurant les comportements de type dépressif sont le test de pulvérisation d'eau sucrée, de construction de nid et de préférence au sucre. Les tests mesurant les comportements de type anxieux sont le test d'enfouissement de billes et le test d'hyponéophagie, ce dernier évaluant les deux types de comportements à la fois. Pour éviter un protocole trop lourd pour les animaux, tous n'ont pas été évalués dans tous les tests (n= 5 à 10 souris par test et par point temporel).

Dans le test de pulvérisation d'eau sucrée, aucune différence n'est observée entre les groupes contrôles et stimulés après trois stimulations (p=0,616473). En revanche, une diminution de la durée de toilettage est visible pour les animaux stimulés après six (p=0,000918) et neuf stimulations (p=0,011051), comparée aux animaux contrôles. De même, dans le test de construction de nid, le score des nids des souris stimulées est inférieur à celui des souris contrôles après neuf stimulations (p=0,003112), alors qu'aucun effet comportemental n'est visible après trois stimulations (p=0,780827). Enfin, le test de préférence au sucre, réalisé après six stimulations, confirme le développement de comportements de type dépressif. La consommation d'eau sucrée est augmentée par rapport à la consommation moyenne (50%) chez les animaux contrôles (p=0,035720), alors qu'aucune différence significative n'est observée chez les animaux stimulés (p= 0,408502).

En ce qui concerne les tests évaluant les comportements de type anxieux, le test d'enfouissement de billes est le seul permettant d'observer une différence significative entre les deux groupes dès trois stimulations, avec un pourcentage de billes enfouies plus élevé chez les animaux stimulés (p=0,021663). Cette différence est toujours présente après neuf stimulations (p=0,026077). A l'inverse, aucun comportement de type anxio-dépressif n'est mis en évidence par le test d'hyponéophagie après trois stimulations (p=0,316553).

Un test d'évitement actif est réalisé après neuf stimulations optogénétiques afin d'évaluer l'effet potentiellement aversif de la stimulation elle-même. Aucune différence significative du temps passé dans le compartiment associé à la stimulation n'est observée entre les deux groupes (p=0,566360). La stimulation n'induit donc aucun état aversif chez l'animal. Comme tous les tests comportementaux utilisés dépendent de l'activité motrice des animaux, nous avons également évalué l'impact de la stimulation de la voie BLA-CCA sur l'activité spontanée des animaux après six

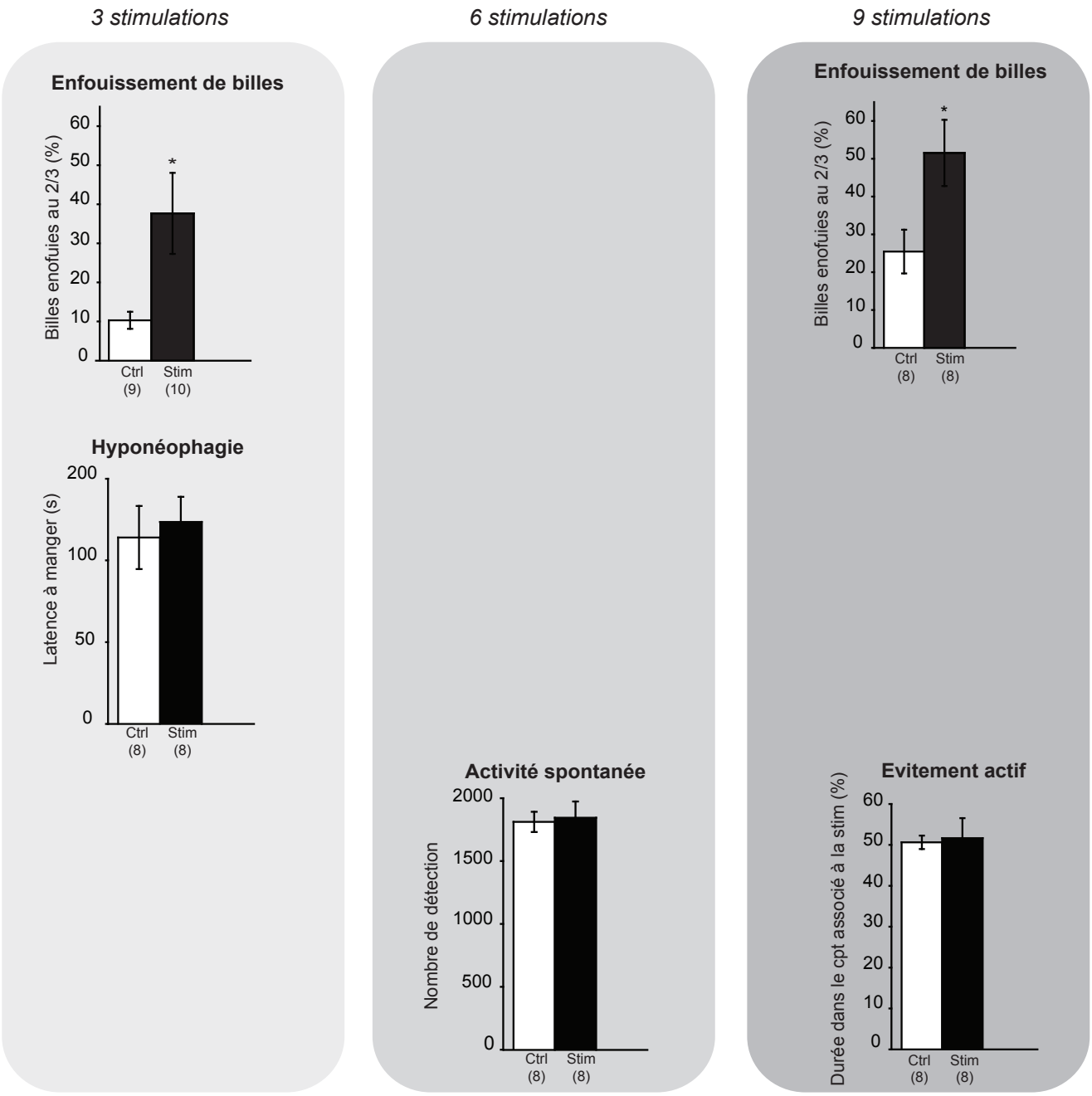


Figure 20: Evolution des comportements de type anxiodépressif après trois, six et neuf stimulations de la voie BLA-CCA (suite)

stimulations. Aucune différence n'est observée entre les deux groupes d'animaux (p=0,808295) ce qui suggère l'absence d'un effet de la stimulation optogénétique sur le comportement moteur des souris.

L'ensemble de ces résultats préliminaires montre un effet comportemental de la stimulation optogénétique de la projection BLA-CCA qui semble dépendant de sa répétition. L'établissement des comportements de type anxieux et dépressif chez la souris naïve est donc progressif, suggérant peut-être la mise en place potentielle d'une plasticité nécessaire au développement de tels comportements.

C. Discussion

Nous avons montré que la stimulation optogénétique des terminaisons des neurones du BLA dans le CCA provoque des comportements de type anxio-dépressif chez la souris naïve et que cet effet se renforce lors des répétitions des stimulations. Ces expériences suggèrent donc pour la première fois une implication de la voie BLA-CCA dans le développement des troubles de l'humeur. Ces résultats sont bien entendu préliminaires et nécessitent d'être approfondis. Ce travail a permis de valider l'hypothèse de départ, mais a surtout été important pour mettre en place et valider l'approche. Dans cette partie, nous discuterons donc uniquement des aspects techniques de cette étude, les considérations fonctionnelles et mécanistiques seront abordés dans la **Discussion Générale** de la thèse.

I. Considérations méthodologiques

Afin de pouvoir interpréter les données comportementales comme résultant de l'effet induit par la stimulation optogénétique, il nous a fallu contrôler plusieurs paramètres : l'expression de la ChR2 dans les neurones du BLA projetant au CCA, ainsi que l'efficacité et la spécificité de la stimulation de cette voie par la lumière bleue. Pour cela, un certain nombre d'expériences contrôles *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées.

1) Spécificité de l'infection virale et expression de la ChR2

La spécificité de l'expression de la ChR2 repose sur la localisation de l'injection du virus réalisée dans le BLA, ainsi que sur son expression. Il arrive que, malgré des sites d'injection centrés sur le BLA, une diffusion du virus dans les structures adjacentes soit parfois observée. L'étude des afférences des aires 24a/24b chez la souris (voir Article 1) nous a permis de confirmer que le BLA est le seul noyau de l'amygdale qui projette au CCA et que les régions corticales du lobe temporal, latérales au BLA, n'y projettent pratiquement pas. Enfin, nous avons pu confirmer que l'expression de la ChR2 se faisait bien dans les terminaisons du BLA, car la topographie des fibres exprimant l'YFP, après injection de l'AAV, apparaissait identique à celle des fibres BDA positives des expériences de traçage antérograde. Ainsi, même si le virus peut diffuser dans les régions voisines au site d'injection dans le BLA, nous pouvons considérer que la stimulation optogénétique dans le CCA n'affecte que la voie BLA-CCA.

2) Efficacité et spécificité de la stimulation optogénétique

a) Protocole de stimulation

Le protocole de stimulation optogénétique *in vivo* utilisé dans les expériences de comportement a été établi en se basant sur les expériences précédentes de notre équipe (Barthas et al. 2015), mais également sur les travaux de l'équipe du Dr Kay Tye (Felix-Ortiz et al. 2013; Felix-Ortiz and Tye 2014; Tye et al. 2011). Ces derniers, en utilisant la même souche virale, ont étudié l'effet d'une stimulation des terminaisons du BLA dans différentes structures comme l'amygdale centrale ou l'hippocampe lors de tests permettant l'évaluation des comportements sociaux ou de type anxieux. Les résultats de ces travaux seront abordés plus en détail dans la **Discussion Générale** de cette thèse. Nous avons ainsi sélectionné une durée identique de 20 min, mais une fréquence plus basse de 10 Hz, plus proche de la fréquence physiologique de décharge des neurones du BLA (Rosenkranz and Grace 1999; Song et al. 2017).

b) Validation de la réponse des neurones du CCA à la stimulation

Les effets de la stimulation des terminaisons des neurones du BLA sur l'activité des neurones du CCA ont été évalués *in vitro* par patch-clamp et *in vivo* par quantification de l'expression de la protéine c-Fos. Nous avons ainsi pu observer que la stimulation provoquait des courants entrants dans les neurones pyramidaux de la couche II du CCA, ainsi qu'une augmentation bilatérale de l'expression de la protéine c-Fos dans les aires 24a et 24b. Toutefois, l'enregistrement par la technique de patch-clamp, dans les conditions de cette expérience, ne permet pas d'affirmer si la stimulation des terminaisons du BLA induit des potentiels post-synaptiques de type excitateur ou inhibiteur dans les neurones de la couche II du CCA. De plus, cette expérience a été réalisée sur des tranches de cerveaux, où seule une portion limitée des terminaisons du BLA est encore présente et induit ainsi une sous-estimation de l'effet de notre stimulation. Si ces expériences permettent d'affirmer que la stimulation optogénétique des terminaisons du BLA modifie l'activité des neurones du CCA, une validation électrophysiologique *in vivo* reste indispensable afin d'évaluer l'effet de notre protocole de stimulation sur les neurones pyramidaux du CCA au sein d'un réseau intact. Une analyse neurochimique de l'identité des neurones exprimant la protéine c-Fos permettra également d'en savoir plus sur les circuits locaux recrutés.

Sur la base de la littérature, certaines hypothèses mécanistiques peuvent toutefois déjà être avancées et seront abordées dans la **Discussion Générale** de cette thèse.

c) Spécificité de la stimulation lumineuse

En activant les terminaisons du BLA, nous nous sommes placés dans une condition précise où l'effet observé n'est induit que par les neurones du BLA projetant au CCA. Cependant, il est envisageable que des régions adjacentes aux aires 24a/24b, recevant également des projections du BLA comme l'aire 32 ou le RS (Dziewiatkowski et al. 1998; Olucha-Bordonau et al. 2015), soient également atteintes par le faisceau lumineux et participent à l'effet comportemental que nous observons. Il serait possible de s'affranchir de cette implication potentielle d'autres structures en stimulant directement les corps cellulaires des neurones du BLA, tout en restant spécifique de la voie BLA-CCA. Pour cela, d'autres outils viraux associés au système d'expression conditionnel cre-lox peuvent être employés. L'injection dans le CCA d'un adénovirus canin rétrograde induisant l'expression de la Cre-recombinase (Cav2-cre), associée à l'injection dans le BLA d'un AAV contenant le gène de la ChR2 flanqué de séquences LoxP (AAV-EF1a-DIO-hChR2), conduirait à l'expression de la ChR2 uniquement dans les neurones de la voie BLA-CCA. Cette approche pourrait également permettre d'étudier l'implication respective des aires 24a et 24b. En effet, notre analyse des efférences du CCA a mis en évidence des différences parmi les projections des aires 24a et 24b, en particulier vers l'hypothalamus et certaines régions de la PAG et du SC (voir Article 2), pouvant ainsi suggérer l'existence de fonctions spécifiques à ces deux aires.

L'utilisation de ce système Cav2-cre/AAV-EF1a-DIO-hChR2 pourrait donc, sous réserve d'une diffusion réduite du Cav2-cre dans 24a et 24b, permettre d'étudier séparément l'implication de ces deux aires dans les comportements de type anxieux et dépressif chez la souris. Cette approche n'a toutefois pas été retenue pour deux raisons majeures. Cela nécessite l'implantation à demeure de deux fibres optiques (BLA bilatéral) ce qui représente un appareillage lourd pour l'animal. De plus, plusieurs études ont montré que les neurones du BLA projetant au cortex préfrontal étaient capables d'émettre des collatérales dans d'autres régions comme le noyau accumbens, l'hypothalamus ou encore le cortex préfrontal latéral (Chiba 2000; Sarter and Markowitsch 1984; Shinonaga et al. 1994). Cette approche ne permettrait donc

pas d'atteindre un niveau de spécificité de la voie BLA-CCA aussi efficace que celui que nous possédons en ciblant directement les terminaisons du BLA dans le CCA.

II. Analyse des résultats

Nous avons utilisé des tests comportementaux permettant de mesurer soit des comportements de type anxieux, de type dépressif ou les deux (Bodnoff et al. 1988; Romano et al. 2015; Svirsky et al. 2016; Yalcin et al. 2011; Zhang et al. 2016b). Ces tests sont principalement basés sur l'évaluation de comportements naturels de l'animal, comme la construction d'un nid, le toilettage ou encore l'exploration de l'environnement et permettent donc de conserver une dimension éthologique indispensable lors de nos expériences. L'accumulation des répétitions de la stimulation optogénétique semble donc permettre de renforcer ces comportements de type anxio-dépressif, bien que les tests n'aient été effectués qu'après un délai minimal d'un jour suivant la dernière stimulation. De manière intéressante, il semble que la diversité des tests comportementaux que nous avons réalisés a permis d'observer des effets différents selon la nature de la tâche comportementale effectuée, comme nous allons le développer ci-dessous.

1) Interprétation de l'effet itératif-dépendant de la stimulation optogénétique

Parmi les tests réalisés après trois stimulations, aucune différence de consommation de sucre, de construction de nid ou de latence à manger dans le test d'hyponéophagie n'a été observée entre nos groupes d'animaux stimulés et témoins. Après six et neuf stimulations en revanche, ces mêmes tests mettent en évidence une altération de ces comportements chez les animaux ayant reçu les stimulations. Répéter la stimulation uniquement trois fois n'est donc pas suffisant à induire une modification de l'ensemble des comportements de type anxieux et dépressif.

Il est envisageable que ce résultat soit dû au délai entre la dernière stimulation et le test pendant lequel l'effet induit par la stimulation pourrait s'estomper. Le planning de nos expériences de comportement (voir Matériel et Méthode ; Figure 10) implique effectivement un délai d'un à trois jours entre la dernière stimulation et le début des tests comportementaux. Après un nombre de répétitions plus important, l'accumulation de l'effet induit par la stimulation serait alors suffisante pour permettre

l'expression de phénotypes anxieux et dépressifs, même plusieurs jours après l'arrêt des stimulations. Afin de s'assurer que le délai d'une journée n'est pas à l'origine de nos résultats négatifs après trois stimulations, une expérience contrôle évaluant le comportement pendant la stimulation ou immédiatement après pourrait être réalisée. L'étude récente de Barthas et al. (2017), dans laquelle les auteurs stimulent directement les corps cellulaires du CCA, permet d'apporter un début de réponse. Immédiatement après la stimulation optogénétique des neurones du CCA, aucun effet comportemental n'est observé dans le test d'hyponéophagie. En revanche, la répétition de la stimulation durant quatre jours consécutifs conduit à une diminution du comportement de toilettage dans le test de pulvérisation d'eau sucrée. Même si cette étude concerne la totalité des neurones infectés du CCA, ces résultats suggèrent tout de même que ce serait la répétition de la stimulation optogénétique qui induirait les phénotypes anxio-dépressifs observés et que le délai entre la fin de la stimulation et le début du comportement ne serait pas impliqué. Cette nécessité de réitérer la stimulation plusieurs fois avant d'obtenir un effet observable dans plusieurs tests pourrait impliquer la mise en place de mécanismes plastiques, dont l'accumulation progressive permettrait le développement de ces phénotypes. Sur ce point, il serait également intéressant d'évaluer la persistance des symptômes de type anxieux et dépressif.

2) Test d'enfouissement de billes : un cas particulier ?

Parmi les tests évaluant l'anxiété, le test d'enfouissement de billes est le seul qui met en évidence un comportement de type anxieux dès trois stimulations, à l'inverse du test d'hyponéophagie, qui ne montre aucun effet après trois stimulations. Dans une étude menée par notre équipe visant à établir la chronologie du développement de comportements de type anxieux et dépressif suite à l'induction d'une douleur neuropathique chez la souris, le test d'enfouissement de billes met également en évidence une différence significative entre les animaux douloureux et les animaux témoins dès quatre semaines, alors que le test d'hyponéophagie ne montre une telle différence qu'à partir de cinq semaines (Yalcin et al. 2011). Le test d'enfouissement de bille est un test relativement simple, qui fait probablement appel à une réponse motrice peu élaborée d'un point de vue cognitif face à un objet intrusif considéré comme potentiellement dangereux (Nicolas et al. 2006; Njung'e and Handley 1991).

Cette situation pourrait alors faire appel directement aux rôles du BLA dans la peur et l'anxiété. Le test d'hyponéophagie serait plus complexe, impliquant la motivation pour aller manger et l'anxiété générée par l'environnement exposé (Bodnoff et al. 1988; Ibarguen-Vargas et al. 2008; Yalcin et al. 2011), et nécessiterait une intégration cérébrale plus importante. Cela pourrait donc suggérer une différence de sensibilité de ces tests à la répétition de stimulation de la voie BLA-CCA.

