



HAL
open science

La mémoire hippocampo-dépendante : altérations dans un modèle de vieillissement accéléré et régulation par le système nociceptinergique chez la souris

Khaoula Rekik

► **To cite this version:**

Khaoula Rekik. La mémoire hippocampo-dépendante : altérations dans un modèle de vieillissement accéléré et régulation par le système nociceptinergique chez la souris. Neurosciences. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30327 . tel-01995975

HAL Id: tel-01995975

<https://theses.hal.science/tel-01995975>

Submitted on 28 Jan 2019

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par

Khaoula REKIK

Le mercredi 13 décembre 2017

La mémoire hippocampo-dépendante: Altérations dans un modèle de vieillissement accéléré et régulation par le système nociceptinergique chez la souris

École doctorale et discipline ou spécialité

ED BSB : Neurosciences

Unité de recherche

Centre de Recherches sur la Cognition Animale CRCA UMR5169

Directeurs de Thèse

Bernard FRANCÉS & Lionel MOULÉDOUS

Jury

Pascale BELENGUER (Présidente du jury)

Nadine RAVEL (Rapporteur)

Abdel-Mouttalib OUAGAZZAL (Rapporteur)

Lionel MOULÉDOUS (Directeur de thèse)

Bernard FRANCÉS (Membre invité)

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury. Un grand merci au **Pr. Pascale Belenguer** d'avoir accepté de présider ce jury, c'est un grand honneur pour moi. Je remercie la **Pr. Nadine Ravel** qui a accepté de juger mon travail et a donné de son temps pour lire attentivement ma thèse, j'en suis très honorée. Un grand merci au **Dr. Abdel-Mouhtalib Ouagazzal** pour la disponibilité et l'énergie que vous avez accordé à l'évaluation de ces travaux.

Merci aussi à Catherine Mollereau et Claude Knauf d'avoir pris le temps de discuter de l'évolution de cette thèse lors des comités de thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes directeurs de thèse, le **Pr. Bernard Francés** et le **Dr. Lionel Moulédous**. Tout d'abord je remercie Bernard qui m'a donné la chance d'être docteur de l'université Paul Sabatier quand il m'a accepté pour faire un master 1 biosanté au sein de cet établissement. Merci de m'avoir accepté dans votre équipe et pour la confiance vous m'avez accordée tout au long de ces années. Merci pour vos conseils et votre professionnalisme qui ont beaucoup servi à améliorer mon niveau de recherche. Vous m'avez appris plusieurs choses tant sur le plan pratique que sur le plan théorique. Bernard, vous êtes une merveilleuse personne, vous m'avez fortement aidé à dépasser mes lacunes à plusieurs niveaux à mon arrivée en France. Ce n'est pas parce que vous êtes mon directeur de thèse, mais vous êtes une personne exceptionnelle. Je ne pourrai jamais oublier tout ce que vous avez fait pour moi. Durant ces sept ans, vous étiez mon prof certes, mais vous étiez aussi et vous serez toujours « mon père ». Vous m'avez soutenu dans plusieurs situations de ma vie professionnelle mais également personnelle. Vous étiez à mes côtés dans les plus beaux jours de ma vie et aussi dans les plus mauvais jours. Merci n'est qu'un mot. Je remercie Lionel qui m'a permis de « partager » son projet sur les neuropeptides. Merci pour tout le temps que vous avez consacré à m'apprendre à opérer une souris sur l'appareil stéréotaxique. Je vous remercie infiniment pour vos conseils, pour toutes les discussions qui ont bien enrichi mon esprit. Vous êtes mon exemple par votre travail, votre manière de faire les choses et surtout votre respect exceptionnel. Je vous remercie d'avoir supporté mes erreurs, d'avoir accepté de faire les choses à ma place quand il le fallait. Votre encadrement, votre gentillesse et plusieurs choses chez vous sont exceptionnelles. Vous étiez à mon écoute, vous étiez disponible quand j'avais besoin de votre aide. Comme je l'ai dit à Bernard le mot merci ne suffit jamais.

Merci au Dr. Cédric Florian pour m'avoir encadré dans la première partie de ma thèse avant l'arrivée de Lionel Moulédous. Je vous remercie pour tous vos conseils pratiques et théoriques qui ont permis de réaliser mes manips dans les meilleures conditions. Je vous remercie aussi pour votre aide au bon déroulement de l'exposé oral de ma thèse.

Je remercie le **Pr. Philippe Valet et le Dr. Cédric Dray** pour leur participation active au projet Werner et pour leur collaboration.

Je remercie également nos collaborateurs ; le Pr M. Lebel (Canada) de nous avoir envoyé les souris Werner, G. Calo (Italy) et N. T. Zaveri (USA) qui ont synthétisé les ligands NOP.

Mes remerciements vont également au **Dr. Bruno Guiard** pour votre encadrement dans le projet Phodé qui a permis de financer ma thèse. Merci de m'avoir piloté dans ces travaux qui sont différents du cadre de ma thèse. Je vous remercie pour tous vos conseils, de m'avoir fait bénéficier de votre expertise et surtout de votre gentillesse dans nos contacts au quotidien ; sans oublier de vous remercier pour votre soutien psychologique.

Je remercie également la **Dr. Claire Rampon** pour tous les conseils que vous m'avez donnés et les diverses discussions que nous avons pu avoir que ce soit dans la vie professionnelle ou privée. Je vous remercie de m'avoir serrée dans vos bras dans les moments les plus difficiles. Vous êtes une excellente directrice d'équipe.

Un grand merci au Pr. Pascal Rouillet pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir lors des réunions d'équipe. Je vous remercie surtout pour vos conseils pour la préparation de mon oral de thèse. Je n'ai pas oublié non plus votre soutien pour choisir le parcours neurosciences en master1.

Je tiens à remercier aussi le Dr. Lionel Dahan et la Dr. Laure Verret de m'avoir toujours conseillée et dirigée dans mes idées, de nos discussions aussi riches.

Je remercie Stéphane Pech, notre fameux animalier, d'être toujours présent et surtout d'avoir toujours répondu à mes besoins durant ces années.

Je remercie Hélène Halley et le Pr. Jean Michel Lassale pour toutes les discussions que nous avons pu avoir.

Je remercie Sébastien Lopez de m'avoir aidé à maîtriser les nouveaux dispositifs comportementaux du laboratoire sans oublier son aide pour relier mon tout premier exemplaire de thèse. C'était rigolo !

Merci à Camille Lejards pour ta disponibilité et à ta volonté de nous aider, merci aussi à Alix Gabrielli notre gestionnaire d'avoir répondu à nos besoins.

Je remercie notre post-doc la Dr. Stella Manta pour tes conseils lors des discussions que nous avons eu ensemble, pour tes disponibilités à me montrer certaines tâches. Je te remercie pour ton cadeau sympa qui m'a aidé à dépasser les nausées de ma grossesse.

Je tiens à remercier Raquel Faria Da Silva avec qui j'ai commencé le projet nociceptine. Je te remercie pour les moments que nous avons passé ensemble, à faire les expériences, à discuter, à rigoler. T'es une personne très gentille et je ne t'ai jamais oublié car tu étais aussi mon amie et tu le resteras malgré la distance.

Merci à mes « colocataires de bureau » : Christophe Rey d'avoir toujours répondu à mes questions d'orthographe et de français. Merci au bon voisinage que tu m'as offert. Tu as toujours supporté les tonnes de publications qui trainaient entre mon bureau et le tien sans me dire un mot. Et Benjamin Portal, pour ta gentillesse exceptionnelle, pour tous tes conseils et tes remarques durant les répétitions de la thèse. Merci pour ton aide le jour de la soutenance à bien m'installer pour la présentation orale.

Je remercie aussi Vanessa Cattaud et Basile Coutens qui n'étaient pas dans le même bureau mais qui sont deux belles personnes. Merci pour votre gentillesse et je suis très contente de vous avoir croisés durant ces années.

Une partie de mes résultats a pu être obtenue grâce à la participation de Morgan Colom que je remercie fortement.

Je pense aussi à remercier tous les doctorants qui étaient au sein de notre équipe avec qui j'ai pu discuter et partager, notamment Nicolas Massaly, Jessica Remaud, Charlotte Bezzina, Kévin Richetin, Petnoi Petsophonsacul, Triniovita, Andraini, Hélène Villain et Aicha BenKahloul.

Je remercie également tous les étudiants que j'ai croisés (doctorants, M1 et M2), notamment, François Labaste, Yann Hureau, Cecile Juan, Amélie Dia, Cindy Graussman, Céline Derreumaux, Adam Philipp.

Je remercie le directeur, Pr. Martin Giurfa et tous les membres du CRCA en particulier Jean Marc Devaud, Isabelle Massou, Marlène Botella, Marie Christine Miquel.

Je remercie les laboratoires PHODE d'avoir financé ma thèse.

Je remercie mes parents, la clé de ma réussite. C'est grâce à votre éducation, votre soutien, votre direction, votre sacrifice que je suis devenue docteur. J'espère être comme vous et réussir à suivre votre chemin.

Je remercie aussi mes frères, Omar et Montacer, de leur soutien. Vous avez bien participé à cette réussite moralement et matériellement.

Je remercie mes sœurs, Asma et exceptionnellement Amina, ma deuxième mère, de m'avoir toujours soutenu pour réussir ma vie. Amina, je te remercie d'avoir été une maman pour Abdoullah durant les années de thèse surtout de bien prendre soin de lui. Asma ou plutôt Souma merci pour ton soutien continu qui m'a aidé à dépasser plusieurs lacunes, sans oublier ton aide le jour de la soutenance pour que tout se passe comme souhaité.

Je tiens à remercier mon mari, Sedki, et mon fils Abdoullah, d'avoir supporté mon absence surtout les 5 derniers mois. Sedki je te remercie pour ton soutien aussi et d'avoir pris soin de notre bout de chou quand j'étais occupée.

Je remercie également ma belle-famille.

Je remercie Radhia et Mounir Boughattas de m'avoir ouvert leur porte et m'avoir hébergée chez eux. Merci pour votre confiance.

Merci à Aladin Tuffenkji d'être présent quand j'ai eu besoin de toi.

Merci à mes amis Safia, Salma, Khadija-Lina, Youssef et Ilyes.

Table des matières

Introduction générale.....	1
A) La mémoire	3
1) Définition et étapes de la mémoire	3
2) Différents types de mémoire	4
2.1 Mémoire explicite ou déclarative	5
2.2 Mémoire implicite ou non déclarative	5
3) Supports anatomique de la mémoire	6
3.1 La formation hippocampique	7
3.1.1 Connexions de la formation hippocampique	8
3.1.1.1 Afférences	8
3.1.1.2 Efférences	9
3.1.1.3 Circuit trisynaptique	9
3.1.2 Hippocampe dorsal et hippocampe ventral	11
3.1.3 Rôle de l'hippocampe dans la formation de la mémoire.....	11
3.2 L'amygdale	12
3.2.1 Structure anatomique	12
3.2.2 Rôle de l'amygdale dans la mémoire	14
4) Mécanismes neurobiologiques de la mémoire	15
4.1 Encodage et mémoire à court terme	15
4.2 Consolidation mnésique	15
4.2.1 Consolidation synaptique ou cellulaire.....	16
4.2.1.1 La Potentialisation à Long Terme (LTP).....	17
<i>Activation des récepteurs NMDA et influx calcique.....</i>	<i>17</i>
<i>Autophosphorylation des CamK II.....</i>	<i>18</i>
<i>Production de l'AMPC et activation de PKA et MAPK.....</i>	<i>18</i>
<i>Expression des gènes précoces.....</i>	<i>20</i>
<i>BDNF.....</i>	<i>23</i>
<i>Dégradation et Synthèse protéique et réorganisation synaptique.....</i>	<i>24</i>
4.2.1.2 La Dépression à Long Terme (LTD)	26
4.2.2 Consolidation systémique	27
4.3 La reconsolidation	29
4.3.1 Mécanismes moléculaires de la reconsolidation	30
4.3.1.1 Dégradation et synthèse protéique.....	30
4.3.1.2 Activation des facteurs de transcription	33
4.3.1.3 Les kinases.....	33
4.3.2 Reconsolidation versus consolidation.....	34
4.4 Extinction	37
5) Neuromodulateurs de la mémoire	39
5.1 Noradrénaline	39
5.2 Dopamine	40
5.3 Acétylcholine.....	41
5.4 Glucocorticoïdes	42
5.5 Neuropeptides	43
B) Le système nociceptinergique	44

1) Le récepteur de la nociceptine (NOP)	44
2) Le neuropeptide nociceptine/orphanine FQ	45
3) Transduction du signal	46
4) Action électrophysiologique des récepteurs NOP et effets sur la libération des neurotransmetteurs centraux.....	47
5) Fonctions biologiques du système nociceptinergique	48
5.1 Nociception	48
5.2 Locomotion et motricité.....	49
5.3 Prise alimentaire.....	49
5.4 Motivation et récompense.....	49
5.5 Anxiété et dépression	49
5.6 Système nociceptinergique et mémoire	50
6) Ligands du récepteur NOP.....	51
6.1 Les agonistes peptidiques.....	51
Les agonistes totaux	51
Les agonistes partiels	51
Les antagonistes	51
6.2 Les ligands non peptidiques	52
Les agonistes	52
Les antagonistes	53
C) Les altérations de la mémoire	54
1) Le vieillissement	54
1.1 Généralités	54
1.2 Le vieillissement accéléré : Progéria	57
2) La mémoire traumatique et le syndrome de stress post-traumatique	58
2.1 Généralités.....	58
2.2 Prise en charge et traitement	60
2.2.1 Psychothérapies.....	60
2.2.2 Psychopharmacologie	60
Objectifs	63
Matériels et méthodes.....	67
1) Animaux	69
2) Agents pharmacologiques.....	69
2.1 Agonistes	69
Nociceptine	69
Ro 65-6570.....	70
AT-403	70
2.2 Antagonistes.....	70
SB612111	70
MK-801	71
3) Injections icv.....	71
3.1 Chirurgie	71
3.2 Injection	72
4) Actimètre, mesure de l'activité locomotrice	72
Principe	72
Dispositif expérimental.....	72
5) Le rotarod.....	72
Principe	72

Description du dispositif.....	72
6) Labyrinthe en croix surélevé	73
Principe.....	73
Dispositif expérimental	73
7) Test d'objet déplacé.....	73
Principe.....	73
Dispositif expérimental	74
8) Test de reconnaissance d'objet.....	75
Principe.....	75
Dispositif expérimental	75
9) Piscine de Morris	76
Principe.....	76
Dispositif expérimental	76
10) Conditionnement de peur (fear conditioning)	78
Principe.....	78
Dispositif expérimental 1	78
Dispositif expérimental 2	81
11) Mesure de l'expression de l'IEG c-Fos.....	81
Perfusion et coupe des cerveaux	81
Immunohistochimie	82
Contre coloration et déshydratation des coupes	82
Observation microscopique et quantification de c-fos	83
12) Analyses statistiques	83
Résultats	85
<u>Partie 1 : Caractérisation comportementale du vieillissement cognitif des souris Werner</u>	87
Introduction	89
Publication	93
Discussion.....	103
<u>Partie 2 : Etude des effets amnésiants des agonistes des récepteurs NOP sur la reconsolidation de la mémoire</u>	105
Introduction	107
Publication.....	111
Discussion.....	123
<u>Partie 3 : Etude des effets promnésiques de l'antagoniste des récepteurs NOP</u>	129
Introduction	131
1) La maladie d'Alzheimer.....	131
2) PTSD et extinction	133
Résultats	135
1) Effet de l'antagoniste SB612111 sur la mémoire spatiale chez les souris transgéniques Tg2576.....	135
2) Effet de l'antagoniste NOP SB612111 sur l'extinction de la mémoire aversive contextuelle.....	136
2.1 Mise en place du protocole expérimental pour étudier l'extinction	136
2.2 Etude de l'effet de l'antagoniste SB612111 sur l'extinction de la mémoire.....	138
Discussion.....	140
Discussion générale et perspectives	143

Références bibliographiques	155
Annexe	199

Liste des figures :

Introduction :

Figure 1 : Deux modèles des processus de mémoire.....	4
Figure 2 : Taxonomie de la mémoire à long terme.....	6
Figure 3 : Hippocampe humain après ablation de l'hémisphère gauche.....	7
Figure 4 : La formation hippocampique.....	8
Figure 5 : Afférences (Inputs) et efférences (Outputs) de la formation hippocampique.....	9
Figure 6 : Circuit trisynaptique de l'hippocampe de rongeur.....	10
Figure 7 : Inputs (haut) et outputs (bas) des noyaux amygdaliens.....	14
Figure 8 : Régulation de l'expression de différentes molécules dans la voie de signalisation NMDAR dépendante impliquée dans l'apprentissage et la mémoire.....	19
Figure 9 : Modèle de la fonction de Arc.....	21
Figure 10 : Transcription induite par c-fos en réponse à l'augmentation de l'AMPC ou du Ca ²⁺	23
Figure 11 : Signalisation de BDNF.....	24
Figure 12 : Processus de changement et réorganisation synaptique lors de la formation et la consolidation mnésique.....	26
Figure 13 : Décours temporel des consolidations synaptique (A) et systémique (B).....	27
Figure 14 : La consolidation systémique.....	29
Figure 15 : Les mécanismes moléculaires clés de la reconsolidation.....	34
Figure 16 : Processus de l'extinction.....	38
Figure 17 : Mécanismes cellulaires de la reconsolidation de la mémoire.....	40
Figure 18 : Modèle moléculaire du récepteur NOP lié à un antagoniste C-24.....	45
Figure 19 : Comparaison des séquences de la nociceptine et de quelques peptides opioïdes endogènes.....	46
Figure 20 : Représentation schématique de la transduction du signal du complexe nociceptine/NOP.....	47
Figure 21 : Structure chimique des agonistes du récepteur NOP.....	52
Figure 22 : Structure chimique des antagonistes du récepteur NOP.....	53
Figure 23 : Modèle schématique de la formation de la mémoire normale de peur et la mémoire de peur liée au PTSD.....	59

Matériels et méthodes :

Figure 24 : Protocole expérimental permettant d'évaluer la consolidation dans le test d'objet déplacé.....	75
Figure 25 : Protocole expérimental permettant d'évaluer la reconsolidation dans le test d'objet déplacé.....	75
Figure 26 : Protocole expérimental du test de la reconnaissance d'objet.....	76
Figure 27 : Protocole expérimental de la piscine de Morris.....	78
Figure 28 : Protocole du conditionnement au contexte et au son.....	79
Figure 29 : Protocole du conditionnement au contexte.....	80

Résultats

Partie 1 : Caractérisation comportementale du vieillissement cognitif des souris Werner

Figure 30 : Sénescence répllicative prématurée dans les fibroblastes WS.....	90
--	----

Partie 2 : Etude des effets amnésiants des agonistes des récepteurs NOP sur la reconsolidation de la mémoire

Figure 31 : Modèle des principales structures impliquées dans le conditionnement aversif.....	108
---	-----

Figure 32 : Déroulement de l'expérience de l'étude de la reconsolidation dans le test d'objet déplacé	125
Figure 33 : Effet de Ro65-6570 sur la reconsolidation de la mémoire dans le test d'objet déplacé	126

Partie 3 : Etude des effets promnésiques de l'antagoniste des récepteurs NOP

Figure 34 : Effet de l'antagoniste NOP SB612111 sur la mémoire spatiale dans le test de la localisation d'objet.....	136
Figure 35 : Mise au point du protocole d'extinction	137
Figure 36 : Effet de l'antagoniste NOP SB612111 sur l'extinction de la mémoire aversive .	139

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Liste des expériences ayant utilisé les inhibiteurs de la synthèse protéique (PSIs)	32
Tableau 2 : Similarités entre la consolidation et la reconsolidation	35
Tableau 3 : Différences entre la consolidation et la reconsolidation.....	36
Tableau 4 : Données de la littérature illustrant les problèmes comportementaux et cognitifs liés au vieillissement chez la souris	57

Liste des abréviations :

AC : Adénylate cyclase

ACh : Acétylcholine

Akt : Protéine kinase B

AMPA : acide -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

AP1 : Activator protein-1

Arc : Activity-regulated cytoskeleton-associated

ATV : Aire tegmentale ventrale

B : Noyau basal de l'amygdale

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

BLA : Noyau basolatéral de l'amygdale

BNST : Noyau du lit de la strie terminale

CA1 : Corne d'ammon 1

CA2 : Corne d'ammon 2

CA3 : Corne d'ammon 3

CA4 : Corne d'ammon 4

CaMKII : Kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante II

CAZ : Cytomatrice de la zone active

CE : Noyau central de l'amygdale

CeA : Noyau central de l'amygdale

C/EBP : Enhancer-binding protein- β

CHO : Chinese hamster ovary

CREB : c-AMP Response Element-binding

CRH : Hormone corticotrope

CS : Stimulus conditionné

DA : Dopamine

DG : Gyrus denté

DV : Docked vesicle

Egr-1 : Early growth response protein 1

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

GABA : Acide γ -aminobutyrique

Glu : Glutamate

GR : Récepteurs aux glucocorticoïdes

HC-3 : Hemicholinium-3

HPC : Hippocampe

ICT : Cellules intercalées

ICV : Intracérébroventriculaire

i.p. : Intrapéritonéale

IP3 : Inositol triphosphate

IRM : Imagerie par résonance magnétique

JunB : c-Jun N-terminal kinase

Krox-24 : Autre nom de Zif268

LA : Noyau latéral de l'amygdale

LC : Locus coeruleus

LDCV : Large dense core vesicle

LTD : Dépression à long terme

LTP : Potentialisation à long terme

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MR : Récepteurs aux minéralocorticoïdes

NA : Noradrénaline

NBM : Noyau basal de Meynert

NE : Norepinephrine, noradrénaline

NGF1-A : Autre nom de Zif268

NF-KB : Nuclear factor-kappa B

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NMDAR : N-methyl-D-aspartate receptor

N/OFQ : Nociceptine/Orphanine FQ

NOP : Nociceptin opioid receptor

NSM : Noyau septal median

ODNs : Oligodesoxynucléotides

OFQ : Orphanine FQ
OMS : Organisation mondiale de la Santé
ORL1 : Opioid receptor-like 1
PAG : Substance grise périaqueducule
PI3K: Phosphatidylinositol-3-OH kinase
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PP1 : Protein phosphatase 1
ppN/OFQ : Prépro-orphanine FQ
PSD : Protéines de densité postsynaptique
PSD95 : Postsynaptic density protein 95
PSIs : Inhibiteurs de la synthèse protéique
PTSD : Post-traumatic stress disorder
RSK : Protéine ribosomale kinase
SV : Vésicule synaptique
tPA : Tissue plasminogen activator
TrkB : Tropomyosin receptor kinase B
US : Stimulus inconditionné
WRN : Werner
Zif268 : Zinc finger protein 268
5 HT : 5-hydroxytryptamine, sérotonine

Introduction générale

A) La mémoire :

1) Définition et étapes de la mémoire :

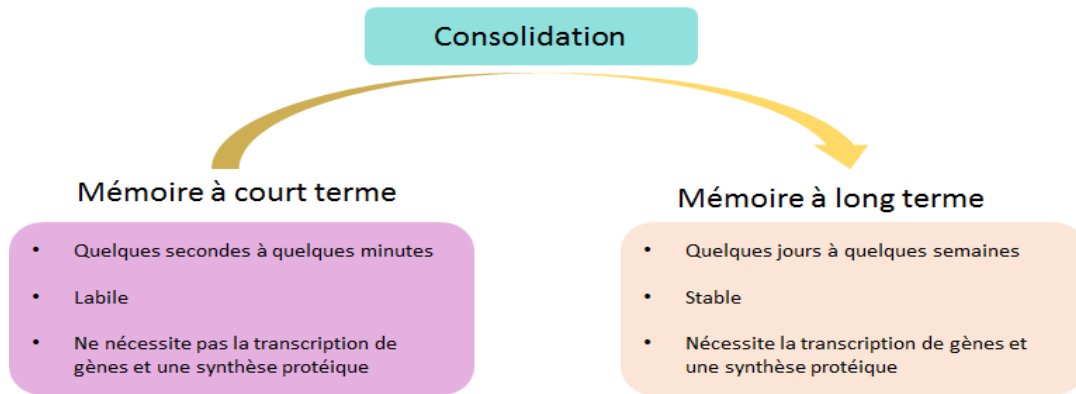
La mémoire peut être définie comme une **activité cérébrale biologique et psychique qui permet d'emmagasiner, de conserver et de restituer des informations. Les souvenirs sont une partie fondamentale de notre identité qui guide notre comportement à chaque instant** en nous rappelant nos actions passées et leurs résultats (Stern and Alberini, 2013). La mémoire permet de gérer de multiples problèmes du vivant liés à des changements environnementaux rapides, de prédire des événements ou des comportements, de reconnaître des individus ou des situations. La mémoire induit donc une modification consciente ou inconsciente des comportements que l'on peut attribuer à des expériences passées.

La mémoire ne constitue pas une entité unique mais est composée d'un ensemble de sous-systèmes de mémoire (Squire and Dede, 2015). Une première distinction peut être faite en fonction du temps de conservation du souvenir : la mémoire à court terme (secondes, minutes, heures), la mémoire à long terme (jours, semaines) et la mémoire ancienne (mois, années). La mémoire à court terme est plus couramment appelée mémoire de travail dans laquelle l'information est encodée de façon non permanente pendant quelques minutes, comme par exemple lorsqu'on mémorise un numéro de téléphone avant de le noter. Lorsque l'information est consolidée à long terme, la trace mnésique passe dans un état plus stable.

La formation de la mémoire à long terme a donc lieu en plusieurs étapes incluant acquisition/codage, mémoire à court terme, mémoire à long terme/consolidation et rappel/reconsolidation. **L'acquisition ou codage** est l'étape initiale de la formation de la mémoire au cours de laquelle l'individu enregistre de nouveaux éléments. Ces éléments nouveaux peuvent être gardés à l'esprit pendant une période de temps relativement courte de l'ordre de la seconde à quelques minutes, on parle alors de **mémoire à court terme**. Ce type de mémoire ne nécessite pas de synthèse protéique. Les nouvelles informations acquises peuvent être transformées en **mémoire à long terme** via le processus de **consolidation** et peuvent alors être stockées pendant des jours, des semaines, des mois, des années et même durant toute la vie (McGaugh, 2000). Ce mécanisme de consolidation permet la transition de la mémoire de l'état **labile** à l'état **stable** résistant à la perturbation. La récupération de cette mémoire qui est devenue résistante nécessite un processus dit de **rappel** au cours duquel le souvenir devient de nouveau temporairement labile, et doit subir un processus de ré-

établissement pour redevenir stable. Ce phénomène est connu sous le nom de **reconsolidation** (Nader, 2003) (Figure 1).

a)



b)

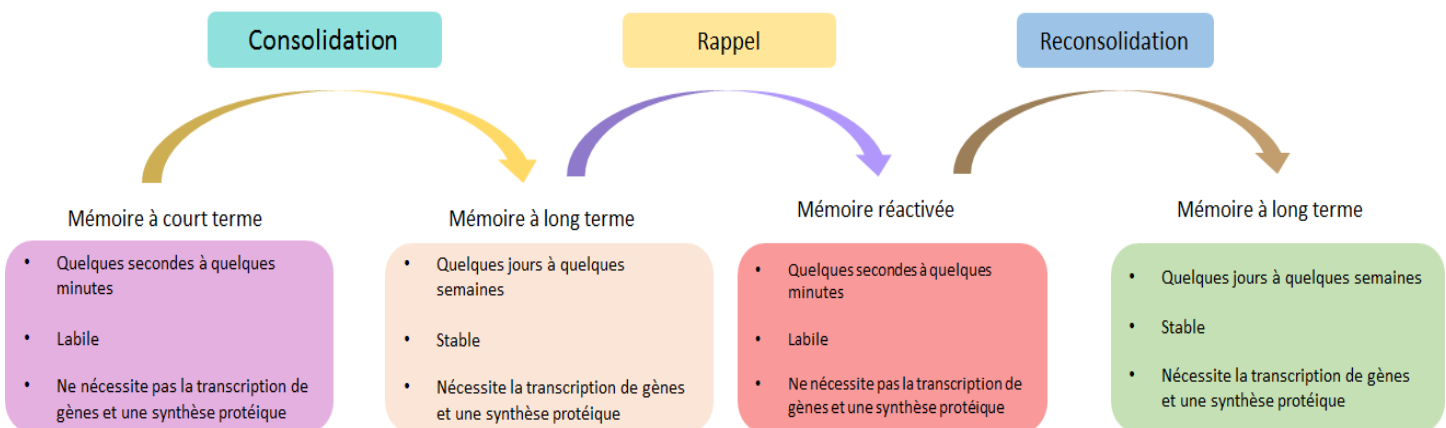


Figure 1 : Deux modèles des processus de mémoire : a) La théorie traditionnelle de la consolidation. b) Processus de reconsolidation (D'après (Nader, 2003))

2) Différents types de mémoire :

Étant donné la grande variété des tâches d'apprentissage et de mémoire explorées dans plusieurs études et le nombre de structures cérébrales différentes impliquées, et sur la base de nombreuses observations chez l'Homme et chez l'animal, Squire a proposé un modèle dichotomique qui est largement utilisé comme référence en Neurosciences (Squire, 1992, 2004). Dans cette classification, la mémoire à long terme est divisée en deux systèmes majeurs : la mémoire déclarative ou explicite et la mémoire non-déclarative ou implicite (Figure 2).

2.1. La mémoire explicite ou déclarative :

Ce type de mémoire permet le rappel conscient ou explicite d'évènements personnels et de faits (mémoire épisodique) ou de connaissances générales (mémoire sémantique).

- La mémoire épisodique : concerne la rétention des évènements autobiographiques récents ou anciens. C'est la mémoire de la vie, centrée sur la personne elle-même qui permet de voyager dans le temps, c'est-à-dire de revivre de manière consciente des expériences passées personnelles (Tulving, 1983) caractérisées par un contexte spatio-temporel. C'est le système qui se rapproche le plus de la définition populaire de la mémoire puisqu'il permet de se rappeler de l'évènement en lui-même, où et quand il a eu lieu (Tulving, 2001).
- La mémoire sémantique : consiste en l'ensemble des connaissances sur le monde, incluant le langage et les caractéristiques associatives fonctionnelles des mots et des concepts. C'est la mémoire du savoir acquis non pas par l'expérience mais par l'étude intellectuelle en dehors du contexte spatio-temporel. Ce système mnésique peut acquérir un très grand nombre d'informations et les manipuler d'une façon flexible sans que l'objet de la pensée soit nécessairement présent et sans le sentiment de revivre à nouveau l'expérience (Tulving, 2002). La mémoire déclarative dépend essentiellement de l'intégrité de la formation hippocampique.

2.2. La mémoire implicite ou non déclarative :

Cette mémoire est composée de plusieurs sous-systèmes de mémoire indépendants les uns des autres.

- La mémoire procédurale : permet l'apprentissage moteur, l'acquisition d'habiletés motrices et le savoir-faire et sous-tend les gestes habituels (Squire, 1992, 2004). L'apprentissage d'habitude désigne l'acquisition graduelle d'habiletés par la pratique, c'est à dire par l'exposition répétée à un stimulus ou à une activité spécifique. Il s'agit de liaisons automatiques qui s'établissent entre un stimulus et une réponse. Une fois acquises et stockées par la mémoire procédurale, ces habiletés peuvent être rappelées sans faire nécessairement référence aux expériences passées. C'est grâce à cette mémoire que l'on peut se souvenir comment exécuter une séquence de gestes.
- L'amorçage perceptuel (facilitation du traitement d'une information familière) : implique la récupération non consciente de l'information de la part du sujet. Il s'agit de l'influence de la présentation préalable d'un stimulus (l'amorce) sur le traitement d'un stimulus consécutif (la cible).

- Le conditionnement classique : est un modèle de type « stimulus-réponse ». Selon cette approche, le comportement de l'individu est une réponse, une réaction à un stimulus que lui envoie l'environnement.
- Le conditionnement opérant : dans ce cas le stimulus ne cause pas le comportement. C'est l'organisme qui fait une action qui déclenche un changement dans l'environnement. Ce changement a pour l'organisme un effet soit récompensant soit punitif.

Nous qualifions souvent ces systèmes d'implicite car le rappel d'informations mises en mémoire ne se fait pas de façon consciente. Ces diverses capacités mnésiques ont en commun le fait que leurs substrats neurobiologiques respectifs ne semblent pas strictement dépendre de l'hippocampe.

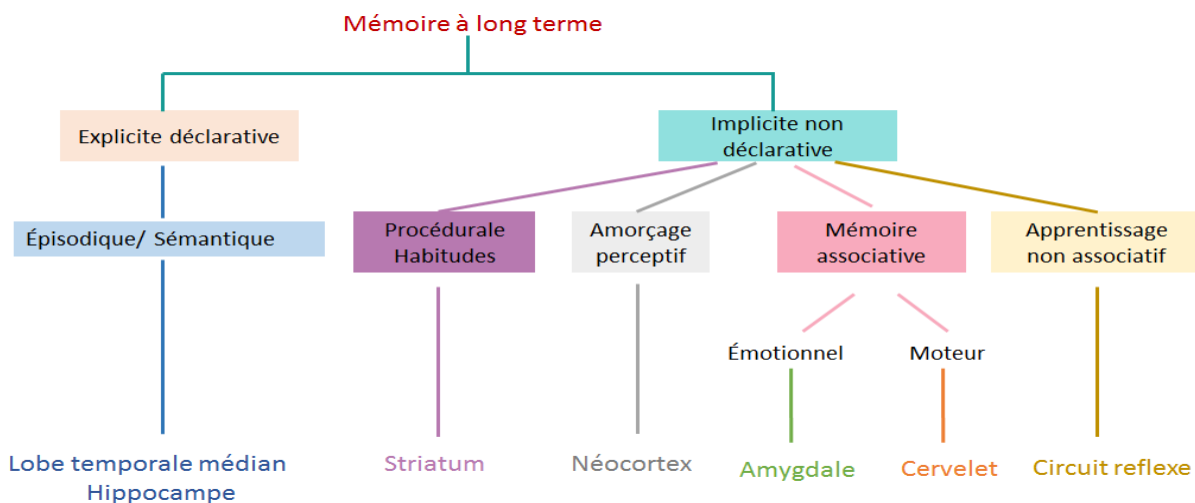


Figure 2 : Taxonomie de la mémoire à long terme : la mémoire à long terme est divisée en deux types de mémoire. La première est la mémoire déclarative, caractérisée par la capacité d'un souvenir conscient. L'autre est la mémoire non déclarative, qui comprend les apprentissages et les habiletés inconscients. D'après Squire 1994.