En plus de compléter l'étude des effets comportementaux de la stimulation de la voie BLA-CCA après trois, six et neuf stimulations (Figure 20), il serait donc intéressant de mesurer l'effet de l'activation de cette voie dans d'autres protocoles expérimentaux évaluant différents comportements de type anxieux et/ou dépressif. Par exemple, le test du labyrinthe en croix surélevé est basé sur la tendance exploratoire naturelle des rongeurs ainsi que leur aversion innée pour les environnements exposés et permet d'évaluer un phénotype de type anxieux (Pellow and File 1986). Le test d'interaction sociale évalue quant à lui la durée de l'interaction de deux animaux, décrite comme indicative d'un comportement de type anxiogène si cette durée est réduite (File and Hyde 1978). Ces expériences nous permettraient de compléter notre caractérisation des comportements pouvant être perturbés par la stimulation répétée de la projection du BLA dans le CCA.

D. Conclusions

Nous avons donc mis en évidence pour la première fois l'implication de la voie BLA-CCA dans les comportements de type anxio-dépressif. Comme nous venons de le voir, certaines expériences complémentaires devront être réalisées afin de compléter la caractérisation de l'effet de l'activation de cette voie, comme un comptage de c-Fos dans certaines régions adjacentes ou la réalisation d'autres tests comportementaux. Nous manquons encore d'information afin d'expliquer les mécanismes potentiellement impliqués par la répétition de cette stimulation, mais certaines hypothèses peuvent toutefois être avancées comme cela sera abordé dans la **Discussion générale**.

Ce travail est prometteur et ces résultats préliminaires incitent à continuer à étudier cette voie. Plusieurs questions restent encore sans réponse et devront être abordées dans la suite de ce projet. Quels sont les types cellulaires ciblés par les neurones de projection du BLA ? Où ces neurones projettent-ils et quelle est la proportion de neurones projetant en retour au BLA ? Quel effet produit l'activation de cette voie sur l'activité globale du CCA ? Cela induit-il des modifications d'expression de gènes ? Est-ce que l'inhibition de cette voie chez des animaux présentant un phénotype anxio-dépressif permet de rétablir leur comportement ? Ces questions nécessiteront des réponses pouvant être apportées par différentes expériences de comarquage, de traçage transynaptique, d'imagerie cérébrale et d'analyse moléculaire. D'ores et déjà, cette thématique est poursuivie dans l'équipe par Léa Becker, étudiante en master actuellement et souhaitant poursuivre l'étude de ce projet en thèse.

Discussion générale

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence pour la première fois chez la souris l'ensemble des afférences et des efférences des aires 24a et 24b du CCA, mais également des aires 24a` et 24b` du CCM. Nous avons montré un patron de connexions commun entre ces aires cingulaires mais également plusieurs différences de densité et de topographie. Avant toute chose, certains aspects méthodologiques de cette étude seront abordés. Nous reviendrons ensuite sur les différences entre les connexions du CCA et du CCM ainsi que sur les gradients dorso-ventraux que nous avons observés, et discuterons d'un point de vue anatomo-fonctionnel de leurs possibles rôles. Nous considérerons ensuite ces réseaux dans leur globalité et aborderons, en nous basant sur la littérature et les connexions que nous avons observées, du ou des rôle(s) potentiel(s) de ces circuits. Nous discuterons enfin du rôle du connectome du CCA dans les troubles de l'humeur en se basant sur nos travaux étudiant du rôle de la voie BLA-CCA.

I. Considérations méthodologiques

Le traçage neuronal conventionnel est une technique simple et efficace pour déterminer la connectivité d'une structure. Son utilisation dans une étude de connectivité comme la nôtre, s'employant à cibler des régions plus discrètes comme les aires cingulaires, apporte une précision anatomique nécessaire et indispensable. Il reste cependant important de discuter de certains aspects techniques.

1) Les traceurs

Chacun des traceurs que nous avons utilisés possède des avantages et des inconvénients qui leurs sont propres. Ainsi, le FG présente l'avantage d'une fluorescence intrinsèque permettant son observation directe, mais il peut toutefois être à l'origine d'une marquage non spécifique au site d'injection par sa capture par des fibres de passage (Kobbert et al. 2000). A l'inverse, la CTb possède un mode de capture actif, via les gangliosides GM1 présents à la synapse, ce qui diminue sa probabilité d'être pris par les fibres de passage. En revanche, ce mode de capture conduit à un marquage moins dense dans certaines régions dont les terminaisons contiennent moins de GM1 (Fillinger et al. 2016; Kobbert et al. 2000). LA CTb est aussi à l'origine d'un marquage antérograde conséquent. Enfin, la BDA possède l'avantage d'être rapidement détectable par le système de révélation avidine-biotine-

peroxydase mais la PHA-L produit un marquage plus intense et contrasté, facilitant l'analyse des fibres. Malgré tout, il est plus difficile de maitriser la taille des sites d'injection de la PHA-L que de la BDA. D'autres traceurs auraient pu être sélectionnés pour cette étude, de type antérograde tels que la neurobiotine ou la biocytine, ou rétrograde comme la peroxydase de raifort (HRP). Mais dans tous les cas, les avantages inhérents à chaque traceur s'accompagnent presque toujours d'inconvénients ne pouvant être évités (Kobbert et al. 2000; Lanciego and Wouterlood 2011).

Nous avons donc choisi d'utiliser une combinaison de deux traceurs dont les paramètres d'injection et de révélation étaient déjà connus dans l'équipe : le FG et la CTb pour l'analyse des afférences et la BDA et la PHA-L pour l'analyse des efférences du CCA. Cette combinaison nous a permis de confirmer les connexions mises en évidence par un traceur grâce à l'autre traceur de même type, mais également de préciser notre analyse dans certaines régions. Par exemple, les injections de FG ont confirmé l'existence d'une projection modérée depuis les centres cholinergiques du télencéphale non-cortical et monoaminergiques du tronc cérébral marqués très faiblement par des injections à la CTb (voir Article 1). Nous avons également réalisé des traçages antérogrades dans des régions comme la HDB, le LC ou le raphé, dans lesquelles la densité de marquage obtenue après une injection de FG et de CTb différait (voir Supplementary, Article 1).

2) Précision anatomique des sites d'injection

Dans nos deux études de traçage neuronal, nous avons basé notre analyse sur plusieurs cas que nous avons jugés représentatifs d'une injection dans 24a (rostral, caudal), 24b (rostral, caudal), 24a` ou 24b` en fonction des données anatomiques fournies par l'atlas stéréotaxique du cerveau de la souris (Paxinos and Franklin 2012). Parmi ces différents cas (trois à quatre par condition), nous avons pu observer une certaine hétérogénéité dans le marquage obtenu. Cette hétérogénéité s'explique notamment par la position et l'étendue du site d'injection. Une injection de BDA, centrée sur les couches superficielles du cortex cingulaire, conduit par exemple à un marquage antérograde dans le thalamus plus faible qu'une injection centrée sur les couches profondes. De même, une injection de PHA-L centrée sur la partie la plus dorsale de 24b et pouvant ainsi s'étendre au M2, a conduit à un marquage

antérograde plus dense et topographiquement différent dans le CPu. Afin de pouvoir valider les connexions mises en évidence comme spécifiques à l'aire 24, nous avons confronté nos résultats avec ceux obtenus par des injections situées dans les régions adjacentes, comme l'aire 32 et le M2 (résultats non montrés). En comparant les différents marquages, nous avons été en mesure d'identifier des sites d'injection dont la position équivoque pouvait être à l'origine d'un marquage non spécifique de la région visée. L'utilisation du traçage antérograde réciproque dans le BLA, en complément du traçage rétrograde, a également aidé à préciser la topographie de sa projection au sein des couches corticales du CCA (*i.e.* aires 24a/24b).

Il faut toutefois garder à l'esprit que la définition anatomique des aires 24a/24b et 24a`/24b` sur laquelle nous nous sommes basés aujourd'hui a déjà beaucoup évoluée avec le temps (voir **Introduction Générale, I. 2) a) Modélisation du cortex cingulaire : une approche histrorique**) et peut encore évoluer en fonction des nouvelles données de la littérature. De plus, une région n'est pas seulement définie par ses connexions, mais également par sa cyto- et sa chimioarchitecture qui peuvent ne pas correspondre. Par exemple, l'analyse des cyto- et chimioarchitectures du CCA n'a pas permis d'identifier une aire 33 chez la souris (Sesack and Bunney 1989; Van De Werd et al. 2010; Vogt 2015; Vogt and Paxinos 2014; Vogt et al. 2001). En revanche, le marquage obtenu par certaines de nos injections situées dans la partie la plus ventrale de 24a pourrait suggérer l'existence de cette aire car le connectome obtenu diffère de celui induit par une injection dans la partie plus dorsale de 24a (résultats non montrés).

L'ensemble des ces expériences contrôles nous a donc permis de valider l'existence de chacune des connexions des aires cingulaire que nous avons étudiées en accord avec la 4ème édition de l'atlas stéréotaxique du cerveau de la souris (Paxinos and Franklin 2012).

3) Analyse de la densité des marquages

L'une des principales informations fournie par nos travaux après l'établissement du connectome est l'évaluation de la densité de marquage. Dans l'étude des entrées, nous avons réalisé une analyse quantitative du marquage rétrograde obtenu par comptage des corps cellulaires marqués (voir Article 1). Alternativement, une

approche de quantification par stéréologie aurait également pu être utilisée mais n'aurait pas non plus permis de passer outre la variabilité interindividuelle inhérente à chaque cas, comme discuté plus loin dans ce paragraphe. Dans l'étude des efférences en revanche, nos résultats ont été exprimés de manière semiquantitative. L'expérimentateur attribue une valeur quantitative subjective de densité de fibres marquées pour chaque structure et pour chaque cas, puis une valeur moyenne est donnée pour quantifier la densité d'innervation d'une structure par une aire cingulaire. Une évaluation quantitative, au sens propre du terme, aurait nécessité un comptage du nombre de boutons synaptiques, rendu particulièrement ardu notamment dans certaines régions du tronc cérébral où les projections se mélangent aux fibres de passage. Une mesure de l'intensité lumineuse, cette fois-ci avec une révélation fluorescente, aurait également été une option. Cependant, ces approches ne sont pas dénuées de biais, puisque les qualités de révélation histochimique, ainsi que les caractéristiques des sites d'injection (position dans l'aire injectée, couches corticales, étendues rostro-caudale et dorso-ventrale) peuvent différer grandement. Notre approche comparative, même si elle ne permet pas d'écarter un « effet expérimentateur », permet de tenir compte de ces différences pour donner une évaluation de la densité relative de chacune des projections des aires 24a, 24b, 24a` et 24b`.

A l'ère des études connectomiques à grande échelle et du traçage viral, l'utilisation de traceurs conventionnels peut sembler basique. Cependant, dans ce type d'étude automatisée "whole brain", la production de résultats en masse se fait parfois au détriment de la précision anatomique indispensable à l'étude de régions discrètes. Nous avons ainsi été en mesure de mettre en évidence des différences de patron de connexions entre les aires 24a/24b du CCA et 24a`/24b` du CCM, mais aussi entre les aires ventrales 24a/24a` et dorsales 24b/24b`.

II. Spécificités anatomo-fonctionnelles des aires cingulaires

1) CCA (24a/24b) *versus* CCM (24a`/24b`)

Le CCA et le CCM sont deux régions du cortex cingulaire qui trouvent leur équivalence chez le primate. Toutefois, l'identification du CCM en tant que région à part entière du cortex cingulaire est récente chez le rongeur (Vogt and Paxinos 2014; Vogt et al. 2004), le CCM étant jusqu'alors considéré uniquement comme la partie caudale du CCA. Cette considération explique le peu d'information dont nous disposions jusqu'alors quant à sa connectivité chez le rongeur, mais est également à l'origine du manque d'études fonctionnelles. Leur position anatomique, ainsi que le nombre conséquent de connexions communes au CCA et au CCM peuvent expliquer pourquoi ces deux régions ont longuement été « fusionnées ». Nos résultats montrent en effet de nombreux points communs, mais également certaines spécificités justifiant la dissociation de ces deux régions.

Les connectomes respectifs du CCA et du CCM sont largement comparables, avec toutefois une densité de connexions du CCA globalement plus forte et une projection réduite du CCM vers la partie la plus caudale du tronc cérébral. Certaines régions présentent cependant une connectivité renforcée avec le CCM. Ainsi le RS, particulièrement les aires 29c et 30, l'AV, et l'AD sont préférentiellement connectées au CCM, et d'autres régions corticales (V2M, V2L), thalamiques (LD, LP) ou du tronc cérébral (SC) présentent une innervation du CCM comparable à celle du CCA. Il est intéressant de noter que ces structures sont principalement impliquées dans des processus d'attention ou d'orientation visuospatiales (Aggleton et al. 1996; Aggleton et al. 1995; Aggleton et al. 2010; Cooper et al. 2001; Kuljis and Fernandez 1982; Takada 1992; Vann et al. 2003). Dans leurs études, Vogt et al. (2015, 2016) décrivent le CCM, en association avec ses connexions réciproques avec le CCA et le RS, comme une région charnière. Le CCM sous-tendrait alors l'intégration des informations « égocentriques », de types autonome et somatosensoriel sous-traitées par le CCA, ainsi que les informations « allocentriques », fournies par le RS et visant à orienter la navigation spatiale sur la base d'indices visuels et auditifs (Vogt 2015; Vogt 2016). Le CCM participerait ainsi à la sélection de la stratégie comportementale la mieux adaptée lors d'une situation conflictuelle, en prenant en compte les

bénéfices attendus d'une stratégie, mais aussi sa validité. De manière intéressante, la sélection d'une stratégie vis-à-vis d'une autre, basée sur des indices environnementaux, est une fonction du CCM également décrite chez le primate (Bush 2009).

Si le patron de connexions du CCA dans sa globalité est plus dense que celui du CCM, il reste qualitativement comparable. Toutefois, certaines structures comme les noyaux thalamiques de la ligne médiane et intralaminaires, en particulier le Re/Rh, présentent des connexions privilégiées, presque exclusives avec le CCA. Cette observation n'est pas étonnante : ces noyaux ont été décrits comme une projection spécifique du CCA par opposition au CCM (Vertes and Hoover 2008; Vogt 2015). Leurs connexions, avec le tronc cérébral en particulier, font de ces noyaux thalamiques un centre majeur de modulation corticale, impliqué dans l'éveil attentionnel (*arousal*) et la conscience perceptuelle (Jasper 1998; Van der Werf et al. 2002). Le BLA est également un partenaire privilégié du CCA (voir Article 1 et Article 2). Cette connexion participe pleinement au rôle singulier du CCA dans les émotions en permettant l'attribution d'une valence émotionnelle aux informations sensorielles (Arruda-Carvalho and Clem 2015; Canteras et al. 2010; Likhtik and Paz 2015; Marek et al. 2013; Pape and Pare 2010). Plusieurs études ont d'ailleurs étudié le rôle particulier de cette projection dans la peur, en montrant que l'activation de la projection du BLA dans les aires 32/24 attribuait une valence de menace au stimulus, alors que l'activation de sa projection à l'aire 25 favorisait une valence de sécurité (Knapska et al. 2012; Livneh and Paz 2012; Senn et al. 2014; Sotres-Bayon et al. 2012).

Ainsi, les spécificités de connexions du CCA et du CCM leurs confèrent des rôles en partie distincts. Cependant, les fortes interconnexions entre ces deux régions cingulaires et le partage d'une grande majorité de leurs connexions extrinsèques suggèrent que leurs rôles seraient complémentaires.

2) Aires dorsales (24b/24b`) *versus* aires ventrales (24a/24a`)

En analysant séparément les connectivités des aires dorsales et ventrales, nous avons pu observer des différences de densité et de topographie entre les aires 24a et 24b. Certaines de ces différences de densité ont également été retrouvées en

comparant les aires 24a` et 24b` du CCM, mais leur topographie reste souvent comparable. Lors de notre analyse des interconnexions de l'aire 24, nous avons de même observé une connexion préférentielle entre les aires 24a/24a` ventrales et 24b/24b dorsales, par comparaison avec celles observées entre 24a/24b et 24a`/24b` (voir Article 1 et Article 2). Ces spécificités de connexion peuvent être mises en parallèle avec des fonctions particulières. Comme nous l'avons vu dans l'**Introduction générale**, la région anatomique du CCA, constituée des aires 25, 32, 24a et 24b chez la souris, est souvent « absorbée » par le concept de mPFC, regroupement anatomo-fonctionnel des aires cingulaires 25 et 32, de la partie rostrale de l'aire 24 et du M2. Le CCM, quant à lui, est souvent « l'oublié » de ces études. En nous basant sur les informations anatomiques et fonctionnelles du mPFC données par la littérature, nous suggérerons qu'il existe d'une certaine cohérence dans leur organisation.

a) Régions dorsales

L'aire 24b a été identifiée sur la base de ses connexions comme un des composants du mPFC dorsal chez le rat, en association avec la partie dorsale de l'aire 32 et le M2 (Christakou et al. 2004; Gabbott et al. 2005; Morgan and LeDoux 1995; Neafsey et al. 1993). Les connexions importantes de 24b avec le M2, le RS et le PtA, ou encore une projection peu conséquente vers l'hypothalamus sont des caractéristiques également retrouvées dans l'analyse des projections du mPFC dorsal (Conde et al. 1995; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Hurley et al. 1991; Sesack and Bunney 1989; Vertes 2004).

Que cela peut-il impliquer d'un point de vue fonctionnel ? Le mPFC dorsal a été décrit comme jouant un rôle dans un certains nombre de fonctions exécutives comme la prise de décision, la mémoire de travail, la sélection et l'initiation d'une réponse comportementale, le séquençage spatiotemporel de cette réponse, l'apprentissage de la navigation spatiale, la détection d'erreurs et l'allocation attentionnelle nécessaire à la rectification d'un comportement inadapté (Bissonette et al. 2013; Dalley et al. 2004; Heidbreder and Groenewegen 2003; Kesner and Churchwell 2011; Kesner and Ragozzino 2003; Killcross and Coutureau 2003). Cette région semble donc jouer un rôle majeur dans la sélection et l'adaptation du comportement. Par ses relations privilégiées avec des régions associées à

l'information visuospatiale et à l'attention visuelle (cortex visuel, RS, cortex pariétal, M2, noyaux thalamiques antérieurs, LP, LD, SC) et à la mémoire (RS, région hippocampale et parahippocampale, noyaux thalamiques antérieurs, Re/Rh), l'aire 24b pourraient ainsi sous-tendre l'adaptation du comportement en fonction des indices visuels et des souvenirs visuospatiaux relatifs à une action similaire, en sélectionnant une allocation adéquate de l'attention visuelle (Aggleton and Nelson 2015; Aggleton et al. 2010; Cooper et al. 2001; Corcoran et al. 2016; Hindley et al. 2014; Kamishina et al. 2009; Reep et al. 1990; Takada 1992; Takenouchi et al. 1999; van Groen et al. 2002b; Zhang et al. 2016a; Zhang et al. 2014). L'initiation de ce comportement dirigé vers un but pourrait alors être sous-tendue par les connexions privilégiées de 24b avec plusieurs régions prémotrices et motrices comme le M2, le CPu, les noyaux ventraux du thalamus, la ZI, le SC, les régions caudales du tronc cérébral et la moelle épinière (Barthas and Kwan 2017; Brecht et al. 2004; Dean et al. 1986; Friedman et al. 2015; Gabbott et al. 2005; Pastoriza et al. 1996; Sahibzada et al. 1986; Yin et al. 2005).

b) Régions ventrales

Il n'existe aujourd'hui que de très rares études connectomiques et fonctionnelles individualisant l'aire 24a (Bota et al. 2015; Han et al. 2003; Takenouchi et al. 1999), la grande majorité cible en effet le CCA (*i.e.* 24a/24b) comme un ensemble (Bussey et al. 1997b; Hoover and Vertes 2007; Tang et al. 2005; Totah et al. 2009; Wang et al. 2016), ou uniquement l'aire 24b qui bénéficie fortement de son affiliation au concept plus reconnu de mPFC dorsal (Albrechet-Souza et al. 2009; Delatour and Gisquet-Verrier 2001; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hosking et al. 2014; Koike et al. 2016; Radley et al. 2008; Ragozzino et al. 1998).

D'après nos observations, certains arguments anatomiques et connectomiques peuvent toutefois être avancés et plaideraient en faveur d'une association de l'aire 24a avec le mPFC ventral, composé de la partie ventrale de l'aire 32 et de l'aire 25 (Dalley et al. 2004; Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Vertes 2004). Ainsi, la région la plus rostrale de 24a occupe, dans la nouvelle édition de l'atlas du cerveau de la souris (Paxinos and Franklin 2012), la position anatomique auparavant occupée par la partie ventrale de l'aire 32 (Franklin and Paxinos 2007). Cela supposerait donc que dans certaines études, des fonctions allouées à la partie ventrale de l'aire 32 pourraient en fait correspondre à des fonctions de l'aire 24a

rostrale. De plus, certaines des connexions préférentielles de l'aire 24a comme l'entrée qu'elle reçoit de CA1 ou sa projection à l'hypothalamus, au PV, au PT, à la LHb, sont également attribuées au mPFC ventral (Gabbott et al. 2005; Heidbreder and Groenewegen 2003; Hoover and Vertes 2007; Vertes 2004).

Ces arguments anatomiques semblent donc plaider en faveur d'une association de l'aire 24a au mPFC ventral. Cette région serait impliquée dans l'association des états physiologiques internes à un stimulus spécifique, en permettant ainsi une adaptation du comportement (Heidbreder and Groenewegen 2003). Plus précisément, le mPFC ventral jouerait un rôle dans la coordination de certaines fonctions autonomes comme la modulation des activités gastro-intestinale et cardiovasculaire, ainsi que dans l'association d'un stimulus avec une réponse comportementale donnée et dans l'expression de la réponse lors de l'apprentissage d'un conditionnement (Bissonette et al. 2013; Dalley et al. 2004; Fisk and Wyss 2000; Frysztak and Neafsey 1994; Hardy and Holmes 1988; Heidbreder and Groenewegen 2003; Morgan et al. 2003). Cette modulation des fonctions autonomes est sous-tendue par les connexions du mPFC ventral avec certain centres autonomes du mésencéphale et du tronc cérébral (Heidbreder and Groenewegen 2003; Thompson and Swanson 2003; Vertes 2004), et notamment avec l'hypothalamus, ce que nous avons également observé pour 24a (voir Article 2). Dans ce contexte, l'aire 24a pourrait donc, grâce à ses connexions privilégiées avec l'hypothalamus, la PAGdl ou encore les noyaux thalamiques PV et PT en lien direct avec de nombreux centres viscéromoteurs (Floyd et al. 2000; Floyd et al. 2001; Gabbott et al. 2005; Van der Werf et al. 2002), participer à l'association d'un état émotionnel et viscéral au contexte.

III. CCA et réseau médian

Nous venons de voir que les spécificités de connexions des différentes aires cingulaires peuvent être associées à des fonctions particulières. Nous suggérons ainsi que le CCM permettrait la sélection de la stratégie la plus adéquate à la résolution d'une situation inextricable alors que le CCA (*i.e.* aires 24a/24b), qui présente des différences de connexions dorso-ventrales plus marquées, pourrait être à l'origine de fonctions dissociables mais complémentaires. Ainsi, il pourrait agir comme un « coach » émotionnel à l'origine de la mise en place de stratégies actives en lien avec une menace telles que le « fight or flight », l'aire 24b sous-tendant leurs aspects prémoteurs alors que l'aire 24a régirait les réactions autonomes associées.

Cette hypothèse de l'organisation anatomo-fonctionnelle du réseau du CCA trouve sa place dans la littérature actuelle. En effet, plusieurs études chez le rongeur décrivent l'existence d'un réseau, le plus souvent appelé réseau médian, regroupant les régions corticales médianes, c'est-à-dire toutes les aires du CCA (aires 25, 32, 24a et 24b), le MO et le RS, ainsi que les structures préférentiellement connectées. Ce réseau médian est mis en opposition à un réseau dit orbital, constitué du reste du cortex orbital et de ses connexions privilégiées avec des régions sensorielles (Bota et al. 2015; Floyd et al. 2000; Floyd et al. 2001; Oh et al. 2014; Sesack et al. 1989; Zhang et al. 2016a; Zingg et al. 2014). Cette dissociation est également faite chez le primate (Carmichael and Price 1995a; Carmichael and Price 1995b; Carmichael and Price 1996; Ongur and Price 2000; Price et al. 1996). Ces deux réseaux en apparence parallèles seraient en fait complémentaires. Ainsi, le réseau orbital, grâce à ses interconnexions entre les cortex orbital, insulaire et différentes régions sensorielles et limbiques, fournirait au réseau médian des informations extérieures (visuelles, auditives, gustatives, …) et interne (viscérales), afin que celui-ci sélectionne la stratégie comportementale la plus adaptée au dénouement de la situation (Price et al. 1996; Zhang et al. 2016a; Zingg et al. 2014).

Le CCA se situe donc à l'interface d'un réseau de structures permettant l'échange d'informations cognitives, émotionnelles, motrices et autonomes, et représente donc un substrat majeur des comportements liés aux émotions. Cette position privilégiée fait de lui un candidat intéressant dans l'étude de pathologies telles que l'anxiété et la dépression, dans lesquelles la gestion des émotions est altérée et s'accompagne de

déficits cognitifs. Cependant, il s'agit de pathologies de circuits et l'analyse du rôle du CCA dans ces pathologies doit tenir compte de son connectome. Dans la deuxième partie de cette étude, nous nous sommes donc intéressés à la projection du BLA dans le CCA (*i.e.* aires 24a/24b) et à son implication fonctionnelle dans les troubles anxio-dépressifs.

IV. Projection du BLA dans le CCA : implication dans les comportements de type anxio-dépressif chez la souris naïve

Le BLA est un noyau appartenant à la partie basolatérale de l'amygdale dont la projection au CCA semble jouer un rôle majeur dans les émotions (voir **Partie II, A.Introduction**). Cette connectivité a été décrite comme altérée d'un point de vue fonctionnel chez des patients présentant des troubles dépressifs (Connolly et al. 2013; Straub et al. 2017) et anxieux (Brown et al. 2014; Makovac et al. 2016). Quelques études chez des rongeurs présentant des comportements de type anxieux liés à leur souche ou induits par un stress juvénile (Fragale et al. 2016; Ishikawa et al. 2015) abondent également en ce sens. De manière intéressante, une étude récemment menée par Felix-Ortiz et al. (2016) a établi qu'une activation de la projection du BLA dans les aires 25 et 32 du CCA chez des souris pouvait être à l'origine du développement de comportements de type anxieux. A partir de cette littérature et de notre analyse connectomique, nous nous sommes intéressés à l'implication de la projection du BLA dans les aires 24a/24b dans les comportements de type anxio-dépressif.

Notre étude préliminaire de l'effet de la stimulation optogénétique de la projection du BLA dans les aires 24a et 24b du CCA a ainsi permis pour la première fois de montrer son implication dans le développement de tels comportements. Les aspects techniques de cette étude ayant déjà été discutés (voir **Partie II, C. Discussion**), il reste maintenant à identifier et comprendre les mécanismes mis en jeu au sein du CCA par l'activation des terminaisons du BLA. Nous allons voir que le BLA peut influencer ces comportements différemment selon la cible de ses projections et nous discuterons alors des mécanismes potentiels mis en jeu dans les aires 24a/24b pouvant être à l'origine de la mise en place de ces comportements.

1) BLA et phénotype anxio-dépressif : état de la question

L'influence des projections du BLA dans d'autres structures comme l'amygdale centrale ou l'hippocampe sur les comportements de type anxieux chez le rongeur a déjà été mise en évidence par optogénétique (Felix-Ortiz et al. 2013; Felix-Ortiz et al. 2016; Tye et al. 2011). La stimulation du BLA lui-même entraîne un effet anxiogène (Allsop et al. 2014; Dias et al. 2013; Janak and Tye 2015). Toutefois il existe

différentes sous-populations de neurones au sein du BLA, définies sur la base de leur connectivité, qui peuvent avoir des rôles antagonistes (Felix-Ortiz et al. 2013; Felix-Ortiz et al. 2016; Truitt et al. 2007; Tye et al. 2011). Ainsi, l'activation de la projection de l'amygdale basolatérale à l'amygdale centrale, issue plutôt du BLP, possède un effet anxiolytique (Tye et al. 2011), alors que l'activation de la projection du BLA dans l'hippocampe ventral produit une augmentation des comportements de type anxieux (Felix-Ortiz et al. 2013). Une autre étude, analysant cette fois l'effet de l'activation de la projection du BLA dans les aires 25 et 32 du CCA montre également une augmentation des comportements de type anxieux (Felix-Ortiz et al. 2016).

Concernant le rôle de la voie BLA-CCA dans les comportements de type dépressif ou dans d'autres déficits associés aux troubles de l'humeur, il existe aujourd'hui peu d'information dans la littérature. Une étude menée par Ji et al. (2010) chez des rats présentant une douleur arthritique a mis en évidence que certains déficits cognitifs comme la prise de décision étaient liés à une hyperactivité du BLA, corrélée à une hypoactivation du mPFC. Plus récemment, Ishikawa et al. (2015) ont montré, dans un modèle murin de stress juvénile, pouvant induire à long terme des troubles anxieux, une activité antagoniste du mPFC et du BLA. Ces auteurs observent ainsi une surexpression de la protéine c-Fos dans le BLA et sa diminution dans l'aire 25. Notre étude permet donc pour la première fois de montrer un effet anxiogène de l'activation de la projection du BLA aux aires 24a/b.

2) Quels sont les acteurs et processus mis en jeu dans le CCA ?

Le point commun de l'ensemble de ces études montrant des déficits émotionnels et cognitifs chez le rongeur semble être une hyperactivité du BLA. Dans notre étude, l'activation forcée et répétée des terminaisons mimerait cette hyperactivité du BLA, et engendrerait une altération de l'activité du CCA à l'origine des comportements de types anxieux et dépressif observés chez les souris naïves. Chez l'homme effectivement, plusieurs études montrent une altération de l'activité de cette région chez des patients présentant des troubles de l'humeur (Ball et al. 2013; Balzarotti et al. 2016; Blair et al. 2012; Mayberg et al. 1999; Mochcovitch et al. 2014; Palm et al. 2011; Yoshimura et al. 2010). L'architecture fonctionnelle du réseau recruté dans le CCA n'est pas connue, mais certains éléments de réponse sur les mécanismes mis en jeu peuvent être apportés par la littérature.

a) Circuits locaux recrutés par le BLA

La projection glutamatergique des neurones du BLA atteint massivement les couches II et V-VI du mPFC (Gabbott et al. 2006; Guirado et al. 2016). Au sein de ces couches, le BLA cible principalement les neurones pyramidaux, ainsi que certains types d'interneurones (Gabbott et al. 2012; Gabbott et al. 2006; Olucha-Bordonau et al. 2015). Différentes études ont ainsi montré que les axones du BLA contactent préférentiellement les neurones de projection cortico-spinaux (Gabbott et al. 2012), cortico-PAG (Cheriyan et al. 2016), cortico-amygdaliens et cortico-striataux (Gabbott et al. 2005; Little and Carter 2013) du mPFC, permettant ainsi au BLA d'influencer les projections cingulaires vers divers centres autonomes, moteurs ou limbiques. On s'attendrait donc à ce que la stimulation du BLA ait un effet excitateur sur l'activité du CCA. Or, de nombreuses études montrent un effet plutôt inhibiteur (Dilgen et al. 2013; Floresco and Tse 2007; Ishikawa and Nakamura 2003). En effet, les neurones du BLA établissent également des synapses avec les interneurones inhibiteurs du mPFC, en particulier les PV+ et les SOM+ (Dilgen et al. 2013; Gabbott et al. 2006; McGarry and Carter 2016). Il a même été suggéré que la quasi-totalité des interneurones GABAergiques du mPFC chez le rat soit physiquement contactée par des axones en provenance du BLA (Cunningham et al. 2008).

Ces données relatives à une projection amygdalienne proportionnellement plus dense sur les neurones pyramidaux que sur les interneurones du mPFC, mais induisant un effet globalement inhibiteur, ne sont pourtant pas contradictoires. Tout d'abord, même si les interneurones GABAergiques corticaux sont quatre à cinq fois moins nombreux que les neurones pyramidaux, un seul interneurone est capable de faire synapse sur de nombreuses cellules pyramidales (DeFelipe and Farinas 1992; Gabbott et al. 2006; Gupta et al. 2000; Kawaguchi and Kubota 1997; Markram et al. 2004). C'est le cas notamment des interneurones PV+ et SOM+, qui présentent des morphologies en corbeille ou en chandelier et sont donc connus pour présenter ce type d'organisation synaptique (Markram et al. 2004). De plus, l'inhibition induite par les interneurones PV+, est très rapide et peut potentiellement masquer l'activation directe des neurones pyramidaux par le BLA (Dilgen et al. 2013; Gupta et al. 2000; McGarry and Carter 2016). Ces interneurones, en inhibant rapidement la production de potentiels d'action, permettent en réalité de synchroniser des populations pyramidales et d'organiser une sortie effectrice efficace (Karalis et al. 2016; Markram

et al. 2004; Steullet et al. 2014; Tremblay et al. 2016). Ainsi, la projection du BLA vers des interneurones inhibiteurs du mPFC participe à l'élaboration d'une réponse adaptée et pertinente. Il est à noter que la majorité des études évoquées précédemment a été menée dans les aires 25 et 32, mais certaines données, au moins anatomiques (Gabbott et al. 2012; Gabbott et al. 2006), suggèrent une situation analogue dans les aires 24a et 24b.

b) Hypothèse mécanistique

En se basant sur ces différentes considérations, nous proposons ici une hypothèse mécanistique qui pourrait expliquer la raison pour laquelle la répétition de la stimulation de la voie BLA-CCA serait à l'origine du développement de comportements de type anxio-dépressif. En contactant les interneurones GABAergiques du CCA (*i.e.* aires 24a/24b), les afférences du BLA peuvent donc moduler rapidement les premières étapes de l'intégration de l'information corticale, mais aussi influencer les étapes finales de cette intégration en projetant directement sur les neurones pyramidaux cortico-spinaux, cortico-amygdaliens ou encore cortico-striataux. Dans ce cas, comment une activité anormale, ou induite expérimentalement, des neurones du BLA pourrait-elle provoquer des comportements de type anxio-dépressif via le CCA ? Dans notre étude, la répétition de la stimulation optogénétique des terminaisons du BLA serait en mesure de recruter les circuits locaux du CCA et d'ainsi déclencher la mise en place progressive d'une boucle rétroactive entre le BLA et le CCA. Cette boucle autoentretenue par les connexions réciproques du BLA et du CCA pourrait, en plus du dysfonctionnement du CCA, modifier la communication entre ces deux régions indispensable à la régulation des émotions. Chez l'homme, une altération fonctionnelle similaire de la connexion du BLA avec le CCA a ainsi été montrée chez des patients dépressifs (Ho et al. 2014; Manelis et al. 2015; Murphy et al. 2016; Tadayonnejad et al. 2014) et anxieux (Etkin et al. 2010; Szekely et al. 2016; Tromp et al. 2012).

3) Conclusion

Ces travaux de thèse ont donc montré pour la première fois que la stimulation répétée de la voie BLA-CCA induit le développement de comportements de type anxio-dépressif, mais ils ne permettent pas encore de conclure sur les mécanismes sous-jacents au développement de ces phénotypes. Cette étude est donc

préliminaire mais prometteuse. Si la validité descriptive de ce modèle est confirmée par la réalisation d'autres tests comportementaux, alors il pourra également être utilisé pour mieux comprendre les bases mécanistiques des troubles de l'humeur et peut-être apporter de nouvelles pistes dans la compréhension de ces pathologies et de leurs traitements.

Conclusion générale et perspectives

L'implication du CCA dans les troubles de l'humeur a été démontrée chez l'homme (Ball et al. 2013; Blair et al. 2012; Drevets et al. 1997; Mayberg et al. 1999; Wu et al. 2011; Yucel et al. 2008) et dans des modèles précliniques (Albrechet-Souza et al. 2009; Bi et al. 2013; Castillo-Gomez et al. 2015; de Andrade et al. 2013; Nashed et al. 2015; Yu et al. 2011b). Notre équipe a ainsi montré que dans un modèle murin de troubles de l'humeur consécutifs à une douleur neuropathique, le CCA est sujet à des modifications génomiques (Barthas et al. 2017) et électrophysiologiques (Manuscrit de thèse, Dr Jim Seillmeijer). De plus, notre équipe a également montré que la lésion du CCA empêche le développent de symptômes de type anxio-dépressif induits par la douleur et que la stimulation optogénétique du CCA chez la souris naïve suffit à provoquer de tels symptômes (Barthas et al. 2015). Pour comprendre le rôle du CCA et des circuits auxquels il participe, il était nécessaire de définir précisément son connectome. En effet, aucune étude complète n'avait auparavant été menée chez la souris, *a fortiori* au vue de la révision récente du concept de cortex cingulaire des rongeurs. Nous avons donc établi au cours de cette thèse une cartographie des connexions des aires 24a/24b du CCA et 24a`/24b`du CCM de la souris et mis en évidence les spécificités de chacune des ces aires mais aussi des "signatures" cingulaires communes.

Depuis plusieurs années maintenant, un certain nombre de grands projets anatomiques analysant les connexions du cortex cérébral chez la souris ont été engagés (voir The Mouse Connectome Project, http://www.mouseconnectome.org, et The Allen Mouse Brain Connectivity Atlas, http://www.connectivity.brain-map.org). Le challenge de ces études est de réussir à isoler de cette masse de données des macrocircuits spécifiques pouvant sous-tendre des fonctions particulières. A l'inverse, d'autres études emploient une approche plus ciblée, se focalisant uniquement sur les connexions d'une structure particulière en analysant l'ensemble des caractéristiques. Notre travail anatomique se place dans cet objectif et fournit un corpus d'informations précis sur les connexions des aires 24a/24b et 24a`/24b`. Même si ce travail a été initié dans l'optique de comprendre le rôle du CCA dans les troubles de l'humeur, l'élucidation de son connectome est utile à l'ensemble de la communauté scientifique s'intéressant au cortex cingulaire. L'approche globale et notre approche ciblée sont donc complémentaires et peuvent être par la suite complétée par des études visant à disséquer une voie particulière. Dans ce contexte,

des approches de traçage génétique permettant l'analyse de circuits polysynaptiques comme la technique du TRIO (*Tracing the Relationship between Input and Output)* (Beier et al. 2015; Schwarz et al. 2015) permettraient d'apporter de nouvelles informations relatives sur les structures spécifiques impliquées dans ces voies particulières. Dans notre étude, la technique de TRIO permettrait de répondre à deux questions distinctes : 1) quelle est la cibles des neurones de projection du CCA contactés par les terminaisons du BLA et 2) quelles structures projetant au BLA pourraient être à l'origine de son hyperactivité et ainsi participer au développement des troubles de l'humeur ? En plus de compléter l'identification du réseau de structures sous-tendant le développement des troubles de l'humeur, nous serions ainsi en mesure d'étoffer notre hypothèse mécanistique, en établissant la proportion de neurones cingulaires projetant en retour au BLA (BLA-CCA-BLA) et pouvant ainsi participer à l'entretien de cette boucle rétroactive.