3) Supports anatomiques de la mémoire :

La formation de la mémoire est un processus complexe qui implique plusieurs régions du cerveau (Figure 2). Selon le type de mémoire étudié, les régions impliquées ne sont pas les mêmes. Au cours de notre étude nous nous sommes intéressés à des formes de mémoire qui dépendent principalement de l'hippocampe et de l'amygdale.

3.1. La formation hippocampique :

Chez les mammifères, la formation hippocampique regroupe un ensemble de structures télencéphaliques de l'archéo-cortex, qui s'est replié et enfoui sous le lobe temporal (Amaral and Witter, 1989). Elle est symétrique et va de la partie haute et interne du lobe temporal et s'enroule en avant et en arrière jusqu'à la partie postérieure et ventrale du corps calleux chez l'Homme (Figure 3). L'hippocampe tient son nom de sa forme enroulée qui rappelle celle de l'animal marin (Giulio Aranzi, 1564). La face dorsale de l'hippocampe est attachée à un ruban épais de fibre dit la fimbria de l'hippocampe qui forme le fornix et se termine au niveau du corps mamillaire (Figure 3). L'hippocampe est connecté à l'amygdale, au septum et au thalamus constituant le système limbique impliqué dans l'apprentissage et les émotions.

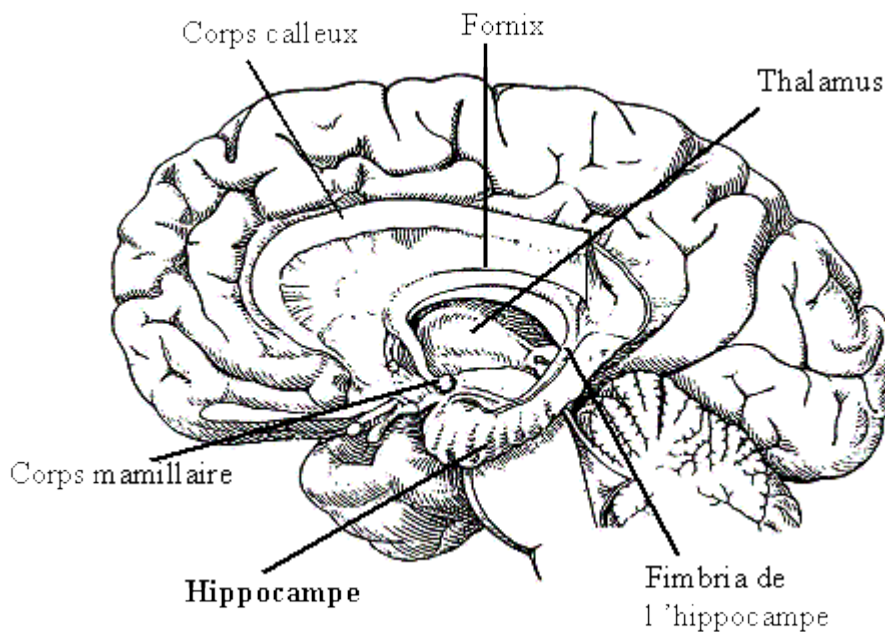


Figure 3 : Hippocampe humain après ablation de l'hémisphère gauche

Chez le rongeur, l'hippocampe est en position dorsale et médiane dans sa partie antérieure et devient plus latéral dans sa partie postérieure. Nous distinguons généralement trois parties : le gyrus denté, l'hippocampe proprement dit ou corne d'Ammon et le subiculum. L'hippocampe est associé au subiculum d'une part et au gyrus denté d'autre part qui constituent deux ensembles cellulaires distincts, en forme de « C » qui s'interpénètrent. L'organisation de l'hippocampe est complexe car il est constitué de sept couches distinctes (Amaral and Witter, 1989). La distinction est basée sur la présence ou non des corps cellulaires pyramidaux, des axones ou des dendrites de ces cellules. Le gyrus denté est subdivisé en trois couches (structure

allocorticale) : la couche moléculaire principalement dendritique, la couche granulaire qui contient le soma des cellules granulaires et la couche polymorphocellulaire ou hilus contenant plusieurs types neuronaux dont les cellules moussues et les interneurons inhibiteurs. La corne d'Ammon, elle est subdivisée en quatre couches : l'oriens, la couche pyramidale, le radiatum et la couche lacunosum/moléculaire. L'hippocampe est subdivisé en quatre régions selon des critères morphologiques : CA4, qui pénètre dans le hilus, CA3, CA2 et CA1, prolongé par le subiculum (Figure 4) (Lorente de N 1934). Ces espaces ammoniques contiennent essentiellement des interneurons et des cellules pyramidales dont la taille diffère selon la région : les cellules de CA3 sont de grandes cellules pyramidales tandis que les cellules de CA1 sont plus petites. Le subiculum, le présubiculum et le parasubiculum, quant à eux, contiennent également une couche pyramidale. Ils constituent la principale voie de sortie de l'information traitée par la formation hippocampique.

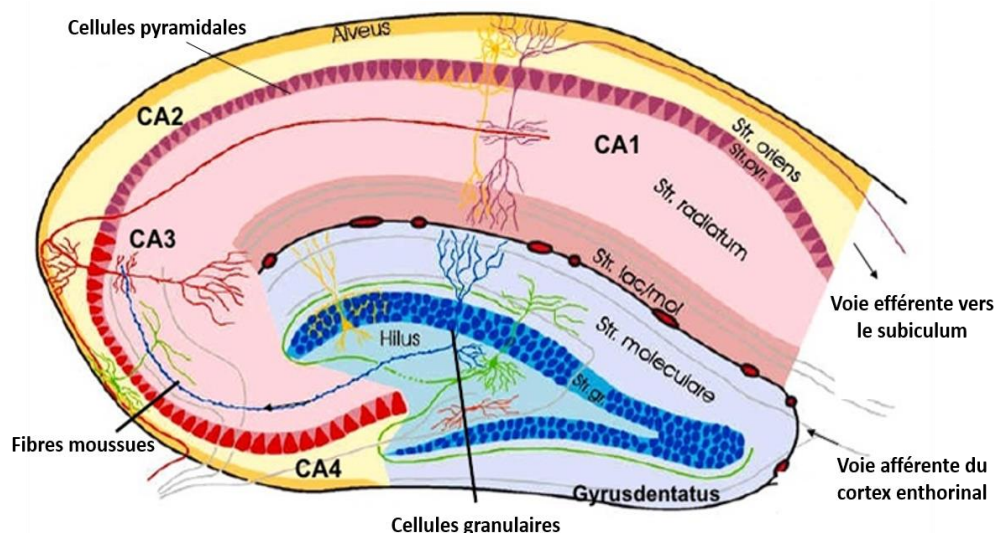


Figure 4 : La formation hippocampique (d'après uni-leipzig.de)

3.1.1 Connexions de la formation hippocampique :

3.1.1.1. Afférences :

La formation hippocampique reçoit des afférences directes principalement par trois voies : la voie entorhinale, la voie septale et la voie commissurale. Il existe également des afférences provenant du thalamus antérieur, de l'hypothalamus, du locus coeruleus, de l'aire tegmentale ventrale et du noyau du raphé.

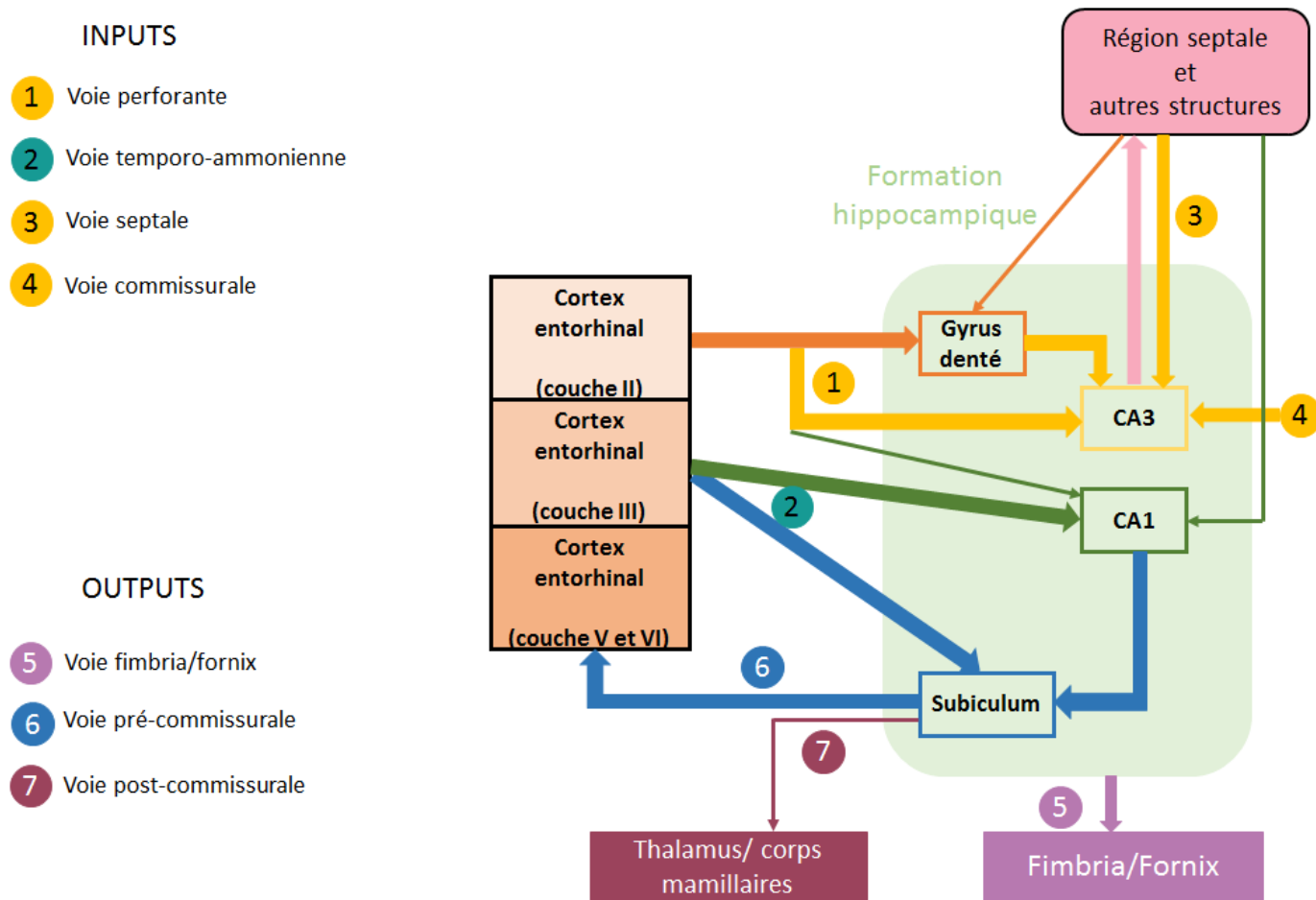


Figure 5 : Afférences (Inputs) et efférences (Outputs) de la formation hippocampique (adapté de (Myers et al., 1996))

3.1.1.2. Efférences :

Les efférences sont constituées par le fornix dorsal et par la fimbria qui convergent pour former le trigone. Au niveau de la commissure antérieure, le trigone se divise en une composante pré-commissurale et une composante post-commissurale qui passent respectivement devant et derrière la commissure antérieure. Les fibres pré-commissurales, issues de l'hippocampe et du subiculum, innervent principalement le septum et le cortex entorhinal. Les fibres post-commissurales, originaires exclusivement du subiculum, contactent principalement le thalamus et les corps mamillaires (Figure 5).

3.1.1.3. Circuit trisynaptique :

Le flux d'informations à travers l'hippocampe est unidirectionnel. Le circuit le plus simple est constitué d'une voie principale excitatrice trisynaptique mettant en jeu 4 groupes de neurones : les cellules pyramidales du cortex entorhinal envoient leurs axones, formant **la voie perforante**, vers le gyrus denté pour contacter les cellules granulaires. Les cellules granulaires,

dont les axones constituent les **fibres moussues**, font synapse sur les dendrites des neurones pyramidaux du champ CA3 qui, à leur tour, envoient des axones, appelés les **collatérales de Schaffer**, à travers le stratum pyramidale vers l'aire CA1. Ces derniers neurones envoient leurs projections hors de l'hippocampe, vers le subiculum qui contacte en retour le cortex entorhinal, formant ainsi une boucle anatomique (Figure 6) (Stepan et al., 2015).

Par ailleurs, au sein de chacune des structures hippocampiques, les connexions sont plus complexes. Il existe de nombreux interneurons locaux qui vont réguler la communication entre neurones d'une même région. D'autres possèdent des arborisations plus étendues dirigées entre régions, aussi bien transversalement que longitudinalement, qui ajoutent une troisième dimension à cette organisation (Stepan et al., 2015).

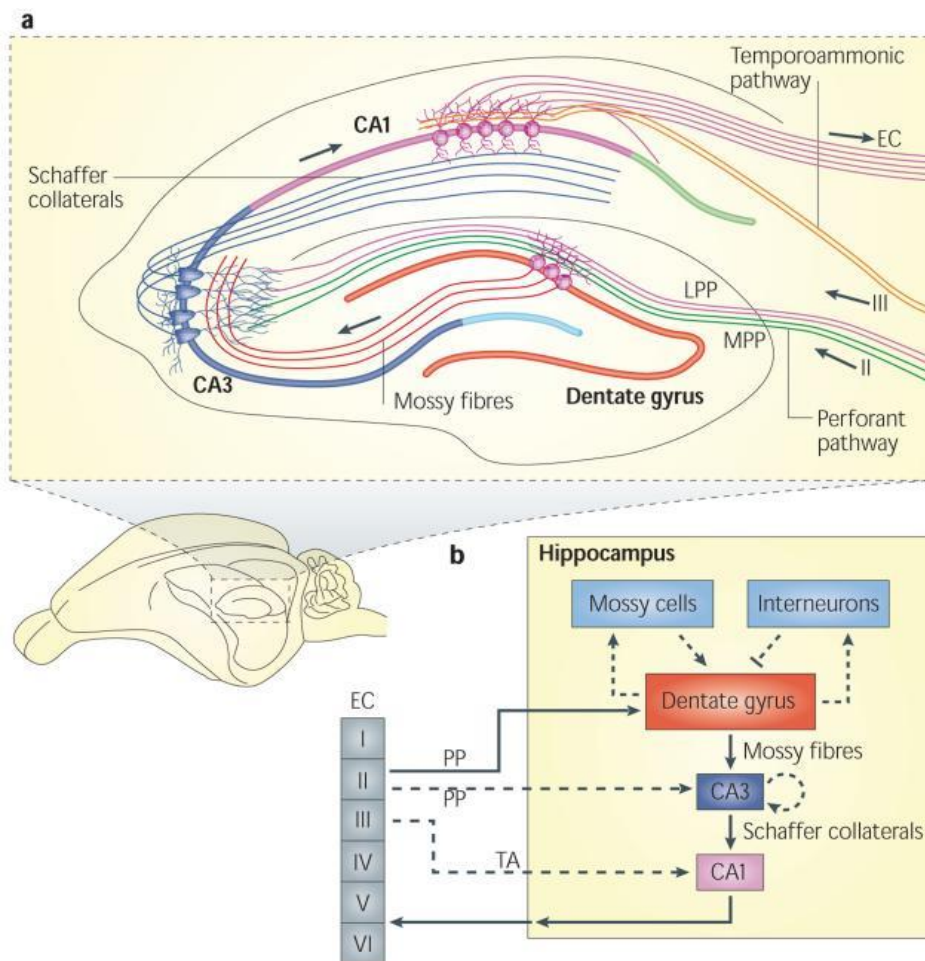


Figure 6 : Circuit trisynaptique de l'hippocampe de rongeur. EC : cortex entorhinal ; PP : voie perforante (LPP : voie perforante latérale, MPP : voie perforante médiane). TA : voie temporo-ammonique. (Deng et al., 2010)

3.1.2 Hippocampe dorsal et hippocampe ventral :

L'hippocampe n'est pas une structure unitaire et possède des fonctions distinctes tout le long de son axe longitudinal (Moser and Moser, 1998). Chez le rongeur il s'agit d'un axe dorso-ventral et chez l'homme d'un axe postéro-antérieur. Suivant des critères anatomiques (Pitkanen et al., 2000), physiologiques (Segal et al., 2010) et génétiques (Dong et al., 2009, Fanselow and Dong, 2010), nous distinguons deux régions de l'hippocampe ; l'hippocampe dorsal et hippocampe ventral.

Les deux composantes présentent des connexions différentes avec les autres régions du cerveau notamment avec l'amygdale. En effet, l'hippocampe dorsal reçoit une afférence mineure de l'amygdale contrairement à l'hippocampe ventral qui reçoit une afférence majeure avec de nombreuses projections en provenance des noyaux amygdaliens. De plus, seul l'hippocampe ventral émet des projections vers l'amygdale à partir de la région de CA1 et du subiculum (Pitkanen et al., 2000).

D'autre part les afférences sensorielles se répartissent différemment dans les deux régions. En effet, l'hippocampe dorsal reçoit majoritairement les projections acheminant les informations visio-spatiales en provenance des cortex sensoriels primaires via les cortex associatifs et les cortex entorhinal et périrhinal (Amaral and Witter, 1989). En ce qui concerne les autres voies sensorielles, celles-ci sont réparties sur l'ensemble de l'hippocampe (Bannerman et al., 2004). Les projections provenant du CA1 ventral se terminent dans le cortex visuel, auditif, somatosensoriel, gustatif, olfactif et viscéral. Les projections en provenance du CA1 dorsal se terminent dans le cortex rétrosplénial (Cenquizca and Swanson, 2007).

3.1.3 Rôle de l'hippocampe dans la formation de la mémoire :

Les études chez l'Homme et les primates ont montré le rôle crucial de l'hippocampe dans la formation de plusieurs types de mémoire. Cette structure est engagée dans différents stades de la mémoire ; l'encodage, la consolidation et le rappel (Daumas et al., 2005). Chez l'animal, des études lésionnelles de l'hippocampe ont montré l'implication de la structure dans la formation de la mémoire à long terme (Kim et al., 1992, Anagnostaras et al., 1999, Daumas et al., 2005). Comme nous l'avons décrit, l'hippocampe se décompose en hippocampe dorsal et hippocampe ventral avec pour chacune de ces sous-régions sa propre fonction. L'hippocampe dorsal est fortement impliqué dans l'apprentissage spatial (Moser et al., 1993, Moser et al., 1995, Daumas et al., 2005) car il reçoit les entrées visuo-spatiales via le cortex temporal et pariétal, tandis que l'hippocampe ventral qui est connecté à l'hypothalamus et à l'amygdale est

impliqué dans les émotions (Kjelstrup et al., 2002). L'inactivation des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal empêche l'acquisition et la consolidation de la mémoire contextuelle aversive (Daumas et al., 2005). Dans ce même contexte des études plus précises ont montré le rôle des fibres de moussues de l'hippocampe dans la formation de la mémoire contextuelle aversive par des expériences d'infusion d'un chélateur du zinc co-libéré avec le glutamate par ces neurones (Ceccom et al., 2014). L'hippocampe permet de former ce qu'on appelle une carte cognitive spatiale qui est une carte mentale de l'environnement grâce aux cellules de lieu. Ces cellules de lieu interagissent avec d'autres neurones d'autres structures afin de constituer cette carte. Des études ont montré que l'exposition des rats à un environnement familier induit l'activation de ces cellules (Bures et al., 1997).

L'hippocampe joue également un rôle dans la dépression et l'anxiété. La neurogenèse au niveau du gyrus denté ventral est un élément clé dans la régulation de l'anxiété et l'humeur (Sahay and Hen, 2007). La neurogenèse adulte est un mécanisme impliqué aussi dans la séparation de pattern et la flexibilité cognitive chez la souris, des fonctions qui sont altérées chez les patients déprimés (Kheirbek et al., 2012, Leal et al., 2014). Les patients dépressifs ont un hippocampe moins volumineux que les patients non dépressifs (Kempton et al., 2011, Miller and Hen, 2015). Cette baisse de volume est causée par la diminution de la neurogenèse adulte dans l'hippocampe des patients déprimés (Jacobs et al., 2000, Miller and Hen, 2015). Chez la souris, l'induction du stress chronique cause la dépression et l'anxiété ainsi qu'une baisse de la neurogenèse hippocampique (Miller and Hen, 2015).

3.2 L'amygdale :

3.2.1 Structure anatomique de l'amygdale :

L'amygdale ou complexe amygdalien, petite structure du système limbique, correspond à un ensemble de noyaux et sous-noyaux, qui sont typiquement différenciés sur la base de critères cytoarchitectoniques, histochimiques et selon leur connectivité (Paxinos et al., 1980, Swanson, 1992, Pitkanen et al., 2000). Elle est située sur la face médiane du lobe temporal, dans la partie antérieure de l'extrémité temporale de la corne des ventricules latéraux (Isaacson, 1974).

Le noyau latéral (LA), considéré comme la voie d'entrée sensorielle de l'amygdale, reçoit un grand nombre d'informations de toutes les modalités sensorielles (auditives, visuelles, somatosensorielles...) en provenance des cortex sensoriels primaires (lobe temporal, insulaire et pariétal) et du thalamus (Romanski et al., 1993, Duvarci and Pare, 2014). Le LA reçoit aussi

des projections venant de l'hippocampe, du cortex entorhinal et du cortex préfrontal médian (Ji and Maren, 2007, Rodrigues et al., 2009).

Le noyau basolatéral ou basal (BLA) reçoit et envoie de fortes projections vers les cortex associatifs polymodaux, l'hippocampe, le cortex entorhinal et le cortex préfrontal médian. Il projette massivement vers le striatum ventral ou noyau accumbens (McDonald, 1998, Pitkanen et al., 2000, McDonald, 2003, Felix-Ortiz et al., 2013, Wassum and Izquierdo, 2015).

L'ensemble des deux noyaux LA et BLA forme une masse tissulaire en forme d'amande d'où le nom amygdale. Ces deux noyaux groupés, appelés aussi complexe basolatéral, contiennent majoritairement des neurones de projection glutamatergiques et une minorité d'interneurones GABAergiques (Marowsky et al., 2005, Spampanato et al., 2011, Wassum and Izquierdo, 2015).

Finalement, le noyau central de l'amygdale (CeA), de forme arrondie, situé à côté du complexe basolatéral, est considéré comme voie de sortie de l'amygdale. Le CeA projette vers des régions impliquées dans différentes réponses émotionnelles telles que la substance grise périaqueducale (responsable de l'expression comportementale de peur ; « freezing » chez le rat et la souris), l'hypothalamus, le noyau moteur du nerf vague, le BNST (noyau du lit de la strie terminale, réponse d'anxiété) et le noyau ambigu (LeDoux, 1995, Maren, 2001, Pare et al., 2004, Rodrigues et al., 2004, Fanselow and Poulos, 2005, Maren, 2005, Lang and Davis, 2006, Rodrigues et al., 2009). En retour, le CeA reçoit des projections en provenance des cortex sensoriels, du BNST, de la formation hippocampique, du cortex préfrontal, d'un certain nombre de noyaux thalamiques et hypothalamiques. Il reçoit également des projections en provenance des noyaux LA et BLA (Pitkanen et al., 1997, LeDoux, 2000, Rodrigues et al., 2009). Contrairement au complexe basolatéral, CeA est majoritairement composé de neurones GABAergiques et minoritairement de neurones glutamatergiques (Lopez de Armentia and Sah, 2004, Duvarci and Pare, 2014).

En plus de ces trois composantes du complexe amygdalien, il existe les cellules intercalées (ICT) qui sont situées entre les noyaux latéral et basolatéral et le noyau central (Marowsky et al., 2005, Wassum and Izquierdo, 2015). Il s'agit d'un réseau inhibiteur puisque la majorité de ces cellules sont des neurones GABAergiques (Duvarci and Pare, 2014). Les ITC reçoivent des projections des noyaux BLA et LA (Likhtik et al., 2008, Rodrigues et al., 2009) (Figure 7).

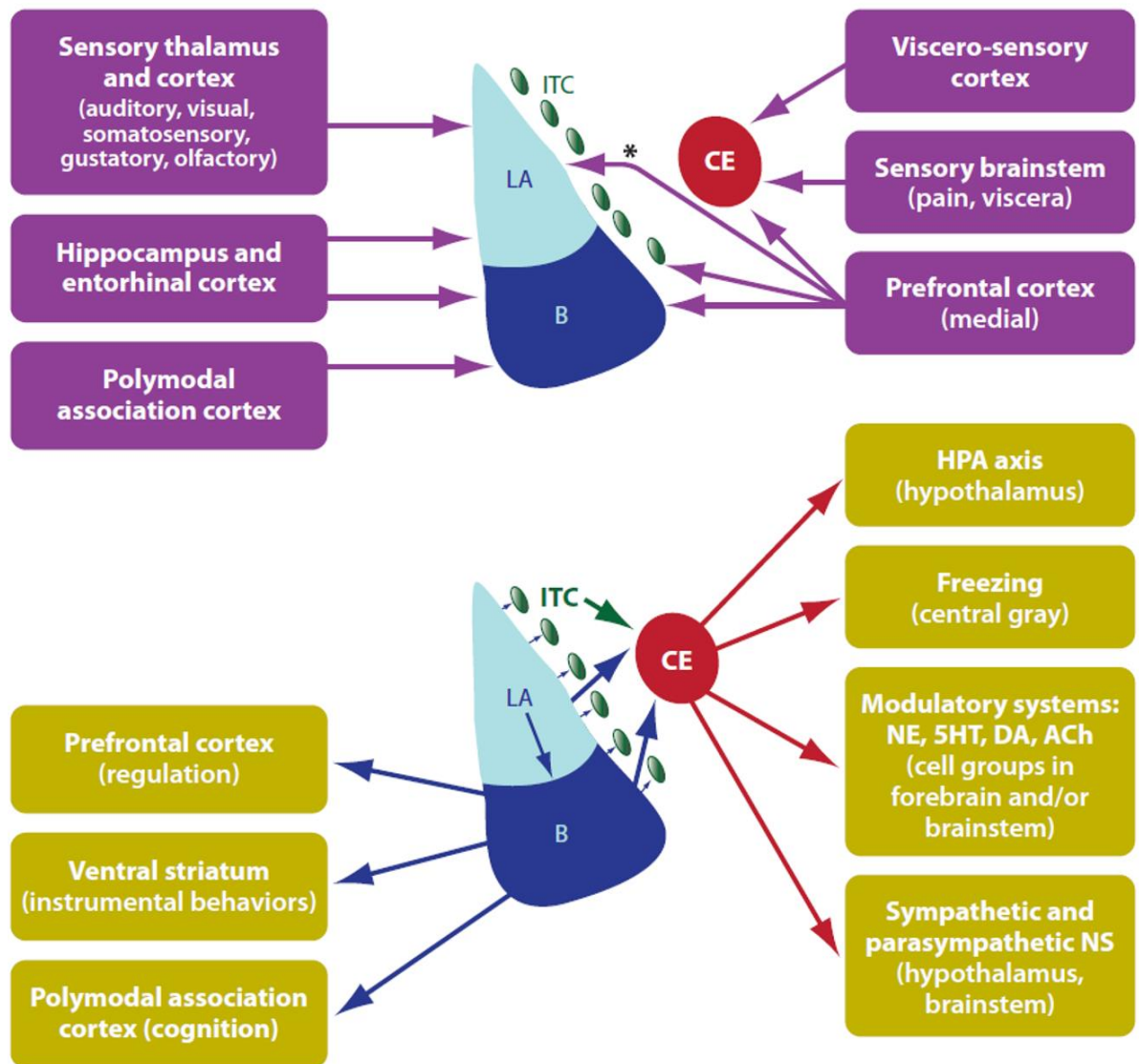


Figure 7 : Inputs (haut) et outputs (bas) des noyaux amygdaliens : 5HT, sérotonine ; ACh, acétylcholine ; B, noyau basal ; CE, noyau central ; DA, dopamine ; ITC, cellules intercalées ; LA, noyau latéral ; NE, norepinephrine ; NS, système nerveux. (D'après (Rodrigues et al., 2009))

L'amygdale suit une hiérarchie permettant la transmission de l'information entre ses différentes parties : LA, BLA, ITC, CeA. L'information est reçue par LA pour soit passer par l'ensemble des noyaux pour arriver au CeA, soit passer directement à ce noyau sans traverser les autres noyaux.

3.2.2 Rôle de l'amygdale dans la mémoire :

L'amygdale est impliquée dans la formation de la mémoire émotionnelle associative (LeDoux, 2000, Duvarci and Pare, 2014). Une série d'expériences de lésion et d'inactivation de cette région a montré le rôle crucial du noyau LA de l'amygdale comme un site indispensable de plasticité synaptique lors de l'acquisition de la mémoire Pavlovienne (Pape and Pare, 2010,

Duvarci and Pare, 2014). Le conditionnement Pavlovien permet aux animaux d'associer un stimulus spécifique dit conditionné (CS) comme par exemple un son à un stimulus aversif inconditionné (US) comme par exemple un choc électrique dans le paradigme de peur conditionnée (Maren, 2017). Le noyau latéral reçoit l'information sensorielle liée au CS (auditive, visuelle, somatosensorielle) à partir des projections provenant de plusieurs régions cérébrales particulièrement du thalamus, de l'hippocampe et du cortex (Rodrigues et al., 2009, Maren, 2017). Il y a donc une intégration de l'information du CS et de l'US au niveau du complexe amygdalien générant ainsi un conditionnement à la peur (Bocchio et al., 2017, Maren, 2017). Ceci induit un comportement défensif appelé « freezing » (immobilité totale de l'animal sauf les mouvements respiratoires). C'est au niveau du noyau latéral que se font les modifications moléculaires qui permettront la consolidation de la mémoire liée à la peur (Dudai, 2004, Rodrigues et al., 2004, Rodrigues et al., 2009). Le noyau central du complexe amygdalien contrôle l'expression de la réaction comportementale à la peur via les connexions CeA/LA (Maren, 2001, Fanselow and Poulos, 2005, Lang and Davis, 2006, Rodrigues et al., 2009).

4) Mécanismes neurobiologiques de la mémoire :

4.1 Encodage et mémoire à court terme :

Chaque information stockée dans le cerveau passe par une première étape qui est l'encodage. Cette étape correspond à l'acquisition au cours de laquelle sont traitées et codées l'ensemble des informations environnementales en provenance de nos sens : la vue, l'ouïe, le toucher, l'odorat et le goût pour créer une représentation mentale. L'encodage est déclenché au moment de la tâche. Toute mémoire nouvellement acquise est d'abord sensorielle. L'information apportée par les sens est très éphémère car elle dure de quelques centaines de millisecondes à environ deux secondes. Cette information passe en mémoire à court terme qui est très sensible aux interférences. La mémoire à court terme est facilement perturbée par différents facteurs comme le stress, la fatigue (Serences 2016).

4.2 Consolidation mnésique :

La notion de réorganisation au cours du temps des substrats neuronaux sous-tendant les processus mnésiques fut évoquée pour la première fois par le psychologue Théodule Ribot en 1881 grâce à l'étude clinique de plusieurs cas de patients amnésiques après un traumatisme cérébral. Le terme de consolidation fut quant à lui proposé pour la première fois par les psychologues Müller et Pilzecker (1900). Ils ont démontré qu'après un apprentissage verbal, la présentation de stimuli distractifs nuisait au rappel des informations récemment acquises.

Cependant, si le second apprentissage avait lieu quelques heures après le premier, ce dernier était préservé. Leurs études ont conclu qu'une trace mnésique se formait graduellement au cours du temps après l'acquisition, étape qu'ils ont appelé consolidation. Ce terme fait ainsi référence à la modification progressive d'une trace mnésique d'une forme initialement labile en une forme stable et durable.

Des études ont montré que l'utilisation des traitements affectant l'activité cérébrale post apprentissage comme l'anesthésie ou l'hypothermie (Beitel and Porter, 1968) perturbe l'activité cérébrale et prévient la consolidation. D'autres part, dans les années 1960, l'utilisation d'antibiotiques inhibant la synthèse protéique administrés avant ou immédiatement après l'apprentissage a montré un effet amnésiant sur la mémoire 24 h après mais aucun effet lorsque l'administration était plus tardive (Agranoff, 1965, Barondes and Cohen, 1967). A l'inverse, des substances psychostimulantes comme la strychnine facilitaient la consolidation mnésique (McGaugh, 1966, LaLumiere et al., 2017). Le point commun entre ces études est que les traitements promnésiques ou amnésiants perdaient leur capacité à augmenter ou réduire la mémoire lorsque le délai entre l'acquisition et l'administration était allongé, définissant ainsi un gradient temporel d'efficacité.

Dans la littérature contemporaine, le terme consolidation mnésique fait référence à deux types de processus dont les cinétiques sont fondamentalement différentes : **la consolidation synaptique ou cellulaire** qui correspond à la stabilisation des changements d'efficacité **synaptique** qui ont lieu durant les quelques heures qui suivent l'acquisition ; et **la consolidation systémique**, qui se réfère à la réorganisation progressive à travers le cerveau des circuits neuronaux sous-tendant la mémoire à long terme.

4.2.1 Consolidation synaptique ou cellulaire :

La formation d'un souvenir résulte du remodelage du réseau neuronal par la modification des connexions entre les neurones. Une fois que l'information est perçue et traitée, une activation de l'expression de certains gènes dans les neurones postsynaptiques se met en place. Cette activation est suivie par la production de protéines qui seront acheminées vers les connexions établies entre les neurones pré et postsynaptiques. Ces protéines assurent le renforcement des synapses et la formation de nouvelles synapses. Ce processus est relativement rapide, survenant dans les heures qui suivent la fin d'une séance d'acquisition. La consolidation cellulaire nécessite une phase post-acquisition au cours de laquelle l'information encodée est stabilisée et se manifeste par une résistance aux perturbations soit comportementales, pharmacologiques ou lésionnelles.

4.2.1.1 La Potentialisation à Long Terme (LTP) :

Activation des récepteurs NMDA et influx calcique (Wang and Peng, 2016) :

L'activation du neurone entraîne la libération par le neurone présynaptique du neurotransmetteur, le glutamate, dans la fente synaptique, qui va se fixer sur ses récepteurs au niveau du neurone postsynaptique. Il existe plusieurs types de récepteurs au glutamate qui interviennent dans la transmission et le renforcement synaptique notamment AMPA et NMDA. Les récepteurs AMPA sont des récepteurs ionotropes couplés à des canaux sodiques. Les récepteurs NMDA sont également des récepteurs ionotropes couplés à des canaux cationiques : avec un canal calcium qui est bloqué par des ions magnésium (Mg^{2+}) en conditions de repos. La fixation du glutamate sur les récepteurs AMPA provoque une entrée de sodium qui, si elle se répète plusieurs fois, peut induire une dépolarisation qui va permettre l'expulsion des ions Mg^{2+} des récepteurs NMDA et les rendre activables par la liaison du glutamate. Après libération par les boutons présynaptiques, les molécules de glutamate sont recaptées par ces boutons pour être réutilisées afin d'assurer une nouvelle transmission synaptique. La répétition d'une intense activation présynaptique induit une augmentation d'amplitude de la réponse postsynaptique. Ce processus est nommé **Potentialisation à Long Terme (LTP)**. Il se divise en deux phases. Une phase réversible, dite early-LTP, qui est basée sur des phénomènes de phosphorylation et une phase dite late-LTP qui implique des réorganisations durables basées sur des changements d'expression génique et de synthèse protéique. C'est cette dernière phase qui sous-tend la consolidation synaptique (Clopath, 2012). Cette potentialisation agit sur les deux niveaux pré- et postsynaptique pour renforcer la synapse. La LTP dépend de l'entrée des ions calcium par les récepteurs NMDA. D'autre part, les récepteurs métabotropiques au glutamate sont également activés. Cette activation provoquera la libération de Ca^{2+} intracellulaire par action sur des récepteurs à l'IP3 du réticulum endoplasmique. Cette augmentation du Ca^{2+} postsynaptique contribue au réarrangement des protéines de « scaffolding » cellulaire, à l'augmentation de l'aire post synaptique et à la diminution de la résistance durant la transmission synaptique. La liaison du Ca^{2+} à des protéines et à des enzymes intracellulaires induit plusieurs modifications dont leur changement conformationnel (Figure 8). Notamment, 4 molécules de calcium vont se fixer à la calmoduline ce qui permet l'activation de cette dernière.

Autophosphorylation de CaMKII :

La fixation du complexe Ca^{2+} -Calmoduline sur la protéine kinase II calmoduline-dépendante va induire son activation par autophosphorylation (Wang and Peng, 2016). La CaM kinase II activée va phosphoryler les récepteurs NMDA de la synapse activée ce qui diminue la force du blocage du canal calcique par les ions Mg^{2+} , et entraîne donc une meilleure conductance au Ca^{2+} . Dans le maintien de la LTP, CaMK II se lie à un certain nombre de protéines de la densité post-synaptiques comme actinine, PSD 95, des molécules d'adhésion synaptique, suggérant le rôle important de la CaMK II dans la plasticité structurale de la synapse (Lynch, 2004, Wang and Peng, 2016).

La production d'AMPC et l'activation de PKA et MAPK :

L'activation de l'adénylate cyclase, notamment par le complexe Ca^{2+} -calmoduline, induit la production d'AMPC qui va se fixer sur une Protéine Kinase A. Cette dernière est activée après fixation de deux molécules d'AMPC. Au niveau cytoplasmique, l'activation de PKA provoquera la phosphorylation des protéines comme les récepteurs AMPA de la synapse. Ceci induit un changement de ces récepteurs pour qu'ils s'ouvrent plus rapidement lors d'une prochaine fixation du glutamate et une meilleure conductance des ions sodiques. De plus l'activation de la PKA inhibe la protéine phosphatase 1 (PP1) facilitant l'induction de la LTP et renforçant la mémoire et l'apprentissage puisque l'inhibition de PP1 augmente le potentiel postsynaptique NMDAR dépendant (Skeberdis et al., 2006, Yang et al., 2009, Wang and Peng, 2016). Des études ont montré que l'induction de la LTP peut être inhibée par l'inhibition de la PKA suggérant le rôle clé de cette kinase dans le processus de LTP (Yasuda et al., 2003, Wang and Peng, 2016). Une fois activée, la PKA va pouvoir entrer dans le noyau des neurones et, directement ou indirectement, va activer des facteurs de transcription tels que CREB. Ceux-ci vont alors se fixer sur des sites spécifiques sur l'ADN (sites CRE et SRE), situés au niveau de promoteurs de gènes comme le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) et le tPA (tissue-type plasminogen activator), déclenchant ainsi leur expression. Ces gènes spécifiques induits durant la LTP codent pour des protéines de plasticité qui sont indispensables pour la LTP et la formation de la mémoire (Gooney and Lynch, 2001, Yin et al., 2002, Wang and Peng, 2016). Un sous-ensemble de gènes induits par les stimuli de la plasticité, connus sous le nom de « gènes précoces », est impliqué dans le processus de la LTP en raison de leur rapidité et de leur réactivité à l'activation synaptique. Certains de ces gènes codent pour des protéines qui agissent directement au niveau de la synapse, comme des protéines de régulation de récepteurs ou des facteurs de croissance. Parmi ces gènes nous pouvons citer zif286, Arc et c-Fos, qui sont

régulés après une activation synaptique (Wang and Peng, 2016). D'autre part la PKA phosphoryle les MAP kinases dont il existe plusieurs sous-types dont les extracellular signal-regulated protein kinases (ERK), la p38 MAPK et la c-jun N-terminal kinase. Ces voies de signalisation transmettent et amplifient le signal des récepteurs membranaires jusqu'au noyau. L'activation de MAPK joue un rôle crucial, notamment via CREB, dans la modification des connexions interneuronales dans le cerveau (Jin et al., 2013, Wang and Peng, 2016).

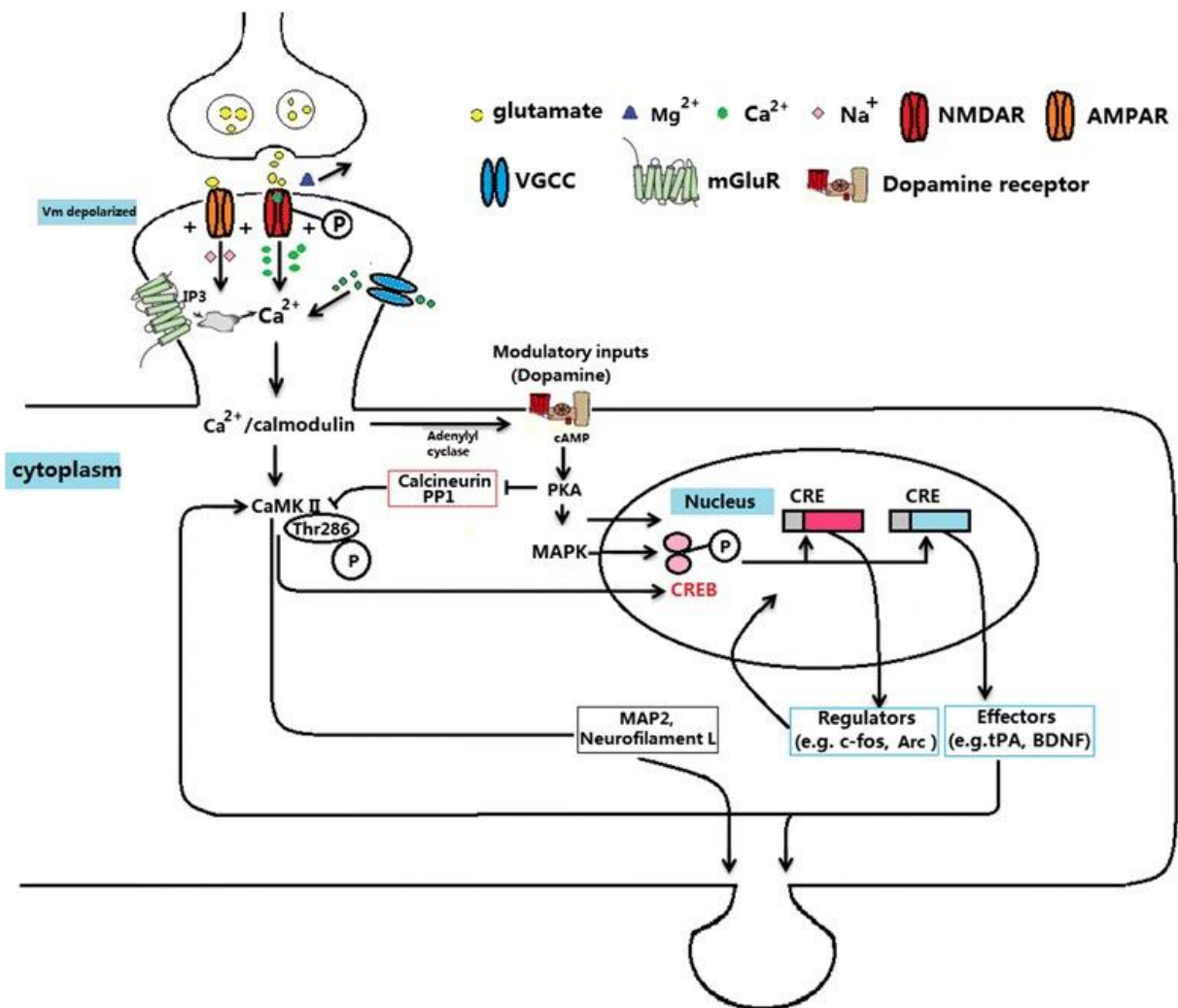


Figure 8 : Régulation de l'expression de différentes molécules dans la voie de signalisation NMDAR dépendante impliquée dans l'apprentissage et la mémoire : la libération de glutamate pré-synaptique active les récepteurs NMDAR post-synaptique, induisant l'exclusion des ions Mg^{2+} et l'entrée du Ca^{2+} . Le calcium se lie à la calmoduline pour activer PKA et CaMKII. La MAPK activée notamment par PKA est transportée dans le noyau pour co-activer CREB induisant l'expression de certains gènes comme tPA et BDNF, d'après (Wang and Peng, 2016).

Expression des gènes précoces :

Les gènes précoces immédiats sont des gènes activés dans des régions spécifiques du cerveau durant une activité neuronale associée à un test comportemental (Minatohara et al., 2015). Les gènes précoces les mieux caractérisés sont c-fos, zif268 et Arc (Wang and Peng, 2016). Les produits de ces gènes, tant ribonucléiques que protéiques, sont utilisés comme marqueurs de l'activation neuronale afin d'établir, avec une résolution au niveau cellulaire, une cartographie de l'activité et de la plasticité de différentes régions cérébrales suite à différentes tâches comportementales.

- **Arc :**

Arc pour **activity-regulated cytoskeleton-associated** a été identifié comme un élément indispensable de multiples formes de plasticité dépendante de la synthèse des protéines, y compris la potentialisation à long terme. Le gène précoce Arc est nécessaire pour la formation de la mémoire à long terme mais pas pour l'apprentissage ou la formation de la mémoire à court terme (Plath et al., 2006). Il s'agit donc plus d'un marqueur de plasticité que d'activité proprement dite. Les souris Arc knockout montrent un défaut de consolidation des mémoires spatiale et de peur (Plath et al., 2006, Peebles et al., 2010, Minatohara et al., 2015). De plus, l'inhibition transitoire de l'expression de Arc après infusion d'oligodesoxynucléotides (ODNs) antisens de Arc au niveau de l'hippocampe, l'amygdale latérale et le cortex cingulaire antérieur inhibe la consolidation de la mémoire (Guzowski et al., 2000, Ploski et al., 2008, Holloway and McIntyre, 2011, Nakayama et al., 2015). Ce déficit de consolidation de mémoire n'a lieu que quand les ODNs sont infusés immédiatement après l'acquisition, suggérant que l'induction de l'expression de Arc après l'acquisition est nécessaire pour la consolidation de la mémoire à long terme (Minatohara et al., 2015).

Une caractéristique unique de Arc est que son ARNm et sa protéine peuvent être ciblés sur les compartiments dendritiques des neurones (Figure 9). Suite à l'activité neuronale induite par le comportement, l'ARNm de Arc est exprimé dans le noyau puis transporté dans le cytoplasme jusqu'aux dendrites (Wallace et al., 1998, Guzowski et al., 1999). La localisation de l'ARNm de Arc ainsi que sa protéine est également régulée par l'activité synaptique. Ces deux éléments s'accumulent dans les dendrites activées par des stimuli à haute fréquence (Steward et al., 1998, Moga et al., 2004). Arc fonctionne par interaction avec d'autres protéines post synaptiques. Arc interagit avec l'endophiline et la dynamine pour former des complexes d'endocytose afin de faciliter le trafic post-synaptique des récepteurs AMPA. La surexpression de Arc ou la perte de sa fonction induit respectivement une augmentation ou une diminution

d'expression des récepteurs AMPA à la surface des synapses (Chowdhury et al., 2006). Par ailleurs cette régulation de l'expression des récepteurs AMPA par Arc disparaît quand l'interaction de cette dernière avec l'endophiline/dynamine est perdue (Chowdhury et al., 2006, Verde et al., 2006).

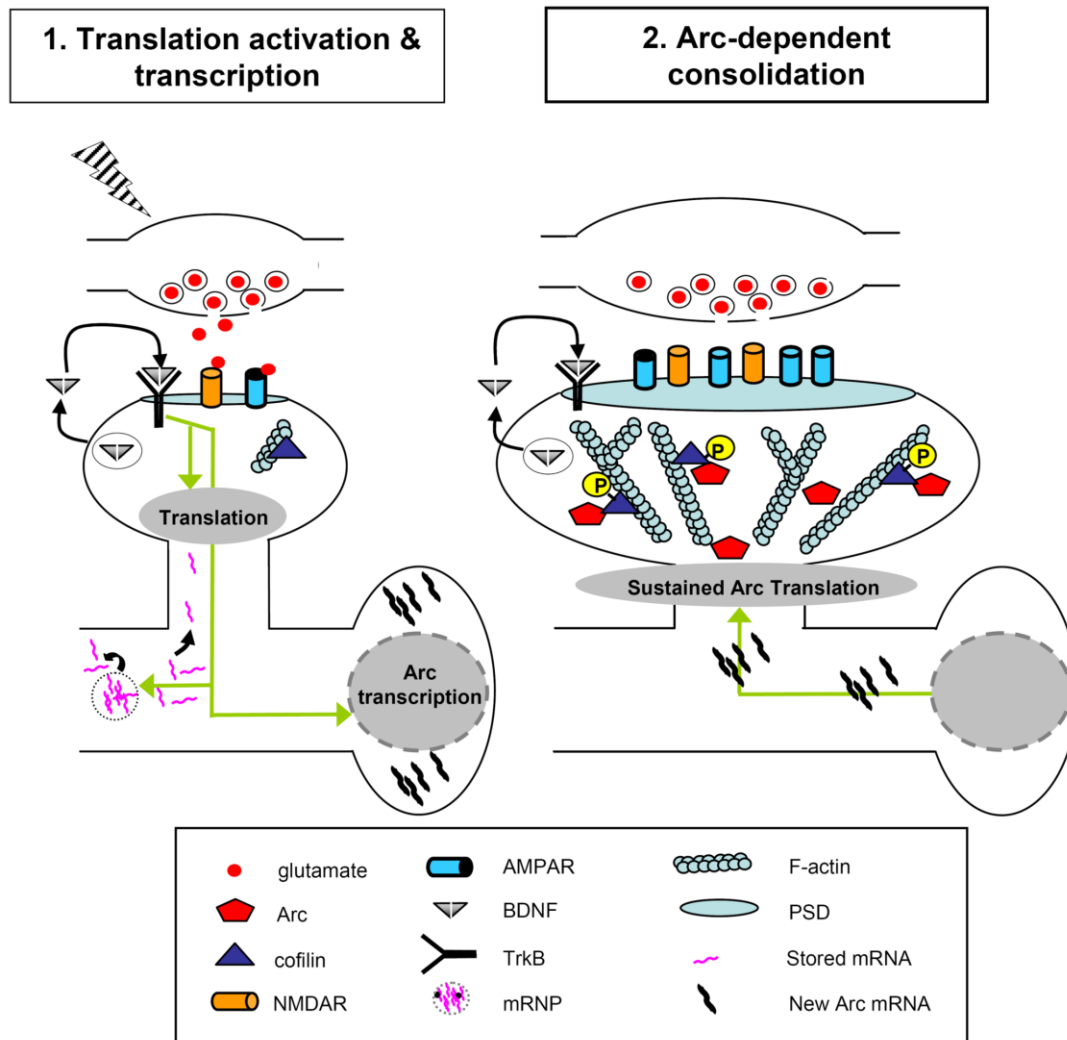


Figure 9 : Modèle de la fonction de Arc : la stimulation à haute fréquence active les récepteurs NMDAR post-synaptiques ainsi que les récepteurs TrkB au BDNF induisant ainsi la transcription de Arc. L'ARNm de Arc est transporté vers les dendrites et les épines activées en association avec la cofiline. (Bramham et al., 2008).

- **Zif268**

Le gène *zif268* (zinc finger binding protein 268), connu aussi sous le nom de *Egr-1*, *Krox-24*, *NGF1-A*, *TIS8* et *Zenk*, fait partie de la famille des *Egr* (Early growth response) (Lemaire et al., 1990). Suite à la transcription du gène *zif268*, l'ARNm est transporté vers le cytoplasme où il est traduit en protéine. La protéine *zif268* retourne alors dans le noyau où elle agit comme facteur de transcription en entraînant l'expression de gènes cibles.

En condition basale dans le cerveau adulte, l'ARNm et la protéine du gène zif268 sont exprimés dans plusieurs régions cérébrales : les couches IV et VI du cortex cérébral, dans le noyau accumbens, l'hippocampe, l'amygdale, les cortex visuel, olfactif et enthorhinal.

L'expression de Zif268 est modifiée par des stimulations physiologiques comme des changements de l'environnement ou l'exploration d'un nouvel objet (Mohammed et al., 1990, Knapska and Kaczmarek, 2004). L'expression de Zif268 est induite par la LTP. Celle-ci entraîne la transcription et la traduction rapides et robustes du gène notamment dans les cellules granulaires du Gyrus Denté de l'hippocampe (Cole et al., 1989, Wisden et al., 1990). Cette régulation transitoire de l'induction de l'ARNm de zif268 (entre 10 minutes et 2 heures après l'induction de la LTP) nécessite l'activation des récepteurs NMDA.

- **C-fos**

Depuis les premières applications neurobiologiques, c-fos est le marqueur anatomique fonctionnel le plus utilisé (Kovacs, 2008). L'expression de c-fos révèle l'activation des cellules neuronales suite à une stimulation synaptique et n'est donc pas à proprement parlé un marqueur de plasticité. Son expression explique son utilisation pour établir une cartographie de l'activité cérébrale consécutive à la réalisation d'une tâche cognitive. Ce gène est activé même en condition basale mais à un niveau faible. En effet, quand les animaux sont éveillés et au repos, on observe une expression de c-fos et de sa protéine surtout au niveau des structures présentant un fort niveau d'activité neuronale tonique comme le cortex visuel (Kaczmarek and Chaudhuri, 1997, Kovacs, 1998). De plus des études ont montré qu'une simple injection d'une solution saline induit une activation de c-fos dans certaines régions notamment celles impliquées dans la réponse au stress (noyau hypothalamique paraventriculaire) (Mouledous et al., 2010).

Fos, produit de l'expression du gène c-fos, est une protéine de 55kDa possédant entre autres un motif « leucine zipper » permettant son hétérodimérisation avec une protéine nucléaire de 39kDa appartenant à la famille des gènes précoces Jun pour former un facteur de transcription activateur (AP-1 : activator protein-1). Ce complexe a la capacité de moduler l'expression de nombreux gènes en se liant à une séquence de reconnaissance AP-1^{RE} (AP-1 responsive element) présente au niveau de leur région promotrice (Figure 10). Ce complexe permettra la répression ou la transcription de nombreux gènes tardifs impliqués dans les changements phénotypiques durables des cellules (Kovacs, 1998).

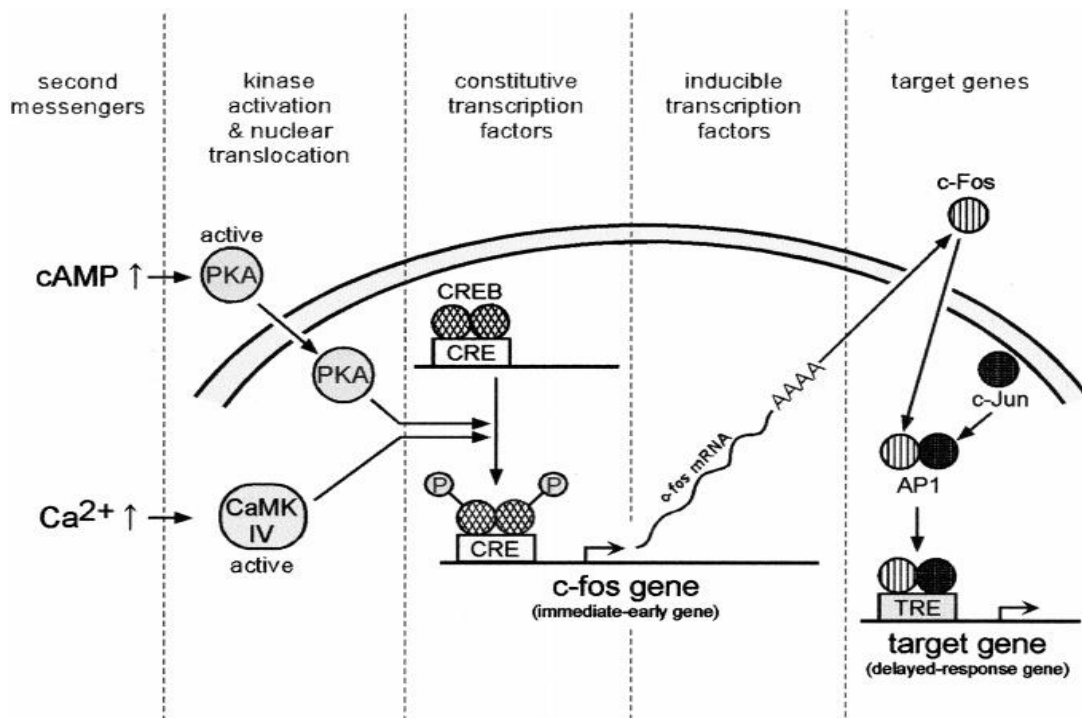


Figure 10 : Transcription induite par c-fos en réponse à l'augmentation de l'AMPc ou du Ca²⁺ (Platenik et al., 2000).

BDNF:

Le BDNF (brain-derived neurotrophic factor) appartient à la famille des neurotrophines. Il s'agit d'un régulateur majeur de la transmission synaptique dans plusieurs régions du cerveau (Bramham and Messaoudi, 2005). Le BDNF joue un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire, ainsi que dans la plasticité synaptique (Gottmann et al., 2009, Yoshii and Constantine-Paton, 2010, Park and Poo, 2013, Edelman et al., 2014). Des études ont montré que la plasticité synaptique au niveau de l'amygdale latérale dépend de la signalisation BDNF/Trk (Daftary et al., 2012, Meis et al., 2012). Cette neurotrophine joue un rôle important dans la LTP puisque l'inhibition aigue de sa voie de signalisation altère la LTP (Meis et al., 2012). Ces résultats sont également observés chez des souris transgéniques BDNF^{+/-} (Meis et al., 2012). Le BDNF est impliqué dans l'apprentissage. En effet, les souris transgéniques BDNF^{+/-} montrent un déficit d'apprentissage lié à la peur (Meis et al., 2012).

Le BDNF se fixe sur son récepteur tyrosine kinase (TrkB). Cette fixation induit l'autophosphorylation des résidus tyrosine au niveau intracellulaire créant ainsi des sites de fixation pour des protéines de signalisation (Figure 11). Les protéines Shc se fixent sur le récepteur TrkB pour activer la cascade de signalisation de Ras-raf-ERK et le système phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/Akt. D'autre part l'ancrage de la phospholipase Cγ

(PLPC γ) induit la production du diacylglycérol, un activateur transitoire de la protéine kinase C (PKC) et l'inositol triphosphate (IP₃) permettant la mobilisation calcique intracellulaire (Lessmann et al., 2003, Bramham and Messaoudi, 2005).

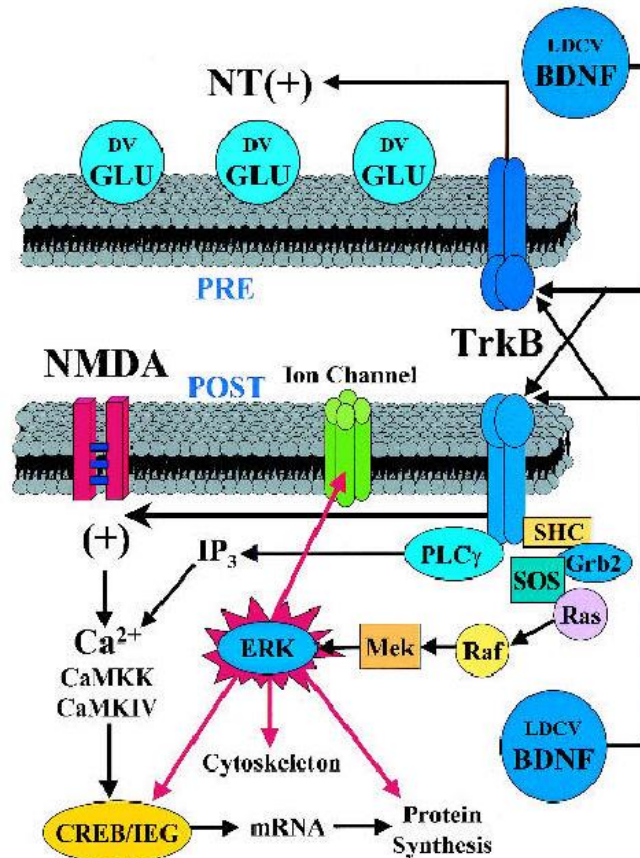


Figure 11 : Signalisation de BDNF : Le BDNF est libéré des deux éléments pré et post synaptiques. Cette neurotrophine facilite la libération de glutamate au niveau pré synaptique. Au niveau post synaptique la fixation du BDNF sur son récepteur Trk induit la cascade de signalisation qui active ERK. La phosphorylation de ERK active des cibles comme CREB et les gènes précoces immédiats, des éléments du cytosquelette, les canaux voltage-dépendants. (DV) docked vesicle; (Glu) glutamate; (LDCV) Large dense core vesicle (d'après (Tyler et al., 2002)).

Dégradation et Synthèse protéique et réorganisation synaptique :

La réorganisation structurale des synapses est une étape-clé pour la mise en place et la stabilité de la plasticité synaptique. La mémoire est accompagnée par une « altération de la structure » des éléments pré et post-synaptiques (Amtul and Atta Ur, 2015). Au niveau synaptique, la trace mnésique est associée à la formation de nouvelles connections synaptiques, au renforcement de certaines synapses, à un affaiblissement d'autres et à une élimination des autres (Amtul and Atta Ur, 2015). Suite à l'activation des voies de signalisation comme PKA

et ERK et à la transcription des gènes la LTP tardive a lieu. Ce mécanisme implique la modification durable de la synapse pour favoriser la stabilité de la trace. Des études ont montré que la plasticité synaptique liée à un apprentissage implique l'insertion de nouvelles protéines mais aussi la dégradation protéique au niveau de la cytomatrice présynaptique de la zone active d'une part et de la densité post-synaptique d'autre part, permettant ainsi de préparer leur renforcement (Kahne et al., 2012, Rosenberg et al., 2014) (Figure 12).

La dégradation protéique et la synthèse protéique sont deux mécanismes indispensables pour la consolidation de la mémoire (Lopez-Salon et al., 2001, Artinian et al., 2008, Jarome et al., 2011, Reis et al., 2013, Rosenberg et al., 2014). La LTP augmente la synthèse protéique ainsi que la dégradation protéique via le système ubiquitine protéasome (Fonseca et al., 2006). Une balance entre la dégradation protéique et la synthèse protéique est nécessaire pour la plasticité synaptique. En effet, l'injection d'un inhibiteur du système ubiquitine protéasome (lactacystine) ou d'un inhibiteur de la synthèse protéique (anisomycine) inhibe la consolidation de la mémoire (Artinian et al., 2008). D'autres études ont montré que l'inhibition du protéasome ou de la synthèse protéique inhibe la LTP mais que la co-inhibition du protéasome et de la synthèse protéique n'a pas d'effet (Fonseca et al., 2006) ce qui suggère que dans certaines conditions la LTP peut être maintenue sans synthèse protéique si la vague initiale de dégradation n'a pas lieu.

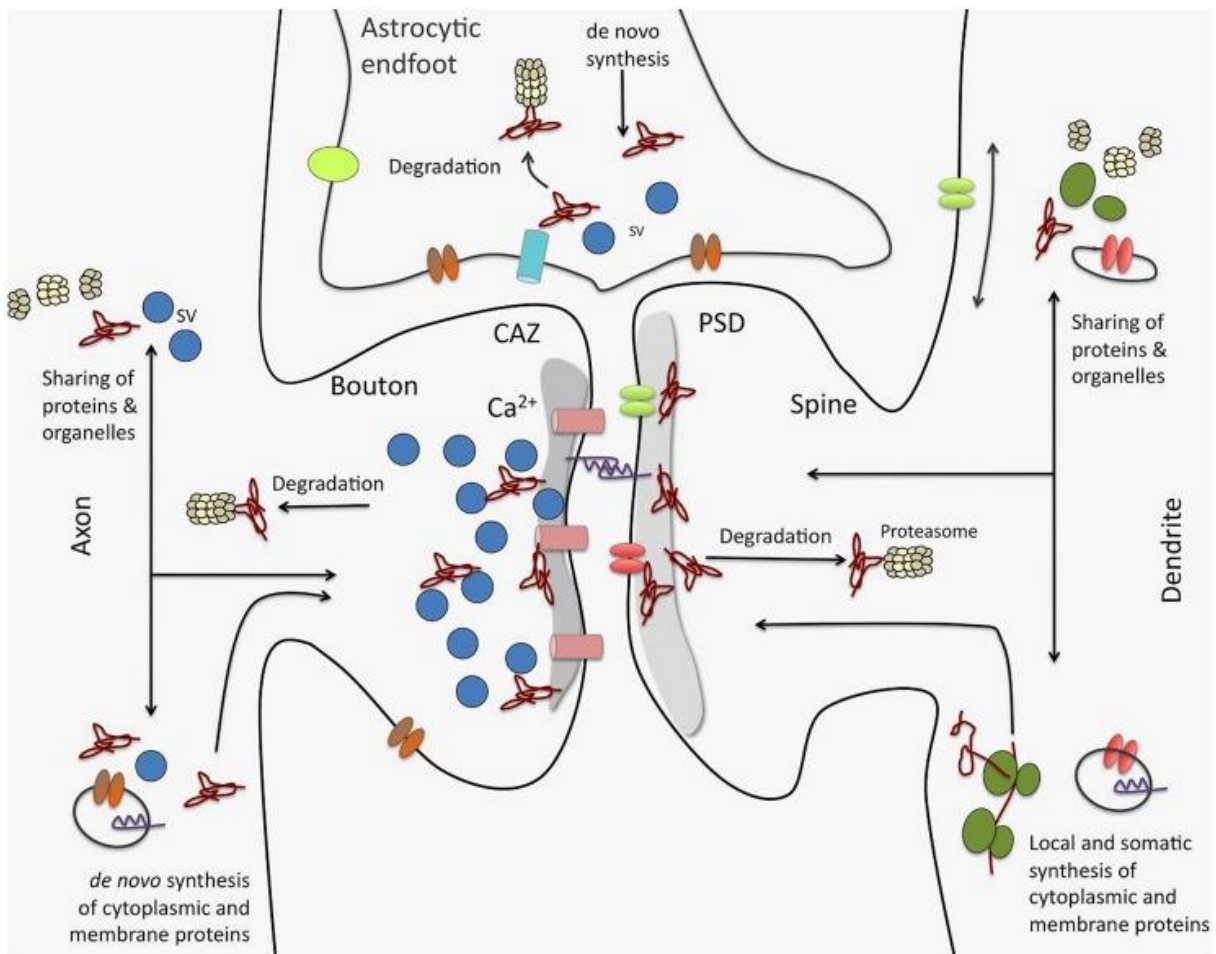


Figure 12 : Processus de changement et réorganisation synaptique lors de la formation et la consolidation mnésique : trois principaux mécanismes au niveau des deux sites synaptiques et de l'astrocyte fortement lié à la synapse : (i) synthèse de nouvelles protéines membranaires et cytoplasmiques. (ii) dégradation protéique par le système ubiquitine protéasome. (iii) partage de protéines, de la machinerie moléculaire (protéasomes, ribosomes) entre les synapses par un transport intracellulaire et par diffusion membranaire. CAZ, cytomatrice de la zone active ; PSD, densité postsynaptique ; SV, vésicule synaptique. (Rosenberg et al., 2014).

4.2.1.2 La Dépression à Long Terme (LTD) :

En parallèle et de façon complémentaire à la LTP, il existe également un autre type de plasticité synaptique, la Dépression à Long Terme (LTD) aboutissant à un affaiblissement durable de l'efficacité synaptique (Bruehl-Jungerman et al., 2007). Contrairement à la LTP, au niveau de l'hippocampe ou dans différentes aires corticales, la LTD peut être déclenchée par des stimulations synaptiques à basse fréquence qui aboutissent à un affaiblissement des connexions synaptiques. L'induction de cette forme de plasticité est également permise par l'activation des récepteurs NMDA et l'entrée d'ions calcium mais l'amplitude ainsi que la cinétique d'entrée du calcium sont différentes et permettent d'aboutir à une LTD via la déphosphorylation des récepteurs AMPA par les phosphatases, et à leur internalisation

(Collingridge et al., 2004). D'autres mécanismes indépendants des récepteurs NMDA ont également été décrits (Anwyl, 2006). La LTD représente un mécanisme d'oubli de l'information mais peut également servir à renforcer l'émergence de schémas de connexions en affaiblissant les connexions inutilisées afin de rendre plus saillantes les connexions renforcées. Il a déjà été montré que des diminutions d'efficacité synaptique de type LTD surviennent dans l'hippocampe lors de l'exploration d'objets ou de l'acquisition de tâches spatiales (Goh and Manahan-Vaughan, 2013), suggérant que des mécanismes de LTD, comme de LTP, jouent un rôle important dans la consolidation mnésique (Kemp and Manahan-Vaughan, 2007, Kemp et al., 2013).