Au delà de l'intérêt fondamental de définir le connectome d'une structure, ces résultats fournissent également des pistes pour identifier les connexions du CCA pertinentes dans le contexte des troubles de l'humeur. Ces pathologies sont en effet décrites comme des pathologies de circuit, impliquant différentes structures corticales et sous-corticales chez l'homme (Etkin et al. 2010; Ho et al. 2014; Szekely et al. 2016; Tadayonnejad et al. 2014; Tripp et al. 2012; Tromp et al. 2012; Yoshimura et al. 2017). Nous avons alors montré que le CCA se trouvait à l'interface de régions impliquées dans des fonctions cognitives, motrices, émotionnelles et autonomes, pouvant ainsi sous-tendre son implication dans les comportements liés aux émotions et *a fortiori* son rôle principal dans les troubles de l'humeur. Par l'étude de voie ciblée, nous avons ainsi démontré le rôle de la voie BLA-CCA dans les comportements de type anxieux et dépressif. Il faut noter que la haute précision anatomique dans notre définition des connexions aires 24a/24b et 24a`/24b` peut contraster avec la stimulation optogénétique globale du CCA utilisée dans l'étude fonctionnelle. Cette dernière étude reste préliminaire et il sera nécessaire d'affiner l'approche pour mieux identifier les sous-régions du CCA mises en jeu. De plus, au delà des perspectives immédiates évoquées à la fin de la Partie II pour préciser le rôle de la voie BLA-CCA dans les troubles de l'humeur, le connectome du CCA invite à explorer d'autres voies. Ainsi, la connectivité particulière du claustrum avec les aires cingulaires positionne cette structure intrigante comme un "modérateur"

possible de l'activité corticale (Reser et al. 2014; Smythies et al. 2012; Smythies et al. 2014). D'autre part, au-delà des voies conduisant à une modification d'activité du CCA dans les troubles de l'humeur, une question importante est de définir par quelles voies efférentes le CCA influencera le comportement. Le BLA, le CPu et la PAG sont ici des pistes qui pourraient être explorées sur les plans anatomiques et fonctionnels. A long terme, ces approches intégrées pourraient permettre d'isoler une « matrice » des troubles de l'humeur, représentant l'ensemble des structures interconnectées intervenant dans l'origine, le maintien, ou même dans des symptômes plus précis de ces pathologies. L'identification d'une telle « matrice » serait alors utile chez l'homme à des approches thérapeutiques ciblées telles que la stimulation cérébrale profonde (DBS), qui pourraient ainsi permettre une adaptation du traitement à chaque patient selon sa symptomatologie et l'avancée de leurs états anxio-dépressifs.

Références

Abdallah CG, Jackowski A, Sato JR, Mao X, Kang G, Cheema R, Coplan JD, Mathew SJ, Shungu DC (2015) Prefrontal cortical GABA abnormalities are associated with reduced hippocampal volume in major depressive disorder. Eur Neuropsychopharmacol 25:1082-1090

Aceti M, Vetere G, Novembre G, Restivo L, Ammassari-Teule M (2015) Progression of activity and structural changes in the anterior cingulate cortex during remote memory formation. Neurobiol Learn Mem 123:67-71

Adolphs R, Gosselin F, Buchanan TW, Tranel D, Schyns P, Damasio AR (2005) A mechanism for impaired fear recognition after amygdala damage. Nature 433:68-72

Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio A (1994) Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. Nature 372:669-672

Aggleton JP, Hunt PR, Nagle S, Neave N (1996) The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. Behav Brain Res 81:189-198

Aggleton JP, Neave N, Nagle S, Sahgal A (1995) A comparison of the effects of medial prefrontal, cingulate cortex, and cingulum bundle lesions on tests of spatial memory: evidence of a double dissociation between frontal and cingulum bundle contributions. J Neurosci 15:7270-7281

Aggleton JP, Nelson AJ (2015) Why do lesions in the rodent anterior thalamic nuclei cause such severe spatial deficits? Neurosci Biobehav Rev 54:131-144

Aggleton JP, O'Mara SM, Vann SD, Wright NF, Tsanov M, Erichsen JT (2010) Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. Eur J Neurosci 31:2292-2307

Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C (2014) Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. Front Behav Neurosci 8:199

Albrechet-Souza L, Borelli KG, Carvalho MC, Brandao ML (2009) The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. Neuroscience 164:387-397

Alheid GF, de Olmos JS, Beltramino CA (1995) Amygdala and extended amygdala. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 2 edn. CA: Academic, San Diego pp 495–578

Allsop SA, Vander Weele CM, Wichmann R, Tye KM (2014) Optogenetic insights on the relationship between anxiety-related behaviors and social deficits. Front Behav Neurosci 8:241

Amano T, Unal CT, Pare D (2010) Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. Nat Neurosci 13:489-494

An X, Bandler R, Ongur D, Price JL (1998) Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. J Comp Neurol 401:455-479

Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. Eur J Pain 9:463-484

Apps MA, Lockwood PL, Balsters JH (2013) The role of the midcingulate cortex in monitoring others' decisions. Front Neurosci 7:251

Arikuni T, Sako H, Murata A (1994) Ipsilateral connections of the anterior cingulate cortex with the frontal and medial temporal cortices in the macaque monkey. Neurosci Res 21:19-39

Armstrong E, Zilles K, Schlaug G, Schleicher A (1986) Comparative aspects of the primate posterior cingulate cortex. J Comp Neurol 253:539-548

Arruda-Carvalho M, Clem RL (2015) Prefrontal-amygdala fear networks come into focus. Front Syst Neurosci 9:145

Atlan G, Terem A, Peretz-Rivlin N, Groysman M, Citri A (2017) Mapping synaptic cortico-claustral connectivity in the mouse. J Comp Neurol 525:1381-1402

Bachevalier J, Meunier M, Lu MX, Ungerleider LG (1997) Thalamic and temporal cortex input to medial prefrontal cortex in rhesus monkeys. Exp Brain Res 115:430-444

Bailey KR, Mair RG (2007) Effects of frontal cortex lesions on action sequence learning in the rat. Eur J Neurosci 25:2905-2915

Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K (2003) Depression and pain comorbidity: a literature review. Arch Intern Med 163:2433-2445

Baleydier C, Mauguiere F (1980) The duality of the cingulate gyrus in monkey. Neuroanatomical study and functional hypothesis. Brain 103:525-554

Ball TM, Ramsawh HJ, Campbell-Sills L, Paulus MP, Stein MB (2013) Prefrontal dysfunction during emotion regulation in generalized anxiety and panic disorders. Psychol Med 43:1475-1486

Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch KC, Gynna AH, Westphal V, Stefani FD, Elf J, Hell SW (2016) Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. Science

Bandler R, Keay KA (1996) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. Prog Brain Res 107:285-300

Bandler R, Price JL, Keay KA (2000) Brain mediation of active and passive emotional coping. Prog Brain Res 122:333-349

Bandler R, Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? Trends Neurosci 17:379-389

Bantick SJ, Wise RG, Ploghaus A, Clare S, Smith SM, Tracey I (2002) Imaging how attention modulates pain in humans using functional MRI. Brain 125:310-319

Barbas H, Pandya DN (1989) Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. J Comp Neurol 286:353-375

Barthas F, Humo M, Gilsbach R, Waltisperger E, Karatas M, Leman S, Hein L, Belzung C, Boutillier A-L, Barrot M, Yalcin I (2017) Cingulate Overexpression of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 as a Key Factor for Depression. Biological Psychiatry

Barthas F, Kwan AC (2017) Secondary Motor Cortex: Where 'Sensory' Meets 'Motor' in the Rodent Frontal Cortex. Trends Neurosci 40:181-193

Barthas F, Sellmeijer J, Hugel S, Waltisperger E, Barrot M, Yalcin I (2015) The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression. Biol Psychiatry 77:236-245

Bechtholt AJ, Valentino RJ, Lucki I (2008) Overlapping and distinct brain regions associated with the anxiolytic effects of chlordiazepoxide and chronic fluoxetine. Neuropsychopharmacology 33:2117-2130

Behzadi G, Kalen P, Parvopassu F, Wiklund L (1990) Afferents to the median raphe nucleus of the rat: retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish peroxidase tracing, and selective D-[3H]aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs. Neuroscience 37:77-100

Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, Gao XJ, Kremer EJ, Malenka RC, Luo L (2015) Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. Cell 162:622-634

Berendse HW, Galis-de Graaf Y, Groenewegen HJ (1992) Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. J Comp Neurol 316:314-347

Berger B, Trottier S, Verney C, Gaspar P, Alvarez C (1988) Regional and laminar distribution of the dopamine and serotonin innervation in the macaque cerebral cortex: a radioautographic study. J Comp Neurol 273:99-119

Bi LL, Wang J, Luo ZY, Chen SP, Geng F, Chen YH, Li SJ, Yuan CH, Lin S, Gao TM (2013) Enhanced excitability in the infralimbic cortex produces anxiety-like behaviors. Neuropharmacology 72:148-156

Biber MP, Kneisley LW, LaVail JH (1978) Cortical neurons projecting to the cervical and lumbar enlargements of the spinal cord in young and adult rhesus monkeys. Exp Neurol 59:492-508

Birrell JM, Brown VJ (2000) Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. J Neurosci 20:4320-4324

Bissiere S, Plachta N, Hoyer D, McAllister KH, Olpe HR, Grace AA, Cryan JF (2008) The rostral anterior cingulate cortex modulates the efficiency of amygdala-dependent fear learning. Biol Psychiatry 63:821-831

Bissonette GB, Powell EM, Roesch MR (2013) Neural structures underlying set-shifting: roles of medial prefrontal cortex and anterior cingulate cortex. Behav Brain Res 250:91-101

Blair K, Shaywitz J, Smith BW, Rhodes R, Geraci M, Jones M, McCaffrey D, Vythilingam M, Finger E, Mondillo K, Jacobs M, Charney DS, Blair RJ, Drevets WC, Pine DS (2008) Response to emotional expressions in generalized social phobia and generalized anxiety disorder: evidence for separate disorders. Am J Psychiatry 165:1193-1202

Blair KS, Geraci M, Smith BW, Hollon N, DeVido J, Otero M, Blair JR, Pine DS (2012) Reduced dorsal anterior cingulate cortical activity during emotional regulation and top-down attentional control in generalized social phobia, generalized anxiety disorder, and comorbid generalized social phobia/generalized anxiety disorder. Biol Psychiatry 72:476-482

Blanco E, Castilla-Ortega E, Miranda R, Begega A, Aguirre JA, Arias JL, Santin LJ (2009) Effects of medial prefrontal cortex lesions on anxiety-like behaviour in restrained and non-restrained rats. Behav Brain Res 201:338-342

Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Aitken DH, Quirion R, Meaney MJ (1988) The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. Psychopharmacology (Berl) 95:298-302

Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. Nature 400:671-675

Bota M, Sporns O, Swanson LW (2015) Architecture of the cerebral cortical association connectome underlying cognition. Proc Natl Acad Sci U S A 112:E2093-2101

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat Neurosci 8:1263-1268

Brecht M, Krauss A, Muhammad S, Sinai-Esfahani L, Bellanca S, Margrie TW (2004) Organization of rat vibrissa motor cortex and adjacent areas according to cytoarchitectonics, microstimulation, and intracellular stimulation of identified cells. J Comp Neurol 479:360-373

Broca P (1878) Anatomie comparée des circonvolutions cérébrales: le grand lobe limbique et la scissure limbique dans la série des mammifères Revue d'Anthropologie – Deuxième Série (Paris) 1:385-498

Brodmann K (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Barth, Leipzig

Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. J Comp Neurol 338:255-278

Brown JA, Ramikie TS, Schmidt MJ, Baldi R, Garbett K, Everheart MG, Warren LE, Gellert L, Horvath S, Patel S, Mirnics K (2015) Inhibition of parvalbumin-expressing interneurons results in complex behavioral changes. Mol Psychiatry 20:1499-1507

Brown VM, LaBar KS, Haswell CC, Gold AL, McCarthy G, Morey RA (2014) Altered resting-state functional connectivity of basolateral and centromedial amygdala complexes in posttraumatic stress disorder. Neuropsychopharmacology 39:351-359

Burdach KF (1819-1822) Vom Baue und Leben des Gehirns. Leipzig

Burman K, Darian-Smith C, Darian-Smith I (2000) Macaque red nucleus: origins of spinal and olivary projections and terminations of cortical inputs. J Comp Neurol 423:179-196

Bush G (2009) Dorsal anterior midcingulate cortex : roles in normal cognition and disruption in attebntion-deficit/hyperactivity disorder In: Vogt BA (ed) Neurobiology of cingulate cortex and disease. Oxford University Press, New York, pp 245-274

Bush G, Luu P, Posner MI (2000) Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. Trends Cogn Sci 4:215-222

Bush G, Vogt BA, Holmes J, Dale AM, Greve D, Jenike MA, Rosen BR (2002) Dorsal anterior cingulate cortex: a role in reward-based decision making. Proc Natl Acad Sci U S A 99:523-528

Bussey TJ, Everitt BJ, Robbins TW (1997a) Dissociable effects of cingulate and medial frontal cortex lesions on stimulus-reward learning using a novel Pavlovian autoshaping procedure for the rat: implications for the neurobiology of emotion. Behav Neurosci 111:908-919

Bussey TJ, Muir JL, Everitt BJ, Robbins TW (1997b) Triple dissociation of anterior cingulate, posterior cingulate, and medial frontal cortices on visual discrimination tasks using a touchscreen testing procedure for the rat. Behav Neurosci 111:920-936

Byun MS, Kim JS, Jung WH, Jang JH, Choi JS, Kim SN, Choi CH, Chung CK, An SK, Kwon JS (2012) Regional cortical thinning in subjects with high genetic loading for schizophrenia. Schizophr Res 141:197-203

Canteras NS, Resstel LB, Bertoglio LJ, Carobrez Ade P, Guimaraes FS (2010) Neuroanatomy of anxiety. Curr Top Behav Neurosci 2:77-96

Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. Brain Res 513:43-59

Cardinal RN, Parkinson JA, Lachenal G, Halkerston KM, Rudarakanchana N, Hall J, Morrison CH, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ (2002) Effects of selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core, anterior cingulate cortex,

and central nucleus of the amygdala on autoshaping performance in rats. Behav Neurosci 116:553-567

Carlson JM, Beacher F, Reinke KS, Habib R, Harmon-Jones E, Mujica-Parodi LR, Hajcak G (2012) Nonconscious attention bias to threat is correlated with anterior cingulate cortex gray matter volume: a voxel-based morphometry result and replication. Neuroimage 59:1713-1718

Carmichael ST, Price JL (1994) Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. J Comp Neurol 346:366-402

Carmichael ST, Price JL (1995a) Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. J Comp Neurol 363:615-641

Carmichael ST, Price JL (1995b) Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. J Comp Neurol 363:642-664

Carmichael ST, Price JL (1996) Connectional networks within the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. J Comp Neurol 371:179-207

Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. Behav Brain Res 58:27-47

Casey KL (1999) Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging. Proc Natl Acad Sci U S A 96:7668-7674

Cassaday HJ, Nelson AJ, Pezze MA (2014) From attention to memory along the dorsal-ventral axis of the medial prefrontal cortex: some methodological considerations. Front Syst Neurosci 8:160

Cassell MD, Wright DJ (1986) Topography of projections from the medial prefrontal cortex to the amygdala in the rat. Brain Res Bull 17:321-333

Castillo-Gomez E, Coviello S, Perez-Rando M, Curto Y, Carceller H, Salvador A, Nacher J (2015) Streptozotocin diabetic mice display depressive-like behavior and alterations in the structure, neurotransmission and plasticity of medial prefrontal cortex interneurons. Brain Res Bull 116:45-56

Chandler DJ, Lamperski CS, Waterhouse BD (2013) Identification and distribution of projections from monoaminergic and cholinergic nuclei to functionally differentiated subregions of prefrontal cortex. Brain Res 1522:38-58

Chen S, Su HS (1990) Afferent connections of the thalamic paraventricular and parataenial nuclei in the rat--a retrograde tracing study with iontophoretic application of Fluoro-Gold. Brain Res 522:1-6

Chen T, Koga K, Descalzi G, Qiu S, Wang J, Zhang LS, Zhang ZJ, He XB, Qin X, Xu FQ, Hu J, Wei F, Huganir RL, Li YQ, Zhuo M (2014) Postsynaptic potentiation of corticospinal projecting neurons in the anterior cingulate cortex after nerve injury. Mol Pain 10:33

Chen ZY, Shen FY, Jiang L, Zhao X, Shen XL, Zhong W, Liu S, Wang ZR, Wang YW (2016) Attenuation of Neuropathic Pain by Inhibiting Electrical Synapses in the Anterior Cingulate Cortex. Anesthesiology 124:169-183

Cheriyan J, Kaushik MK, Ferreira AN, Sheets PL (2016) Specific Targeting of the Basolateral Amygdala to Projectionally Defined Pyramidal Neurons in Prelimbic and Infralimbic Cortex. eNeuro 3

Chiba T (2000) Collateral projection from the amygdalo--hippocampal transition area and CA1 to the hypothalamus and medial prefrontal cortex in the rat. Neurosci Res 38:373-383

Cho YT, Ernst M, Fudge JL (2013) Cortico-amygdala-striatal circuits are organized as hierarchical subsystems through the primate amygdala. J Neurosci 33:14017-14030

Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2013) The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. J Neurosci 33:8772-8783

Christakou A, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Prefrontal cortical-ventral striatal interactions involved in affective modulation of attentional performance: implications for corticostriatal circuit function. J Neurosci 24:773-780

Chudasama Y, Baunez C, Robbins TW (2003a) Functional disconnection of the medial prefrontal cortex and subthalamic nucleus in attentional performance: evidence for corticosubthalamic interaction. J Neurosci 23:5477-5485

Chudasama Y, Passetti F, Rhodes SE, Lopian D, Desai A, Robbins TW (2003b) Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. Behav Brain Res 146:105-119

Comoli E, Das Neves Favaro P, Vautrelle N, Leriche M, Overton PG, Redgrave P (2012) Segregated anatomical input to sub-regions of the rodent superior colliculus associated with approach and defense. Front Neuroanat 6:9

Conde F, Audinat E, Maire-Lepoivre E, Crepel F (1990) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. Brain Res Bull 24:341-354

Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F (1995) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. J Comp Neurol 352:567-593