4.2.2 Consolidation systémique

Comme nous l'avons indiqué plus haut, la consolidation mnésique fait référence à une consolidation cellulaire et à une consolidation systémique dont les cinétiques sont différentes (Figure 13). Après une stabilisation de la trace mnésique qui survient en quelques heures par la consolidation cellulaire que nous avons décrite, la trace mnésique subit une réorganisation au niveau des circuits cérébraux qui peut se dérouler sur des jours, des mois voire des années, c'est la consolidation systémique. Ce processus correspond à un déplacement de la trace mnésique entre différentes régions cérébrales.

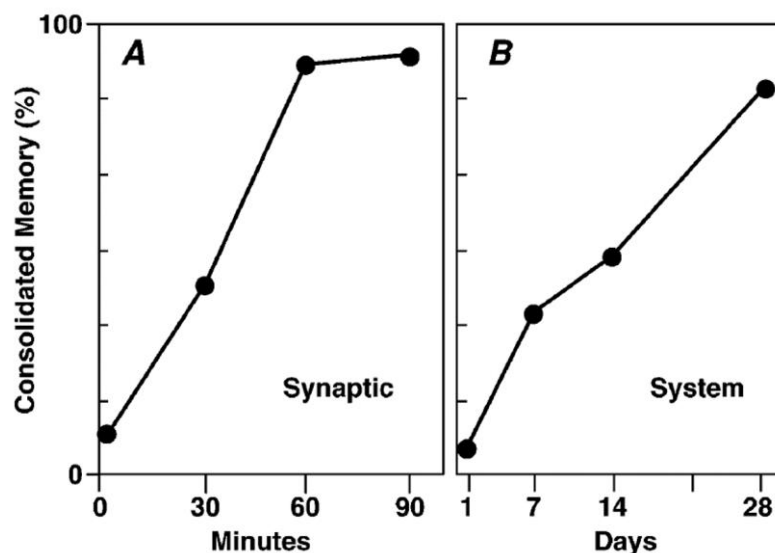


Figure 13 : Décours temporel des consolidations synaptique (A) et systémique (B). Le décours temporel de la consolidation synaptique est déterminé en fonction de la sensibilité de la mémoire à l'inhibition de la synthèse protéique (A) tandis que celui de la consolidation systémique est déterminé en fonction de la sensibilité de la mémoire à long terme à une lésion hippocampique (B). (Dudai, 2004)

L'hippocampe joue un rôle indispensable dans la formation de la mémoire épisodique mais son rôle en tant que lieu de stockage de la mémoire ancienne est débattu. La théorie standard de la consolidation énonce que l'hippocampe se désengagerait progressivement de la trace mnésique au profit du néocortex, capable d'assurer à lui seul le stockage et le rappel d'une mémoire ancienne (Bontempi et al., 1999, Frankland and Bontempi, 2005) (Figure 14 panel du haut et 14a). La stabilisation et la conservation des souvenirs viendraient d'un dialogue entre l'hippocampe et le néocortex. Dans les conditions de repos ou de sommeil, l'hippocampe permet la réactivation des structures corticales ayant permis le stockage du souvenir. Ainsi, la réactivation répétée plusieurs fois permet le renforcement des connexions cortico-corticales et la trace mnésique devient indépendante de l'hippocampe. Cependant, une théorie alternative propose que la mémoire reste codée par des réseaux hippocampo-corticaux et que l'hippocampe est toujours nécessaire pour la récupération des souvenirs. Chaque réactivation de la trace mnésique génère une trace mnésique supplémentaire. Un souvenir ancien associé à plusieurs réactivations et donc à plusieurs traces aura plus de chance d'être récupéré qu'un souvenir récent (figure 14b). Cette théorie implique la coexistence des mémoires épisodique et sémantique. La mémoire épisodique est une mémoire qui comporte une importante composante spatio-temporelle et engage toujours l'hippocampe pour son rappel, contrairement à la mémoire sémantique qui devient avec le temps indépendante du contexte d'apprentissage et de réactivation, et est portée uniquement par les traces corticales. Cette mémoire peut donc être rappelée sans le concours de l'hippocampe (Frankland and Bontempi, 2005).

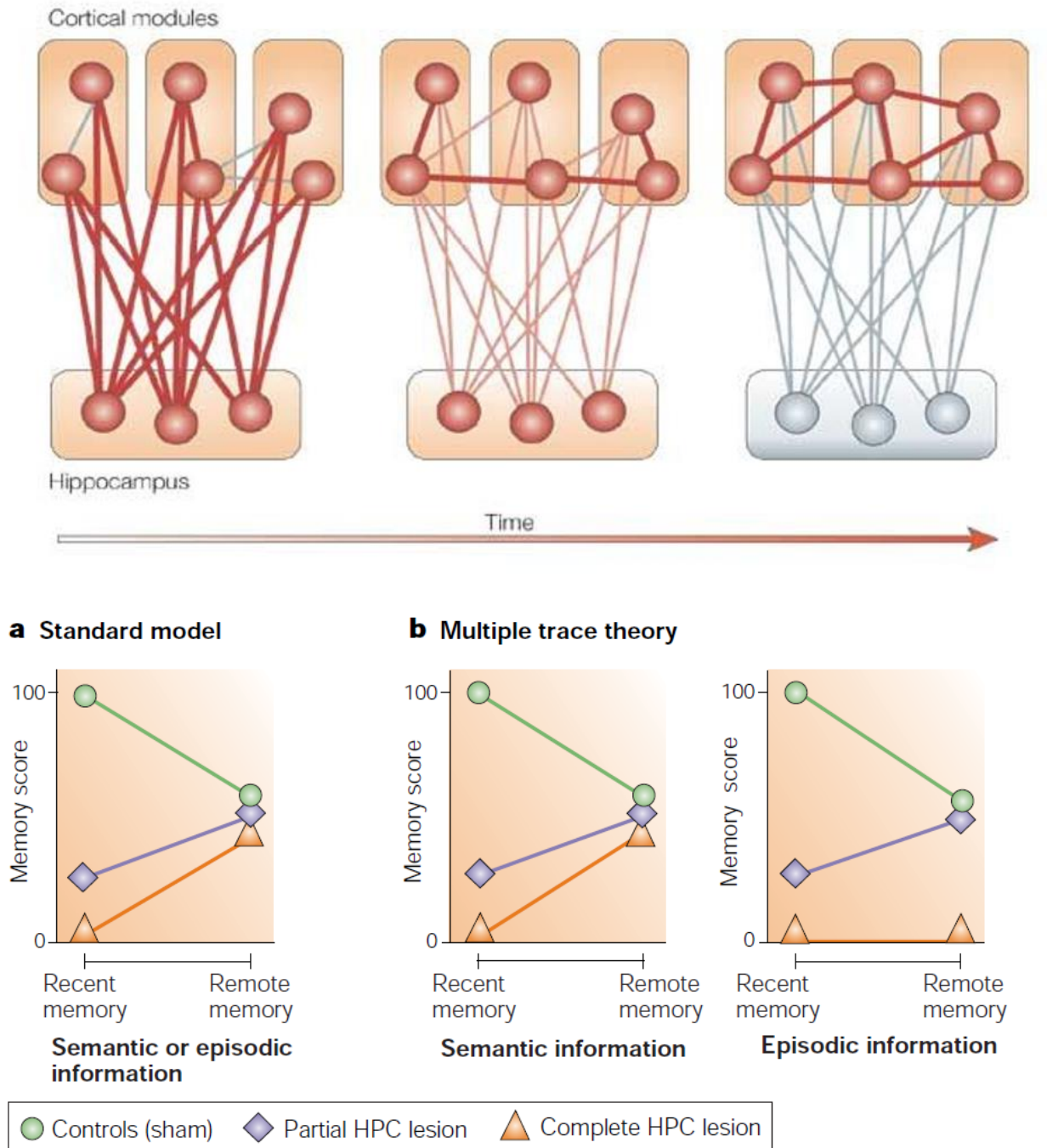


Figure 14 : La consolidation systémique : Panel du haut ; Théorie standard de la consolidation mnésique. Panel du bas ; prévision des performances de mémoire en cas de lésion hippocampique selon le modèle standard (a) ou selon la théorie des traces multiples (b) (Frankland and Bontempi, 2005).

4.3 La reconsolidation :

Les chercheurs ont longtemps pensé que les souvenirs, une fois consolidés et stockés, restaient inchangés et prêts à être rappelés à la demande. Or la mémoire est un processus dynamique puisque le rappel de certains souvenirs peut les modifier, les effacer ou les rendre

indisponibles. Les performances de rappel dépendent de l'accessibilité de l'information stockée en mémoire à long terme. La récupération d'une information dépend du degré de correspondance entre le contexte de réactivation et le contexte d'encodage (Tulving et Thomson 1973). La présentation d'indices peut faciliter le rappel. En effet, lors d'un test de mémoire, la présentation d'un stimulus qui a été inclus au cours d'un apprentissage permet de rappeler la tâche à l'individu. Une fois le souvenir rappelé, la trace mnésique réactivée doit à nouveau être consolidée: c'est la reconsolidation mnésique (Nader et al., 2000, Nader, 2003, Alberini, 2005, Artinian et al., 2008, Nader and Hardt, 2009, Besnard et al., 2012, Lee et al., 2017).

La reconsolidation est un processus complexe, dont la compréhension nécessite une connaissance des mécanismes moléculaires sous-jacents et des processus psychologiques impliqués. Pour étudier la reconsolidation, l'implication ou le rôle de certaines molécules dans ce mécanisme, une mémoire doit être consolidée dans un premier temps, ensuite une réactivation de cette mémoire est nécessaire (Tronson and Taylor, 2007, Lee et al., 2017). Suite à cette réactivation, la mémoire déjà consolidée devient à nouveau labile et nécessite un processus actif pour la stabiliser et la maintenir de nouveau ou pour la modifier. La reconsolidation est fréquemment étudiée en utilisant le paradigme du « Pavlovian fear conditioning » ou conditionnement de peur.

4.3.1 Les mécanismes moléculaires impliqués dans la reconsolidation :

4.3.1.1 Dégradation et synthèse protéique :

La stabilisation de la mémoire et sa mise en place à long terme nécessitent deux grands mécanismes qui sont la dégradation protéique et la synthèse protéique. Il a été déjà montré que la dégradation protéique par le système ubiquitine protéasome est impliquée non seulement dans la consolidation de la mémoire mais aussi dans la reconsolidation de la mémoire mais avec des cinétiques différentes (Artinian et al., 2008). En effet, l'injection de lactacystine, un inhibiteur du système ubiquitine protéasome, immédiatement après la réactivation de la mémoire altère la reconsolidation de la mémoire spatiale mais pas si la drogue est injectée 3 heures après la réactivation, alors que dans ces conditions la consolidation serait inhibée (Artinian et al., 2008). Cependant, une autre étude a montré que l'inhibition de la dégradation protéique n'altère pas la reconsolidation de la mémoire (Sol Fustinana et al., 2014). Pour expliquer ce résultat on peut émettre l'hypothèse que dans certaines tâches mnésiques, ou selon les conditions de réactivation, l'inhibition du protéasome empêche la trace de revenir à l'état labile. En effet, pour que la reconsolidation ait lieu il faut que la trace redevienne labile à

nouveau (Nader, 2003). En bloquant le phénomène de dégradation protéique on pourrait alors maintenir la trace dans un état stable sans avoir à passer par une étape de reconsolidation.

De la même façon de nombreuses études ont montré que la synthèse protéique est un processus indispensable pour la reconsolidation de la mémoire. En effet, dans la plupart des cas l'injection d'un inhibiteur de synthèse protéique immédiatement après le rappel induit une perturbation de la mémoire déjà établie (Nader et al., 2000, Artinian et al., 2008). Ceci montre également que le rappel est nécessaire pour que la mémoire consolidée passe de nouveau à un état labile qui nécessitera un processus actif pour la restabiliser de nouveau.

Cependant l'utilisation des inhibiteurs de synthèse protéique n'inhibe pas la reconsolidation dans tous les tests de mémoire. Par exemple dans l'évitement passif, l'injection des inhibiteurs de synthèse protéique dans l'hippocampe ne perturbe pas la reconsolidation de la mémoire (Power et al., 2006) alors que l'injection d'un inhibiteur dans l'hippocampe inhibe la mémoire contextuelle dans le test de conditionnement à la peur (Debiec et al., 2002). Cela pourrait indiquer des niveaux de déstabilisation de la trace mnésique différents selon le type de test de mémoire et la région cérébrale considérée (Tableau 1).

Memory task	Injection site	Was reconsolidation disrupted?
Auditory fear conditioning	Basolateral amygdala	Yes
Contextual fear conditioning	Hippocampus	Yes
	Hippocampus	No
	Hippocampus	Recent memories only
	Anterior cingulate	No
	ICV	No
	Systemic	Transiently
	Systemic	Yes
Trace fear conditioning	Hippocampus	Yes
	Medial prefrontal cortex	No
Inactive avoidance	Systemic	Yes
	ICV	New memories
	Hippocampus	No
	Basolateral amygdala	No
	Entorhinal cortex	No
Conditioned taste aversion	Basolateral amygdala	No
	Central amygdala	No
	Systemic	Yes
Instrumental learning	Systemic	No
	Nucleus accumbens	No
Incentive learning	Amygdala	Yes
Morris water maze	Systemic	No
	Hippocampus	In limited conditions
	Hippocampus	Yes
Object recognition	Ventromedial prefrontal cortex	Yes
	Hippocampus CA1	Yes
Eyelid conditioning	Systemic	Yes
Conditioned place preference	Systemic	Yes (two injections)
	Basolateral amygdala	No
Gill withdrawal	Systemic	Yes
Paired training event	Systemic	Yes
Auditory discrimination	Auditory cortex	No

Tableau 1 : Liste des expériences ayant utilisé les inhibiteurs de la synthèse protéique (PSIs) pour étudier le rôle de ce mécanisme dans la reconsolidation de la mémoire. Les PSIs ont été administrés après réactivation de la mémoire déjà consolidée et les animaux ont été testés 24h après. ICV, intracérébroventriculaire (d’après (Tronson and Taylor, 2007).

4.3.1.2 Activation des facteurs de transcription :

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la reconsolidation de la mémoire. Des études ont montré que la perturbation de CREB au niveau de l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal inhibe la reconsolidation de la mémoire dans le test de conditionnement de peur, au son et au contexte (Kida et al., 2002, Tronson and Taylor, 2007). Dans ce même test, l'expression de CREB phosphorylé est augmentée au niveau de l'amygdale (Hall et al., 2001). D'autre part, au niveau de l'hippocampe, C/EBP β (enhancer-binding protein- β) est impliqué dans la consolidation mais pas dans la reconsolidation de la mémoire dans le test d'évitement inactif contrairement au niveau de l'amygdale où C/EBP est impliqué dans la reconsolidation mais pas dans la consolidation. NF- κ B, un autre facteur de transcription est activé au cours de la reconsolidation de la mémoire (Merlo et al., 2005). En ce qui concerne les gènes précoces, Zif268 est fortement impliqué dans la reconsolidation de la mémoire (Lee et al., 2004) dans l'hippocampe et dans l'amygdale basolatérale (Lee et al., 2005, Hellemans et al., 2006). C-fos est également impliqué dans le mécanisme de reconsolidation et est activé dans plusieurs régions notamment dans l'hippocampe (Strekalova et al., 2003) et l'amygdale (Hall et al., 2001).

4.3.1.3 Les kinases :

Tous les facteurs de transcription cités ci-dessus sont phosphorylés par des kinases (Figure 15). Les deux kinases ERK et PKA sont particulièrement intéressantes pour leur implication dans la régulation de la transcription des gènes. ERK est nécessaire pour la reconsolidation de la mémoire de peur au son (Duvarci et al., 2005), dans la mémoire de reconnaissance (Kelly et al., 2003) et dans la préférence de place (Miller and Marshall, 2005, Valjent et al., 2006). La protéine PKA est également impliquée dans la reconsolidation de la mémoire de peur liée au son. Son inhibition au niveau du BLA inhibe la mémoire dans le test du conditionnement au son (Tronson et al., 2006).

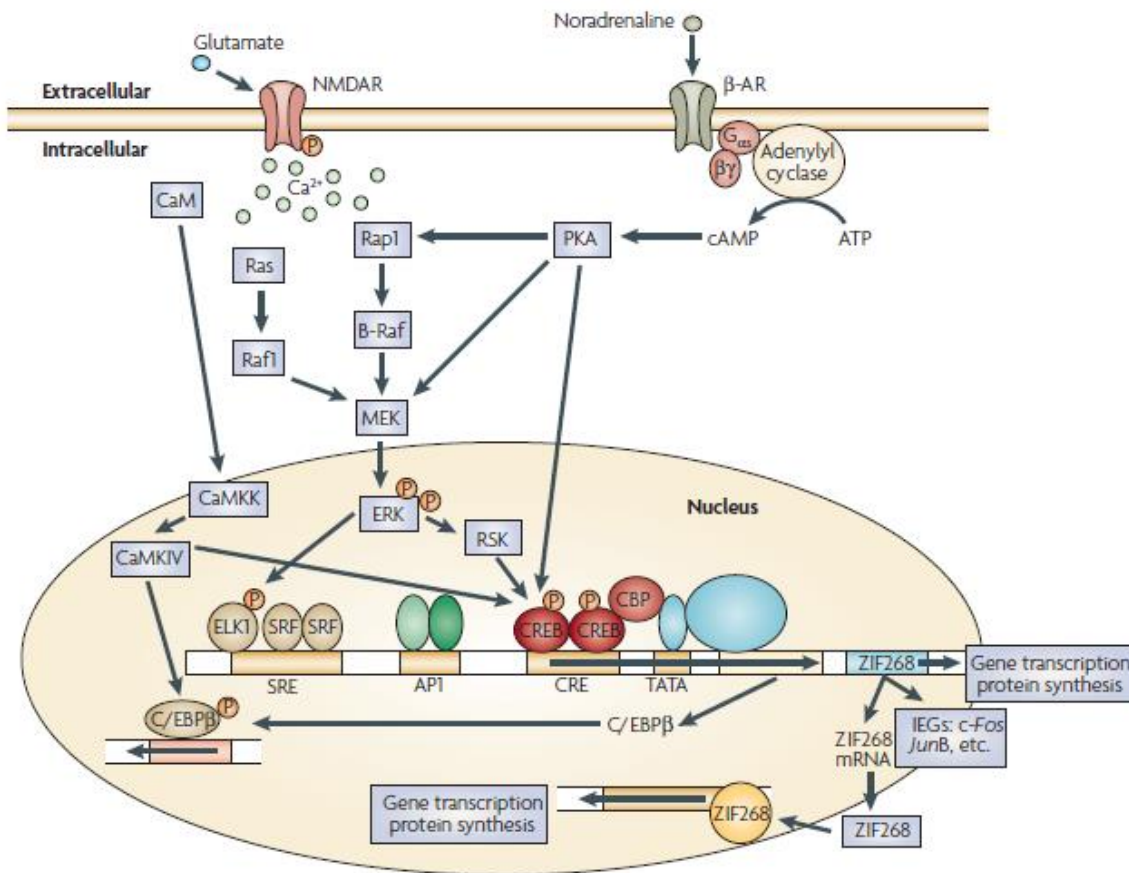


Figure 15 : Les mécanismes moléculaires clés de la reconsolidation : plusieurs molécules sont impliquées dans la reconsolidation de la mémoire notamment les récepteurs beta adrénergiques β -AR et NMDA, NMDAR, et les voies de signalisation issues de ces deux récepteurs. ERK est activée par des GTPases comme Ras, Raf et Rap activées elles-mêmes par l'influx calcique. La protéine kinase A (PKA) est activée par l'AMP cyclique et agit directement ou indirectement sur ERK et la protéine ribosomale kinase (RSK) pour activer les facteurs de transcription notamment CREB, Zif268, ELK1 eux-mêmes induisant la transcription des gènes. C-fos et JunB sont également activés (d'après (Tronson and Taylor, 2007)).

4.3.2 Reconsolidation versus consolidation :

Plusieurs recherches ont été menées sur la reconsolidation afin de déterminer son mécanisme cellulaire et de le comparer à celui de la consolidation. Certaines études ont montré que la reconsolidation partage des similarités avec la consolidation (Dudai, 2004, Alberini, 2005, Tronson and Taylor, 2007) (Tableau 2). En effet, il a été démontré que la reconsolidation engage un sous-ensemble des gènes impliqués dans la consolidation (von Herten and Giese, 2005). Nader et al., et Debiec et al ont prouvé que la synthèse protéique dans l'amygdale est nécessaire à la fois pour la consolidation et la reconsolidation de la mémoire de peur au son. De la même manière, cette synthèse protéique est nécessaire dans l'hippocampe pour les deux processus de mémoire de peur au contexte (Nader et al., 2000, Debiec et al., 2002). Cette

similarité entre les deux processus est également confirmée par des études sur l'implication de certaines molécules spécifiques. Par exemple, l'inhibition de la voie ERK par l'injection intracébroventriculaire d'un inhibiteur spécifique affecte la consolidation et la reconsolidation de la mémoire dans le test de reconnaissance d'objet (Kelly et al., 2003). De plus, le knockout du facteur de transcription CREB inhibe la consolidation et la reconsolidation de la mémoire de la peur au contexte (Kida et al., 2002). Enfin, l'inhibition de Zif268 par knockout affecte la consolidation et la reconsolidation de la mémoire dans le test de reconnaissance d'objet (Bozon et al., 2003).

Travaux	Espèces	Références
La consolidation ainsi que la reconsolidation impliquent :		
-Synthèse protéique dans le cortex insulaire en conditionnement d'aversion au gout	rat	Eisenberg, M et al. 2003
-Zif268 dans le test de reconnaissance d'objet	souris	Bozon, B. et al. 2003
-La synthèse protéique dans le conditionnement opérant	pond snail	Sangha, S. et al. 2003
-MAPK hippocampique dans le test de reconnaissance	rat	Kelly, A. et al 2003
-PKA amygdalienne dans le test d'évitement de gout	rat	Koh, M.T.and Bernstein 2003
-CREB dans le conditionnement de peur au contexte	souris	Kida, S. et al. 2000
-Synthèse protéique hippocampique dans le conditionnement de peur au contexte	rat	Debiec, J. et al 2002
-Synthèse protéique dans l'amygdale dans le conditionnement de peur au son	rat	Nader, K. et al 2000

Tableau 2 : Similarités entre la consolidation et la reconsolidation adapté d'après (Alberini, 2005).

Bien qu'il existe des similarités entre la consolidation et la reconsolidation, ces deux processus sont deux mécanismes différents. La pharmacologie fonctionnelle et les études de knockdown des gènes ont montré que ces deux processus n'ont pas les mêmes mécanismes (Tableau 3). En effet, l'infusion du propranolol, antagoniste des récepteurs beta adrénergiques dans l'amygdale inhibe la reconsolidation mais pas la consolidation de la mémoire de peur au son (Debiec and LeDoux, 2004). De plus, au niveau de l'hippocampe dorsal la consolidation et la reconsolidation de la mémoire contextuelle de peur sont dissociées (Lee et al., 2004). Grâce à l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour bloquer la traduction de protéines particulières, il a été montré dans l'hippocampe que le facteur neurotrophique BDNF est impliqué dans la consolidation et pas dans la reconsolidation de la mémoire de peur au contexte tandis que le facteur de transcription Zif268 est nécessaire pour la reconsolidation mais pas pour la

consolidation (Lee et al., 2004). En revanche, dans l'amygdale Zif268 est nécessaire à la fois pour la consolidation et la reconsolidation de la mémoire de peur au son. Salinska et al ont montré que, dans le test d'évitement passif chez la poule, l'implication de la synthèse protéique et de la glycosylation des protéines néosynthétisées ainsi que l'induction du facteur de transcription c-fos après un apprentissage ou une réactivation sont anatomiquement et temporairement différents (Salinska et al., 2004). D'autre part il a été démontré qu'une synthèse de *novo* de protéines dans le noyau accumbens est nécessaire pour la consolidation mais pas pour la reconsolidation de la mémoire appétitive (Hernandez et al., 2002). En utilisant c-fos comme marqueur d'activité, le cortex frontal et l'amygdale basolatérale sont activés suite à un apprentissage associatif odeur/récompense mais pas après un rappel qui a activé d'autres régions (Tronel and Sara, 2002). Kelly et al ont montré que ERK s'active dans des circuits hippocampiques différents suite à l'apprentissage et suite à la réactivation lors du test de la reconnaissance d'objet (Kelly et al., 2003).

Comme décrit ci-dessus, la consolidation et la reconsolidation de la mémoire partagent donc des mécanismes moléculaires communs mais ce sont également deux processus différents parce qu'ils nécessitent l'activation de régions cérébrales et des circuits différents. Dans certains cas, la consolidation implique certaines régions qui ne sont pas impliquées dans la reconsolidation. Par contre, dans d'autres cas les deux processus nécessitent l'activation des mêmes régions (Alberini, 2005).

Travaux	Espèces	Références
La consolidation est différente de la reconsolidation par :		
-Synthèse protéique, glycosylation et induction de c-fos dans le test d'évitement passif	poule	Salinska, E et al. 2004
-Synthèse protéique dans le noyau central de l'amygdale dans le test de conditionnement aversif au gout	rat	Bahar, A. et al. 2004
-Synthèse protéique dans le noyau accumbens dans la mémoire appétitive	rat	Hernandez, P.J. et al. 2002
-Synthèse protéique dans le cortex auditif dans le test de discrimination au son	gerbille	Kraus, M. et al. et al 2002
-c-fos est induit dans des régions différentes dans la mémoire de récompense aux odeurs	rat	Tronel et Sara 2002
-Synthèse protéique hippocampique dans la mémoire d'évitement inhibiteur	rat	Vianna M.R. et al 2001

Tableau 3 : Différences entre la consolidation et la reconsolidation adapté d'après (Alberini, 2005)

4.4 Extinction :

En plus du processus de reconsolidation de la mémoire, le rappel de la trace mnésique peut induire l'initiation d'un processus différent qui est l'extinction de la mémoire. En effet, au cours du rappel, si la réexposition au stimulus conditionné est courte, la reconsolidation va être privilégiée mais si cette réexposition est longue, ce sera l'extinction (Debiec et al., 2002, de la Fuente et al., 2011).

L'extinction de la mémoire est le déclin en fréquence ou en intensité d'une réponse conditionnée après la présentation répétée et non renforcée du stimulus (Pavlov, 1927). Cela ne reflète pas l'oubli dû à l'effacement progressif de la trace mnésique, mais plutôt un nouvel apprentissage où la nouvelle trace mnésique entre en compétition avec la trace initiale pour l'expression d'un comportement. Le processus d'extinction a été largement étudié dans des tâches associatives comme le conditionnement de peur (Baldi and Bucherelli, 2014).

Dans l'exemple du conditionnement de peur, trois principales régions cérébrales interviennent dans l'extinction : l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal médian. L'extinction est un processus contexte-dépendant. Le cortex préfrontal intègre l'information du stimulus conditionné avec une information contextuelle provenant de l'hippocampe pour déterminer le rappel de l'extinction. Dans le contexte d'extinction, le cortex préfrontal inhibe l'amygdale (ou plutôt favorise l'expression de la nouvelle association du CS avec l'absence de danger) pour limiter les réponses de peur, tandis qu'en dehors de ce contexte d'extinction, l'amygdale n'est pas inhibée (Quirk and Mueller, 2008, Baldi and Bucherelli, 2015).

L'extinction équivaut à un nouvel apprentissage et se déroule donc en trois phases : l'acquisition, la consolidation, et le rappel. La consolidation du processus d'extinction engage des mécanismes cellulaires et moléculaires pour stabiliser la trace mnésique de « *la nouvelle information* » proches de ceux de la consolidation initiale (Quirk and Mueller, 2008). En effet, l'activation des récepteurs NMDA est nécessaire dans le processus de l'extinction (Baker and Azorlosa, 1996, Suzuki et al., 2004, Burgos-Robles et al., 2007). L'infusion d'un antagoniste des récepteurs NMDA que ce soit dans la BLA ou dans l'hippocampe dorsal inhibe l'extinction de la mémoire dans les tests d'évitement passif et du conditionnement de peur (Lee and Kim, 1998, Laurent et al., 2008, Myskiw et al., 2010, Fiorenza et al., 2012, Myskiw et al., 2014) .

L'extinction est un processus qui implique aussi l'activation des voies de signalisation déjà décrites. Par exemple, la voie MAPK est indispensable dans ce processus. L'administration d'inhibiteurs de cette voie dans la BLA avant l'acquisition de l'extinction inhibe le nouvel

apprentissage (Herry et al., 2006). La phosphorylation de ERK est augmentée au niveau de l'amygdale après l'acquisition de l'extinction (Cannich et al., 2004, Davis and Bauer, 2012, Kwapis et al., 2014). Cette voie de signalisation est également nécessaire au niveau de l'hippocampe puisque l'extinction est bloquée par l'injection d'inhibiteurs de MAPK dans l'hippocampe dorsal (Bevilaqua et al., 2007, Fischer et al., 2007, Bonini et al., 2011). La PKA et la CamKII sont également indispensables dans cette même région pour la consolidation de l'extinction (Szapiro et al., 2003, Myskiw et al., 2010). Cependant, contrairement à la consolidation initiale de la mémoire, l'activation du facteur de transcription CREB dans l'hippocampe et l'amygdale ne semble pas requise pour l'extinction de la mémoire (Tronson et al., 2008, Mamiya et al., 2009).

Contrairement au blocage de la reconsolidation, qui induit théoriquement une atténuation durable de la trace mnésique, l'extinction est un processus réversible. En effet, après l'acquisition et la consolidation de l'extinction, l'association CS/US initiale toujours présente peut réapparaître. Par exemple, suite à l'extinction de l'association son/choc, après un certain temps, en remettant l'animal dans le contexte de conditionnement, ou en présentant de nouveau le stimulus inconditionné, la réponse conditionnée (freezing) peut réapparaître (Quirk and Mueller, 2008) (Figure 16).

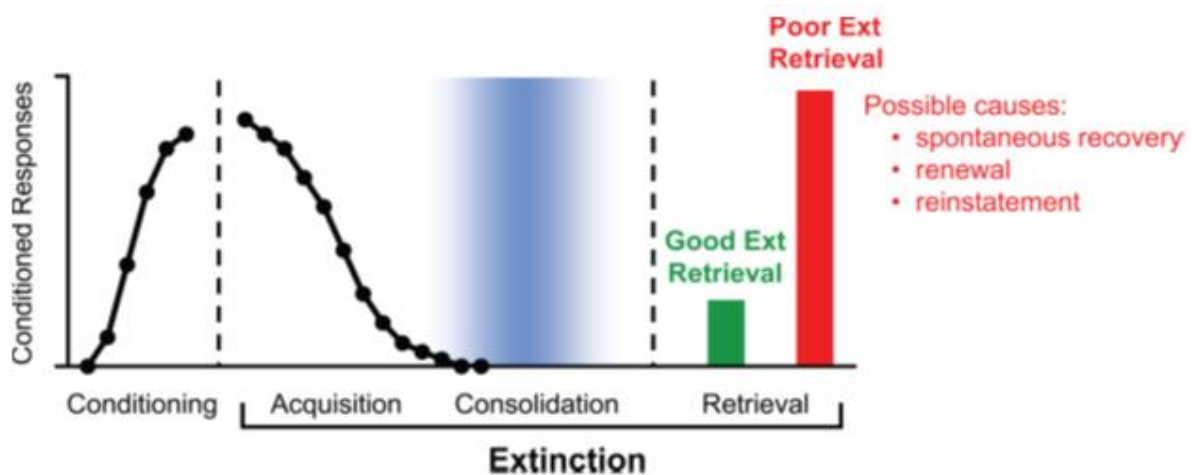


Figure 16 : Processus de l'extinction. L'acquisition est caractérisée par la diminution des réponses conditionnées lors de la présentation du stimulus conditionné en l'absence du stimulus inconditionné. Au cours du temps, la consolidation de l'extinction a lieu. Une bonne extinction se traduit par un faible niveau de réponse conditionnée (barre verte). Le niveau de réponse peut augmenter (barre rouge). Cette augmentation peut apparaître soit spontanément après un certain temps (spontaneous recovery), soit suite à l'exposition au contexte initial (renewal) soit suite à la présentation du stimulus inconditionné (reinstatement). (Quirk and Mueller, 2008)

5) Les neuromodulateurs de la mémoire :

Selon les circonstances, de nombreux neuromodulateurs peuvent être libérés en grande quantité durant l'apprentissage, la consolidation et la reconsolidation. Nous pouvons par exemple citer la dopamine, la noradrénaline, l'acétylcholine, les glucocorticoïdes et certains neuropeptides (Pare, 2003). Ces neuromodulateurs exercent une action sur les processus mnésiques par renforcement pour certains et par inhibition pour d'autres.

5.1 Noradrénaline :

L'adrénaline et la noradrénaline (NA) sont deux hormones de stress qui jouent un rôle important dans la mémorisation des souvenirs émotionnels. Le système noradrénergique est extrêmement impliqué dans la mémoire aversive et traumatique. Les corps cellulaires des neurones noradrénergiques se regroupent dans sept noyaux localisés dans le tronc cérébral. Adjacent au quatrième ventricule dans le tronc cérébral, le locus coeruleus (LC, noyau A6) est la structure noradrénergique la plus dense (Szabadi, 2013). Le LC est responsable de la majeure partie des projections noradrénergiques dans le cerveau. Deux tiers des projections du LC forment la voie ascendante qui projette vers diverses structures cérébrales comme l'hippocampe, l'hypothalamus, l'amygdale, le thalamus, le néocortex (Szabadi, 2013). Ce faisceau est impliqué dans de nombreux processus cognitifs tels que la mémoire, l'éveil, l'attention, ou le rythme circadien.

Les récepteurs à la NA sont des récepteurs couplés à des protéines G. Il existe trois classes différentes de récepteurs à la noradrénaline selon leurs propriétés pharmacologiques : **les récepteurs α 1-adrénergiques**, sont des récepteurs activateurs et post-synaptiques couplés à une protéine Gq qui active la phospholipase C (PLC) et activent la voie inositol-3-phosphate. **Les récepteurs α 2-adrénergiques** sont des récepteurs inhibiteurs couplés à une protéine Gi qui inhibe l'adénylate cyclase (AC) ainsi que l'activité du neurone et donc réduisent le potentiel de plasticité synaptique. Les récepteurs **β -adrénergiques** sont des récepteurs activateurs couplés aux protéines Gs couplées positivement à l'adénylate cyclase qui activent la voie AMPc-PKA-CREB (Maletic et al., 2017).

Il a été démontré que ces différents récepteurs noradrénergiques sont impliqués dans la formation de la mémoire à long terme. En effet, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs α 1 diminue les performances mnésiques dans le test de peur conditionnée et d'apprentissage spatial (Do Monte et al., 2013, Torkaman-Boutorabi et al., 2014). Par contre les antagonistes des récepteurs α 2 améliorent la mémoire notamment la yohimbine qui augmente les performances

dans les tests de conditionnement de peur et de labyrinthe aquatique de Morris (Gazarini et al., 2013, Torkaman-Boutorabi et al., 2014). En ce qui concerne les récepteurs β adrénergiques, l'utilisation de l'antagoniste propranolol, que ce soit administré systématiquement ou injecté localement dans l'amygdale, bloque la consolidation de la mémoire dans les tests de mémoire de peur, de mémoire spatiale ou de mémoire de reconnaissance d'objet (Gallagher et al., 1977, Cahill et al., 2000, Kroon and Carobrez, 2009, Cohen et al., 2011).

Comme dans la consolidation, le système noradrénergique est également impliqué dans la reconsolidation (Figure 17) (Otis et al., 2015). L'inhibition de l'activité des récepteurs α_1 et β -adrénergiques durant la reconsolidation inhibe la mémoire dans les paradigmes appétitif et aversif (Przybylski et al., 1999, Bernardi et al., 2006, Milton et al., 2008, Bernardi et al., 2009, Wouda et al., 2010, Do Monte et al., 2013, Gazarini et al., 2013). De plus, la perturbation de la signalisation adrénergique inhibe la reconsolidation de la mémoire émotionnelle (Lonergan et al., 2013).

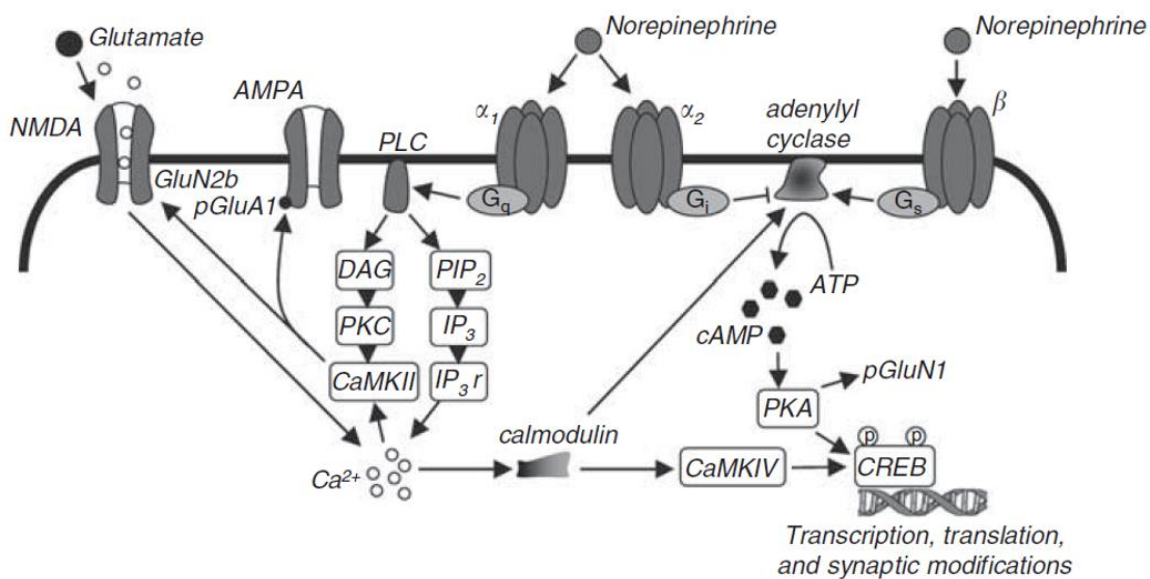


Figure 17 : Mécanismes cellulaires de la reconsolidation de la mémoire : rôles des récepteurs noradrénergiques La signalisation noradrénergique post synaptique améliore la reconsolidation de la mémoire par le renforcement de la plasticité synaptique dépendante des récepteurs glutamatergiques. (d'après (Otis et al., 2015).

5.2 Dopamine :

La dopamine est un neuromodulateur qui joue un rôle dans un grand nombre de fonctions du système nerveux, telles que la mémoire et l'apprentissage, l'activité motrice, l'éveil, les émotions et les processus de récompense. Des perturbations du système dopaminergique sont à l'origine de la maladie de Parkinson (Das et al., 2015) et d'autres

maladies psychiatriques comme la schizophrénie, le désordre de l'hyperactivité, et la dépendance aux drogues (Aleph Prieto, 2017).

Les corps cellulaires des neurones dopaminergiques se regroupent dans plusieurs noyaux constituant des systèmes anatomiques différents. Le système qui contient la majorité des neurones dopaminergiques est un système à projection longue qui se divise en trois noyaux : A8, A9 et A10. Le noyau A10 ou aire tegmentale ventrale (ATV) projette dans les aires frontale, cingulaire et entorhinale du cortex (Juarez and Han, 2016). Cette projection constitue la voie méso-corticale. L'ATV projette également dans le noyau accumbens et les bulbes olfactifs ainsi que le septum, l'amygdale, l'hippocampe et le cortex piriforme dites structures limbiques. Cette projection constitue la voie méso- limbique. Les deux voies méso-corticale et méso- limbique sont impliquées dans le contrôle des fonctions cognitives, des émotions et dans la dépendance aux drogues (Juarez and Han, 2016).

Les récepteurs à la dopamine sont des récepteurs couplés à une protéine G. Il existe cinq types de récepteurs dopaminergiques. Les récepteurs de type D1 et D5 sont couplés à une protéine Gs qui active l'AC. Les récepteurs D2, D3 et D4 sont des récepteurs couplés à la protéine Gi qui inhibe l'AC et ainsi l'activité du neurone et donc réduit le potentiel de plasticité synaptique. Plusieurs études ont montré l'implication de ces récepteurs dans les processus mnésiques. L'administration d'un agoniste des récepteurs D1 facilite la consolidation de la mémoire (Peczely et al., 2014, Lenard et al., 2017) et leur blocage au niveau des cortex antérolatéral préfrontal et entorhinal inhibe cette mémoire (Izquierdo et al., 1998, Lenard et al., 2017).

Le système dopaminergique est impliqué dans la reconsolidation de la mémoire (Yan et al., 2013). Le blocage des récepteurs dopaminergiques D3 altère la reconsolidation de la mémoire dans le test de préférence de place à la cocaïne (Yan et al., 2013). D'autre part, le blocage des récepteurs dopaminergique D1 et D2 par des antagonistes au niveau de l'amygdale basolatérale inhibe la déstabilisation de la mémoire, suggérant que la transmission dopaminergique est indispensable pour déstabiliser la mémoire appétitive (Merlo et al., 2015).

5.3 Acétylcholine :

L'acétylcholine n'est pas uniquement un neurotransmetteur mais également un neuromodulateur du système nerveux qui joue un rôle important dans les fonctions cognitives (Picciotto et al., 2012). Les neurones produisant l'acétylcholine sont principalement localisés dans le proencéphale basal comprenant le noyau basal de Meynert (NBM), les bras verticaux et

horizontaux de la bande diagonale de Broca et le noyau septal médian (NSM). Ces neurones cholinergiques projettent dans les structures limbiques (cortex cingulaire, cortex entorhinal, hippocampe, amygdale et bulbe olfactif) (Newman et al., 2012). L'acétylcholine agit sur deux types de récepteurs cholinergiques : les récepteurs nicotiniques et les récepteurs muscariniques. Les récepteurs nicotiniques sont des canaux ioniques cationiques excitateurs ; l'activation de ces récepteurs induit une dépolarisation de la membrane (Albuquerque et al., 2009). Ces récepteurs sont composés de cinq sous unités dont la combinaison détermine les caractéristiques pharmacologiques et physiologiques du sous-type de récepteur (Dineley et al., 2015, Haam and Yakel, 2017). Les récepteurs muscariniques sont composés de 5 sous-types de M1 jusqu'à M5. M1, M3 et M5 sont des récepteurs couplés à la protéine G_q excitatrice (Haam and Yakel, 2017). Au contraire, les récepteurs M2 et M4 sont couplés à la protéine $G_{i/o}$ inhibitrice (Akam et al., 2001). Les récepteurs cholinergiques sont localisés dans les domaines pré et post-synaptiques.

La transmission cholinergique est impliquée dans la mémoire épisodique (von Linstow Roloff et al., 2007, Haam and Yakel, 2017). Le blocage des récepteurs cholinergiques muscariniques par un antagoniste (scopolamine) inhibe l'encodage de la mémoire mais pas la consolidation (Green et al., 2005, Newman and Gold, 2016, Haam and Yakel, 2017). L'augmentation de l'acétylcholine par l'administration de la physostigmine, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, inhibe la consolidation et le rappel de la mémoire chez les rongeurs et chez l'Homme (Rogers and Kesner, 2003, Gais and Born, 2004, Kukulja et al., 2009, Haam and Yakel, 2017). L'inhibition de la synthèse cholinergique par l'hémicholinium-3 (HC-3), un inhibiteur de la recapture de l'acétylcholine, perturbe les premiers stades de la consolidation de la mémoire (Boccia et al., 2004). Cette drogue HC-3 inhibe également la reconsolidation de la mémoire (Blake et al., 2014). Son administration par voie intracérébroventriculaire immédiatement après la réactivation altère la mémoire (Boccia et al., 2004).

5.4 Glucocorticoïdes :

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol qui sont synthétisées par les glandes corticosurrénales et produites dans les conditions de stress. Les glucocorticoïdes exercent leur fonction via des récepteurs intracellulaires : le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (Reul and de Kloet, 1985, De Kloet et al., 1998).

Dans le cerveau, l'expression des récepteurs MR est confinée au niveau du système limbique notamment dans l'hippocampe, l'amygdale, le septum et l'hypothalamus. Par contre les récepteurs GR sont présents en forte densité dans l'hippocampe (De Kloet et al., 1998).

Le stress et les glucocorticoïdes sont de puissants modulateurs de l'activité neuronale. De nombreuses données ont montré qu'une élévation du taux de glucocorticoïdes, comme lors d'un stress, altère la LTP (Diamond et al., 1992, Pavlides et al., 1993, Diamond and Rose, 1994). Par contre, un faible taux de glucocorticoïdes facilite ce type de plasticité (Diamond et al., 1992, Pavlides et al., 1994).

Il a été démontré que l'administration des glucocorticoïdes ou des ligands synthétiques des récepteurs GR avant ou après l'apprentissage renforce la consolidation de la mémoire chez l'Homme et chez le rat (de Quervain et al., 2009, Wolf, 2009, de Quervain et al., 2017). L'administration des glucocorticoïdes en dose modérée améliore la mémoire, mais à des doses faibles ou fortes, l'effet devient inhibiteur (Roosendaal and McGaugh, 1997, Andreano and Cahill, 2006, de Quervain et al., 2017).

L'effet des glucocorticoïdes sur la reconsolidation est débattu (de Quervain et al., 2017). Certaines études ont montré que l'activation des récepteurs GR renforce la reconsolidation de la mémoire (Bos et al., 2014), contrairement à d'autres études qui ont montré que leur activation inhibe la reconsolidation de la mémoire (Schwabe and Wolf, 2010). En plus des effets sur la consolidation et la reconsolidation, les glucocorticoïdes agissent également sur l'extinction. L'extinction de la mémoire est facilitée en administrant les glucocorticoïdes et inhibée en bloquant les voies de signalisation de leurs récepteurs (Barrett and Gonzalez-Lima, 2004, Blundell et al., 2011, de Quervain et al., 2017).

5.5 Neuropeptides :

Les neuropeptides jouent un rôle important dans la modulation de la mémoire. Parmi ces neuropeptides nous pouvons citer les opioïdes qui se lient à plusieurs sous-types de récepteurs couplés à la protéine Gi/o. L'activation des récepteurs mu opioïdes par exemple, affecte la transmission synaptique au niveau du CA1 de l'hippocampe et inhibe la mémoire spatiale (Wagner et al., 2001, Pu et al., 2002). Au niveau de cette région hippocampique, les récepteurs mu opioïdes sont localisés sur des interneurons inhibiteurs (Drake and Milner, 2002). L'activation de ces récepteurs au niveau de ces interneurons induit l'hyperpolarisation de ces cellules et inhibe la libération du GABA (Lupica, 1995) .

La substance P et la neurotensine sont d'autres exemples de neuropeptides qui, en agissant sur leurs récepteurs respectivement neurokinine et neurotensine, jouent un rôle positif sur la mémoire (Lenard et al., 2017).

Il existe plusieurs autres neuropeptides qui interviennent dans la modulation de la mémoire parmi lesquels la nociceptine qui va nous intéresser au cours de notre étude.

B) Le système nociceptinergique :

L'utilisation des approches de la biologie moléculaire a mené à des découvertes extraordinaires dans la compréhension des actions des opioïdes. Immédiatement après le clonage des trois sous-types de récepteurs aux opioïdes delta, kappa et mu, un quatrième récepteur a été cloné. Ce récepteur présente une forte homologie avec les récepteurs classiques aux opioïdes cités ci-dessus (50% d'homologie approximative avec 80% d'homologie des régions transmembranaires) (Mogil and Pasternak, 2001). Il était difficile de caractériser ces récepteurs nouvellement clonés et ils ont été nommés alors récepteurs orphelins. Des études ont montré une relation structurale étroite entre ce récepteur nouvellement cloné et les récepteurs kappa opioïdes (Mogil and Pasternak, 2001).

1) Le récepteur de la nociceptine (NOP) :

Le récepteur NOP a été cloné à partir de plusieurs espèces dans différents laboratoires. Il s'agit d'un récepteur couplé à une protéine G, typiquement à sept domaines transmembranaires (Figure 18). Ce récepteur présente une particularité qu'on ne retrouve que dans le récepteur kappa opioïde, à savoir que près du tiers des acides aminés qui composent sa seconde boucle extracellulaire sont de type acide (Toll et al., 2016). A l'époque, le récepteur a été appelé ORL1 pour opioid receptor-like 1 (Mollereau et al., 1994).

Une construction codant pour ORL1 a été transfectée dans des cellules CHO et l'activation de ce récepteur par l'étorphine, ligand universel des récepteurs des opiacés, a entraîné une inhibition de l'adénylyl cyclase, un effet réversé par la diprénorphine, antagoniste universel de cette même famille. Mais l'étude pharmacologique réalisée à l'aide de substances opiacées endogènes ou synthétiques sur ces cellules transfectées a permis de montrer que ORL1 n'est pas un récepteur des opiacés classique et que son profil pharmacologique restait à déterminer.

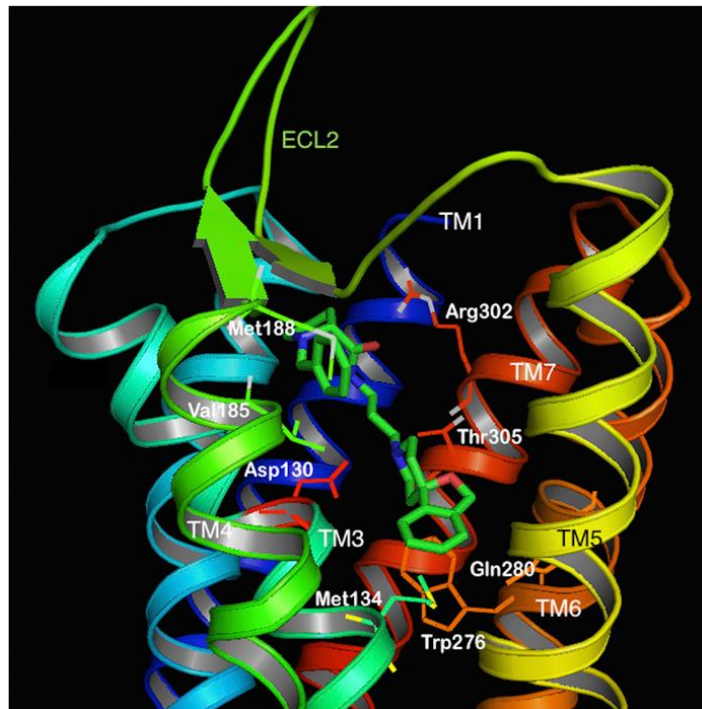


Figure 18 : Modèle moléculaire du récepteur NOP lié à un antagoniste C-24 (en vert). Les hélices transmembranaires sont colorées de sept couleurs différentes et sont nommées TM. La seconde boucle extracellulaire est située entre les hélices TM4 et TM5 et colorée en vert (Toll et al., 2016).

2) Le neuropeptide nociceptine/orphanine FQ :

Le fait que le récepteur ORL1, maintenant appelé NOP, soit structurellement apparenté aux récepteurs des opiacés, eux-mêmes récepteurs de neuropeptides, et que ce récepteur possède un domaine acide analogue à celui qui dans le récepteur de type kappa fixe la dynorphine A, a orienté les chercheurs vers une suggestion que le ligand endogène du récepteur orphelin ORL1 soit un peptide au caractère basique marqué. Suite à ces hypothèses, un extrait d'une vingtaine (environ 35 g) de cerveaux de rat a permis d'isoler une substance ayant la propriété d'inhiber l'adénylyl cyclase dans la lignée CHO qui exprime le récepteur (Meunier et al., 1995). En accord avec l'hypothèse de départ, cette substance est un peptide dont la séquence de 17 acides aminés montre des analogies avec celle de la dynorphine A (Figure 19).

Cet heptadécapeptide est un très fort agoniste du récepteur NOP. En effet, dans la lignée CHO transfectée, la fixation du ligand sur son récepteur inhibe l'adénylyl cyclase à des concentrations proches de 10^{-9} mol/l. Par contre, aucun effet n'est observé dans la lignée cellulaire « sauvage » et un faible effet dans des lignées CHO recombinantes exprimant l'un des trois types de récepteur des opiacés. *In vivo* et chez la souris, ce peptide injecté par voie i.c.v. diminue de

manière très significative le temps de réaction (redressement, saut) des animaux à un stimulus nociceptif (épreuve de la plaque chaude). C'est à partir de cette action hyperalgésiante que cette molécule a été nommée « nociceptine ». Une autre équipe a isolé le même neuropeptide à partir d'extraits d'hypothalamus de porc (Reinscheid et al., 1995). Lors de leur étude, ces auteurs ont montré que le peptide, administré par voie i.c.v. chez la souris, diminue significativement le délai de retrait de la queue dans ce test nociceptif. La dénomination « orphanine FQ » fait référence à la présence en position N- et C- terminale de résidus phénylalanine (F) et glutamine (Q) respectivement. La différence clé entre N/OFQ et les peptides opioïdes endogènes se présente au niveau du résidu phénylalanine au niveau N-terminal qui chez ces derniers est remplacé par une tyrosine (Y) caractéristique du motif signature de ces opioïdes « YGGF ». La N/OFQ est dérivée d'un polypeptide précurseur, la prépro-orphanineFQ (ppN/OFQ). Ce polypeptide codé par un gène proche de celui des précurseurs des peptides opioïdes est clivé par plusieurs peptidases pour donner naissance à N/OFQ (Mollereau et al., 1996).

β -endorphine	YGGFMTSEK KS Q TPL VTL LF KNAI IKNVHKKGQ
Met-enképhaline	YGGFM
Leu-enképhaline	YGGFL
α -néoendorphine	YGGFLRKYPK
dynorphine	YGGFLRRIRPKL KWDN Q
nociceptine	FGGFTGARKSAR KL AN Q

Figure 19 : Comparaison des séquences de la nociceptine et de quelques peptides opioïdes endogènes. Les acides aminés en rouge sont communs à la nociceptine et, respectivement, aux cinq peptides opioïdes dont la β -endorphine et la dynorphine (Revue mini/synthèse, 1996).

3) Transduction du signal :

L'activation des récepteurs par le ligand active les protéines $G_{ai(1-3)}$ et α_0 sensibles à la toxine pertussique. Cette activation induit une inhibition de la synthèse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par l'adénylate cyclase. Les récepteurs NOP sont aussi couplés aux canaux Ca^{2+} et K^+ via la sous unité $G_{\beta\gamma}$. Ces sous unités augmentent l'ouverture des canaux potassiques (canaux GIRK) et favorisent la sortie du potassium (Figure 20). La conductance potassique qui en résulte induit l'hyperpolarisation du neurone. D'autre part, l'activation des récepteurs NOP induit la réduction de flux du Ca^{2+} en inhibant les canaux

calciques voltage-dépendants de type T (low voltage activated), L, N et P (high voltage activated) ce qui conduit à l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs. L'activation des récepteurs NOP peut aussi induire l'activation des phospholipases A2 et C (Toll et al., 2016).

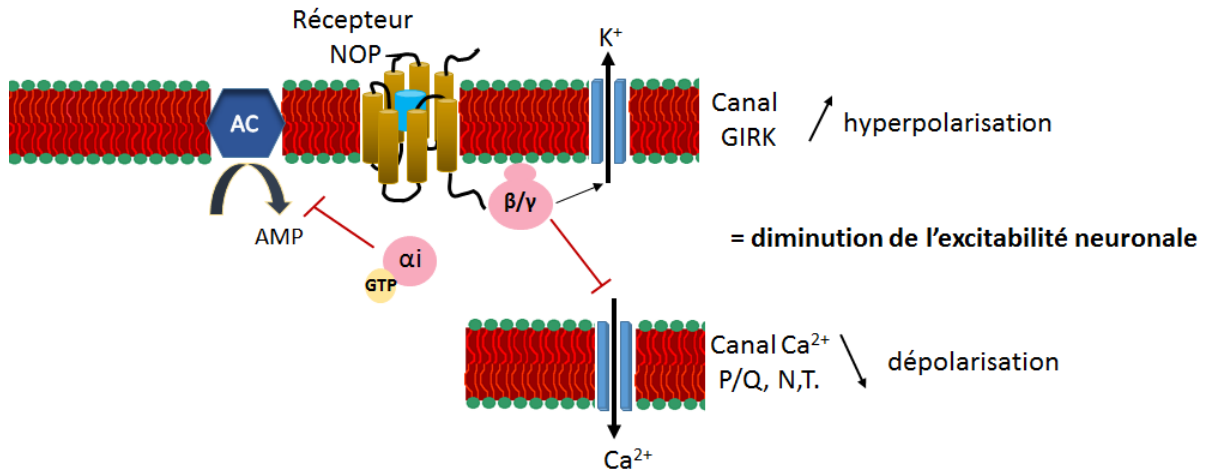


Figure 20 : Représentation schématique de la transduction du signal du complexe nociceptine/NOP.

4) Action électrophysiologique des récepteurs NOP et effets sur la libération des neurotransmetteurs centraux :

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les récepteurs NOP sont couplés à des canaux calciques voltage dépendants et à des canaux potassiques induisant un effet inhibiteur sur le neurone. N/OFQ induit par exemple un effet inhibiteur sur les canaux calciques de type N présents sur les neurones de la racine dorsale de la moelle épinière. Cette suppression inhibe donc la transmission de l'information douloureuse depuis la périphérie vers la moelle épinière (Abdulla and Smith, 1998, Beedle et al., 2004, Murali et al., 2012). D'autre part, cet effet inhibiteur sur la conductance calcique et d'hyperpolarisation post-synaptique entraîne aussi un blocage des phénomènes de plasticité synaptique dans de nombreuses régions du système nerveux central et notamment au niveau du circuit tri-synaptique de l'hippocampe (Manabe et al., 1998, Yu and Xie, 1998, Wei and Xie, 1999, Bongsebandhu-Phubhakdi and Manabe, 2007).

L'inhibition de la conductance calcique voltage-dépendante par les récepteurs NOP a un effet immédiat de réduction de la libération des neurotransmetteurs. L'activation des récepteurs NOP induit notamment une diminution de la libération des monoamines. Par exemple le traitement par N/OFQ a un effet inhibiteur sur la libération de NA sur des coupes corticales, dans le cervelet, l'hippocampe et l'hypothalamus (Siniscalchi et al., 1999, Werthwein et al., 1999, Schlicker and Morari, 2000, Lu et al., 2010). L'activation de ces récepteurs induit également une diminution de la libération de dopamine sur des coupes

striatales, dans le noyau accumbens et l'aire tegmentale ventrale in vivo évaluée par microdialyse (Murphy et al., 1996, Vazquez-DeRose et al., 2013). La régulation de la dopamine extracellulaire par la nociceptine suggère l'implication des récepteurs NOP dans la régulation des propriétés renforçantes de la cocaïne (Murphy and Maidment, 1999, Vazquez-DeRose et al., 2013). L'activation des récepteurs NOP a aussi un effet inhibiteur sur la libération de sérotonine (Siniscalchi et al., 1999, Fantin et al., 2007, Nazzaro et al., 2010). Ces récepteurs ont également un rôle dans la modulation de la libération de l'acétylcholine dans les circuits cholinergiques (Uezu et al., 2005, Hiramatsu et al., 2008).

Les récepteurs NOP régulent aussi la libération du glutamate dans les neurones corticaux chez le rat (Bianchi et al., 2004, Lu et al., 2010). D'autres études ont montré le rôle des récepteurs NOP dans la modulation de la libération du GABA et du glutamate dans l'amygdale latérale et le cortex cérébral. Ces effets sur la libération des neurotransmetteurs ont un impact sur l'apprentissage et la mémoire via la LTP et la LTD dans l'hippocampe (Toll et al., 2016).

5) Fonctions biologiques du système nociceptinergique :

Le récepteur NOP est exprimé de nombreuses régions du cerveau comme les aires corticales, les régions olfactives, l'hypothalamus et les structures limbiques, notamment l'hippocampe et l'amygdale. Cette large distribution anatomique suggère un large spectre d'action de N/OFQ et la régulation d'un grand nombre de fonctions biologiques.

5.1 Nociception :

Dès la découverte du peptide, il a été démontré que l'administration de N/OFQ par voie i.c.v chez la souris induit une diminution de la latence dans le test de la plaque chaude suggérant que le système augmente la sensibilité douloureuse et induit un effet nociceptif. La nociceptine bloque l'effet antinociceptif des récepteurs opioïdes d'où la notion d'action anti-opioïde. Cet effet est médié par l'activation des récepteurs au niveau de la substance grise périaqueducule (PAG). Il existe en fait plusieurs régions impliquées dans la transmission de l'information nociceptive exprimant le système nociceptinergique. Selon les régions, la nociceptine exerce un effet antinociceptif (niveau spinal) et pronociceptif anti-opioïde (niveau supraspinal) (Toll et al., 2016). Une injection systémique d'agoniste NOP induit des effets variables selon le type de douleur testée, avec un effet principalement analgésique dans les modèles de douleur chronique (Kiguchi et al., 2016).

5.2 Locomotion et motricité :

Le système nociceptinergique est exprimé dans les circuits impliqués dans la motricité. Il est exprimé notamment au niveau du cortex moteur, du tronc cérébral ainsi que de la moelle épinière. La nociceptine exerce un effet inhibiteur sur la locomotion chez la souris et chez le rat mais uniquement à forte dose (Higgins et al., 2001, Kuzmin et al., 2004). La N/OFQ perturbe aussi la coordination motrice (Marti et al., 2009). Le blocage des récepteurs NOP ou leur délétion n'induisent pas d'effet chez des animaux sains mais diminuent l'hypokinésie chez les modèles de la maladie de Parkinson (Marti et al., 2005, Viaro et al., 2008).

5.3 Prise alimentaire :

Le système N/OFQ-NOP est exprimé dans les centres du contrôle de la prise alimentaire notamment dans les noyaux hypothalamiques, parabrachiaux et du tractus solitaire. La nociceptine augmente la prise alimentaire en inhibant les effets anorexigènes soit des neurones à ocytocine (Olszewski and Levine, 2004) soit des neurones exprimant les récepteurs à la leptine au niveau du noyau paraventriculaire hypothalamique (Chee et al., 2011)

5.4 Motivation et récompense :

Le système N/OFQ est également présent dans les structures limbiques et dans les voies dopaminergiques notamment l'hippocampe, le noyau accumbens, le cortex cingulaire, les corps mamillaires, l'amygdale. Cette présence au niveau de ces structures explique l'implication du système dans la régulation des comportements motivés par la récompense. Ainsi, l'activation du système diminue la préférence de place conditionnée à l'alcool et aux drogues d'abus notamment la morphine et la cocaïne (Toll et al., 2016).

5.5 Anxiété et dépression :

La localisation du système nociceptinergique au niveau des noyaux sérotoninergique, noradrénergique et dopaminergique comme le raphé, le locus coeruleus, l'aire tegmentale ventrale expliquent son implication dans l'anxiété et la dépression. Les études sont contradictoires quant à un effet anxiolytique. En effet, certaines études montrent que la nociceptine est anxiolytique (Jenck et al., 2000, Dautzenberg et al., 2001), contrairement à d'autres qui ont montré un effet anxiolytique et antidépresseur **des antagonistes** des récepteurs NOP (Redrobe et al., 2002, Gavioli et al., 2004, Duzzioni et al., 2011). Le système nociceptinergique exerce donc des effets complexes sur l'anxiété et la dépression qui résultent de sa régulation de la libération de divers neuromodulateurs (monoamines, CRH) dans différentes régions du cerveau (BNST, hypothalamus...) (Gavioli and Calo, 2006).

5.6 Système nociceptinergique et mémoire :

Le système nociceptinergique est exprimé dans plusieurs régions du cerveau notamment les régions impliquées dans la mémoire. Plusieurs études ont étudié l'effet du système nociceptinergique sur différents types de mémoire. En termes de mémoire spatiale, l'administration de la nociceptine par voie locale dans l'hippocampe ou d'un agoniste (Ro64-6198) par voie intrapéritonéale induit une diminution des performances d'apprentissage (Sandin et al., 1997, Redrobe et al., 2000, Higgins et al., 2002, Sandin et al., 2004, Kuzmin et al., 2009). L'effet inhibiteur du système nociceptinergique sur l'acquisition est également observé sur la consolidation de la mémoire spatiale car l'injection d'un agoniste du récepteur NOP diminue le temps passé dans le quadrant cible (Higgins et al., 2002). En ce qui concerne la mémoire contextuelle, plusieurs études ont été réalisées dans le but d'évaluer l'effet de l'agoniste NOP sur la mémoire hippocampo-dépendante contextuelle. Il a été montré que Ro64-6198 perturbe l'apprentissage dans le test du conditionnement de peur contextuelle mais aucun effet inhibiteur n'est observé sur l'apprentissage dans le test du conditionnement de peur au son (Fornari et al., 2008, Goeldner et al., 2009). Cet effet inhibiteur est également observé sur la consolidation dans les tests de conditionnement à la peur contextuelle et d'évitement passif (Hiramatsu and Inoue, 2000, Roozendaal et al., 2007, Andero et al., 2013). Dans le test de conditionnement de peur, deux types de mémoires peuvent être testées : la mémoire contextuelle (contexte) et la mémoire non contextuelle (son). L'effet du système nociceptinergique a été étudié dans la tâche « au son » et des résultats contradictoires ont été décrits. Mamiya et al (2003) ont montré que l'injection de N/OFQ en i.c.v. immédiatement après l'apprentissage perturbe la consolidation de la mémoire contextuelle mais pas la mémoire au son (Mamiya et al., 2003). Des résultats similaires ont été retrouvés par Fornari et collaborateurs sur l'absence de l'effet de N/OFQ sur la mémoire au son. Inversement, un effet inhibiteur de l'agoniste SR-8993 a été observé sur l'apprentissage dans le test du conditionnement de peur au son. De plus, l'administration de SR-8993 avant ou après le conditionnement perturbe la mémoire au son chez la souris (Andero et al., 2013). L'injection locale de l'agoniste au niveau de l'amygdale induit le même effet.

L'effet inhibiteur du système nociceptinergique a été retrouvé sur la mémoire de reconnaissance puisque l'injection de la nociceptine par voie i.c.v ou de l'agoniste Ro64-6198 par voie i.p. inhibe la mémoire dans le test de reconnaissance d'objet (Goeldner et al., 2008).

Toutes ces études ont mis en évidence l'effet inhibiteur de l'activation du récepteur NOP par son agoniste sur l'acquisition et sur la consolidation de la mémoire dans différents types de tests hippocampo-dépendants ou non.

6) Ligands du récepteur NOP:

6.1 Les ligands peptidiques :

6.1.1 Les agonistes totaux :

N/OFQ (1-13)-NH₂ : Cette molécule tronquée maintient une activité équivalente à celle du peptide endogène in vivo et in vitro. L'amidation en C-terminal du peptide augmente la puissance de la molécule in vivo et in vitro en réduisant l'accessibilité aux carboxypeptidases (Calo et al., 2000a).

UFP-112 : Ce peptide a été obtenu par des modifications chimiques qui ont généré le peptide [(pF)Phe⁴ Aib⁷ Arg¹⁴Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-112) (Rizzi et al., 2007). UFP112 est un agoniste total des récepteurs NOP et il est 100 plus puissant et plus stable que le ligand N/OFQ.

PWT-N/OFQ : Ce peptide est dérivé du N/OFQ et existe en trois formes : PWT1, PWT2, PWT3 (Guerrini et al., 2014). Il s'agit d'un peptide avec une forte affinité et 40 fois plus puissant que le ligand N/OFQ. PWT a une durée d'action plus longue que celle du N/OFQ, cette durée est de 24 heures pour PWT tandis que celle de N/OFQ est d'environ une heure (Toll et al., 2016).

6.1.2 Les agonistes partiels :

[F/G]N/OFQ(1-13)-NH₂ : La modification de la liaison Phe¹-Gly² de N/OFQ aboutit à l'obtention de l'agoniste partiel [F/G]N/OFQ(1-13)-NH₂. Il était initialement considéré comme un antagoniste car il a un effet bloquant de la bradycardie et de l'hypotension induite par N/OFQ (Madeddu et al., 1999). [F/G]N/OFQ(1-13)-NH₂ est en fait un agoniste de faible efficacité dans certains systèmes puisqu'il mime par exemple l'effet pronociceptif de N/OFQ (Calo' et al., 1998).

UFP-113 : Les modifications chimiques [(pF)Phe⁴], [Aib⁷], et [Arg¹⁴Lys¹⁵] ont été combinées avec [F/G] pour générer l'UFP-113 (Arduin et al., 2007). Ce peptide est 100 fois moins efficace que N/OFQ et a une durée d'action plus longue (Toll et al., 2016).

6.1.3 Les antagonistes :

[Nphe¹]N/OFQ(1-13)-NH₂ : Il s'agit du premier peptide antagoniste qui a été décrit dans la littérature. Ce ligand se lie d'une manière sélective aux récepteurs NOP recombinants et reverse l'effet inhibiteur de N/OFQ sur la production d'AMPC (Calo et al., 2000b).