Connolly CG, Wu J, Ho TC, Hoeft F, Wolkowitz O, Eisendrath S, Frank G, Hendren R, Max JE, Paulus MP, Tapert SF, Banerjee D, Simmons AN, Yang TT (2013) Resting-state functional connectivity of subgenual anterior cingulate cortex in depressed adolescents. Biol Psychiatry 74:898-907

Connor DA, Gould TJ (2016) The role of working memory and declarative memory in trace conditioning. Neurobiol Learn Mem 134 Pt B:193-209

Conte WL, Kamishina H, Corwin JV, Reep RL (2008) Topography in the projections of lateral posterior thalamus with cingulate and medial agranular cortex in relation to circuitry for directed attention and neglect. Brain Res 1240:87-95

Cooper BG, Manka TF, Mizumori SJ (2001) Finding your way in the dark: the retrosplenial cortex contributes to spatial memory and navigation without visual cues. Behav Neurosci 115:1012-1028

Corcoran KA, Frick BJ, Radulovic J, Kay LM (2016) Analysis of coherent activity between retrosplenial cortex, hippocampus, thalamus, and anterior cingulate cortex during retrieval of recent and remote context fear memory. Neurobiol Learn Mem 127:93-101

Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Afferent and efferent connections of the laterodorsal tegmental nucleus in the rat. Brain Res Bull 25:271-284

Cornwall J, Phillipson OT (1988) Afferent projections to the dorsal thalamus of the rat as shown by retrograde lectin transport--I. The mediodorsal nucleus. Neuroscience 24:1035-1049

Corwin JV, Kanter S, Watson RT, Heilman KM, Valenstein E, Hashimoto A (1986) Apomorphine has a therapeutic effect on neglect produced by unilateral dorsomedial prefrontal cortex lesions in rats. Exp Neurol 94:683-698

Courtin J, Bienvenu TC, Einarsson EO, Herry C (2013) Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. Neuroscience 240:219-242

Cowan WM, Powell TP (1956) A note on terminal degeneration in the hypothalamus. J Anat 90:188-192

Cullen PK, Gilman TL, Winiecki P, Riccio DC, Jasnow AM (2015) Activity of the anterior cingulate cortex and ventral hippocampus underlie increases in contextual fear generalization. Neurobiol Learn Mem 124:19-27

Cunningham MG, Bhattacharyya S, Benes FM (2008) Increasing Interaction of amygdalar afferents with GABAergic interneurons between birth and adulthood. Cereb Cortex 18:1529-1535

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. Neurosci Biobehav Rev 28:771-784

Datiche F, Cattarelli M (1996) Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin. Brain Res Bull 41:391-398

de Andrade JS, Cespedes IC, Abrao RO, Dos Santos TB, Diniz L, Britto LR, Spadari-Bratfisch RC, Ortolani D, Melo-Thomas L, da Silva RC, Viana MB (2013) Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response, Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis. Behav Brain Res 250:81-90

Deacon RM (2006) Assessing nest building in mice. Nat Protoc 1:1117-1119

Deacon TW, Eichenbaum H, Rosenberg P, Eckmann KW (1983) Afferent connections of the perirhinal cortex in the rat. J Comp Neurol 220:168-190

Dean P, Redgrave P, Sahibzada N, Tsuji K (1986) Head and body movements produced by electrical stimulation of superior colliculus in rats: effects of interruption of crossed tectoreticulospinal pathway. Neuroscience 19:367-380

DeCoteau WE, Kesner RP, Williams JM (1997) Short-term memory for food reward magnitude: the role of the prefrontal cortex. Behav Brain Res 88:239-249

DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. Prog Neurobiol 39:563-607

Delatour B, Gisquet-Verrier P (2001) Involvement of the dorsal anterior cingulate cortex in temporal behavioral sequencing: subregional analysis of the medial prefrontal cortex in rat. Behav Brain Res 126:105-114

Delatour B, Witter MP (2002) Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat: evidence of multiple pathways. Eur J Neurosci 15:1400-1407

Delevich K, Tucciarone J, Huang ZJ, Li B (2015) The mediodorsal thalamus drives feedforward inhibition in the anterior cingulate cortex via parvalbumin interneurons. J Neurosci 35:5743-5753

Deng Y, Lanciego J, Kerkerian-Le-Goff L, Coulon P, Salin P, Kachidian P, Lei W, Del Mar N, Reiner A (2015) Differential organization of cortical inputs to striatal projection neurons of the matrix compartment in rats. Front Syst Neurosci 9:51

Derbyshire SW, Jones AK, Gyulai F, Clark S, Townsend D, Firestone LL (1997) Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity. Pain 73:431-445

Deziel RA, Ryan CL, Tasker RA (2015) Ischemic lesions localized to the medial prefrontal cortex produce selective deficits in measures of executive function in rats. Behav Brain Res 293:54-61

Dias BG, Banerjee SB, Goodman JV, Ressler KJ (2013) Towards new approaches to disorders of fear and anxiety. Curr Opin Neurobiol 23:346-352

Dilgen J, Tejeda HA, O'Donnell P (2013) Amygdala inputs drive feedforward inhibition in the medial prefrontal cortex. J Neurophysiol 110:221-229

Ding DC, Gabbott PL, Totterdell S (2001) Differences in the laminar origin of projections from the medial prefrontal cortex to the nucleus accumbens shell and core regions in the rat. Brain Res 917:81-89

Domesick VB (1969) Projections from the cingulate cortex in the rat. Brain Res 12:296-320

Drevets WC (2001) Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. Curr Opin Neurobiol 11:240-249

Drevets WC, Bogers W, Raichle ME (2002) Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism. Eur Neuropsychopharmacol 12:527-544

Drevets WC, Ongur D, Price JL (1998) Neuroimaging abnormalities in the subgenual prefrontal cortex: implications for the pathophysiology of familial mood disorders. Mol Psychiatry 3:220-226, 190-221

Drevets WC, Price JL, Simpson JR, Jr., Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME (1997) Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. Nature 386:824-827

Duerden EG, Albanese MC (2013) Localization of pain-related brain activation: a meta-analysis of neuroimaging data. Hum Brain Mapp 34:109-149

Dum RP, Strick PL (1991) The origin of corticospinal projections from the premotor areas in the frontal lobe. J Neurosci 11:667-689

Dunn E, Fritschy JM, Carter DB, Merchant KM (1996) Differential distribution of gamma-aminobutyric acidA receptor subunit (alpha 1, alpha 2, alpha 3, alpha 5 and beta 2 + 3) immunoreactivity in the medial prefrontal cortex of the rat. Neurosci Lett 210:213-217

Dziewiatkowski J, Spodnik JH, Biranowska J, Kowianski P, Majak K, Morys J (1998) The projection of the amygdaloid nuclei to various areas of the limbic cortex in the rat. Folia Morphol (Warsz) 57:301-308

Einarsson EO, Pors J, Nader K (2015) Systems reconsolidation reveals a selective role for the anterior cingulate cortex in generalized contextual fear memory expression. Neuropsychopharmacology 40:480-487

Eleore L, Lopez-Ramos JC, Guerra-Narbona R, Delgado-Garcia JM (2011) Role of reuniens nucleus projections to the medial prefrontal cortex and to the hippocampal pyramidal CA1 area in associative learning. PLoS One 6:e23538

Espejo EF, Minano FJ (1999) Prefrontocortical dopamine depletion induces antidepressant-like effects in rats and alters the profile of desipramine during Porsolt's test. Neuroscience 88:609-615

Etkin A, Egner T, Kalisch R (2011) Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. Trends Cogn Sci 15:85-93

Etkin A, Prater KE, Hoeft F, Menon V, Schatzberg AF (2010) Failure of anterior cingulate activation and connectivity with the amygdala during implicit regulation of emotional processing in generalized anxiety disorder. Am J Psychiatry 167:545-554

Everitt BJ, Sirkia TE, Roberts AC, Jones GH, Robbins TW (1988) Distribution and some projections of cholinergic neurons in the brain of the common marmoset, Callithrix jacchus. J Comp Neurol 271:533-558

Felix-Ortiz AC, Beyeler A, Seo C, Leppla CA, Wildes CP, Tye KM (2013) BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. Neuron 79:658-664

Felix-Ortiz AC, Burgos-Robles A, Bhagat ND, Leppla CA, Tye KM (2016) Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by amygdala projections to the medial prefrontal cortex. Neuroscience 321:197-209

Felix-Ortiz AC, Tye KM (2014) Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. J Neurosci 34:586-595

Ferris CF, Stolberg T, Kulkarni P, Murugavel M, Blanchard R, Blanchard DC, Febo M, Brevard M, Simon NG (2008) Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. BMC Neurosci 9:111

File SE, Hyde JR (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? Br J Pharmacol 62:19-24

Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P (2016) Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse. Brain Struct Funct

Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P (2017) Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse. Brain Struct Funct 222:1509-1532

Fink RP, Heimer L (1967) Two methods for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system. Brain Res 4:369-374

Fisk GD, Wyss JM (1999) Associational projections of the anterior midline cortex in the rat: intracingulate and retrosplenial connections. Brain Res 825:1-13

Fisk GD, Wyss JM (2000) Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. Brain Res 859:83-95

Floresco SB, Tse MT (2007) Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. J Neurosci 27:2045-2057

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2000) Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. J Comp Neurol 422:556-578

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2001) Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. J Comp Neurol 432:307-328

Fragale JE, Khariv V, Gregor DM, Smith IM, Jiao X, Elkabes S, Servatius RJ, Pang KC, Beck KD (2016) Dysfunction in amygdala-prefrontal plasticity and extinction-resistant avoidance: A model for anxiety disorder vulnerability. Exp Neurol 275 Pt 1:59-68

Frankland PW, Bontempi B, Talton LE, Kaczmarek L, Silva AJ (2004) The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. Science 304:881-883

Frankle WG, Laruelle M, Haber SN (2006) Prefrontal cortical projections to the midbrain in primates: evidence for a sparse connection. Neuropsychopharmacology 31:1627-1636

Franklin KBJ, Paxinos G (1996) The mouse brain in stereotaxic coordinates. 1 edn. Academic Press, Sydney

Franklin KBJ, Paxinos G (2007) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press 3th edition

Freedman LJ, Cassell MD (1991) Thalamic afferents of the rat infralimbic and lateral agranular cortices. Brain Res Bull 26:957-964

Friedman A, Homma D, Gibb LG, Amemori K, Rubin SJ, Hood AS, Riad MH, Graybiel AM (2015) A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict. Cell 161:1320-1333

Frysztak RJ, Neafsey EJ (1994) The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in the rat. Brain Res 643:181-193

Fuchs PN, Peng YB, Boyette-Davis JA, Uhelski ML (2014) The anterior cingulate cortex and pain processing. Front Integr Neurosci 8:35

Furuyashiki T, Gallagher M (2007) Neural encoding in the orbitofrontal cortex related to goal-directed behavior. Ann N Y Acad Sci 1121:193-215

Gabbott P, Warner TA, Brown J, Salway P, Gabbott T, Busby S (2012) Amygdala afferents monosynaptically innervate corticospinal neurons in rat medial prefrontal cortex. J Comp Neurol 520:2440-2458

Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ (1997) Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. J Comp Neurol 377:465-499

Gabbott PL, Warner TA, Busby SJ (2006) Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. Neuroscience 139:1039-1048

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. J Comp Neurol 492:145-177

Garcia-Larrea L, Peyron R (2013) Pain matrices and neuropathic pain matrices: a review. Pain 154 Suppl 1:S29-43

Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J (1990) Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. J Comp Neurol 293:103-124

Gaykema RP, van Weeghel R, Hersh LB, Luiten PG (1991) Prefrontal cortical projections to the cholinergic neurons in the basal forebrain. J Comp Neurol 303:563-583

Geisler S, Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. J Comp Neurol 490:270-294

George MS, Ketter TA, Parekh PI, Horwitz B, Herscovitch P, Post RM (1995) Brain activity during transient sadness and happiness in healthy women. Am J Psychiatry 152:341-351

Gerfen CR, Sawchenko PE (1984) An anterograde neuroanatomical tracing method that shows the detailed morphology of neurons, their axons and terminals: immunohistochemical localization of an axonally transported plant lectin, Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L). Brain Res 290:219-238

Gersner R, Toth E, Isserles M, Zangen A (2010) Site-specific antidepressant effects of repeated subconvulsive electrical stimulation: potential role of brain-derived neurotrophic factor. Biol Psychiatry 67:125-132

Gisquet-Verrier P, Winocur G, Delatour B (2000) Functional dissociation between dorsal and ventral regions of the medial prefrontal cortex in rats. Psychobiology 28:248-260

Goldwater DS, Pavlides C, Hunter RG, Bloss EB, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2009) Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. Neuroscience 164:798-808

Goll Y, Atlan G, Citri A (2015) Attention: the claustrum. Trends Neurosci 38:486-495

Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2011) Dynamics of retrieval strategies for remote memories. Cell 147:678-689

Goto M, Swanson LW, Canteras NS (2001) Connections of the nucleus incertus. J Comp Neurol 438:86-122

Granon S, Poucet B (2000) Involvement of the rat prefrontal cortex in cognitive functions: A central role for the prelimbic area. Psychobiology 28:229-237

Greatrex RM, Phillipson OT (1982) Demonstration of synaptic input from prefrontal cortex to the habenula i the rat. Brain Res 238:192-197

Groenewegen HJ (1988) Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. Neuroscience 24:379-431

Groenewegen HJ, Wouterlood FG, Uylings HBM (2017) Organization of prefrontal-striatal connections. In: Handbook of basal ganglia structure and function. 2 edn. Academic Press, San Diego, pp 423-436

Gu L, Uhelski ML, Anand S, Romero-Ortega M, Kim YT, Fuchs PN, Mohanty SK (2015) Pain inhibition by optogenetic activation of specific anterior cingulate cortical neurons. PLoS One 10:e0117746

Guirado R, Umemori J, Sipila P, Castren E (2016) Evidence for Competition for Target Innervation in the Medial Prefrontal Cortex. Cereb Cortex 26:1287-1294

Gupta A, Wang Y, Markram H (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. Science 287:273-278

Hallock HL, Wang A, Shaw CL, Griffin AL (2013) Transient inactivation of the thalamic nucleus reuniens and rhomboid nucleus produces deficits of a working-memory dependent tactile-visual conditional discrimination task. Behav Neurosci 127:860-866

Han CJ, O'Tuathaigh CM, van Trigt L, Quinn JJ, Fanselow MS, Mongeau R, Koch C, Anderson DJ (2003) Trace but not delay fear conditioning requires attention and the anterior cingulate cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 100:13087-13092

Hardy SG (1986) Projections to the midbrain from the medial versus lateral prefrontal cortices of the rat. Neurosci Lett 63:159-164

Hardy SG, Holmes DE (1988) Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. Exp Brain Res 73:249-255

Harker A, Raza S, Williamson K, Kolb B, Gibb R (2015) Preconception paternal stress in rats alters dendritic morphology and connectivity in the brain of developing male and female offspring. Neuroscience 303:200-210

Hastings RS, Parsey RV, Oquendo MA, Arango V, Mann JJ (2004) Volumetric analysis of the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus in major depression. Neuropsychopharmacology 29:952-959

Hatanaka N, Tokuno H, Hamada I, Inase M, Ito Y, Imanishi M, Hasegawa N, Akazawa T, Nambu A, Takada M (2003) Thalamocortical and intracortical connections of monkey cingulate motor areas. J Comp Neurol 462:121-138

Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev 27:555-579

Heilbronner SR, Rodriguez-Romaguera J, Quirk GJ, Groenewegen HJ, Haber SN (2016) Circuit-Based Corticostriatal Homologies Between Rat and Primate. Biol Psychiatry 80:509-521

Henckens MJ, van der Marel K, van der Toorn A, Pillai AG, Fernandez G, Dijkhuizen RM, Joels M (2015) Stress-induced alterations in large-scale functional networks of the rodent brain. Neuroimage 105:312-322

Herkenham M (1978) The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. J Comp Neurol 177:589-610

Hindley EL, Nelson AJ, Aggleton JP, Vann SD (2014) The rat retrosplenial cortex is required when visual cues are used flexibly to determine location. Behav Brain Res 263:98-107

Ho TC, Yang G, Wu J, Cassey P, Brown SD, Hoang N, Chan M, Connolly CG, Henje-Blom E, Duncan LG, Chesney MA, Paulus MP, Max JE, Patel R, Simmons AN, Yang TT (2014) Functional connectivity of negative emotional processing in adolescent depression. J Affect Disord 155:65-74

Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. Brain Struct Funct 212:149-179

Hoover WB, Vertes RP (2011) Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. J Comp Neurol 519:3766-3801

Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. Brain Struct Funct 217:191-209

Horikawa K, Kinjo N, Stanley LC, Powell EW (1988) Topographic organization and collateralization of the projections of the anterior and laterodorsal thalamic nuclei to cingulate areas 24 and 29 in the rat. Neurosci Res 6:31-44

Hosking JG, Cocker PJ, Winstanley CA (2014) Dissociable contributions of anterior cingulate cortex and basolateral amygdala on a rodent cost/benefit decision-making task of cognitive effort. Neuropsychopharmacology 39:1558-1567

Hsieh JC, Stone-Elander S, Ingvar M (1999) Anticipatory coping of pain expressed in the human anterior cingulate cortex: a positron emission tomography study. Neurosci Lett 262:61-64

Huang MX, Harrington DL, Paulson KM, Weisend MP, Lee RR (2004) Temporal dynamics of ipsilateral and contralateral motor activity during voluntary finger movement. Hum Brain Mapp 23:26-39

Hurley-Gius KM, Neafsey EJ (1986) The medial frontal cortex and gastric motility: microstimulation results and their possible significance for the overall pattern of organization of rat frontal and parietal cortex. Brain Res 365:241-248

Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. J Comp Neurol 308:249-276

Ibarguen-Vargas Y, Surget A, Touma C, Palme R, Belzung C (2008) Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. Psychoneuroendocrinology 33:1357-1368

Iijima M, Fukumoto K, Chaki S (2012) Acute and sustained effects of a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist in the novelty-suppressed feeding test. Behav Brain Res 235:287-292

Ishikawa A, Nakamura S (2003) Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. J Neurosci 23:9987-9995

Ishikawa J, Nishimura R, Ishikawa A (2015) Early-life stress induces anxiety-like behaviors and activity imbalances in the medial prefrontal cortex and amygdala in adult rats. Eur J Neurosci 41:442-453

Ito HT, Zhang SJ, Witter MP, Moser EI, Moser MB (2015) A prefrontal-thalamo-hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. Nature 522:50-55

Janak PH, Tye KM (2015) From circuits to behaviour in the amygdala. Nature 517:284-292

Jankowski MP, Sesack SR (2004) Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. J Comp Neurol 468:518-529

Jasper HH (1998) Sensory information and conscious experience. In: Jasper HH, Castelluci VF, Rossignol S (eds) Consciousness: at the frontiers of neuroscience, advances in neurology, vol 77. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 33-48

Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. J Comp Neurol 313:574-586

Jeon D, Kim S, Chetana M, Jo D, Ruley HE, Lin SY, Rabah D, Kinet JP, Shin HS (2010) Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca2+ channels in ACC. Nat Neurosci 13:482-488

Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC (2009) The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. Neuron 61:786-800

Ji G, Sun H, Fu Y, Li Z, Pais-Vieira M, Galhardo V, Neugebauer V (2010) Cognitive impairment in pain through amygdala-driven prefrontal cortical deactivation. J Neurosci 30:5451-5464