UFP-101 : Les modifications chimiques de [Nphe¹] et [Arg¹⁴Lys¹⁵] sont combinées pour générer l'UFP-101 (Calo et al., 2002). Cet antagoniste est 10 fois plus puissant que [Nphe¹]N/OFQ(1–13)-NH₂. Ce peptide reverse plusieurs actions biologiques de N/OFQ sur l'activité locomotrice, la prise alimentaire, la transmission de la douleur et l'anxiété (Calo et al., 2005).

6.2 Les ligands non peptidiques :

6.2.1 Les agonistes (Figure 21)

Ro 64-6198 : Dans les laboratoires Roche, les études chimiques ont mené à l'identification de [(1S,3aS-8-(2,3,3a,4,5,6-hexahydro-1H-phenalen-1-yl)-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one] ou composé Ro 64-6198 qui est un agoniste puissant et sélectif du récepteur NOP (Wichmann et al., 2000). Ce composé a été utilisé dans plusieurs expériences pour étudier l'anxiété, la douleur, l'abus aux drogues et aussi la mémoire et l'hypothermie (Shoblock, 2007).

Ro 65-6570 : Dans ce même laboratoire, un autre composé a été identifié ; 8-(1,2-dihydroacénaphthylén-1-yl)-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-one ou Ro 65-6570 (Wichmann et al., 1999). Ce composé a une très forte affinité pour le récepteur NOP et un facteur de sélectivité supérieur à 10 vis-à-vis des récepteurs aux opioïdes. Le Ro 65-6570 présente globalement les mêmes effets que le Ro 64-6198 (Byford et al., 2007, Rutten et al., 2010).

AT-403 : Ce composé a récemment été décrit par Ferrari et al en 2017. Il s'agit d'un ligand qui est plus affiné que les composés Ro mais surtout beaucoup plus sélectif (facteur de sélectivité supérieur à 100 pour le récepteur NOP par rapport aux récepteurs opioïdes classiques).

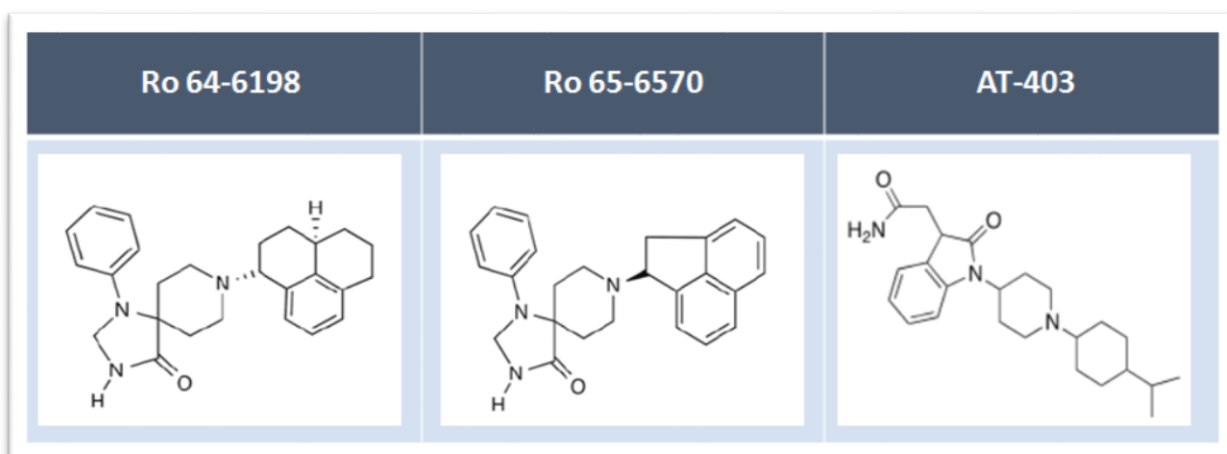


Figure 21 : Structure chimique des agonistes du récepteur NOP

6.2.2 Les antagonistes (Figure 22) :

J-113397 : Cette molécule (1-[(3R, 4R)-1-cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one) a été identifiée par les chercheurs de Banyu comme le premier antagoniste sélectif non peptidique des récepteurs NOP (Kawamoto et al., 1999). Cet antagoniste se lie avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. Cette molécule est un antagoniste compétitif avec une forte sélectivité pour les récepteurs NOP qui est de l'ordre de 150 (Ozaki et al., 2000). Ce composé est capable d'antagoniser les effets de la N/OFQ sur des préparations isolées de moelle épinière et de muscles lisses (Bigoni et al., 2000, Yamada et al., 2003).

SB-612111 : Il s'agit d'une molécule qui a été identifiée par les chercheurs de Smithkline Beecham comme un nouvel antagoniste sélectif du récepteur NOP (-cis-1-Méthyl-7-[[4-(2,6-dichlorophenyl) piperidin-1-yl]methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ol). Cet antagoniste a une affinité qui est subnanomolaire et il a une forte sélectivité par rapport aux récepteurs opioïdes classiques (environ 150). Ce composé est plus affiné et plus sélectif que le J-113397 et est 3 fois plus puissant (Spagnolo et al., 2007). Le SB-612111 antagonise la N/OFQ in vivo et bloque ses effets cellulaires (Chee et al., 2011).

C-24 : Cet antagoniste a été développé en 2006 par les chercheurs de Banyu : 1-benzyl-N-[3-[spiroisobenzofuran-1(3H), 4'-piperidin-1-yl]propyl] pyrrolidine-2-carboxamide. Il s'agit d'une molécule qui a une très forte affinité pour les récepteurs NOP avec une sélectivité très forte et inhibe les effets de la N/OFQ à des doses subnanomolaires (Goto et al., 2006). Cette caractéristique a été confirmée par des études ex vivo sur des préparations de muscles lisses (Fischetti et al., 2009).

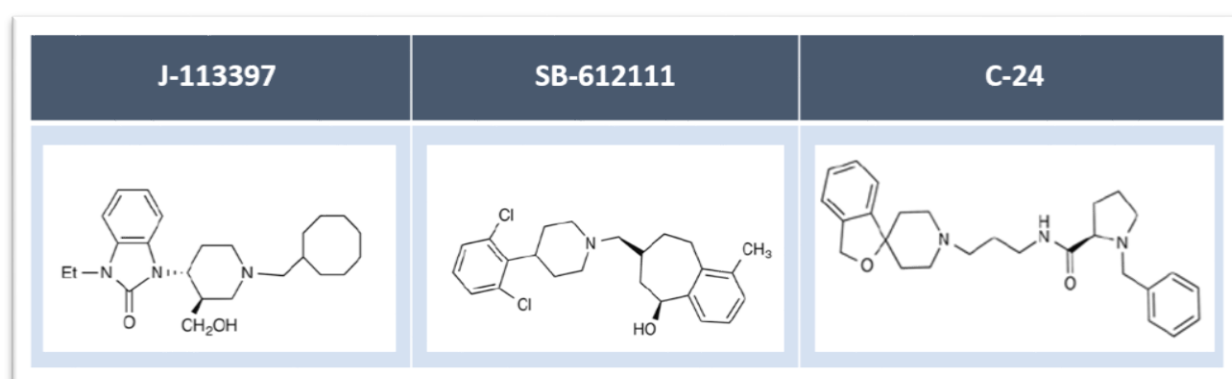


Figure 22 : Structure chimique des antagonistes du récepteur NOP

C) Les altérations de la mémoire :

1) Le vieillissement :

1.1 Généralité :

Le vieillissement est défini comme un processus graduel et irréversible de l'ensemble des fonctions physiologiques et psychologiques qui modifient la structure et les fonctions de l'organisme à partir de l'âge mûr (OMS). Ce processus lent et progressif se caractérise par une augmentation de la variabilité interindividuelle rendant parfois difficile la distinction entre vieillissement normal et vieillissement pathologique. Le cerveau est particulièrement sensible aux effets du vieillissement. Parmi les atteintes cérébrales liées au vieillissement, la mémoire est particulièrement touchée. Ce déficit serait la résultante d'altérations multiples aboutissant à une perturbation du fonctionnement hippocampique, principal substrat neurobiologique de la mémoire. Les techniques modernes de neuroimagerie sont de plus en plus utilisées pour comprendre les bases cérébrales de l'altération cognitive dans le vieillissement (Nyberg, 2017). Elles ont montré que durant le vieillissement normal le cerveau subit des altérations dans de nombreuses régions mais aussi une réorganisation des connections corticales (O'Sullivan et al., 2001, Koch et al., 2010, Wu et al., 2011, Zhu et al., 2012, Li et al., 2013). L'hippocampe représentant le médiateur principal de l'apprentissage et de la mémoire ainsi que le cortex préfrontal qui est le substrat anatomique des fonctions exécutives sont altérés au cours du vieillissement. Ces deux structures présentent une atrophie qui a été mise en évidence par la technique d'imagerie volumétrique en IRM structurale (Raz et al., 2005). De nombreuses autres altérations anatomiques et physiologiques ont été caractérisées au niveau de l'hippocampe au cours du vieillissement contribuant au déclin cognitif. Parmi ces altérations citons la diminution du volume de cette structure associée à une raréfaction vasculaire, la diminution du soutien trophique, l'augmentation du stress oxydatif ainsi que de l'inflammation, la diminution du métabolisme et de l'utilisation du glucose, la dérégulation de la synthèse des protéines et de la synthèse et de la libération de neurotransmetteurs (Sonntag et al., 1999, Calabrese et al., 2004, Paz Gavilan et al., 2006, Erickson et al., 2010, VanGuilder et al., 2011, VanGuilder and Freeman, 2011). Le déclin cognitif observé au cours du vieillissement est accompagné par un dysfonctionnement synaptique mis en évidence par la neurochimie, la morphologie et l'électrophysiologie au niveau de l'hippocampe (Boric et al., 2008, Sierra-Mercado et al., 2008, VanGuilder and Freeman, 2011). Des études électrophysiologiques ont montré qu'au cours du

vieillesse, il y a un déficit de maintien de la LTP (Barnes, 1979, Barnes and McNaughton, 1985, Foster, 1999).

Sur le plan cellulaire, au cours du vieillissement les cellules de lieu chez les sujets âgés sont moins stables lors d'expositions répétées à un même environnement et moins flexibles lorsque des modifications de l'environnement entraînent une refonte de la cartographie chez les animaux jeunes (Wilson et al., 2006). Des rats jeunes placés dans deux environnements différents, encodent rapidement un patron de décharge spécifique de chaque environnement (*pattern separation*), contrairement aux animaux âgés qui conservent des patrons de décharges similaires dans les deux environnements, ce qui traduirait une altération du mécanisme de « *pattern separation* » au profit de celui de « *pattern completion* » (Wilson et al 2006). Au niveau morphologique, le vieillissement se caractérise par une modification de la densité des synapses et des épines dendritiques. En effet une étude a montré que le cerveau du rat âgé présente une diminution de 27% du nombre de synapses axodendritiques en comparaison avec des rats jeunes (von Bohlen und Halbach, 2009). Une autre étude a prouvé que des problèmes liés à la mémoire spatiale seraient en lien avec la réduction des synapses entre cellules granulaires du DG et voie perforante (Geinisman et al., 1986). A l'échelle moléculaire, il a été montré que le sujet âgé présente une forte perturbation de l'homéostasie calcique. En effet, une altération du calcium cytosolique PKA dépendant et indépendant a été observée chez les souris âgées ayant des problèmes de mémoire spatiale par rapports à des souris adultes (Pascale et al., 1998). D'autre part, il y a une diminution des canaux calciques de type L qui est responsable de l'augmentation de l'hyperpolarisation. Cette perturbation est suivie d'une diminution de l'expression de protéines dont l'activité est régulée par le calcium comme la CaMKII (Zhang et al 2009), ou l'adénylate cyclase. CREB qui est un autre facteur en aval du Ca^{2+} est aussi affecté au cours du vieillissement. En effet des études ont montré que l'expression de CREB diminue chez des rats âgés (Brightwell et al., 2004). Ces résultats sont observés dans une autre étude chez la souris qui a montré une diminution de la protéine CREB sous sa forme phosphorylée corrélée avec les faibles performances dans le test de la piscine de Morris (Porte et al., 2008). L'altération de cette protéine touche les autres protéines dont l'expression est régulée par CREB et qui sont impliquées dans la consolidation de la mémoire comme l'expression de la protéine Fos régulée par CREB qui est diminuée. Cette altération d'expression de protéines est également observée avec d'autres facteurs situés cette fois-ci en amont comme le BDNF ou c/EBP (Monti et al., 2005).

Au niveau comportemental, comme chez l'homme, les souris âgées présentent des problèmes moteurs (Barreto et al., 2010) et des problèmes d'anxiété (Bedrosian et al., 2011).

En termes de mémoire les souris âgées montrent des déficits dans des tests de mémoire spatiale de déplacement d'objets mais pas lors d'un test de reconnaissance d'objet indiquant que le vieillissement touche préférentiellement les mémoires dépendantes de l'hippocampe (Wimmer et al., 2012). Le tableau ci-dessous résume les principaux déficits liés au vieillissement qui ont été observés dans le modèle murin.

Test comportemental	Références	Fond génétique	Sexe	Age (mois)	Performance comportementale
Locomotion	Benice <i>et al.</i> (2006)	C57/B16	M/F	3-4 10-12 24	Normale Normale Affectée
	Frye <i>et al.</i> (2008)	C57/B16	M	3 24	Normale Affectée
	Zhao <i>et al.</i> (2011)	C57/B16	F	4 20	Normale Affectée
	Fahlström <i>et al.</i> (2012)	C57/B16	M/F	4 22 28	Normale Normale Affectée
Anxiété élevée	Bedrosian <i>et al.</i> (2012)	C57/B16	M	7 29	Non Oui
	Frye <i>et al.</i> (2008)	C57/B16	M	3 24	Non Oui
	Fahlström <i>et al.</i> (2011, 2012)	C57/B16	M/F	4 22 28	Non Oui Oui
	Bisaz <i>et al.</i> (2013)	C57/B16	M	6-9 17-21	Non Oui
Mémoire non hippocampo-dépendante	Wimmer <i>et al.</i> (2011)	C57/B16	M	2-4 22-24	Normale Normale
	Fahlström <i>et al.</i> (2011, 2012)	C57/B16	M/F	4 22 28	Normale Normale Normale
	Fahlström <i>et al.</i> (2011)	C57/B16	F	3 8 28	Normale Normale Normale
	Benice <i>et al.</i> (2006)	C57/B16	M/F	3-4 10-12 18-20	Normale Normale Normale
	Mémoire hippocampo-	Wimmer <i>et al.</i> (2011)	C57/B16	M/F	2-4 22-24

dépendante: test d'objet déplacé	Benice <i>et al.</i> (2006)	C57/B16	M/F	3-4 10-12 18-20	Normale Normale Déficit
	Murai <i>et al.</i> (2007)	CD1	M	2 20	Normale Déficit
Mémoire hippocampo-dépendante: piscine de Morris	Holschneider <i>et al.</i> (1999)	C57/B16/129-sv	M	2 7 17	Normale Faible performance Faible performance
	Fu <i>et al.</i> (2014)	CD1	M	3 24	Normale Faible performance
	De Fiebre <i>et al.</i> (2006)	C57/B16	M	6 16 24	Normale Normale Faible performance
Flexibilité comportementale dans le test de piscine de Morris	Matzel <i>et al.</i> (2011)	CD1	M	5 18	Normale Déficit
	De Fiebre <i>et al.</i> (2006)	C57/B16	M	6 16 24	Normale Normale Déficit
	Holschneider <i>et al.</i> (1999)	C57/B16/129-sv	M	2 7 17	Normale Normale Déficit
Mémoire hippocampo-dépendante:	Kennard and Woodruff-Pak, (2011)	CB6F1	M	8 18 25	Normale Normale Normale
Conditionnement à la peur	Von Bohlen <i>et al.</i> (2006)	C57/B16	-	6-7 21-22	Normale Normale

Tableau 4 : Données de la littérature illustrant les problèmes comportementaux et cognitifs liés au vieillissement chez la souris (déficit : problèmes de mémoire, faible performance : problèmes d'apprentissage).

1.2 Le vieillissement accéléré : Progeria :

Les syndromes progéroïdes sont, pour la plupart, des maladies monogéniques, rares, héréditaires, caractérisées par le développement prématuré de signes et symptômes habituellement associés au vieillissement chronique. Comme la plupart des syndromes progéroïdes ne présentent habituellement qu'un nombre limité de caractéristiques du vieillissement prématuré, ils sont aussi appelés syndromes de la progeria segmentaire. Les caractéristiques cliniques des syndromes progéroïdes incluent le diabète sucré, les changements du volume du tissu adipeux, les changements pigmentaires avec hyper et hypopigmentation de la peau (poïkilodermie), la fibrose cutanée régionale, le vieillissement prématuré des cheveux ou la chute des cheveux, l'ostéoporose, les symptômes neurodégénératifs et les tumeurs typiques de celles observées chez les patients plus âgés. La plupart des syndromes progéroïdes

comprennent des défauts dans différents systèmes de réparation de l'ADN, tels que la réparation par excision de nucléotide, la réparation par excision de base et la réparation des cassures double brin (York Kamenich 2009).

Il existe plusieurs maladies de Progéria comme le syndrome de Werner, le syndrome de Bloom, le syndrome de Rothmund-Thomson, le syndrome de Hutchinson-Gilford, l'anémie de Fanconi et l'ataxie-télangiectasie, ainsi que le xeroderma pigmentosum, la trichothiodystrophie et le syndrome de Cockayne (York Kamenich 2009).

2) Mémoire traumatique et PTSD :

2.1 Généralités :

Les troubles de la mémoire font généralement référence à des amnésies. Une mémoire pathologique fait défaut suite par exemple à un traumatisme physique lié des lésions cérébrales, à un accident vasculaire cérébral, à une tumeur cérébrale, ou à des dégénérescences neuronales comme la maladie d'Alzheimer. A l'inverse, l'hypermnésie peut aussi constituer une forme de mémoire pathologique, comme la mémoire émotionnelle. En effet, quand celle-ci est trop prégnante, elle reflète un caractère pathologique et peut devenir envahissante et handicaper la vie du patient. Cette mémoire pathologique résulte de l'expérience d'un événement perçu comme traumatisant et menaçant la vie ou l'intégrité physique, entraînant le développement d'un trouble anxieux sévère appelé « trouble de stress post-traumatique » ou PTSD. Il s'agit d'un événement où l'individu est exposé à la mort, à des blessures graves, un viol, des combats, une catastrophe naturelle, un acte de terrorisme, ou encore un accident de route. La personne ayant développé un PTSD peut être victime directe de l'événement ou en avoir été témoin. Le patient PTSD présente 4 symptômes persistants qui sont l'intrusion, l'évitement, l'hypervigilance et les symptômes anhédoniques et dysphoriques (Jorge, 2015). **L'intrusion** représente la sensation de reviviscences persistantes, involontaires et répétées de l'événement traumatique. L'angoisse ressentie lors de l'expérience du traumatisme peut être de nouveau éprouvée au moment du souvenir. Le deuxième symptôme est l'**évitement**. L'individu tente d'éviter des situations et les facteurs déclencheurs (lieux, personnes) qui pourraient lui rappeler le traumatisme. En troisième lieu les patients souffrent d'**hypervigilance**. L'individu n'est plus capable de se concentrer et de mener à terme ses activités en plus d'un comportement agressif. Les symptômes **anhédoniques et dysphoriques** sont également observés chez les patients PTSD avec une anesthésie émotionnelle, un éloignement des autres, un désintérêt pour certaines activités.

Le PTSD se caractérise par une hypermnésie qui est involontaire pour certains stimuli liés au traumatisme et une amnésie déclarative pour un aspect important du traumatisme comme le contexte traumatique, nous parlons donc d'un profil mnésique paradoxal du PTSD (American Psychiatric Association, 2000, 2013, 1980) (Desmedt et al., 2015). Ce profil paradoxal résulte de l'augmentation de l'inhibition de l'hippocampe par l'amygdale. Une fonction altérée de l'hippocampe empêcherait alors la consolidation de la mémoire traumatique dans le système de mémoire déclarative. L'hyperactivation de l'amygdale avec le flux visuel dorsal et l'insula permettrait la consolidation d'une mémoire émotionnelle/sensorielle relativement inflexible liée au traumatisme (Desmedt et al., 2015) (Figure 23).

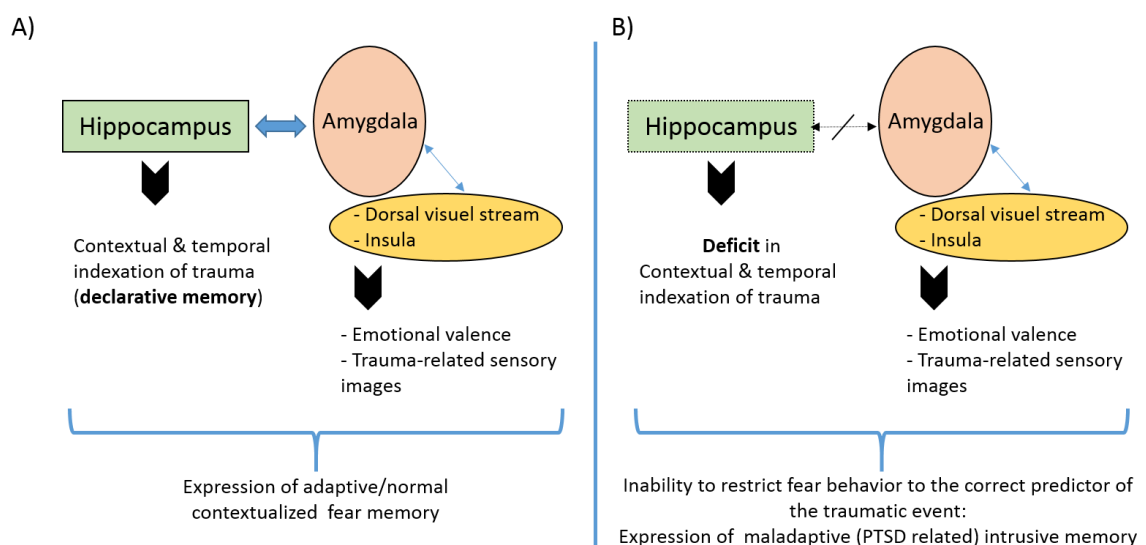


Figure 23 : Modèle schématique de la formation de la mémoire normale de peur et de la mémoire de peur liée au PTSD. A) situation « normale » avec une influence de la composante contextuelle hippocampo-dépendante sur la mémoire émotionnelle dépendante de l'amygdale. B) un déficit de la composante contextuelle hippocampo-dépendante associé au dysfonctionnement de l'interaction hippocampe-amygdale dans la formation de la mémoire liée au PTSD.

Le trauma et le stress sont deux facteurs qui induisent une dégénérescence synaptique et une atrophie neuronale au niveau hippocampique et entraînent au contraire des changements trophiques et une synaptogenèse dans l'amygdale (Popoli et al., 2011, Akiki et al., 2017b). Ces résultats précliniques observés chez l'animal sont accompagnés par une observation clinique d'une réduction du volume hippocampique chez les patients PTSD (Qi et al., 2013, Akiki et al., 2017b) ce que plusieurs meta-analyses ont confirmé (Karl et al., 2006). D'autre part, la synaptogenèse au niveau de l'amygdale observée en préclinique chez l'animal est caractérisée par une hyperactivité de l'amygdale chez les patients PTSD (Shin and Liberzon, 2010, Akiki et

al., 2017a). Des études d'imagerie fonctionnelle ont montré que les patients PTSD Afghans et Iraquiens ayant subi la guerre présentent une réduction du volume de l'hippocampe notamment au niveau des régions CA4 et DG. Cette réduction de volume est également observée au niveau du CA2/3 hippocampique (Hayes et al., 2017). Toujours sur le plan structural, il a également été observé une diminution de volume de la région préfrontale notamment le cortex préfrontal ventro-médian et le cortex cingulaire dorsal (Im et al., 2016).

2.2 Prise en charge et traitements :

La prise en charge des patients PTSD inclut à la fois des méthodes psychothérapeutiques et des méthodes pharmacologiques et parfois une combinaison des deux.

2.2.1 Psychothérapies :

Il existe la thérapie d'exposition (thérapie comportementale) et la thérapie de restructuration cognitive (thérapie cognitive). Cette dernière consiste à restructurer les croyances mésadaptées du patient (sur soi-même, sur le monde, ou sur l'origine du trauma), des éléments qui sont responsables de la détresse psychologique et de l'anxiété. Ces cognitions erronées négatives sont alors corrigées par un raisonnement conscient. Quant à la thérapie d'exposition, cette thérapie consiste à réactiver de manière répétée le souvenir traumatique via une imagerie mentale ou une réexposition à des situations qui étaient évitées puisque rappelant le traumatisme. La charge traumatique peut être alors neutralisée par l'intégration d'informations correctives à ce souvenir et l'individu s'habitue à réagir d'une façon plus calme. Cette approche est donc basée sur le processus d'extinction décrit plus haut.

2.2.2 Psychopharmacologie :

Les antidépresseurs sont utilisés en première intention dans le traitement du PTSD tels que les inhibiteurs de recapture de la sérotonine (ISRS) comme la sertraline (ZOLOFT) et la paroxétine (DEROXAT, PAXIL). Ces antidépresseurs agissent sur les trois symptômes majeurs qui sont la mémoire intrusive, l'évitement et l'hypervigilance ainsi que les troubles psychiatriques comorbides. Les tricycliques et les inhibiteurs de la monoamine oxydase se sont aussi révélés efficaces dans la réduction des symptômes du PTSD. Cependant, plus de 50% des patients présentent toujours des symptômes résiduels après un traitement de première intention (Asnis et al 2004). En plus, les tailles d'effet des traitements pharmacologiques par rapport au placebo sont faibles et inférieures à celles des traitements psychologiques focalisés sur le trauma. De plus, ces traitements pharmacologiques exposent les patients PTSD à des effets secondaires et aux symptômes du syndrome de sevrage.

Un autre médicament a été évalué dans le traitement du PTSD, le propranolol, un antagoniste des récepteurs beta adrénergiques. Ce médicament a été utilisé pour réduire l'hypermnésie traumatique et la stratégie la plus évidente a été de bloquer ou diminuer la sur-consolidation de l'événement traumatique en agissant immédiatement après celui-ci. Deux études ont utilisé une procédure durant laquelle le propranolol a été administré immédiatement après l'événement traumatique (Pitman et al., 2002, Vaiva et al., 2003). Cette stratégie se heurte cependant à des difficultés car le PTSD n'est diagnostiqué la plupart du temps qu'au moins un mois après le traumatisme alors que la consolidation mnésique a lieu dans les heures ou jours suivant l'événement. Cette approche préventive présente de surcroît d'autres limites puisqu'elle nécessiterait de traiter toutes les personnes victimes du traumatisme alors que seuls 15 à 30% développeront la pathologie (North et al., 1999) (Breslau et al., 1991)

Il existe d'autres approches dans le traitement du PTSD qui consistent à agir sur des étapes plus tardives notamment la reconsolidation et l'extinction. Le propranolol a déjà été testé dans le but d'inhiber la reconsolidation. Chez l'animal, Villain et al ont mis en évidence un effet inhibiteur de ce beta bloquant sur la consolidation et la reconsolidation de la mémoire non pathologique suggérant l'intérêt de cette molécule dans le traitement du PTSD (Villain et al., 2016). Chez l'homme il a été demandé à des patients souffrant d'un PTSD chronique et sévère de relire un compte rendu détaillé de leur événement traumatique, afin de réactiver la trace mnésique, suite à une administration du propranolol. Une semaine après, les réponses physiologiques mesurés pendant l'écoute de la description de l'événement traumatisant étaient significativement diminuées chez les patients ayant reçu le propranolol (Brunet et al., 2008). Suite à ces résultats, un essai clinique a été réalisé et a montré que l'augmentation du nombre de séances de traitement permettait d'amplifier la baisse des réponses physiologiques observées lors de l'étude précédente (Brunet et al., 2014). Cependant des résultats négatifs ont été rapportés dans d'autres études cliniques utilisant le propranolol (Wood et al., 2015).

Objectifs

Le vieillissement est un déclin physiologique normal souvent associé à plusieurs déficits au niveau du système nerveux central. La mémoire est une des principales fonctions affectées chez l'Homme vieillissant. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires liés à ce dysfonctionnement, des études chez l'animal sont nécessaires. Cependant, outre les problèmes de mémoire, le vieillissement est associé chez le rongeur à des problèmes moteurs qui représentent un facteur confondant majeur dans l'étude des déficits liés à la mémoire. La nécessité d'attendre jusqu'à environ 20 mois pour observer des déficits liés à l'âge chez la souris constitue également une limitation pratique importante. Une approche intéressante pour limiter ces problèmes serait l'utilisation d'animaux modèles du vieillissement accéléré. Dans ce but une première partie de cette thèse sera consacré à la :

1) Caractérisation comportementale du vieillissement cognitif des souris Werner :

Le but de cette première partie a été de déterminer si les souris WRN modèles du syndrome de Werner (une forme de progeria) pouvaient représenter un nouveau modèle de vieillissement mimant les déficits cognitifs observés chez les souris âgées. Pour cela nous avons caractérisé les performances cognitives de ces souris afin de les comparer à des données de la littérature sur des souris âgées de fond génétique C57/Bl6. Dans ce but nous avons testé des souris WRN de fond génétique C57/Bl6 à différents âges (3, 5 et 8 mois) dans plusieurs tests comportementaux allant de l'activité locomotrice jusqu'aux tests de mémoire hippocampo-dépendants et non hippocampo-dépendants.

Suite à cette première étude comportementale, notre souhait était de caractériser ensuite ces souris sur le plan cellulaire et moléculaire afin de bien conclure l'utilité de ce modèle pour étudier le vieillissement. Comme indiqué dans la partie Matériels et méthodes, les souris Werner ont été fournies par Michel Lebel, un collaborateur Canadien. Celui-ci ne pouvait plus nous fournir de nouveaux géniteurs car il les destinait à des études de génétique moléculaire dans son propre laboratoire. Etant donné que ces souris sont difficiles à obtenir et que l'étude cellulaire et moléculaire nécessiterait un grand nombre d'animaux, nous avons changé l'axe de cette thèse. Ce changement a coïncidé avec l'arrivée dans l'équipe de mon deuxième directeur de thèse, Monsieur Lionel Moulédous qui travaille sur les neuropeptides et notamment la nociceptine. Il nous a proposé un projet sur l'étude du système nociceptinergique dans les phases tardives de la mémoire et son implication dans les mémoires pathologiques liées soit à une amnésie soit à une hypermnésie.

Les mémoires pathologiques sont un handicap chez l'homme et l'empêchent de maintenir une vie normale. Ces mémoires pathologiques peuvent être caractérisées par des

troubles hypermnésiques comme par exemple dans le cas du PTSD ou de l'addiction et il convient donc de développer des stratégies thérapeutiques pour les atténuer. Des médicaments ont été déjà évalués comme par exemple le propranolol dans le traitement du PTSD en ciblant la phase de la reconsolidation. Etant donné l'efficacité limitée de ce médicament, des recherches d'autres traitements pharmacologiques sont nécessaires. Un système qui pourrait être une cible dans le traitement de ce type de maladie est le système nociceptinergique. Ainsi nous nous sommes consacrés à l' :

2) Etude des effets amnésiants des agonistes des récepteurs NOP sur la reconsolidation de la mémoire :

Suite aux données de la littérature sur l'effet inhibiteur des agonistes NOP sur les phases d'acquisition et de consolidation de la mémoire, le but de cette partie était de tester l'effet de différents agonistes sur la reconsolidation de la mémoire. Dans le contexte du syndrome de PTSD, nous avons réalisé la majorité de nos expériences dans un modèle de mémoire aversive, le fear conditioning (conditionnement de peur), en séparant les composantes de mémoire hippocampo- et non hippocampo-dépendante. Afin d'élargir nos perspectives vers des types de mémoires non aversives, un agoniste a également été testé dans le paradigme de localisation d'objet, un autre test de mémoire dépendant de l'hippocampe mais non aversif.

Les formes de mémoire pathologiques peuvent être également caractérisées par des troubles amnésiques comme par exemple dans le cas des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Dans la littérature plusieurs études ont mis en évidence un effet promnésique lors de la délétion des récepteurs NOP ou de leur blocage par des antagonistes. Dans un second temps, les conséquences d'un blocage du système nociceptinergique ont donc été évaluées par l' :

3) Etude des effets promnésiques d'un antagoniste des récepteurs NOP :

Dans le chapitre précédent nous avons testé l'effet amnésiant des agonistes NOP en ciblant la reconsolidation de la mémoire. Dans cette dernière partie de la thèse, nous avons testé l'effet promnésique d'un antagoniste sur une mémoire déjà altérée. Pour cela nous avons utilisé des souris Tg2576 modèle de la maladie d'Alzheimer âgées de 8 mois qui présentent déjà des déficits de mémoire notamment hippocampo-dépendante.

Dans une deuxième sous-partie, nous avons testé l'effet de cet antagoniste sur l'extinction de la mémoire aversive dans le test de conditionnement de peur. En effet, le phénomène d'extinction constitue un nouvel apprentissage et pourrait donc être facilité par un traitement promnésique.

Matériels et méthodes

1) Animaux :

14 souris femelles WRN de 3 mois, 14 souris femelles WRN de 5 mois, 15 souris femelles WRN de 8 mois et 227 souris mâles C57/B16 de 8 semaines et 17 souris Tg2576 modèle de la maladie d'Alzheimer âgées de 8 mois ont été utilisées dans nos expériences.

Les souris WRN de fond génétique C57/B16 reçues du Canada dans le cadre d'une collaboration avec Michel Lebel (Centre de Recherche du CHU de Québec, Québec, Canada), sont obtenues à partir des croisements de souris ayant une délétion de l'exon qui code pour les domaines III et IV de l'helicase RecQ. Cette délétion a été réalisée par la technique de la recombinaison homologue (Lebel and Leder, 1998).

Les souris C57/B16 proviennent du laboratoire Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France. Les souris ont été regroupées par 5 dans des cages en polycarbonate, mesurant 32 x 16 x 14 cm, et placées à température constante ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Dans l'animalerie, la rythmicité circadienne était basée sur un cycle jour-nuit d'une durée de 12h-12h, le début de la phase lumineuse ayant lieu à 08h00. La nourriture et l'eau étaient données *ad libitum*.