Jinks AL, McGregor IS (1997) Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. Brain Res 772:181-190

Johansen JP, Fields HL (2004) Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. Nat Neurosci 7:398-403

Johansen JP, Fields HL, Manning BH (2001) The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 98:8077-8082

Jones BF, Groenewegen HJ, Witter MP (2005) Intrinsic connections of the cingulate cortex in the rat suggest the existence of multiple functionally segregated networks. Neuroscience 133:193-207

Jones BF, Witter MP (2007) Cingulate cortex projections to the parahippocampal region and hippocampal formation in the rat. Hippocampus 17:957-976

Jurgens U (1983) Afferent fibers to the cingular vocalization region in the squirrel monkey. Exp Neurol 80:395-409

Jurik A, Auffenberg E, Klein S, Deussing JM, Schmid RM, Wotjak CT, Thoeringer CK (2015) Roles of prefrontal cortex and paraventricular thalamus in affective and mechanical components of visceral nociception. Pain 156:2479-2491

Kaada BR (1951) Somato-motor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of rhinencephalic and other structures in primates, cat, and dog; a study of responses from the limbic, subcallosal, orbito-insular, piriform and temporal cortex, hippocampus-fornix and amygdala. Acta Physiol Scand Suppl 24:1-262

Kamishina H, Conte WL, Patel SS, Tai RJ, Corwin JV, Reep RL (2009) Cortical connections of the rat lateral posterior thalamic nucleus. Brain Res 1264:39-56

Kang SJ, Kwak C, Lee J, Sim SE, Shim J, Choi T, Collingridge GL, Zhuo M, Kaang BK (2015) Bidirectional modulation of hyperalgesia via the specific control of excitatory and inhibitory neuronal activity in the ACC. Mol Brain 8:81

Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. Nat Neurosci 19:605-612

Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2009) Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. J Comp Neurol 513:597-621

Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. Cereb Cortex 7:476-486

Keay KA, Bandler R (2015) Periaqueductal gray. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 4 edn. Elsevier, San Diego, pp 207-216

Kesner RP (2000) Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat. Psychobiology 28:219-228

Kesner RP, Churchwell JC (2011) An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. Neurobiol Learn Mem 96:417-431

Kesner RP, Ragozzino ME (2003) The role of the prefrontal cortex in object-place learning: a test of the attribute specificity model. Behav Brain Res 146:159-165

Killcross S, Coutureau E (2003) Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. Cereb Cortex 13:400-408

Kim BS, Lee J, Bang M, Seo BA, Khalid A, Jung MW, Jeon D (2014) Differential regulation of observational fear and neural oscillations by serotonin and dopamine in the mouse anterior cingulate cortex. Psychopharmacology (Berl) 231:4371-4381

Kim H, Ahrlund-Richter S, Wang X, Deisseroth K, Carlen M (2016a) Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention. Cell 164:208-218

Kim J, Wasserman EA, Castro L, Freeman JH (2016b) Anterior cingulate cortex inactivation impairs rodent visual selective attention and prospective memory. Behav Neurosci 130:75-90

Kim SS, Wang H, Li XY, Chen T, Mercaldo V, Descalzi G, Wu LJ, Zhuo M (2011) Neurabin in the anterior cingulate cortex regulates anxiety-like behavior in adult mice. Mol Brain 4:6

Kim U, Lee T (2012) Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat. Eur J Neurosci 35:1253-1269

Kita T, Osten P, Kita H (2014) Rat subthalamic nucleus and zona incerta share extensively overlapped representations of cortical functional territories. J Comp Neurol 522:4043-4056

Kitayama N, Quinn S, Bremner JD (2006) Smaller volume of anterior cingulate cortex in abuse-related posttraumatic stress disorder. J Affect Disord 90:171-174

Kluver H, Bucy PC (1937) "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkey. American journal of physiology 119:352-353

Knapska E, Macias M, Mikosz M, Nowak A, Owczarek D, Wawrzyniak M, Pieprzyk M, Cymerman IA, Werka T, Sheng M, Maren S, Jaworski J, Kaczmarek L (2012) Functional anatomy of neural circuits regulating fear and extinction. Proc Natl Acad Sci U S A 109:17093-17098

Kobayashi Y, Amaral DG (2000) Macaque monkey retrosplenial cortex: I. three-dimensional and cytoarchitectonic organization. J Comp Neurol 426:339-365

Kobayashi Y, Amaral DG (2003) Macaque monkey retrosplenial cortex: II. Cortical afferents. J Comp Neurol 466:48-79

Kobbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. Prog Neurobiol 62:327-351

Koike H, Demars MP, Short JA, Nabel EM, Akbarian S, Baxter MG, Morishita H (2016) Chemogenetic Inactivation of Dorsal Anterior Cingulate Cortex Neurons Disrupts Attentional Behavior in Mouse. Neuropsychopharmacology 41:1014-1023

Kolb B (1974) Prefrontal lesions alter eating and hoarding behavior in rats. Physiol Behav 12:507-511

Kolb B, Buhrmann K, McDonald R, Sutherland RJ (1994) Dissociation of the medial prefrontal, posterior parietal, and posterior temporal cortex for spatial navigation and recognition memory in the rat. Cereb Cortex 4:664-680

Kolb B, Pellis S, Robinson TE (2004) Plasticity and functions of the orbital frontal cortex. Brain Cogn 55:104-115

Kolb B, Whishaw IQ (1983) Dissociation of the contributions of the prefrontal, motor, and parietal cortex to the control of movement in the rat: an experimental review. Can J Psychol 37:211-232

Kolmac CI, Power BD, Mitrofanis J (1998) Patterns of connections between zona incerta and brainstem in rats. J Comp Neurol 396:544-555

Kolomiets BP, Deniau JM, Mailly P, Menetrey A, Glowinski J, Thierry AM (2001) Segregation and convergence of information flow through the cortico-subthalamic pathways. J Neurosci 21:5764-5772

Krettek JE, Price JL (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. J Comp Neurol 171:157-191

Kross E, Davidson M, Weber J, Ochsner K (2009) Coping with emotions past: the neural bases of regulating affect associated with negative autobiographical memories. Biol Psychiatry 65:361-366

Kubota Y, Hattori R, Yui Y (1994) Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. Brain Res 649:159-173

Kuhn S, Kaufmann C, Simon D, Endrass T, Gallinat J, Kathmann N (2013) Reduced thickness of anterior cingulate cortex in obsessive-compulsive disorder. Cortex 49:2178-2185

Kuljis RO, Fernandez V (1982) On the organization of the retino-tecto-thalamo-telencephalic pathways in a Chilean rodent; the Octodon degus. Brain Res 234:189-204

Kulkarni B, Bentley DE, Elliott R, Youell P, Watson A, Derbyshire SW, Frackowiak RS, Friston KJ, Jones AK (2005) Attention to pain localization and unpleasantness discriminates the functions of the medial and lateral pain systems. Eur J Neurosci 21:3133-3142

Kunishio K, Haber SN (1994) Primate cingulostriatal projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input. J Comp Neurol 350:337-356

LaBuda CJ, Fuchs PN (2000) A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. Exp Neurol 163:490-494

Lalumiere RT (2014) Optogenetic dissection of amygdala functioning. Front Behav Neurosci 8:107

Lanciego JL, Wouterlood FG (2011) A half century of experimental neuroanatomical tracing. J Chem Neuroanat 42:157-183

LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23:155-184

Lee TY, Kim SN, Jang JH, Shim G, Jung WH, Shin NY, Kwon JS (2013) Neural correlate of impulsivity in subjects at ultra-high risk for psychosis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 45:165-169

Legrain V, Mancini F, Sambo CF, Torta DM, Ronga I, Valentini E (2012) Cognitive aspects of nociception and pain: bridging neurophysiology with cognitive psychology. Neurophysiol Clin 42:325-336

Leichnetz GR, Astruc J (1976) The efferent projections of the medial prefrontal cortex in the squirrel monkey (Saimiri sciureus). Brain Res 109:455-472

Lencer WI, Tsai B (2003) The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. Trends Biochem Sci 28:639-645

Lenz FA, Rios M, Zirh A, Chau D, Krauss G, Lesser RP (1998) Painful stimuli evoke potentials recorded over the human anterior cingulate gyrus. J Neurophysiol 79:2231-2234

Leonard CM (1969) The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. Brain Res 12:321-343

Leonard CM (2016) Finding prefrontal cortex in the rat. Brain Res 1645:1-3

Lewis DA (1992) The catecholaminergic innervation of primate prefrontal cortex. J Neural Transm Suppl 36:179-200

Li M, Long C, Yang L (2015) Hippocampal-prefrontal circuit and disrupted functional connectivity in psychiatric and neurodegenerative disorders. Biomed Res Int 2015:810548

Li ZK, Takada M, Hattori T (1986) Topographic organization and collateralization of claustrocortical projections in the rat. Brain Res Bull 17:529-532

Likhtik E, Paz R (2015) Amygdala-prefrontal interactions in (mal)adaptive learning. Trends Neurosci 38:158-166

Likhtik E, Stujenske JM, Topiwala MA, Harris AZ, Gordon JA (2014) Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. Nat Neurosci 17:106-113

Lindner K, Neubert J, Pfannmoller J, Lotze M, Hamm AO, Wendt J (2015) Fear-potentiated startle processing in humans: Parallel fMRI and orbicularis EMG assessment during cue conditioning and extinction. Int J Psychophysiol 98:535-545

Liotti M, Mayberg HS (2001) The role of functional neuroimaging in the neuropsychology of depression. J Clin Exp Neuropsychol 23:121-136

Little JP, Carter AG (2013) Synaptic mechanisms underlying strong reciprocal connectivity between the medial prefrontal cortex and basolateral amygdala. J Neurosci 33:15333-15342

Liu F, Zheng XL, Li BM (2009) The anterior cingulate cortex is involved in retrieval of long-term/long-lasting but not short-term memory for step-through inhibitory avoidance in rats. Neurosci Lett 460:175-179

Liu L, Ito W, Morozov A (2017) GABAb Receptor Mediates Opposing Adaptations of GABA Release From Two Types of Prefrontal Interneurons After Observational Fear. Neuropsychopharmacology

Liu SB, Zhang MM, Cheng LF, Shi J, Lu JS, Zhuo M (2015) Long-term upregulation of cortical glutamatergic AMPA receptors in a mouse model of chronic visceral pain. Mol Brain 8:76

Liu YM, Hu CY, Shen JD, Wu SH, Li YC, Yi LT (2016) Elevation of synaptic protein is associated with the antidepressant-like effects of ferulic acid in a chronic model of depression. Physiol Behav 169:184-188

Livingston-Thomas JM, Jeffers MS, Nguemeni C, Shoichet MS, Morshead CM, Corbett D (2015) Assessing cognitive function following medial prefrontal stroke in the rat. Behav Brain Res 294:102-110

Livneh U, Paz R (2012) Amygdala-prefrontal synchronization underlies resistance to extinction of aversive memories. Neuron 75:133-142

Loren I, Emson PC, Fahrenkrug J, Bjorklund A, Alumets J, Hakanson R, Sundler F (1979) Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. Neuroscience 4:1953-1976

Luppino G, Matelli M, Camarda R, Rizzolatti G (1994) Corticospinal projections from mesial frontal and cingulate areas in the monkey. Neuroreport 5:2545-2548

Luppino G, Matelli M, Camarda RM, Gallese V, Rizzolatti G (1991) Multiple representations of body movements in mesial area 6 and the adjacent cingulate cortex: an intracortical microstimulation study in the macaque monkey. J Comp Neurol 311:463-482

Lyttle K, Ohmura Y, Konno K, Yoshida T, Izumi T, Watanabe M, Yoshioka M (2015) Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. Brain Res 1616:88-100

Ma K, Xu A, Cui S, Sun MR, Xue YC, Wang JH (2016) Impaired GABA synthesis, uptake and release are associated with depression-like behaviors induced by chronic mild stress. Transl Psychiatry 6:e910

Maguire EA (2001) The retrosplenial contribution to human navigation: a review of lesion and neuroimaging findings. Scand J Psychol 42:225-238

Mailly P, Aliane V, Groenewegen HJ, Haber SN, Deniau JM (2013) The rat prefrontostriatal system analyzed in 3D: evidence for multiple interacting functional units. J Neurosci 33:5718-5727

Makovac E, Meeten F, Watson DR, Herman A, Garfinkel SN, H DC, Ottaviani C (2016) Alterations in Amygdala-Prefrontal Functional Connectivity Account for Excessive Worry and Autonomic Dysregulation in Generalized Anxiety Disorder. Biol Psychiatry 80:786-795

Maletic V, Raison CL (2009) Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. Front Biosci (Landmark Ed) 14:5291-5338

Manelis A, Ladouceur CD, Graur S, Monk K, Bonar LK, Hickey MB, Dwojak AC, Axelson D, Goldstein BI, Goldstein TR, Bebko G, Bertocci MA, Hafeman DM, Gill MK, Birmaher B, Phillips ML (2015) Altered amygdala-prefrontal response to facial emotion in offspring of parents with bipolar disorder. Brain 138:2777-2790

Marchand JE, Hagino N (1983) Afferents to the periaqueductal gray in the rat. A horseradish peroxidase study. Neuroscience 9:95-106

Marek R, Strobel C, Bredy TW, Sah P (2013) The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. J Physiol 591:2381-2391

Margulies DS, Kelly AM, Uddin LQ, Biswal BB, Castellanos FX, Milham MP (2007) Mapping the functional connectivity of anterior cingulate cortex. Neuroimage 37:579-588

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 5:793-807

Mathiasen ML, Dillingham CM, Kinnavane L, Powell AL, Aggleton JP (2017) Asymmetric cross-hemispheric connections link the rat anterior thalamic nuclei with the cortex and hippocampal formation. Neuroscience 349:128-143

Mathis V, Barbelivien A, Majchrzak M, Mathis C, Cassel JC, Lecourtier L (2016) The Lateral Habenula as a Relay of Cortical Information to Process Working Memory. Cereb Cortex:1-11

Mathur BN (2014) The claustrum in review. Front Syst Neurosci 8:48

Matyas F, Lee J, Shin HS, Acsady L (2014) The fear circuit of the mouse forebrain: connections between the mediodorsal thalamus, frontal cortices and basolateral amygdala. Eur J Neurosci 39:1810-1823

May PJ (2006) The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. Prog Brain Res 151:321-378

Mayberg HS, Brannan SK, Tekell JL, Silva JA, Mahurin RK, McGinnis S, Jerabek PA (2000) Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. Biol Psychiatry 48:830-843

Mayberg HS, Liotti M, Brannan SK, McGinnis S, Mahurin RK, Jerabek PA, Silva JA, Tekell JL, Martin CC, Lancaster JL, Fox PT (1999) Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. Am J Psychiatry 156:675-682

Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwalb JM, Kennedy SH (2005) Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. Neuron 45:651-660

McDonald AJ (1987) Organization of amygdaloid projections to the mediodorsal thalamus and prefrontal cortex: a fluorescence retrograde transport study in the rat. J Comp Neurol 262:46-58

McDonald AJ (1991a) Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. Neuroscience 44:1-14

McDonald AJ (1991b) Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. Neuroscience 44:15-33

McDonald AJ (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. Prog Neurobiol 55:257-332

McDonald AJ, Mascagni F, Guo L (1996) Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. Neuroscience 71:55-75

McFarland NR, Haber SN (2002) Thalamic relay nuclei of the basal ganglia form both reciprocal and nonreciprocal cortical connections, linking multiple frontal cortical areas. J Neurosci 22:8117-8132

McGarry LM, Carter AG (2016) Inhibitory Gating of Basolateral Amygdala Inputs to the Prefrontal Cortex. J Neurosci 36:9391-9406

McKenna JT, Vertes RP (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. J Comp Neurol 480:115-142

McLean PD (1954) The limbic system and its hippocampal formation: studies in animals and their possible application to man. Journal of Neurosurgery 11:29-44

Miller MW (1987) The origin of corticospinal projection neurons in rat. Exp Brain Res 67:339-351

Mineka S, Watson D, Clark LA (1998) Comorbidity of anxiety and unipolar mood disorders. Annu Rev Psychol 49:377-412

Mitrofanis J, Mikuletic L (1999) Organisation of the cortical projection to the zona incerta of the thalamus. J Comp Neurol 412:173-185

Mochcovitch MD, da Rocha Freire RC, Garcia RF, Nardi AE (2014) A systematic review of fMRI studies in generalized anxiety disorder: evaluating its neural and cognitive basis. J Affect Disord 167:336-342

Mogensen J, Holm S (1994) The prefrontal cortex and variants of sequential behaviour indications of functional differentiation between subdivisions of the rat's prefrontal cortex. Behav Brain Res 63:89-100

Morecraft RJ, Cipolloni PB, Stilwell-Morecraft KS, Gedney MT, Pandya DN (2004) Cytoarchitecture and cortical connections of the posterior cingulate and adjacent somatosensory fields in the rhesus monkey. J Comp Neurol 469:37-69

Morecraft RJ, Stilwell-Morecraft KS, Cipolloni PB, Ge J, McNeal DW, Pandya DN (2012) Cytoarchitecture and cortical connections of the anterior cingulate and adjacent somatomotor fields in the rhesus monkey. Brain Res Bull 87:457-497

Morecraft RJ, Van Hoesen GW (1992) Cingulate input to the primary and supplementary motor cortices in the rhesus monkey: evidence for somatotopy in areas 24c and 23c. J Comp Neurol 322:471-489

Morecraft RJ, Van Hoesen GW (1998) Convergence of limbic input to the cingulate motor cortex in the rhesus monkey. Brain Res Bull 45:209-232

Morgan MA, LeDoux JE (1995) Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. Behav Neurosci 109:681-688

Morgan MA, Schulkin J, LeDoux JE (2003) Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training. Behav Brain Res 146:121-130

Morris R, Petrides M, Pandya DN (1999) Architecture and connections of retrosplenial area 30 in the rhesus monkey (Macaca mulatta). Eur J Neurosci 11:2506-2518

Muakkassa KF, Strick PL (1979) Frontal lobe inputs to primate motor cortex: evidence for four somatotopically organized 'premotor' areas. Brain Res 177:176-182

Muir JL, Everitt BJ, Robbins TW (1996) The cerebral cortex of the rat and visual attentional function: dissociable effects of mediofrontal, cingulate, anterior dorsolateral, and parietal cortex lesions on a five-choice serial reaction time task. Cereb Cortex 6:470-481

Murlidharan G, Samulski RJ, Asokan A (2014) Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. Front Mol Neurosci 7:76

Murphy ER, Barch DM, Pagliaccio D, Luby JL, Belden AC (2016) Functional connectivity of the amygdala and subgenual cingulate during cognitive reappraisal of emotions in children with MDD history is associated with rumination. Dev Cogn Neurosci 18:89-100

Murray EA, Davidson M, Gaffan D, Olton DS, Suomi S (1989) Effects of fornix transection and cingulate cortical ablation on spatial memory in rhesus monkeys. Exp Brain Res 74:173-186

Nakamura H, Hioki H, Furuta T, Kaneko T (2015) Different cortical projections from three subdivisions of the rat lateral posterior thalamic nucleus: a single-neuron tracing study with viral vectors. Eur J Neurosci 41:1294-1310