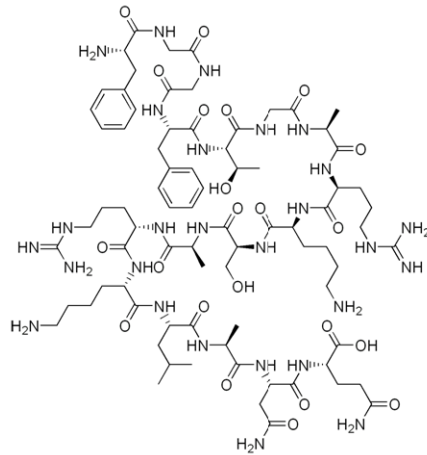
Les souris modèle de la maladie d'Alzheimer proviennent de la lignée Tg2576 décrite par Karen Hsiao (Hsiao et al., 1996). Ces souris ont un fond génétique C57B6/SJL et présentent une forme mutée de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) retrouvée dans une famille suédoise (mutation Swedish) qui porte sur deux acides aminés : Lys670-Asn, Met671-Leu. Cette lignée est entretenue dans le laboratoire depuis plusieurs années par croisement de souris Tg2576 mâles avec des souris C57B6/SJL F1 femelles provenant de l'élevage Charles River (Domaine Des Oncins, Saint-Germain-Nuelles).

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les lois européennes de soin aux animaux (Directive 86/609/CEE du Conseil Européen) et approuvées par le comité d'éthique et le ministère français de l'éducation et de la recherche (#1992-2015092911113438).

2) Agents pharmacologiques :

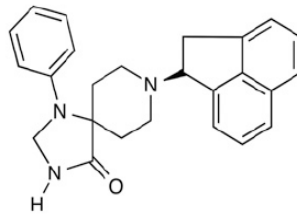
2.1 Agonistes :

Nociceptine : Le peptide a été synthétisé et purifié en Italie (Université de Ferrara), diluée dans une solution de NaCl 0.09% et injecté par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.) à des doses de 1 et 3 nmol.



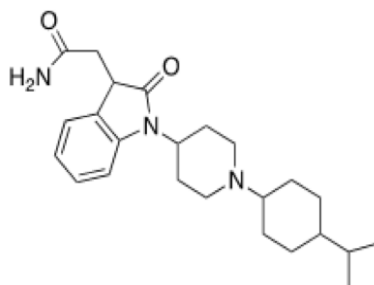
Structure chimique de la nociceptine

Ro 65-6570 : Cet agoniste du récepteur NOP a été synthétisé et purifié en Italie (Université de Ferrara). La molécule a été injectée par voie intrapéritonéale à différentes doses (0.03, 0.1, 0.3, 1 et 3 mg/kg).



Structure chimique du Ro 65-6570

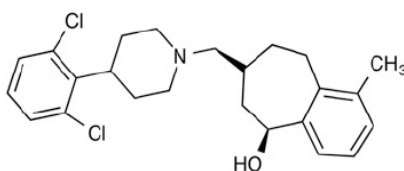
AT-403 : Cette molécule a été synthétisée par la société Astraea Therapeutics (Mountain View, CA, USA). Cet agoniste NOP de forte affinité a été injecté par voie intrapéritonéale à des doses de 0.03 mg/kg et 0.1 mg/kg.



Structure chimique du AT-403

2.2 Antagonistes :

SB612111 : Cette molécule antagoniste des récepteurs NOP injectée par voie intrapéritonéale à une dose de 5 mg/kg a été achetée chez Sigma (St. Quentin Fallavier, France).



Structure chimique du SB612111

MK-801 : Cet antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA au glutamate a été acheté chez Sigma (St. Quentin Fallavier, France). La drogue a été injectée en intrapéritonéal à une dose de 0.1 mg/kg.

Toutes ces molécules ont été stockées dans une solution de 100% DMSO et ensuite diluées dans du NaCl 0.9% pour arriver à une concentration maximale de DMSO de 2 ou 5% selon les expériences. Les injections contrôle véhicule font référence à une solution de NaCl 0.9% contenant une concentration équivalente de DMSO.

3) Injections i.c.v :

3.1 Chirurgie :

La souris est anesthésiée par une solution d'hydrate de chloral (400 mg/kg) par voie intrapéritonéale. Une dizaine de minutes après l'injection, le niveau de sédation est vérifié par un pincement de la peau interdigitale. Les souris sont ensuite maintenues dans un appareil stéréotaxique (David Kopf[®] Instruments, Tujunga, CA, USA) de manière à positionner le crâne dans un plan horizontal. Une incision au scalpel est réalisée au milieu du crâne, la peau est écartée afin de visualiser le bregma. Les sites d'implantation des canules sont repérés par une marque sur le crâne selon les coordonnées suivantes A/P : 0, L : ± 1 par rapport au bregma (PAXINOS). Le crâne est ensuite percé à l'aide d'une fraise et la canule est implantée à 2 mm sous la boîte crânienne. Les coordonnées ont été calculées afin que la base de la canule soit située à 1 mm au dessus du ventricule (l'injecteur pénètre 1mm plus profond que la canule). Cette localisation permet une diffusion locale et précise du produit. Les canules (préalablement obstruée par un mandrin pour éviter toute intrusion d'un corps étranger) sont ensuite fixées par du ciment dentaire. Avant toute expérience, les souris doivent rester en convalescence pendant au minimum une semaine.

A la fin des expériences les animaux reçoivent une dose létale de pentobarbital (Ceva Santé Animale, Libourne, France) et les cerveaux sont disséqués pour la vérification histologique des implantations des canules (Massaly et al., 2013).

3.2 Injection :

L'injection est faite grâce à un injecteur électrique (*Harvard Apparatus*[®]). Il s'agit d'une pompe couplée à une microseringue *Hamilton* de 5 µl. La seringue est reliée par une tubulure en silicone à un injecteur en acier inoxydable (diamètre extérieur 0.48mm). L'injecteur est mis dans la canule et l'injection est faite à 1 µL/min pendant 2 minutes. Une fois l'injection terminée, on attend une minute avant de retirer l'injecteur, afin que le produit diffuse.

4) Actimètre, mesure de l'activité locomotrice :

4.1 Principe :

Ce test permet d'évaluer l'activité locomotrice de l'animal. Celle-ci est mesurée pendant une heure afin de voir l'évolution de cette activité chaque 15 minutes.

4.2 Dispositif expérimental :

L'actimètre (*Apelex*[®]) est composé de cinq boîtes en Plexiglass, identiques, de 25 cm x 21.5 cm x 9.5 cm. Deux faisceaux lumineux permettent de relever les déplacements horizontaux et verticaux des souris. L'ensemble est isolé de la lumière, du son et de l'environnement extérieur. Le nombre de passages à travers les faisceaux figure sur un boîtier connecté au dispositif. Ce nombre qui traduit l'activité locomotrice a été relevé chaque 15 minutes pendant 60 minutes.

5) Le Rotarod :

5.1 Principe :

Le rotarod est un test qui permet d'évaluer la coordination motrice chez la souris.

5.2 Description du dispositif :

Le dispositif est composé d'une barre cylindrique horizontale rainurée de 3 cm de diamètre (*Ugo Basile*©, Gemonio, Italie). Des séparateurs verticaux de 25 cm de diamètre délimitent 5 couloirs de 5.7 cm de large, permettant de tester 5 animaux simultanément. La barre horizontale est placée à 16 cm au-dessus du support pour éviter de blesser l'animal dans sa chute. La vitesse de rotation est ajustable. Les rongeurs tentent naturellement de rester sur le Rotarod et d'éviter de tomber au sol.

Le protocole expérimental se déroule sur deux jours (Varty et al., 2005).

J1 : Familiarisation :

Les souris sont entraînées une seule fois avec un minimum et un maximum de temps limité à 60 et 120 secondes respectivement à une vitesse constante de 12 rpm.

J2 : Test :

20 minutes après l'injection de drogue, la souris passe trois essais avec un temps maximal de 120 secondes pour chaque essai. Le temps de latence avant la chute est mesuré pour chaque essai et la moyenne des trois essais est utilisée pour les analyses.

6) Labyrinthe en croix surélevé :

6.1 Principe :

Le labyrinthe en croix surélevé est un test utilisé pour évaluer les comportements d'anxiété chez les rongeurs.

6.2 Dispositif expérimental :

Il consiste en quatre bras, deux bras ouverts et deux bras fermés, en plexiglas (30 x 5 x 5 cm) réunis par une plateforme centrale (5 x 5 cm). Les quatre bras sont munis de capteurs pour mesurer le temps passé dans les différentes parties du bras (partie distale et partie proximale). Le labyrinthe est placé à 50 cm du sol. Le dispositif est isolé dans une pièce éclairée par une lumière blanche. La souris est déposée sur la plateforme centrale et laissée pendant 10 minutes dans le dispositif. Un logiciel est connecté au labyrinthe afin de mesurer la fréquence d'entrée ainsi que le temps passé dans chaque bras. L'expérience exploite le conflit, chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement ou conflit de type approche-évitement. Les bras fermés représentent la sécurité alors que les bras ouverts offrent une valeur exploratoire. Un animal qui explore les bras ouverts sera décrit comme « peu anxieux » et un animal qui reste confiné dans les bras fermés du dispositif sera considéré comme « anxieux » et aura donc naturellement tendance à préférer les espaces clos et sombres aux espaces ouverts et éclairés.

7) Test de l'objet déplacé :

7.1 Principe :

Lors de notre étude, ce test comportemental permet d'évaluer la mémoire hippocampo-dépendante. Dans ce test, la souris doit apprendre à détecter le nouvel emplacement d'un des deux objets, ce test est basé sur la préférence spontanée qu'ont les souris pour l'objet situé dans un nouvel emplacement.

7.2 Dispositif expérimental :

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé une arène circulaire, d'environ 40 cm de diamètre et 30 cm de hauteur. Toutes les données comportementales ont été collectées par un système automatique de vidéo-tracking (EthoVision XT, Noldus®) à l'exception des temps de contacts avec les objets, qui ont été recueillis manuellement par l'expérimentateur (en aveugle). L'arène **contenant un indice visuel sur la paroi** (voir figure) est isolée dans une pièce d'expérimentation dont la température et la luminosité sont contrôlées. La température est de 21°C et deux sources lumineuses sont suspendues au dessus de l'arène. Avant chaque expérience, les souris sont laissées 10 minutes dans leur cage dans la pièce d'expérimentation, afin que les animaux se familiarisent avec la pièce expérimentale. Le protocole expérimental comporte 3 phases pour la procédure de consolidation : familiarisation, habituation et test sur trois jours successifs (Figure 24) et 4 phases pour la procédure de reconsolidation : familiarisation, habituation, rappel et test sur quatre jours successifs (Figure 25).

J0 : Familiarisation :

Cette phase dure 10 minutes au cours desquelles la souris explore l'arène qui ne contient pas d'objets.

J1 : Habituation :

Deux objets identiques de 12cm de hauteur et 3cm de diamètre sont placés au centre de l'arène. La souris est mise dans l'arène pendant 10 minutes pendant lesquelles nous relevons le temps d'exploration de chaque objet. Les objets étant identiques la souris devrait passer autant de temps à explorer les deux objets.

J2 : Rappel (seulement pour la reconsolidation) :

La souris est remise dans l'arène dans les mêmes conditions que l'habituation, mais seulement pendant 3 minutes.

J2 (ou J3 pour la reconsolidation) : Test :

Un des deux objets est déplacé aléatoirement à droite ou à gauche, afin de réduire les biais dus à une position particulière. La souris est mise dans l'arène pendant 10 minutes pendant lesquelles nous relevons le temps d'exploration de chaque objet. La souris a une préférence spontanée à explorer l'objet déplacé, détectable si elle se souvient de l'emplacement initial des objets lors de l'habituation.

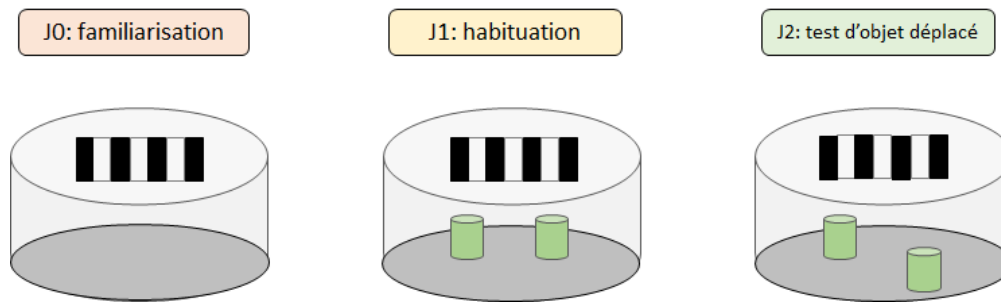


Figure 24 : Protocole expérimental permettant d'évaluer la consolidation dans le test d'objet déplacé

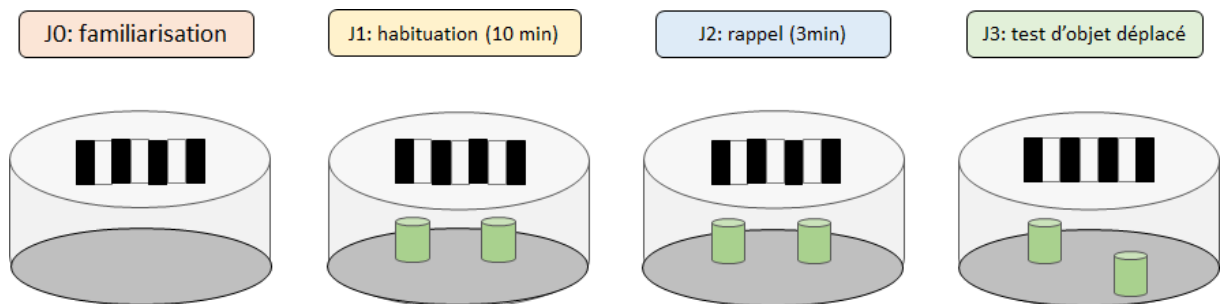


Figure 25 : Protocole expérimental permettant d'évaluer la reconsolidation dans le test d'objet déplacé

8) Test de la reconnaissance d'objet :

8.1 Principe :

Lors de notre étude, ce test comportemental permet d'évaluer la mémoire non hippocampo-dépendante. Dans ce test, la souris doit apprendre à détecter la nouveauté, ce test est basé sur la préférence spontanée des souris pour l'objet nouveau.

8.2 Dispositif expérimental :

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé l'arène circulaire que nous avons utilisée pour le test d'objet déplacé **mais sans le pattern visuel**. Toutes les données comportementales ont été collectées par un système automatique de vidéo-tracking (EthoVision XT, Noldus®) à l'exception des temps de contacts avec les objets, qui ont été recueillis manuellement par l'expérimentateur. L'arène est isolée dans une pièce d'expérimentation dont la température et la luminosité sont contrôlées. La température est de 21°C et deux sources lumineuses sont suspendues au dessus de l'arène. Avant chaque expérience, les souris sont laissées 10 minutes dans leur cage dans la pièce d'expérimentation, afin que les animaux se familiarisent à la pièce expérimentale. Le protocole expérimental comporte 3 phases : familiarisation, habituation et test sur trois jours successifs (Figure 26).

J0 : Familiarisation :

Cette phase dure 10 minutes au cours desquelles la souris explore l'arène sans les objets.

J1 : Habituation :

Deux objets identiques de 12cm de hauteur et 3cm de diamètre sont placés au centre de l'arène. La souris est mise dans l'arène pendant 10 minutes pendant lesquelles nous relevons le temps d'exploration de chaque objet. Les objets étant identiques la souris devrait passer autant de temps à explorer les deux objets.

J2 : Test :

Un des deux objets est remplacé par un nouvel objet qui est différent par sa forme et sa couleur. La souris est mise dans l'arène pendant 10 minutes pendant lesquelles nous relevons le temps d'exploration de chaque objet. La souris a une préférence spontanée à explorer l'objet nouveau.

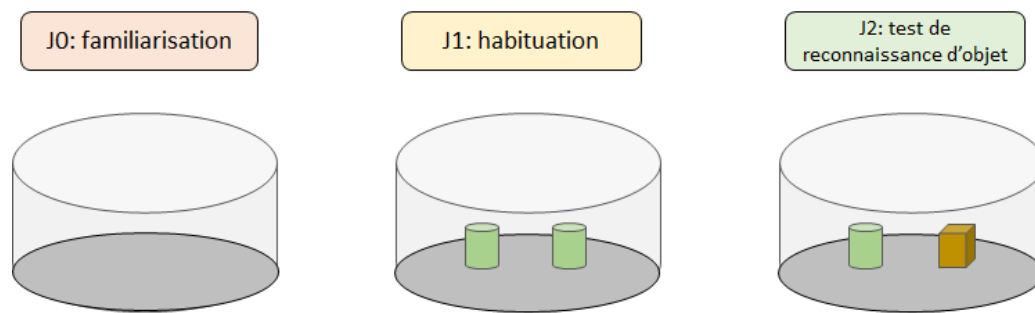


Figure 26 : Protocole expérimental du test de la reconnaissance d'objet

9) Piscine de Morris :

9.1 Principe :

Il s'agit d'une tâche spatiale dans laquelle les animaux doivent apprendre à localiser l'emplacement d'une plateforme cachée sous la surface de l'eau, dont la position est fixe. Ce test repose sur la tendance naturelle de l'animal à chercher à s'échapper d'un environnement stressant et à s'adapter à un changement de consigne.

9.2 Dispositif expérimental :

Une piscine circulaire a été utilisée (diamètre : 110cm, profondeur : 30cm). La piscine est remplie d'eau (température : 21-23°C) rendue opaque par l'ajout d'un colorant blanc non toxique, le lytron 631. Une caméra, suspendue au dessus du centre de la piscine, est connectée à un ordinateur équipé d'un logiciel de trajectométrie (Ethovision, Noldus). La piscine, entourée d'un rideau blanc contenant des repères distaux (motifs noirs et blancs rayés, objets de couleur, etc....), est située dans une pièce d'expérimentation dont la température et la luminosité sont

contrôlées. La température est de 25°C et trois sources lumineuses (lampe à lumière blanche de 60W, lumière rouge de 150W et une lampe halogène) sont réparties dans la pièce de façon à homogénéiser la luminosité. Le labyrinthe aquatique est divisé virtuellement en quatre quadrants de surfaces égales, à l'intérieur desquels une plateforme peinte en blanc (diamètre 9cm) peut être positionnée à 15cm de la paroi. Avant chaque expérience, les souris sont laissées 10 minutes dans leur cage sous la lumière rouge, dans la pièce d'expérimentation, afin que les animaux se familiarisent à la pièce expérimentale. L'apprentissage spatial dans la piscine dans nos conditions expérimentales requiert l'intégrité et la flexibilité de l'hippocampe (Morris et al, 1982 ; Riedel et al., 1999). En effet, le protocole expérimental comporte cinq phases : la familiarisation, l'acquisition, le test, l'acquisition d'un nouvel emplacement de la plateforme (réversal) et le test suite à cette nouvelle acquisition (Figure 27).

J0 : Familiarisation :

Dans cette phase, la plateforme est visible (0.5 cm au dessus de la surface de l'eau) et située dans le quadrant cible. La souris est libérée dans la piscine le museau vers la paroi. Ensuite il y a deux cas de figure, soit la souris trouve la plateforme au cours des 60 premières secondes de nage soit elle ne la trouve pas auquel cas l'expérimentateur guide l'animal sur la plateforme. La souris est laissée sur la plateforme pendant 60 secondes afin d'explorer l'environnement et de se repérer. La séance de familiarisation est composée de 3 essais consécutifs avec un point de départ différent.

J1-J6 : Acquisition :

Lors des séances d'acquisition, la plateforme est invisible (0.5 cm en dessous de la surface de l'eau) et située dans le « quadrant cible ». C'est une procédure distribuée puisqu'elle s'étend sur 5 jours avec 3 essais par jour. Pour chaque essai la souris est libérée d'un point de départ différent, le museau vers la paroi de la piscine. L'animal doit apprendre à s'orienter en s'aidant des indices visuels distaux pour trouver la plateforme. Au cours de cette phase d'acquisition, le temps pour atteindre la plateforme est relevé.

J7 : Test :

Au cours du 7^{ième} jour, la mémoire spatiale de la position de la plateforme est évaluée. Lors de ce test, la plateforme est retirée de la piscine et la souris est placée au centre de la piscine. L'animal est soumis à un seul essai d'une minute. Le temps passé dans chaque quadrant est relevé.

J8-9 : Acquisition d'un nouvel emplacement de la plateforme (réversal) :

Dans cette phase, la plateforme est placée dans le quadrant opposé au quadrant cible. L'acquisition se fait en deux jours seulement (J8 et J9) avec 3 essais chaque jour et des points de départ différents. Nous procédons de la même façon qu'indiqué ci-dessus.

J10 : Test après l'apprentissage d'un nouvel emplacement de la plateforme :

Au cours du 10^{ième} jour, la plateforme est retirée de la piscine et la souris est placée au centre de la piscine. Ce « probe » test s'effectue en un seul essai et dure une minute. Cette mesure permet d'évaluer la flexibilité comportementale.

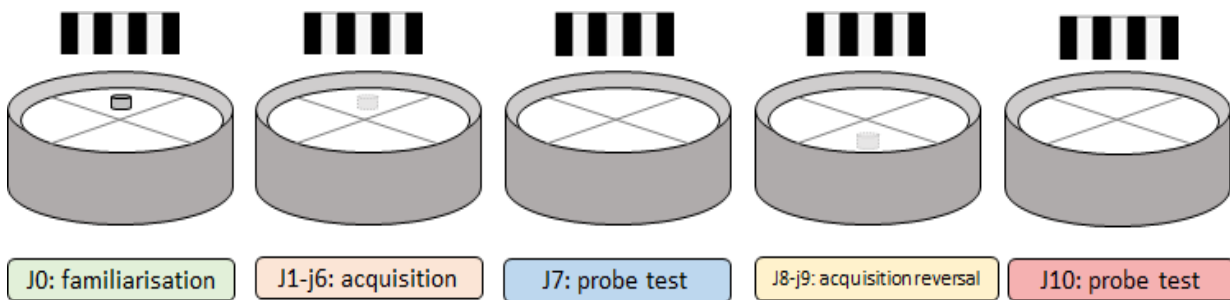


Figure 27 : Protocole expérimental de la piscine de Morris

10) Conditionnement de peur (fear conditioning) :

10.1 Principe :

Dans ce test comportemental, les souris associent un contexte nouveau et/ou un indice sonore discret à une stimulation aversive (choc électrique). Cette tâche fait intervenir l'amygdale (peur, émotions) mais aussi l'hippocampe (mémoire contextuelle).

10.2 Dispositif expérimental 1 :

Contexte A : Une boîte rectangulaire fermée (27 x 27 x 27 cm) avec des barreaux au sol permettant le passage du courant. Une des parois est en plexiglas transparent afin de pouvoir filmer et observer la souris. Deux autres parois présentent des motifs visuels proximaux sous la forme de bandes blanches et noires. Dans ce cadre, deux panneaux figurant deux autres motifs sont fixés au rideau en face de la paroi translucide, constituant ainsi deux indices visuels distaux clairement identifiables. L'ensemble du dispositif est éclairé par une source de lumière blanche contrôlée. La boîte est nettoyée à l'éthanol 70% avant chaque passage, laissant une odeur susceptible d'être intégrée par la souris à la représentation contextuelle du dispositif.

Contexte B : Une boîte triangulaire fermée (21 x 44 x 49 x 18.5 cm) avec parois et sol lisses. Deux des trois parois sont blanches et la troisième est en plexiglas pour pouvoir filmer et observer la souris durant la procédure. Un haut-parleur permettant de délivrer un indice sonore est disposé sur le couvercle. L'ensemble du dispositif est éclairé par une source de lumière rouge. La boîte est nettoyée à l'acide acétique avant chaque passage.

Le protocole expérimental comporte deux phases pour tester la consolidation et trois phases pour tester la reconsolidation.

10.2.1 La consolidation :

J1 : Conditionnement :

Dans cette phase, l'animal est mis dans le contexte A pendant 5 minutes 30 secondes. Lors des deux premières minutes la souris explore le dispositif puis un son (90db) est émis pendant 30 secondes et durant les 2 dernières secondes un choc électrique (0.5mA) est déclenché. Ceci est répété une fois puis, 30 secondes après, la souris est remise dans sa cage (Figure 28).

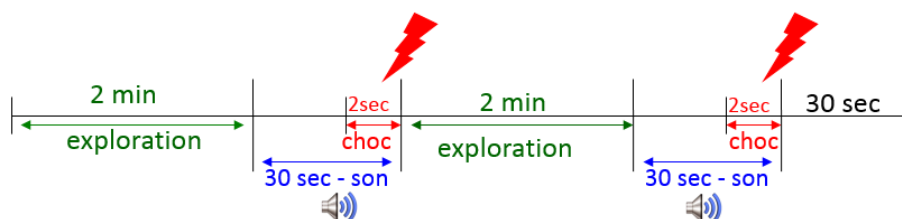


Figure 28 : Protocole du conditionnement au contexte et au son

J2 : Test au contexte A :

La souris est mise dans le contexte A (où elle a reçu les chocs) pendant 2 minutes et l'immobilité totale de la souris appelée **freezing** est évaluée manuellement par périodes de 5 secondes par un expérimentateur aveugle au traitement.

Test au son en contexte modifié (contexte B) :

Deux heures après le premier test, la souris est mise dans le contexte B pendant 4 minutes en présence d'un signal sonore pendant les deux dernières minutes et le nombre de périodes de freezing est mesuré.

10.2.2 La reconsolidation :

J1 : Conditionnement :

L'animal est mis dans le contexte A pendant 4 minutes 30 secondes. Lors des deux premières minutes la souris explore le dispositif puis durant les 2 dernières secondes un choc électrique

(0.5mA) est déclenché. Ceci est répété encore une fois, puis, 30 secondes après, la souris est remise dans sa cage. Dans ce cas il n'y a pas de signal sonore (Figure 29).

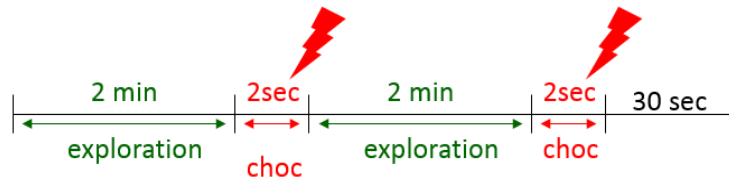


Figure 29 : Protocole du conditionnement au contexte

J2 : Rappel :

Au cours de cette phase la souris est mise dans le contexte pendant 2 minutes. Les drogues sont injectées immédiatement après le rappel.

J3 : Test :

La souris est mise dans le contexte A pendant 4 minutes et le freezing est mesuré.

10.2.3 Le rappel :

J1 : Conditionnement :

Nous avons conditionné les souris de la même façon que pour la reconsolidation, (Figure 29).

J2 : Rappel :

Au cours de cette phase la souris est mise dans le contexte pendant 2 minutes. L'injection des produits est faite 20 minutes avant le rappel.

J3 : Test :

La souris est mise dans le contexte A pendant 4 minutes et le freezing est mesuré.

10.2.4 L'extinction :

J1 : Conditionnement :

Nous avons conditionné les souris par le même protocole que pour la reconsolidation et le rappel (Figure 29).

J2-J5 : Extinction :

Sur 4 jours successifs, les souris ont reçu une injection d'antagoniste (SB612111) 15 minutes avant d'être placées dans le contexte A pendant 10 minutes au cours desquelles le freezing a été mesuré.

J6 : Test :

La souris est placée pendant 4 minutes dans le contexte sans injection préalable et le niveau de freezing est évalué.

10.3 Dispositif expérimental 2 :

Nous avons utilisé un dispositif différent pour l'étude de la reconsolidation de la mémoire de peur au son indépendante du contexte. Afin d'éviter l'association choc-contexte, nous avons utilisé trois contextes différents sur les trois jours de l'expérience.

Contexte du conditionnement : Il s'agit d'un compartiment aux murs blancs et lisses, à l'intérieur d'une boîte carrée en plastique transparent (25*25cm, hauteur 34.5cm) ; le sol est composé d'une grille en métal permettant de délivrer le choc électrique. Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 70% entre chaque souris.

Contexte du rappel : Ce compartiment est aux murs gris en relief, à l'intérieur d'un cylindre en plastique transparent (diamètre 25cm, hauteur 34.5cm) ; le sol est gris et lisse. L'environnement est nettoyé à l'acide acétique 1% après chaque passage.

Contexte du test au son : Ce contexte est composé d'une boîte triangulaire (25*31cm, hauteur 34.5cm) avec des murs rayés noirs et blancs et un sol granuleux, nettoyé à l'eau entre chaque passage.

Le protocole expérimental comporte trois phases :

J1 : Conditionnement :

Les souris ont été conditionnées de la même façon que pour la consolidation (Figure 28).

J2 : Rappel :

Cette session de réactivation comporte une minute d'exploration du contexte 2 suivie du signal sonore pendant 30 secondes. Immédiatement après la souris a reçu le traitement.

J3 : Test :

La souris est mise dans le contexte 3 pendant 4 minutes en présence d'un signal sonore pendant les deux dernières minutes. Le freezing est mesuré automatiquement par le logiciel PolyFear (Imetronic, Pessac, France) et analysé ultérieurement par l'expérimentateur.

11) Mesure de l'expression de l'IEG c-Fos :

11.1 Perfusion et coupe des cerveaux :

Lors du deuxième jour du fear conditioning, et 90 minutes après le rappel et l'injection de la drogue, l'animal est sacrifié par injection d'une dose létale de pentobarbital pour effectuer une perfusion. L'animal est ensuite placé sur une plaque de liège, la cage thoracique est ouverte et une solution de tampon phosphate à 0,1 M (20 ml en 1 minute) est administrée par perfusion intra-cardiaque. L'objectif est d'éliminer le sang dont toute trace peut amener un marquage non

spécifique lors de l'immunohistochimie. Par la suite, une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du tampon phosphate est perfusée pendant 7 minutes (20 ml/minute), pour fixer les tissus, et notamment le cerveau qui nous intéresse. Une fois perfusé, le cerveau est prélevé et stocké à 4°C dans du PFA 4% pendant 24h, puis dans du sucrose à 30% qui protège les tissus de la congélation.

Les cerveaux sont ensuite installés sur le microtome pour être coupés en sections de 40 µm d'épaisseur. Les coupes sont ensuite stockées à -20°C dans du cryoprotectant (Tris 50 mM, NaCl 0,9%, 30% éthylène glycol, 30% glycérol, pH 7,4) jusqu'à leur utilisation pour l'immunohistochimie.

11.2 Immunohistochimie :

Les coupes de cerveau serviront à une immunohistochimie c-Fos, protéine synthétisée lors de l'activation d'un neurone. Les coupes (4 à 5 par région et par animal) subissent un premier lavage pour enlever les traces de cryoprotectant pendant 24 h dans du PBS (tampon phosphate saline) sous agitation à 4°C. Ensuite, les coupes sont trempées dans de l'eau oxygénée (H₂O₂) à 0,3% dans du PBS pendant 30 minutes. Après un nouveau lavage de cinq minutes, les coupes sont incubées dans de la solution de blocage (NGS, sérum de chèvre à 3% dans du PBST soit du PBS contenant 0.25% de Triton X-100) pendant deux heures pour bloquer les sites de liaisons non spécifiques. L'anticorps primaire anti-c-Fos polyclonal de lapin (Santa Cruz Biotech), dilué au 1/5000 dans de la solution de blocage, est ensuite ajouté pendant 48h à 4°C. Après 4 lavages de 10 minutes au PBS, on ajoute l'anticorps secondaire, un anticorps de chèvre anti-lapin biotinylé (Vector Laboratories) au 1/600 dans la solution de blocage, pendant 2h à température ambiante. Après trois rinçages de 10 minutes, une incubation des coupes est réalisée avec le complexe avidine biotine peroxydase de raifort (Solution A au 1/500 + Solution B au 1/500, Vector Laboratories) dilué dans du PBST pendant une heure. Après un nouveau rinçage au PBS pendant deux fois dix minutes, les coupes sont placées dans la solution de DAB + nickel (Kit Vector Laboratories) pendant 10 minutes. Après le rinçage, les coupes sont montées sur une lame gélatinée (la gélatine permet l'adhésion des coupes sur la lame lorsque celles-ci sèchent), et séchées à température ambiante au moins 48h.

11.3 Contre coloration et déshydratation des coupes :

Les lames sont rincées dans de l'eau distillée, puis incubées pendant 8 minutes dans du *Nuclear Fast Red* (colore les noyaux des cellules en rouge). Après avoir fait deux rinçages à l'eau distillée, elles sont déshydratées en passant successivement, pendant 5 minutes à chaque fois, dans de l'éthanol à 50%, puis 90%, puis pour terminer deux fois à 100%. Les lames sont

ensuite placées au moins 5 minutes dans du toluène. Les coupes sont ensuite recouvertes par une lamelle à l'aide de la colle Depex.

11.4 Observation microscopique et quantification de c-fos :

24 heures après, les lames sont mises en observation microscopique. Les cellules ayant été activées et ayant donc synthétisé la protéine c-Fos, apparaîtront en gris/noir. Le microscope utilisé est à champ large Leica CTR 6000 directement relié à un ordinateur et permet de faire une observation en visible tel que c-Fos, mais aussi une observation à lumière fluorescente. Grâce au logiciel Mercator Explora Nova, il est possible de délimiter à l'objectif x5 les surfaces des régions qui nous intéressent. C'est dans ces zones que seront effectués les comptages des cellules marquées à l'objectif x40, afin de pouvoir normaliser le résultat trouvé par unité de surface analysée.

12) Analyses statistiques :

Les résultats sont présentés en moyennes \pm l'erreur standard moyenne (SEM) et ont été analysés grâce au logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software 5.01, Inc., San Diego, CA). Pour les expériences de comparaison entre plusieurs groupes, nous avons réalisé une ANOVA à un seul facteur. Lorsque nous avons comparé plusieurs facteurs entre les groupes, nous avons fait des ANOVA à deux facteurs. Une ANOVA à mesure répétée a été aussi utilisée pour les courbes d'extinction.