Nashed MG, Seidlitz EP, Frey BN, Singh G (2015) Depressive-like behaviours and decreased dendritic branching in the medial prefrontal cortex of mice with tumors: A novel validated model of cancer-induced depression. Behav Brain Res 294:25-35

Neafsey EJ, Terreberry RR, Hurley KM, Ruit KG, Frysztak RJ (1993) Anterior cingulate cortex in rodents: connectionn, visceral control functions, and implications for emotion. In: Vogt BA, Gabriel M (eds) Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus: a comprehensive handbook. Boston, pp 206-223

Negron-Oyarzo I, Neira D, Espinosa N, Fuentealba P, Aboitiz F (2015) Prenatal Stress Produces Persistence of Remote Memory and Disrupts Functional Connectivity in the Hippocampal-Prefrontal Cortex Axis. Cereb Cortex 25:3132-3143

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. Neuron 34:13-25

Nestor PJ, Fryer TD, Ikeda M, Hodges JR (2003) Retrosplenial cortex (BA 29/30) hypometabolism in mild cognitive impairment (prodromal Alzheimer's disease). Eur J Neurosci 18:2663-2667

Newman LA, Creer DJ, McGaughy JA (2015) Cognitive control and the anterior cingulate cortex: how conflicting stimuli affect attentional control in the rat. J Physiol Paris 109:95-103

Nicolas LB, Kolb Y, Prinssen EP (2006) A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. Eur J Pharmacol 547:106-115

Nicolelis MA, Chapin JK, Lin RC (1992) Somatotopic maps within the zona incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, superior colliculus, and brainstem. Brain Res 577:134-141

Njung'e K, Handley SL (1991) Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav 38:63-67

Oh SW, Harris JA, Ng L, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, Kuan L, Henry AM, Mortrud MT, Ouellette B, Nguyen TN, Sorensen SA, Slaughterbeck CR, Wakeman W, Li Y, Feng D, Ho A, Nicholas E, Hirokawa KE, Bohn P, Joines KM, Peng H, Hawrylycz MJ, Phillips JW, Hohmann JG, Wohnoutka P, Gerfen CR, Koch C, Bernard A, Dang C, Jones AR, Zeng H (2014) A mesoscale connectome of the mouse brain. Nature 508:207-214

Ohtake T, Yamada H (1989) Efferent connections of the nucleus reuniens and the rhomboid nucleus in the rat: an anterograde PHA-L tracing study. Neurosci Res 6:556-568

Olson CR, Musil SY, Goldberg ME (1993) Posterior cingulate cortex and visuospatial cognition- properties of single neurons in the behaving monkey. In: Vogt BA, Gabriel M (eds) Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus. Boston,

Olucha-Bordonau FE, Fortes-Marco L, Otero-Garcia M, Lanuza E, Martinez-Garcia F (2015) Amygdala:strcture and function. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 4 edn. CA: Academic, San Diego, pp 441-490

Ongur D, An X, Price JL (1998) Prefrontal cortical projections to the hypothalamus in macaque monkeys. J Comp Neurol 401:480-505

Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. Cereb Cortex 10:206-219

Ottersen OP (1982) Connections of the amygdala of the rat. IV: Corticoamygdaloid and intraamygdaloid connections as studied with axonal transport of horseradish peroxidase. J Comp Neurol 205:30-48

Padilla-Coreano N, Bolkan SS, Pierce GM, Blackman DR, Hardin WD, Garcia-Garcia AL, Spellman TJ, Gordon JA (2016) Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. Neuron 89:857-866

Palm ME, Elliott R, McKie S, Deakin JF, Anderson IM (2011) Attenuated responses to emotional expressions in women with generalized anxiety disorder. Psychol Med 41:1009-1018

Palomero-Gallagher N, Eickhoff SB, Hoffstaedter F, Schleicher A, Mohlberg H, Vogt BA, Amunts K, Zilles K (2015) Functional organization of human subgenual cortical areas: Relationship between architectonical segregation and connectional heterogeneity. Neuroimage 115:177-190

Palomero-Gallagher N, Vogt BA, Schleicher A, Mayberg HS, Zilles K (2009) Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model. Hum Brain Mapp 30:2336-2355

Pan WX, McNaughton N (2004) The supramammillary area: its organization, functions and relationship to the hippocampus. Prog Neurobiol 74:127-166

Pandya DN, Van Hoesen GW, Domesick VB (1973) A cingulo-amygdaloid projection in the rhesus monkey. Brain Res 61:369-373

Pandya DN, Van Hoesen GW, Mesulam MM (1981) Efferent connections of the cingulate gyrus in the rhesus monkey. Exp Brain Res 42:319-330

Pape HC, Pare D (2010) Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. Physiol Rev 90:419-463

Papez JW (1937) A proposed mechanism of emotion. Archives of Neurology and Psychiatry 38:725-743

Passetti F, Chudasama Y, Robbins TW (2002) The frontal cortex of the rat and visual attentional performance: dissociable functions of distinct medial prefrontal subregions. Cereb Cortex 12:1254-1268

Passingham RE, Myers C, Rawlins N, Lightfoot V, Fearn S (1988) Premotor cortex in the rat. Behav Neurosci 102:101-109

Pastoriza LN, Morrow TJ, Casey KL (1996) Medial frontal cortex lesions selectively attenuate the hot plate response: possible nocifensive apraxia in the rat. Pain 64:11-17

Paulesu E, Sambugaro E, Torti T, Danelli L, Ferri F, Scialfa G, Sberna M, Ruggiero GM, Bottini G, Sassaroli S (2010) Neural correlates of worry in generalized anxiety disorder and in normal controls: a functional MRI study. Psychol Med 40:117-124

Paxinos G, Franklin KBJ (2012) Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. 4 edn. Academic Press,

Paxinos G, Watson A (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. 1 edn. Academic Press,

Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxis coordinates. Elsevier 6th edition

Paxinos G, Watson C (2014) Paxinos and Watson's The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press,

Paxinos G, Watson C, Carrive P, Kirkcaldie M, K A (2009) Chemoarchitectonic atlas of the rat brain. 2 edn. Elsevier, San Diego

Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. Pharmacol Biochem Behav 24:525-529

Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. Neuroscience 82:443-468

Pifarre P, Simo M, Gispert JD, Plaza P, Fernandez A, Pujol J (2015) Diazepam and Jacobson's progressive relaxation show similar attenuating short-term effects on stress-related brain glucose consumption. Eur Psychiatry 30:187-192

Pinto L, Dan Y (2015) Cell-Type-Specific Activity in Prefrontal Cortex during Goal-Directed Behavior. Neuron 87:437-450

Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. Trends Neurosci 20:517-523

Ploner M, Gross J, Timmermann L, Schnitzler A (2002) Cortical representation of first and second pain sensation in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 99:12444-12448

Pogatzki-Zahn EM, Wagner C, Meinhardt-Renner A, Burgmer M, Beste C, Zahn PK, Pfleiderer B (2010) Coding of incisional pain in the brain: a functional magnetic resonance imaging study in human volunteers. Anesthesiology 112:406-417

Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C (2004) Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. Behav Brain Res 155:135-146

Preuss TM (1995) Do rats have prefrontal cortex? The rose-woolsey-akert program reconsidered. J Cogn Neurosci 7:1-24

Price JL, Carmichael ST, Drevets WC (1996) Networks related to the orbital and medial prefrontal cortex; a substrate for emotional behavior? Prog Brain Res 107:523-536

Qu C, King T, Okun A, Lai J, Fields HL, Porreca F (2011) Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. Pain 152:1641-1648

Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K (2000) The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. J Neurosci 20:6225-6231

Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL, Hof PR (2008) Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. J Comp Neurol 507:1141-1150

Ragozzino ME, Adams S, Kesner RP (1998) Differential involvement of the dorsal anterior cingulate and prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory. Behav Neurosci 112:293-303

Ragozzino ME, Wilcox C, Raso M, Kesner RP (1999) Involvement of rodent prefrontal cortex subregions in strategy switching. Behav Neurosci 113:32-41

Rajasethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, Berndt A, Ramakrishnan C, Jaffe A, Lo M, Liston C, Deisseroth K (2015) Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. Nature 526:653-659

Ramaswamy S, Markram H (2015) Anatomy and physiology of the thick-tufted layer 5 pyramidal neuron. Front Cell Neurosci 9:233

Rauch SL, Shin LM, Segal E, Pitman RK, Carson MA, McMullin K, Whalen PJ, Makris N (2003) Selectively reduced regional cortical volumes in post-traumatic stress disorder. Neuroreport 14:913-916

Ray JP, Russchen FT, Fuller TA, Price JL (1992) Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the mediodorsal nucleus of the thalamus in the rat. J Comp Neurol 320:435-456

Reep RL, Goodwin GS, Corwin JV (1990) Topographic organization in the corticocortical connections of medial agranular cortex in rats. J Comp Neurol 294:262-280

Reep RL, Winans SS (1982) Afferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster Mesocricetus auratus. Neuroscience 7:1265-1288

Reiner A (1990) The Triune Brain in Evolution. Role in Paleocerebral Functions. Paul D. MacLean. Plenum, New York, 1990. xxiv, 672 pp., illus. $75. Science 250:303-305

Reivich M, Amsterdam JD, Brunswick DJ, Shiue CY (2004) PET brain imaging with [11C](+)McN5652 shows increased serotonin transporter availability in major depression. J Affect Disord 82:321-327

Reppucci CJ, Petrovich GD (2016) Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: a single and double retrograde tracing study in rats. Brain Struct Funct 221:2937-2962

Reser DH, Majka P, Snell S, Chan J, Watkins K, Worthy K, Quiroga MD, Rosa MG (2016) Topography of claustrum and insula projections to medial prefrontal and anterior cingulate cortex of the common marmoset (Callithrix jacchus). J Comp Neurol

Reser DH, Richardson KE, Montibeller MO, Zhao S, Chan JM, Soares JG, Chaplin TA, Gattass R, Rosa MG (2014) Claustrum projections to prefrontal cortex in the capuchin monkey (Cebus apella). Front Syst Neurosci 8:123

Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M (2009) The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. J Neurosci 29:8206-8214

Risold PY, Thompson RH, Swanson LW (1997) The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. Brain Res Brain Res Rev 24:197-254

Rogers JH (1992) Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. Brain Res 587:147-157

Rolls ET, Grabenhorst F, Parris BA (2008) Warm pleasant feelings in the brain. Neuroimage 41:1504-1513

Romano A, Pace L, Tempesta B, Lavecchia AM, Macheda T, Bedse G, Petrella A, Cifani C, Serviddio G, Vendemiale G, Gaetani S, Cassano T (2015) Depressive-like behavior is paired to monoaminergic alteration in a murine model of Alzheimer's disease. Int J Neuropsychopharmacol 18

Romanski LM, Giguere M, Bates JF, Goldman-Rakic PS (1997) Topographic organization of medial pulvinar connections with the prefrontal cortex in the rhesus monkey. J Comp Neurol 379:313-332

Rose JE, Woolsey CN (1948a) The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 27 (1 vol.):210-232

Rose JE, Woolsey CN (1948b) Structure and relations of limbic cortex and anterior thalamic nuclei in rabbit and cat. J Comp Neurol 89:279-347

Rose JE, Woolsey CN (1949) Organization of the mammalian thalamus and its relationships to the cerebral cortex. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1:391-403; discussion 403-394

Rosenkranz JA, Grace AA (1999) Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. J Neurosci 19:11027-11039

Rostkowski AB, Leitermann RJ, Urban JH (2013) Differential activation of neuronal cell types in the basolateral amygdala by corticotropin releasing factor. Neuropeptides 47:273-280

Rudebeck PH, Walton ME, Millette BH, Shirley E, Rushworth MF, Bannerman DM (2007) Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. Eur J Neurosci 26:2315-2326

Rudebeck PH, Walton ME, Smyth AN, Bannerman DM, Rushworth MF (2006) Separate neural pathways process different decision costs. Nat Neurosci 9:1161-1168

Rummel J, Voget M, Hadar R, Ewing S, Sohr R, Klein J, Sartorius A, Heinz A, Mathe AA, Vollmayr B, Winter C (2016) Testing different paradigms to optimize antidepressant deep brain stimulation in different rat models of depression. J Psychiatr Res 81:36-45

Ryan PJ, Ma S, Olucha-Bordonau FE, Gundlach AL (2011) Nucleus incertus--an emerging modulatory role in arousal, stress and memory. Neurosci Biobehav Rev 35:1326-1341

Sacchetti B, Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C (2002) Differential contribution of some cortical sites to the formation of memory traces supporting fear conditioning. Exp Brain Res 146:223-232

Saffari R, Teng Z, Zhang M, Kravchenko M, Hohoff C, Ambree O, Zhang W (2016) NPY+-, but not PV+- GABAergic neurons mediated long-range inhibition from infra- to prelimbic cortex. Transl Psychiatry 6:e736

Sahibzada N, Dean P, Redgrave P (1986) Movements resembling orientation or avoidance elicited by electrical stimulation of the superior colliculus in rats. J Neurosci 6:723-733

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. Cereb Cortex 14:1100-1109

Santana N, Mengod G, Artigas F (2009) Quantitative analysis of the expression of dopamine D1 and D2 receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. Cereb Cortex 19:849-860

Santana N, Mengod G, Artigas F (2013) Expression of alpha(1)-adrenergic receptors in rat prefrontal cortex: cellular co-localization with 5-HT(2A) receptors. Int J Neuropsychopharmacol 16:1139-1151

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 301:805-809

Sar M, Stumpf WE, Miller RJ, Chang KJ, Cuatrecasas P (1978) Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. J Comp Neurol 182:17-37

Sarter M, Markowitsch HJ (1984) Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. J Comp Neurol 224:445-460

Savander V, Go CG, LeDoux JE, Pitkanen A (1995) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the basal nucleus. J Comp Neurol 361:345-368

Schmued LC, Fallon JH (1986) Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. Brain Res 377:147-154

Schoenbaum G, Roesch MR, Stalnaker TA, Takahashi YK (2009) A new perspective on the role of the orbitofrontal cortex in adaptive behaviour. Nat Rev Neurosci 10:885-892

Schwarz LA, Miyamichi K, Gao XJ, Beier KT, Weissbourd B, DeLoach KE, Ren J, Ibanes S, Malenka RC, Kremer EJ, Luo L (2015) Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit. Nature 524:88-92

Scopinho AA, Scopinho M, Lisboa SF, Correa FM, Guimaraes FS, Joca SR (2010) Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. Behav Brain Res 214:437-442

Semba K, Fibiger HC (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. J Comp Neurol 323:387-410

Senn V, Wolff SB, Herry C, Grenier F, Ehrlich I, Grundemann J, Fadok JP, Muller C, Letzkus JJ, Luthi A (2014) Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons. Neuron 81:428-437

Sesack SR, Bunney BS (1989) Pharmacological characterization of the receptor mediating electrophysiological responses to dopamine in the rat medial prefrontal cortex: a microiontophoretic study. J Pharmacol Exp Ther 248:1323-1333

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. J Comp Neurol 290:213-242

Shackman AJ, Salomons TV, Slagter HA, Fox AS, Winter JJ, Davidson RJ (2011) The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. Nat Rev Neurosci 12:154-167

Sheline YI, Barch DM, Donnelly JM, Ollinger JM, Snyder AZ, Mintun MA (2001) Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. Biol Psychiatry 50:651-658

Sheline YI, Gado MH, Price JL (1998) Amygdala core nuclei volumes are decreased in recurrent major depression. Neuroreport 9:2023-2028

Shenhav A, Straccia MA, Cohen JD, Botvinick MM (2014) Anterior cingulate engagement in a foraging context reflects choice difficulty, not foraging value. Nat Neurosci 17:1249-1254

Shibata H (1993) Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to the cingulate cortex in the rat. J Comp Neurol 330:533-542

Shibata H, Naito J (2005) Organization of anterior cingulate and frontal cortical projections to the anterior and laterodorsal thalamic nuclei in the rat. Brain Res 1059:93-103

Shibata H, Naito J (2008) Organization of anterior cingulate and frontal cortical projections to the retrosplenial cortex in the rat. J Comp Neurol 506:30-45

Shibata H, Yukie M (2009) Thalamocingulate connections in the monkey. In: Vogt BA (ed) Cingulate neurobiology and disease. Oxford University Press, New York, pp 96-108

Shima K, Aya K, Mushiake H, Inase M, Aizawa H, Tanji J (1991) Two movement-related foci in the primate cingulate cortex observed in signal-triggered and self-paced forelimb movements. J Neurophysiol 65:188-202

Shinonaga Y, Takada M, Mizuno N (1994) Topographic organization of collateral projections from the basolateral amygdaloid nucleus to both the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the rat. Neuroscience 58:389-397

Siegle GJ, Steinhauer SR, Thase ME, Stenger VA, Carter CS (2002) Can't shake that feeling: event-related fMRI assessment of sustained amygdala activity in response to emotional information in depressed individuals. Biol Psychiatry 51:693-707

Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. Neuropsychopharmacology 36:529-538

Singh MK, Chang KD, Chen MC, Kelley RG, Garrett A, Mitsunaga MM, Bararpour L, Howe M, Reiss AL, Gotlib IH (2012) Volumetric reductions in the subgenual anterior cingulate cortex in adolescents with bipolar I disorder. Bipolar Disord 14:585-596

Sivaselvachandran S, Acland EL, Abdallah S, Martin LJ (2016) Behavioral and mechanistic insight into rodent empathy. Neurosci Biobehav Rev

Slattery DA, Neumann ID, Cryan JF (2011) Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. J Psychopharmacol 25:1295-1303

Smith GE (1907) A New Topographical Survey of the Human Cerebral Cortex, being an Account of the Distribution of the Anatomically Distinct Cortical Areas and their Relationship to the Cerebral Sulci. J Anat Physiol 41:237-254

Smith JB, Alloway KD (2014) Interhemispheric claustral circuits coordinate sensory and motor cortical areas that regulate exploratory behaviors. Front Syst Neurosci 8:93

Smith MA, Banerjee S, Gold PW, Glowa J (1992) Induction of c-fos mRNA in rat brain by conditioned and unconditioned stressors. Brain Res 578:135-141

Smythies J, Edelstein L, Ramachandran V (2012) Hypotheses relating to the function of the claustrum. Front Integr Neurosci 6:53

Smythies J, Edelstein L, Ramachandran V (2014) Hypotheses relating to the function of the claustrum II: does the claustrum use frequency codes? Front Integr Neurosci 8:7

Song C, Zhang WH, Wang XH, Zhang JY, Tian XL, Yin XP, Pan BX (2017) Acute stress enhances the glutamatergic transmission onto basoamygdala neurons embedded in distinct microcircuits. Mol Brain 10:3

Sotres-Bayon F, Sierra-Mercado D, Pardilla-Delgado E, Quirk GJ (2012) Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. Neuron 76:804-812

St-Laurent M, Petrides M, Sziklas V (2009) Does the cingulate cortex contribute to spatial conditional associative learning in the rat? Hippocampus 19:612-622

St Onge JR, Floresco SB (2010) Prefrontal cortical contribution to risk-based decision making. Cereb Cortex 20:1816-1828

Steullet P, Cabungcal JH, Cuenod M, Do KQ (2014) Fast oscillatory activity in the anterior cingulate cortex: dopaminergic modulation and effect of perineuronal net loss. Front Cell Neurosci 8:244

Straub J, Metzger CD, Plener PL, Koelch MG, Groen G, Abler B (2017) Successful group psychotherapy of depression in adolescents alters fronto-limbic resting-state connectivity. J Affect Disord 209:135-139

Strawn JR, Wehry AM, DelBello MP, Rynn MA, Strakowski S (2012) Establishing the neurobiologic basis of treatment in children and adolescents with generalized anxiety disorder. Depress Anxiety 29:328-339

Sugiura M, Shah NJ, Zilles K, Fink GR (2005) Cortical representations of personally familiar objects and places: functional organization of the human posterior cingulate cortex. J Cogn Neurosci 17:183-198

Suzuki S, Saitoh A, Ohashi M, Yamada M, Oka J (2016) The infralimbic and prelimbic medial prefrontal cortices have differential functions in the expression of anxiety-like behaviors in mice. Behav Brain Res 304:120-124

Svirsky N, Levy S, Avitsur R (2016) Prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) increases aggression and modulates maternal behavior in offspring mice. Dev Psychobiol 58:71-82

Swanson LW (1981) A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. Brain Res 217:150-154

Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? Trends Neurosci 21:323-331

Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. Neuroendocrinology 36:165-186

Szekely A, Silton RL, Heller W, Miller GA, Mohanty A (2016) Differential functional connectivity of rostral anterior cingulate cortex during emotional interference. Soc Cogn Affect Neurosci

Tadayonnejad R, Yang S, Kumar A, Ajilore O (2014) Multimodal brain connectivity analysis in unmedicated late-life depression. PLoS One 9:e96033

Takada M (1992) The lateroposterior thalamic nucleus and substantia nigra pars lateralis: origin of dual innervation over the visual system and basal ganglia. Neurosci Lett 139:153-156

Takada M, Hattori T (1986) Collateral projections from the substantia nigra to the cingulate cortex and striatum in the rat. Brain Res 380:331-335

Takenouchi K, Nishijo H, Uwano T, Tamura R, Takigawa M, Ono T (1999) Emotional and behavioral correlates of the anterior cingulate cortex during associative learning in rats. Neuroscience 93:1271-1287

Tanaka D, Jr. (1976) Thalamic projections of the dorsomedial prefrontal cortex in the rhesus monkey (Macaca mulatta). Brain Res 110:21-38

Tang J, Ko S, Ding HK, Qiu CS, Calejesan AA, Zhuo M (2005) Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. Mol Pain 1:6

Thierry AM, Blanc G, Sobel A, Stinus L, Glowinski J (1973) Dopaminergic terminals in the rat cortex. Science 182:499-501

Thompson RH, Swanson LW (2003) Structural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network. Brain Res Brain Res Rev 41:153-202

Torres-Sanchez S, Perez-Caballero L, Berrocoso E (2017) Cellular and molecular mechanisms triggered by Deep Brain Stimulation in depression: A preclinical and clinical approach. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 73:1-10

Totah NK, Kim YB, Homayoun H, Moghaddam B (2009) Anterior cingulate neurons represent errors and preparatory attention within the same behavioral sequence. J Neurosci 29:6418-6426

Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016) GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. Neuron 91:260-292

Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, Sibille E (2012) Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. Am J Psychiatry 169:1194-1202

Trojanowski JQ, Gonatas JO, Gonatas NK (1981) Conjugates of horseradish peroxidase (HRP) with cholera toxin and wheat germ agglutinin are superior to free HRP as orthogradely transported markers. Brain Res 223:381-385

Tromp DP, Grupe DW, Oathes DJ, McFarlin DR, Hernandez PJ, Kral TR, Lee JE, Adams M, Alexander AL, Nitschke JB (2012) Reduced structural connectivity of a major frontolimbic pathway in generalized anxiety disorder. Arch Gen Psychiatry 69:925-934

Truitt WA, Sajdyk TJ, Dietrich AD, Oberlin B, McDougle CJ, Shekhar A (2007) From anxiety to autism: spectrum of abnormal social behaviors modeled by progressive disruption of inhibitory neuronal function in the basolateral amygdala in Wistar rats. Psychopharmacology (Berl) 191:107-118

Turner BH, Herkenham M (1991) Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing. J Comp Neurol 313:295-325

Tye KM, Prakash R, Kim SY, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, Thompson KR, Gradinaru V, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2011) Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. Nature 471:358-362

Uylings HB, van Eden CG (1990) Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. Prog Brain Res 85:31-62

Van De Werd HJ, Rajkowska G, Evers P, Uylings HB (2010) Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. Brain Struct Funct 214:339-353

Van De Werd HJ, Uylings HB (2014) Comparison of (stereotactic) parcellations in mouse prefrontal cortex. Brain Struct Funct 219:433-459

Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. Brain Res Brain Res Rev 39:107-140

Van Eden CG, Buijs RM (2000) Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex: autonomic interactions. In: Uylings HB, Van Eden CG, de Bruin JP, Feenstra MPG, Pennartz CMA (eds) Cognition, emotion, and autonomic responses. The integrative role of the prefrontal cortex and limbic structures., vol 126. Elsevier, Amsterdam, pp 49-62

Van Eden CG, Lamme VA, Uylings HB (1992) Heterotopic Cortical Afferents to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat. A Combined Retrograde and Anterograde Tracer Study. Eur J Neurosci 4:77-97

Van Eden CG, Uylings HB (1985) Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. J Comp Neurol 241:253-267

van Groen T, Kadish I, Michael Wyss J (2002a) Role of the anterodorsal and anteroventral nuclei of the thalamus in spatial memory in the rat. Behav Brain Res 132:19-28

van Groen T, Kadish I, Wyss JM (2002b) The role of the laterodorsal nucleus of the thalamus in spatial learning and memory in the rat. Behav Brain Res 136:329-337

van Groen T, Wyss JM (1990) Connections of the retrosplenial granular a cortex in the rat. J Comp Neurol 300:593-606

van Groen T, Wyss JM (1992) Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat. J Comp Neurol 315:200-216

Van Hoesen GW, Morecraft RJ, Vogt BA (1993) Connections of the monkey cingulate cortex. In: Vogt BAaG, M. (ed) Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus. Boston, pp 249-283

Vandenbergh J, Dupont P, Fischler B, Bormans G, Persoons P, Janssens J, Tack J (2005) Regional brain activation during proximal stomach distention in humans: A positron emission tomography study. Gastroenterology 128:564-573

Vann SD, Kristina Wilton LA, Muir JL, Aggleton JP (2003) Testing the importance of the caudal retrosplenial cortex for spatial memory in rats. Behav Brain Res 140:107-118

Varela C, Kumar S, Yang JY, Wilson MA (2014) Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. Brain Struct Funct 219:911-929

Vargas LC, Marques TA, Schenberg LC (2000) Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. Neurosci Lett 280:45-48

Veenman CL, Reiner A, Honig MG (1992) Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single- and double-labeling studies. J Neurosci Methods 41:239-254

Veinante P, Yalcin I, Barrot M (2013) The amygdala between sensation and affect: a role in pain. J Mol Psychiatry 1:9

Vertes RP (2002) Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. J Comp Neurol 442:163-187

Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse 51:32-58

Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neuroscience 142:1-20

Vertes RP, Hoover WB (2008) Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. J Comp Neurol 508:212-237

Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ (2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. J Comp Neurol 499:768-796

Vertes RP, Hoover WB, Rodriguez JJ (2012) Projections of the central medial nucleus of the thalamus in the rat: node in cortical, striatal and limbic forebrain circuitry. Neuroscience 219:120-136

Vertes RP, Linley SB, Hoover WB (2015) Limbic circuitry of the midline thalamus. Neurosci Biobehav Rev 54:89-107

Vetere G, Restivo L, Novembre G, Aceti M, Lumaca M, Ammassari-Teule M (2011) Extinction partially reverts structural changes associated with remote fear memory. Learn Mem 18:554-557

Vogt BA (1976) Retrosplenial cortex in the rhesus monkey: a cytoarchitectonic and Golgi study. J Comp Neurol 169:63-97

Vogt BA (1993) Structural organization of cingulate cortex: areas, neurons, and somatodendritic transmitter receptors. In: Vogt BA, Gabriel M (eds) Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus. Birkhaüser, Boston,

Vogt BA (2005) Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. Nat Rev Neurosci 6:533-544

Vogt BA (2009) Regions and subregions of the cingulate cortex. In: Cingulate neurobiology and disease. Oxford University Press, New York, pp 3-26
Vogt BA (2015) Cingulate cortex and pain architecture. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 4 edn. Elsevier, San Diego, pp 575-596
Vogt BA (2016) Midcingulate cortex: Structure, connections, homologies, functions and diseases. J Chem Neuroanat 74:28-46
Vogt BA, Derbyshire S, Jones AK (1996) Pain processing in four regions of human cingulate cortex localized with co-registered PET and MR imaging. Eur J Neurosci 8:1461-1473
Vogt BA, Finch DM, Olson CR (1992) Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. Cereb Cortex 2:435-443
Vogt BA, Laureys S (2009) The primate posterior cingulate gyrus: connections, sensorimotor orientation, gateway to limbic processing. In: Vogt BA (ed) Cingulate Neurobiology and Disease. Oxford University Press Inc., NYC, pp 275-303
Vogt BA, Miller MW (1983) Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. J Comp Neurol 216:192-210
Vogt BA, Nimchinsky EA, Vogt LJ, Hof PR (1995) Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. J Comp Neurol 359:490-506
Vogt BA, Palomero-Gallagher N (2012) Cingulate cortex. In: Paxinos G, Mai J (eds) The human nervous system. 3 edn. Elsevier, San Diego, pp 944-983
Vogt BA, Pandya DN (1987) Cingulate cortex of the rhesus monkey: II. Cortical afferents. J Comp Neurol 262:271-289
Vogt BA, Pandya DN, Rosene DL (1987) Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. J Comp Neurol 262:256-270
Vogt BA, Paxinos G (2014) Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. Brain Struct Funct 219:185-192
Vogt BA, Peters A (1981) Form and distribution of neurons in rat cingulate cortex: areas 32, 24, and 29. J Comp Neurol 195:603-625
Vogt BA, Plager MD, Crino PB, Bird ED (1990) Laminar distributions of muscarinic acetylcholine, serotonin, GABA and opioid receptors in human posterior cingulate cortex. Neuroscience 36:165-174
Vogt BA, Rosene DL, Pandya DN (1979) Thalamic and cortical afferents differentiate anterior from posterior cingulate cortex in the monkey. Science 204:205-207
Vogt BA, Vogt L (2003) Cytology of human dorsal midcingulate and supplementary motor cortices. J Chem Neuroanat 26:301-309
Vogt BA, Vogt L, Farber NB (2004) Cingulate cortex and models of disease. In: Paxinos G (ed) The rat nervous system. 3 edn. Elsevier academic press, San Diego, pp 705-727
Vogt BA, Vogt L, Farber NB, Bush G (2005) Architecture and neurocytology of monkey cingulate gyrus. J Comp Neurol 485:218-239
Vogt BA, Vogt L, Laureys S (2006) Cytology and functionally correlated circuits of human posterior cingulate areas. Neuroimage 29:452-466
Vogt BA, Vogt LJ, Nimchinsky EA, Hof PR (1997) Primate cingulate cortex chemoarchitecture and its disruption in Alzheimer's disease. In: Bloom F, Björklund A, Hökfelt T (eds) Handbook of Chemical Neuroanatomy, The Primate Nervous System, Part I, vol 13. Elsevier, Amsterdam, pp 455-528
Vogt C, Vogt O (1919) Allgemeinere Ergebnisse unserer Hirnforschung. J Psychol Neurol 25:279-461

Vogt LJ, Sim-Selley LJ, Childers SR, Wiley RG, Vogt BA (2001) Colocalization of mu-opioid receptors and activated G-proteins in rat cingulate cortex. J Pharmacol Exp Ther 299:840-848

von Economo C, Koskinas G (1925) Die Cytoarchitectonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen. Springer, Berlin

Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. Trends Neurosci 27:468-474

Wang Q, Ng L, Harris JA, Feng D, Li Y, Royall JJ, Oh SW, Bernard A, Sunkin SM, Koch C, Zeng H (2017) Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse. J Comp Neurol 525:1317-1346

Wang S, Shi Y, Li BM (2016) Neural representation of cost-benefit selections in rat anterior cingulate cortex in self-paced decision making. Neurobiol Learn Mem 139:1-10

Watson C, Paxinos G (2010) Chemoarchitectonic atlas of the mouse brain. 1 edn. Elsevier, San Diego

Weible AP, Rowland DC, Monaghan CK, Wolfgang NT, Kentros CG (2012) Neural correlates of long-term object memory in the mouse anterior cingulate cortex. J Neurosci 32:5598-5608

Weible AP, Rowland DC, Pang R, Kentros C (2009) Neural correlates of novel object and novel location recognition behavior in the mouse anterior cingulate cortex. J Neurophysiol 102:2055-2068

Weiskrantz L (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. J Comp Physiol Psychol 49:381-391

White MG, Cody PA, Bubser M, Wang HD, Deutch AY, Mathur BN (2016) Cortical hierarchy governs rat claustrocortical circuit organization. J Comp Neurol

Wiesendanger R, Wiesendanger M (1982) The corticopontine system in the rat. I. Mapping of corticopontine neurons. J Comp Neurol 208:215-226

Wikmark RG, Divac I, Weiss R (1973) Retention of spatial delayed alternation in rats with lesions in the frontal lobes. Implications for a comparative neuropsychology of the prefrontal system. Brain Behav Evol 8:329-339

Wilber AA, Clark BJ, Demecha AJ, Mesina L, Vos JM, McNaughton BL (2014) Cortical connectivity maps reveal anatomically distinct areas in the parietal cortex of the rat. Front Neural Circuits 8:146

Wright NF, Vann SD, Erichsen JT, O'Mara SM, Aggleton JP (2013) Segregation of parallel inputs to the anteromedial and anteroventral thalamic nuclei of the rat. J Comp Neurol 521:2966-2986

Wu M, Andreescu C, Butters MA, Tamburo R, Reynolds CF, 3rd, Aizenstein H (2011) Default-mode network connectivity and white matter burden in late-life depression. Psychiatry Res 194:39-46

Wu S, Gao Q, Zhao P, Gao Y, Xi Y, Wang X, Liang Y, Shi H, Ma Y (2016) Sulforaphane produces antidepressant- and anxiolytic-like effects in adult mice. Behav Brain Res 301:55-62

Wyss JM, Sripanidkulchai K (1984) The topography of the mesencephalic and pontine projections from the cingulate cortex of the rat. Brain Res 293:1-15

Wyss JM, Van Groen T (1992) Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. Hippocampus 2:1-11

Yalcin I, Barthas F, Barrot M (2014) Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. Neurosci Biobehav Rev 47:154-164

Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, Sage-Ciocca D, Yin JC, Freund-Mercier MJ, Barrot M (2011) A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. Biol Psychiatry 70:946-953

Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2004) Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. Eur J Neurosci 19:181-189

Yin HH, Ostlund SB, Knowlton BJ, Balleine BW (2005) The role of the dorsomedial striatum in instrumental conditioning. Eur J Neurosci 22:513-523

Yoshimura S, Okamoto Y, Matsunaga M, Onoda K, Okada G, Kunisato Y, Yoshino A, Ueda K, Suzuki SI, Yamawaki S (2017) Cognitive behavioral therapy changes functional connectivity between medial prefrontal and anterior cingulate cortices. J Affect Disord 208:610-614

Yoshimura S, Okamoto Y, Onoda K, Matsunaga M, Ueda K, Suzuki S, Shigetoyamawaki (2010) Rostral anterior cingulate cortex activity mediates the relationship between the depressive symptoms and the medial prefrontal cortex activity. J Affect Disord 122:76-85

Yu C, Zhou Y, Liu Y, Jiang T, Dong H, Zhang Y, Walter M (2011a) Functional segregation of the human cingulate cortex is confirmed by functional connectivity based neuroanatomical parcellation. Neuroimage 54:2571-2581

Yu T, Guo M, Garza J, Rendon S, Sun XL, Zhang W, Lu XY (2011b) Cognitive and neural correlates of depression-like behaviour in socially defeated mice: an animal model of depression with cognitive dysfunction. Int J Neuropsychopharmacol 14:303-317

Yucel K, McKinnon MC, Chahal R, Taylor VH, Macdonald K, Joffe R, MacQueen GM (2008) Anterior cingulate volumes in never-treated patients with major depressive disorder. Neuropsychopharmacology 33:3157-3163

Yukie M, Shibata H (2009) Temporocingulate interactions in the monkey. In: Vogt BA (ed) Cingulate neurobiology and disease. Oxford University Press, New York, pp 146-158

Zeng D, Stuesse SL (1993) Topographic organization of efferent projections of medial frontal cortex. Brain Res Bull 32:195-200

Zhang S, Xu M, Chang WC, Ma C, Hoang Do JP, Jeong D, Lei T, Fan JL, Dan Y (2016a) Organization of long-range inputs and outputs of frontal cortex for top-down control. Nat Neurosci 19:1733-1742

Zhang S, Xu M, Kamigaki T, Hoang Do JP, Chang WC, Jenvay S, Miyamichi K, Luo L, Dan Y (2014) Selective attention. Long-range and local circuits for top-down modulation of visual cortex processing. Science 345:660-665

Zhang Y, Jiang YY, Shao S, Zhang C, Liu FY, Wan Y, Yi M (2016b) Inhibiting medial septal cholinergic neurons with DREADD alleviated anxiety-like behaviors in mice. Neurosci Lett

Zhang Y, Wang N, Wang JY, Chang JY, Woodward DJ, Luo F (2011) Ensemble encoding of nociceptive stimulus intensity in the rat medial and lateral pain systems. Mol Pain 7:64

Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, Jia Y, Shum F, Xu H, Li BM, Kaang BK, Zhuo M (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. Neuron 47:859-872

Zheng C, Quan M, Zhang T (2012) Decreased thalamo-cortical connectivity by alteration of neural information flow in theta oscillation in depression-model rats. J Comput Neurosci 33:547-558

Zhuo M (2007) A synaptic model for pain: long-term potentiation in the anterior cingulate cortex. Mol Cells 23:259-271

Zhuo M (2016) Neural Mechanisms Underlying Anxiety-Chronic Pain Interactions. Trends Neurosci 39:136-145

Zilles K, Amunts K (2012) Architecture of the cerebral cortex. In: Mai J, Paxinos G (eds) The human nervous system. 3 edn. Elsevier, San Diego, pp 836-878

Zilles K, Armstrong E, Schlaug G, Schleicher A (1986) Quantitative cytoarchitectonics of the posterior cingulate cortex in primates. J Comp Neurol 253:514-524

Zilles K, Schroder H, Schroder U, Horvath E, Werner L, Luiten PG, Maelicke A, Strosberg AD (1989) Distribution of cholinergic receptors in the rat and human neocortex. EXS 57:212-228

Zilles K, Wree A (1995) Cortex: areal and laminar structure vol 2th edition (Paxinos G, ed). Academic, San Diego

Zingg B, Hintiryan H, Gou L, Song MY, Bay M, Bienkowski MS, Foster NN, Yamashita S, Bowman I, Toga AW, Dong HW (2014) Neural networks of the mouse neocortex. Cell 156:1096-1111