Résultats

Partie 1 : Caractérisation
comportementale du vieillissement
cognitif des souris Werner

Introduction :

La progeria de l'adulte a été décrite en 1904 par Otto Werner au sein d'une fratrie de quatre adultes âgés de 31 et 40 ans. Il s'agit d'un prototype des syndromes progéroïdes avec instabilité chromosomique. La progeria de l'adulte ou le syndrome de Werner est une maladie rare dont l'incidence est estimée à 1/1.000.000. Le Japon est le pays avec la plus forte incidence, près de 1/300.000 à cause de la consanguinité (Goto 1981). C'est une affection génétique qui se caractérise principalement par l'apparition à un âge précoce de symptômes ou de maladies associés au vieillissement normal. Les malades sont homozygotes pour une mutation ponctuelle ou une courte délétion dans le gène WRN codant pour une hélicase de type RecQ. Cette hélicase est indispensable au métabolisme de l'ADN et intervient dans de nombreux mécanismes. RecQ participe au processus de réplication (stabilisation de la fourche de réplication), et est aussi impliquée dans la recombinaison homologe et dans la réparation de l'ADN (Lebel, 2001). Cette hélicase intervient aussi dans la résolution des G-quadruplex présents au niveau de l'ADN (Figure 30). La mutation du gène WRN codant pour RecQ entraîne des troubles du système de réparation de l'ADN avec un raccourcissement télomérique du chromosome induisant la sénescence cellulaire. D'autre part, cette mutation a des conséquences moléculaires telles que la perturbation du système ubiquitine/protéasome et le dysfonctionnement de la protéine p53 (Lebel, 2001).

Le phénotype clinique des patients dits Werner est distinctif à partir de l'âge de la puberté puisque ces personnes développent des signes de vieillissement prématuré. Ce phénotype comprend un grisonnement des cheveux ou une calvitie précoce, une peau pseudo-sclérodermique avec des hyperkératoses aux points d'appui, une ostéoporose, une artériosclérose, une cataracte bilatérale, un diabète non insulino-dépendant et un hypogonadisme. Les patients Werner développent des cancers et des maladies cardiovasculaires ce qui entraîne leur décès à un âge d'environ 47 ans en moyenne (Epstein et al., 1966). Ce phénotype observé chez les patients Werner est très proche de celui des personnes subissant un vieillissement physiologique normal.

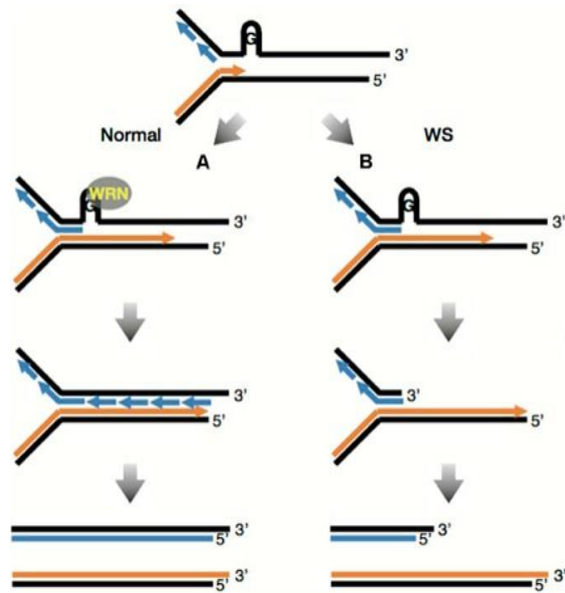
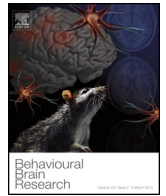


Figure 30 : Sénescence répliquative prématurée dans les fibroblastes WS : (A) les G-quadruplexs sont normalement déroulés par l'hélicase WRN permettant ainsi de compléter la répliquation des télomères. (B) L'absence de WRN provoque des fourches de répliquation bloquées sur les sites de quadruplex G non résolus entraînant un raccourcissement des télomères accéléré. (Shimamoto et al., 2015)

D'un point de vue neuronal, des résultats contradictoires ont été obtenus quant à la présence de plaques amyloïdes dans le cerveau, et de troubles cognitifs chez des personnes atteintes de la progeria (Postiglione et al., 1996, Leverenz et al., 1998, Mori et al., 2003). Chez la souris, Michel Lebel et son équipe ont réussi à modéliser le syndrome de Werner en mutant une hélicase au niveau du gène WRN (Lebel and Leder, 1998). Cette délétion a pour conséquence le développement des symptômes trouvés chez le patient Werner tels que la fibrose cardiaque interstitielle, une augmentation du dépôt de graisse viscérale, une augmentation du taux de triglycérides sanguin à jeun, une augmentation du glucose sanguin et une résistance à l'insuline (Massip et al., 2006). Jusqu'à présent aucune étude cognitive n'a été faite sur ces souris modèles du syndrome de Werner. L'étude cognitive sur ces souris Werner serait intéressante car les études sur le modèle murin en terme de vieillissement restent limitées pour plusieurs raisons, dont le facteur confondant lié à la perte de motricité (Barreto et al., 2010). En effet, la motricité est altérée chez les souris âgées de plus de 18 mois, et une souris qui présente des problèmes moteurs n'est pas un bon modèle pour étudier l'impact du vieillissement sur les processus cognitifs car la plupart des tests exigent que la souris soit capable de se déplacer normalement.

Par conséquent, le but de cette étude a été de déterminer si les souris WRN pouvaient représenter un nouveau modèle de vieillissement qui présente les déficits cognitifs observés chez les souris âgées mais pas de problèmes moteurs. Dans cette première étude nous avons donc caractérisé le phénotype comportemental des souris WRN au travers de différents tests cognitifs. Pour cela nous avons comparé des souris WRN (fond génétique C57/B16) de différents âges (3, 5 et 8 mois) avec les données de la littérature sur des souris âgées de fond génétique C57/B16.



Research report

Cognitive deficit in hippocampal-dependent tasks in Werner syndrome mouse model



Khaoula Reikik^{a,b}, Bernard Francés^{a,b}, Philippe Valet^{a,c}, Cédric Dray^{a,c,1},
Cédric Florian^{a,b,*,1}

^a Université de Toulouse, France

^b Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS, UPS, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, Cedex 9, France

^c Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, UPS, Toulouse, France

HIGHLIGHTS

- Werner syndrome mice show a reduction in glucose tolerance as observed in aged mice.
- 8 month-old Werner syndrome mice show deficit in hippocampal-dependent memory.
- Reversal learning is impaired in Werner syndrome mice model.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2016

Received in revised form 16 January 2017

Accepted 18 January 2017

Available online 21 January 2017

Keywords:

Werner syndrome

Aging

Behavior

Memory

Mouse

ABSTRACT

Mammalian aging is often characterized by metabolic disturbances, cognitive declines and DNA repairs deficiency, but the underlying molecular mechanisms are still not well understood. Alterations in DNA repair can significantly exacerbate aging. Mammalian neuronal cells which accumulate unrepaired DNA damage over time could potentially lead to brain functions disorders. Focusing on the ATP-dependent RecQ-type DNA helicase, an enzyme involved in repair of double strand DNA, a mouse model of Werner syndrome (WS) had been proposed as a model of accelerated aging. Until now, no study has investigated the impact of this premature aging syndrome on learning and memory. Spatial memory and cognitive flexibility are particularly affected by the aging process in both men and rodents. Studies have shown that aged mice exhibited similar performance than young adult mice on non-hippocampus dependent memory whereas their performances were decreased in hippocampus-dependent tasks. In this study, we have submitted 3, 5 and 8 month-old WS mice to several behavioral paradigms to evaluate hippocampus-dependent (spatial object location, Morris water maze and fear conditioning) and non hippocampus-dependent (object recognition) memories. No effect on the locomotion activity and anxiety level has been observed in adult WS mice. Interestingly, the 8 month-old WS mice exhibit long-term memory impairment similar to aged mice, suggesting that adult WS mice do develop some aspects of cognitive aging.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aging is characterized by a physiological process associated with a progressive loss of functional efficiency of all time-dependent organs. Biological aging is often associated with a decrease of physical performances and with metabolic disturbances [1] and cognitive decline [2]. In the case of physiological aging, clear

metabolic changes have been observed including impaired glucose tolerance and type 2 diabetes increase [3]. Spatial learning and memory are cognitive functions most frequently and severely impacted with aging. Indeed spatial memory, which is mediated by the hippocampus, undergoes numerous molecular and physiological changes with aging, including cerebral vascular degeneration, decreased glucose utilization and bioenergetic metabolism [4]. Consistent with cognitive decline, atypical synapse morphology, aberrant protein and neurotransmitter synthesis have been shown with advancing age [5]. Interestingly, studies have shown that aged mice exhibited similar performance than young adult mice on non-hippocampus dependent memory (i.e., object recognition), whereas their performances were decreased in a hippocampus-

* Corresponding author at. CRCA, Université Paul Sabatier, CNRS—UMR 5169, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France.

E-mail address: cedrick.florian@univ-tlse3.fr (C. Florian).

¹ Contributed equally.

dependant object location task [6]. Moreover, the performance of 18 month-old mice showed reduced motor skills and impaired motor coordination in comparison to young mice [7]. Finally, aged mice spent significantly less time in the open arms of an elevated plus maze than adult mice, suggesting a role of aging in anxiety-related behavior [8]. Overall, we cannot exclude that some of cognitive declines observed during aging in mice could be due to anxiety increase and/or locomotion alteration.

Aging is also known to be associated with DNA damage and altered double-strand break (DSB) repair systems [9,10]. Few studies have established a direct link between defect in DNA repair and cognitive deficit during aging. Using a mouse with a mutation in the gene involved in DNA repair pathway (excision repair cross-complementing group1, *Ercc1*), Borgesius and colleagues have shown that unrepaired DNA damage is correlated with age-dependent cognitive decline and hippocampal synaptic plasticity deficit [11]. More recently, altered DSB repair systems has been proposed as a main factor responsible of learning and memory deficit in an Alzheimer's disease mice model [12]. Moreover, altered DNA repair systems might contribute to cognitive decline by regulating the expression of set of genes involved in learning and memory [13]. Altogether, these studies suggest a relationship between DNA damage, memory deficit and aging.

Most premature aging syndromes, as Werner syndrome (WS), are caused by mutations in genes encoding proteins involved in DNA repair, as DNA helicases [14]. WS is an autosomal recessive disease characterized by early onset of many signs of normal aging [15]. The gene responsible for WS was identified by positional cloning and the gene product contains a domain homologous to the RecQ-type DNA helicases involved in repair of double strand DNA [16]. In WS, telomere dysfunction is causal to the accumulation of DNA damage foci and results in premature senescence. Very few little is known on the possible premature aging of the central nervous system in WS [17]. Normal brain morphology and functions have been described in two patients with WS confirming the believe that segmental premature aging spares the central nervous system [17]. However, Leverenz and collaborators have shown extensive β amyloid deposits in frontal cortex, temporal cortex and hippocampus in a 57 year-old patient with WS [18] but it is difficult to conclude since this patient carries also the apolipoprotein (apo) E ϵ 4, the strong risk factor for AD [19]. In contrast, a deletion mutation of *WRN* gene in a 55 year-old patient showed no association with central nervous system pathology, such as amyloid plaques [19]. However because of the rarity of WS patients, the impact of an accelerated aging in brain functions still needs to be established.

Mice lacking the helicase domain exhibit many features of WS, including a pro-oxidant status and a shorter mean life span [20]. Moreover these WS mice developed severe cardiac interstitial fibrosis in addition to tumors and other symptoms found in patients with WS [21]. As a segmental progeroid syndrome, WS does not exhibit all of the features of normal aging but nevertheless is a very useful model system for the behavioral and molecular study of normal aging. Therefore, to address the question whether accelerated aging in WS affects the central nervous system, we investigated the consequences of *WRN* gene mutation on cognitive characteristics in WS mice. Hence, the first aim of our study was to characterize metabolic and behavioral profiles of *WRN* deficiency mice focusing on metabolic dysfunction, locomotion, anxiety, and memory.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Mice lacking part of the helicase domain of the *WRN* gene were generated by homologous recombination as previously described

[20]. Briefly, 121 amino acid residues of the *Wrn* protein were deleted in homozygous *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mice. Initially, the genetic background of these mice was both 129/Sv and Black Swiss. *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mice were at least 12-fold backcrossed to an inbred C57Bl/6 background. Only female homozygous *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mice at 3, 5 and 8 month-old of age were used in behavioral studies. The 3 month-old mice were used as control. Both male and female C57Bl/6 and homozygous *Wrn* ^{Δ hel/ Δ hel} mice were used for the metabolism study. They were housed in a collective cage (5–6 per cage) in a room with controlled temperature (21–23 °C), and a 12-h light/dark cycle. Food and water were provided ad libitum. All experiments were performed in strict accordance with the recommendations of The European Communities Council Directive (86/609/EEC), The French National Committee (87/848) and the guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH publication no. 85–23). In application of the European directive 2010/63/UE and according to the ongoing French legislation at the time of experiments, no specific approval was necessary for this study.

2.2. Metabolic analysis

2.2.1. Glucose tolerance test

Cohorts of mice at different ages were starved for 6 h and then weighed. Baseline blood glucose was measured by tail vein bleeding using a OneTouch glucose meter (Accu-check®). A single dose of 20% D-glucose in saline (1 g/kg body weight) was administered intraperitoneally (t0), which was followed by sampling blood at different time points (t15–t90) to measure blood glucose.

2.3. Behavioral testings

2.3.1. Locomotor and anxiety-related behaviors

Locomotor activity was recorded in a Plexiglas chamber (25 × 21.5 × 9.5 cm) equipped with infrared photobeams (Apelex, Evry, France). Horizontal and vertical activities were measured as the total number of photobeam breaks per 15 min over a 1 h period, starting at 12:00 h P.M. To measure anxiety-related behavior, mice were submitted to an elevated-plus maze. This maze consisted of a plus-shaped track with 2 closed and open arms (30 × 10 × 20 cm) that extended from a central platform (10 × 10 cm). The apparatus was elevated 50 cm above the floor and was surrounded by a white curtain without any conspicuous cues. Each trial began when the mouse was placed in the central zone and lasted 5 min. The number of entries into closed and open arms and the time spent in each arm were monitored. The maze was cleaned with 70% ethanol between each mouse to remove olfactory cues. Mouse behavior was videotaped and analyzed using ethological software.

2.3.2. Object location and object recognition memory task

Object memory tasks were performed in a circular arena (height: 30 cm; diameter: 40 cm) and placed in a room containing no conspicuous features, illuminated by a white light (60 W) and surmounted by a video camera connected to a video recorder and a monitor. The day before training, mice were submitted to a 10-min session consisting to a context habituation period without objects in the arena. During the training day, mice were placed in the same arena with 2 identical objects, i.e. a green glass Pago® bottle (height: 12.9 cm; diameter: 5.8 cm) and their weight was such that they could not be displaced by animals. 24 h after the 10-min training, one group of mice was submitted to a 10-min testing session in the original training arena in which only one of the two objects was moved to a new location. The other group of mice was submitted to a 10-min testing session in the training arena in which a familiar object and a new object, i.e., a white glass cylinder (height: 7 cm; diameter: 6 cm) inserted on a square plastic base (7 × 7 cm) were

located at the same place used during training day. Exploration of the objects was defined as the amount of time mice touched the objects with their nose or anterior paws, and was scored manually by an experimenter blind to age of mice.

2.3.3. Spatial and reversal learning in Morris water maze task

The Morris water maze consisted in a swimming circular pool (height: 30 cm; diameter: 110 cm) filled to a depth of 15 cm with water temperature maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$. The water was made opaque by addition of a white nontoxic opacifier. A white painted platform (diameter: 9 cm) was placed inside the pool, 15.5 cm away from the pool wall. Several extramaze visual cues were attached to the walls of the experimental room. Four start positions were located around the perimeter of the pool, dividing its surface into four equal quadrants. At day 1, mice were individually submitted to a single pre-training session (Familiarization) consisting of three trials with a visible platform that protruded 0.5 cm above the surface of the water and was always located at the same location. At the beginning of each trial, mice were placed in the maze facing the wall at one of the different starting locations. Mice were allowed to swim freely until they reached the platform. Any mouse that did not find the platform within 60 s was gently guided to it by the experimenter. After the animals had climbed onto the platform, they were allowed to remain on it for an additional 60 s. The starting positions were determined in a pseudorandom order, such that each was used once in a single session. Next day, mice were submitted to 6 consecutive training days (day 2 to day 7) with 3 trials a day. Latencies to reach the hidden platform (platform was submerged 0.5 cm beneath the surface of the water) located in the same quadrant (named “target 1”) were recorded by video tracking system (Ethovision XT[®], Noldus, Netherlands). During the probe trial (day 8), the platform was removed and mice, starting from the center of the pool, were allowed a 60-s search for the platform. Time spent in each quadrant was scored. Then, mice were submitted to two days of a reversal learning consisting of 3 trials where the platform was placed to the new location (named “target 2”). Twenty-four hours after the final reversal trial, the platform was removed and the mice were given probe trials as described above.

2.3.4. Contextual fear conditioning paradigm

Training and testing of contextual fear conditioning occurred in rectangular polyvinyl chloride box (length 35 cm, width 20 cm and height 25 cm). Chamber floor was stainless steel rods (diameter 4 mm) spaced 1 cm apart connected to a shock generator (Campden Instruments, UK). The experimental device was lit by a 60 W white bulb. Experiments were recorded by a video camera placed in front of the conditioning chamber, and connected to a TV monitor and a video tape recorder in the adjacent room, where the experimenter and all the electronic system were settled. For all behavioral procedures, freezing (defined as the lack of all movement aside from respiration) served as the dependent measure, and was assessed using a time sampling procedure: mice were observed for 1 s every 5 s and scored as either freezing or active. The conditioning chamber was cleaned with 70% ethanol before each animal's training session. Briefly, mice were placed into the conditioning chamber and were allowed to explore for a 120-s baseline period before to receive a 2-s, 0.70-mA footshock. The first footshock was followed by another one 120 s later. Mice remained in the chambers 30 s after the second footshock before being removed from their home cage. Twenty-four hours after conditioning, mice were individually checked for freezing behavior to the training context for 4 min. Three hours later, mice were submitted to a modified context consisting in a triangular chamber, with white Plexiglas walls and floor. A loud speaker producing an 85 dB tone was fixed on the top of the

chamber. The new chamber was washed with 1% acetic acid and lit by a 40 W red bulb. Freezing was measured as described above.

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism Program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, version, 5.01). Data were tested for normality using Shapiro-Wilk normality test and expressed as means \pm standard error of means (SEM). The trapezoidal rule was used to determine the area under the curve (AUC). Locomotor activity and training in Morris water maze task were analyzed by a two-way ANOVA test with repeated measures. In plus maze and fear conditioning tasks we used one-way ANOVA. In object recognition and object locations tasks, to compare the indice of preference with 50%, one simple *t*-test was used. Only probability values (*P*) less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Werner syndrome mice model show a reduction in glucose tolerance as observed in aged mice

To investigate in vivo the relevance of $\text{Wrn}^{\Delta\text{hel}/\Delta\text{hel}}$ mutant mice in the regulation of glucose, we compared the metabolic phenotype of young (4 month-old), aged (21 month-old) and WS mice (8 month-old). Baseline blood glucose is similar in young, aged and WS mice [pre-injection condition, $F_{(2,30)} = 2.673$, $P = 0.087$]. Upon glucose loading (GTT), 21 month-aged and 8 month-aged WS mice behave the same way exhibiting a significant reduction in glucose tolerance compared to the young mice (Fig. 1A). This decline reached significance at 60 and 120 min in aged and WS mice. Unfortunately, this difference in glycemic levels during the test cannot be appreciated by the area under the curve (AUC) (Fig. 1B).

3.2. Locomotor and anxiety-related behaviors are not affected in Werner syndrome mice model

We examined $\text{Wrn}^{\Delta\text{hel}/\Delta\text{hel}}$ mutant mice for motor and anxiety-related behaviors in actimeter and elevated-plus maze, respectively. Fig. 2 shows the motor activity measured by the number of photobeam breaks during the 60-min session in 3, 5 and 8 month-old mice. An ANOVA revealed no age effect on the motor activity [$F_{(2,39)} = 0.943$, $P = 0.398$]. These results indicated that all experimental groups show identical locomotion, independently of the age of the mice.

Fig. 3 showed the time spent in open arms and the time spent in closed arms (Fig. 3A and B, respectively) of an elevated plus maze. One-way ANOVA showed no difference between the groups for the time spent in the open arms [$F_{(2,36)} = 1.120$, $P = 0.34$] or in the closed arms [$F_{(2,36)} = 2.311$, $P = 0.115$]. Fig. 3C and D showed the frequency of entries into the open arms and the frequency of entries into the closed arms, respectively. Again, statistical analysis revealed no difference between $\text{Wrn}^{\Delta\text{hel}/\Delta\text{hel}}$ mice for the number of entries into the open arms [$F_{(2,36)} = 0.5098$, $P = 0.605$] and the closed arms [$F_{(2,36)} = 0.374$, $P = 0.690$] at the different ages. Altogether these results reveal no age-related effect on emotional behavior in WS mouse model.

3.3. Object location but not object recognition memory is impaired in Werner syndrome mice model

We assessed hippocampal function and spatial memory formation in WS mice by using a hippocampus-dependent object-location memory task [22]. First, mice were submitted to a 10-min session in the training arena with two identical objects (Fig. 4A). No significant difference on the time spent to contact the two objects

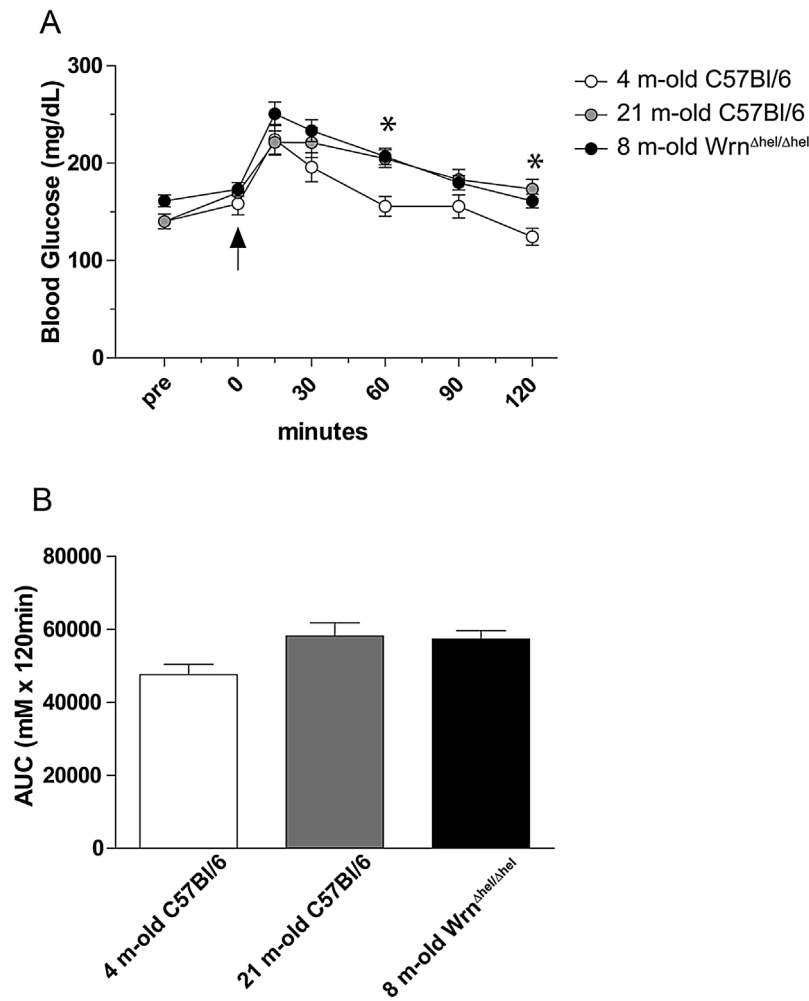


Fig. 1. A) Plasma glucose concentration during the intraperitoneal glucose tolerance test (GTT; 1 g/kg) in young (4 month-old, $n=5$) and aged (21 month-old, $n=11$) male and female C57Bl/6, and in 8 month-old male and female Werner syndrome mice ($n=17$). Arrows indicated the administration of glucose (t0). B) There was no difference in the area under the curve (AUC) of the GTT between groups (Mann Whitney test: 4 month-old vs. 21 month-old mice, $P=0.0829$; 4 month-old vs. WS mice, $P=0.0502$). Results are means \pm SEM ($n=5-17$). * $P<0.05$, in comparison to 4-month-old C57Bl/6 mice.

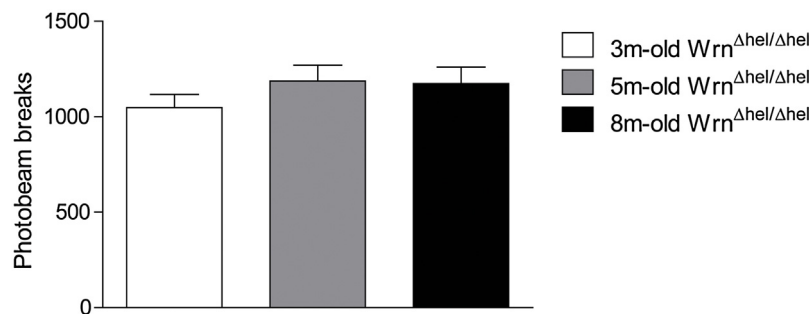


Fig. 2. Locomotor activity in Werner syndrome mice. Total number of horizontal and vertical photobeam breaks (\pm SEM) during 60 min in 3 month-old ($n=14$), 5 month-old ($n=14$) and 8 month-old female Wnr^{Δhel/Δhel} mice ($n=12$).

was observed between the experimental groups (all $P>0.05$), indicating that age does not alter the exploration of the objects in WS mice (Fig. 4B).

Twenty four hours after, half part of experimental groups of mice were re-introduced to the training arena with one of the two objects moved to a new location. The Fig. 4C shows the percentage of time sniffing the displaced object. Overall, an analysis of variance reveals a significant age effect on the exploration of the moved object [$F_{(2,19)}=22.01$, $P<0.0001$]. Three-month old

Wnr^{Δhel/Δhel} mice show a significant preference for the displaced object ($P<0.001$) while 5 and 8 month-old Wnr^{Δhel/Δhel} mice failed to detect the spatial change of the object ($P=0.35$ and $P=0.72$, respectively). This finding suggests that WS mice of 5 and 8 month of age show a hippocampus-dependent memory deficit.

To address whether these deficits are specific to the hippocampus and spatial memory, we assessed an object recognition task to the other half part of the trained mice (Fig. 4D). No difference has been observed on the total time spent sniffing the new object

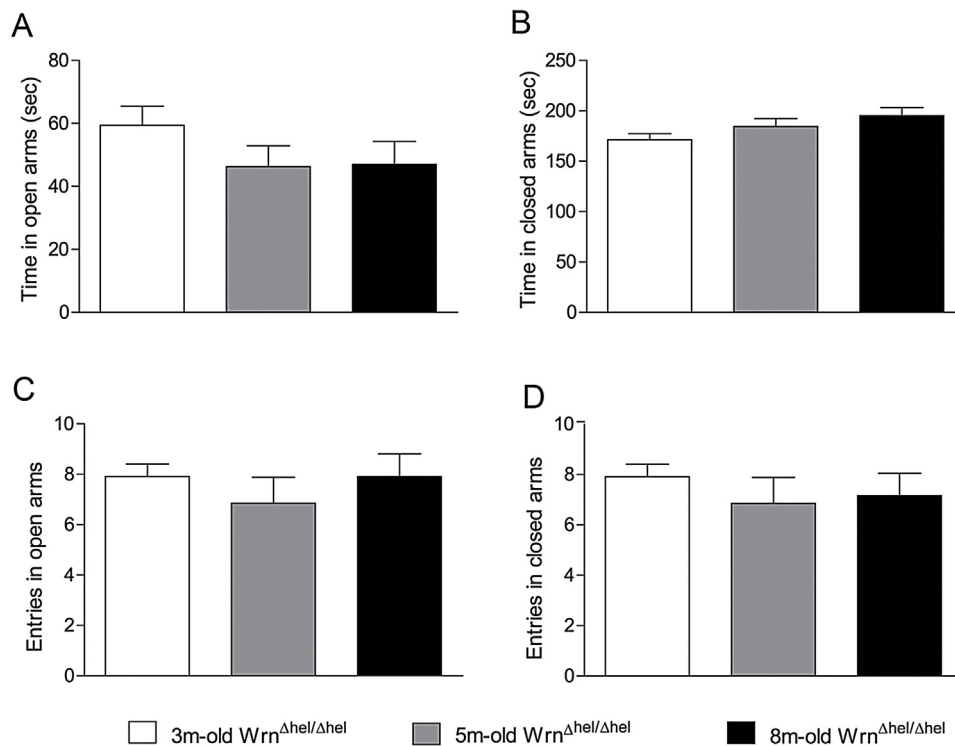


Fig. 3. Anxiety-like behaviors in the elevated-plus-maze in Werner syndrome mice. A) Total time spent in open arms (+SEM) and B) total time spent in closed arms (+SEM). C) Number of open arms entries (+SEM) and D) number of closed arms entries (+SEM) in 3 month-old ($n = 11$), 5 month-old ($n = 14$) and 8 month-old female $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice ($n = 12$).

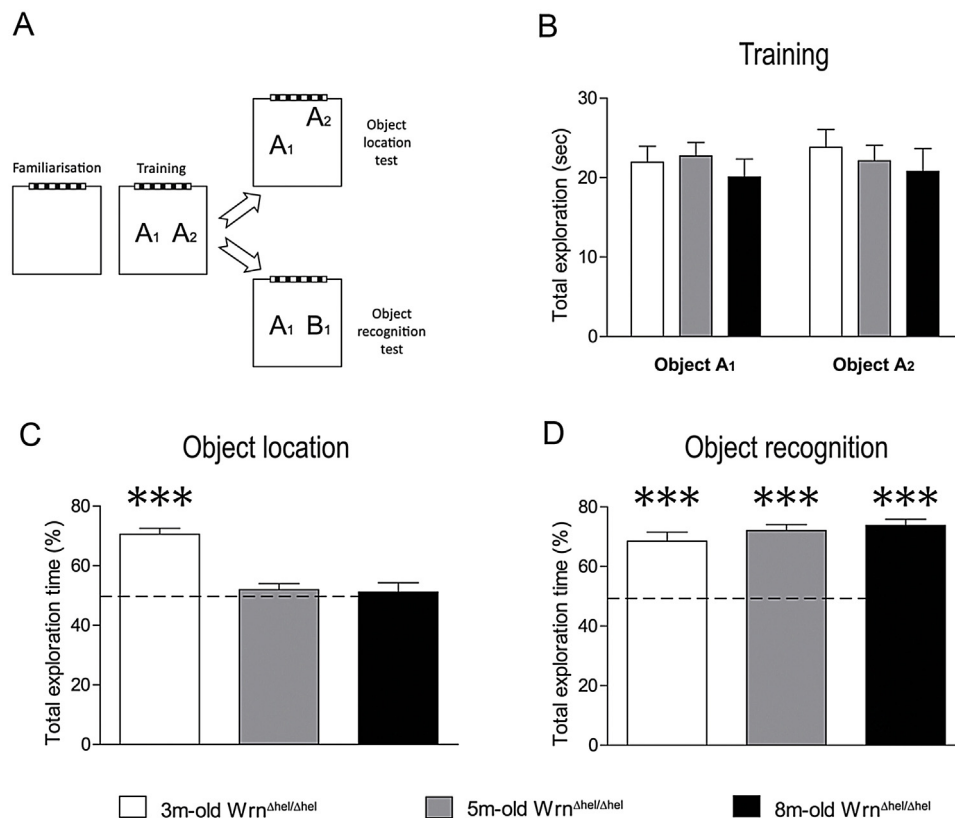


Fig. 4. Object place and object recognition memory task in Werner syndrome mice. Object place memory but not object recognition memory is impaired in Werner mice. A) Experimental design for both tasks. Animals were first familiarized to the training context once for 10 min followed by one 10-min training session with identical objects. Testing occurred 24 h after the training by moving one of the objects or replacing one of the familiar objects (A) with a novel object (B). B) Percentage of exploration time (\pm SEM) for the objects during the 10-min training session. C) Bar graphs showing percentage (\pm SEM) preference for the displaced object at 24 h for 3 month-old ($n = 7$), 5 month-old ($n = 7$) and 8 month-old female $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice ($n = 6$). D) Bar graphs showing percentage preference for the new object during testing (24 h after training) for hours for 3 month-old ($n = 7$), 5 month-old ($n = 7$) and 8 month-old female $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice ($n = 6$). *** $P < 0.001$ relative to 50% chance level (dashed line).

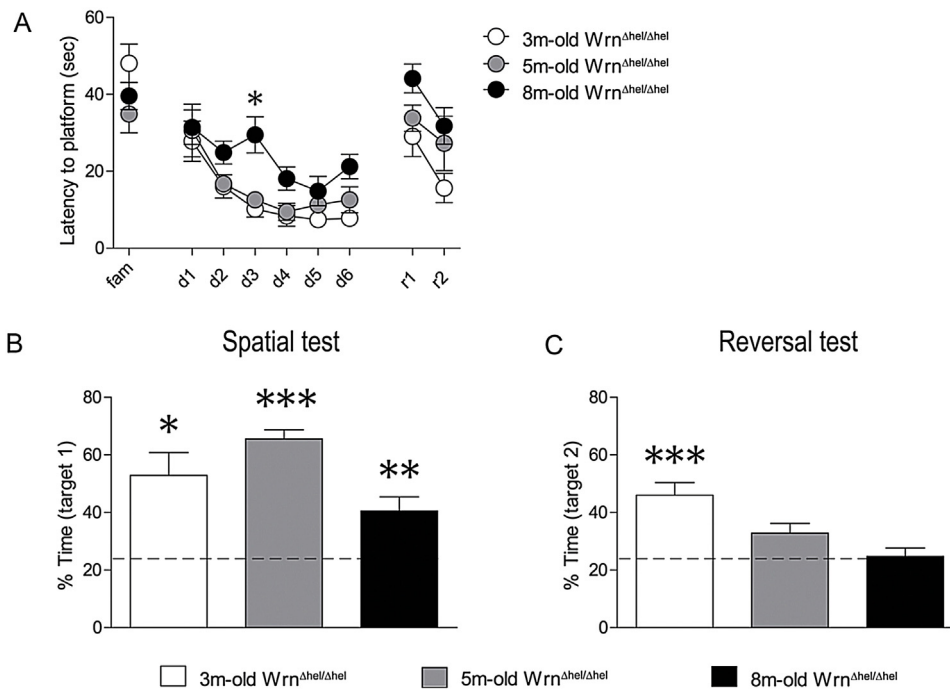


Fig. 5. Spatial memory evaluated with the Morris Water Maze in Werner syndrome mice. A) Latency to reach the visible platform on day 0 (familiarization); latency to reach the hidden platform across the daily-learning sessions (learning, d1 to d6); latency to reach the hidden platform across the reversal-learning sessions (reversal r1 and r2). B) Spatial probe test 24 h after training. C) Probe test 24 h after reversal training. 3 month-old ($n=7$), 5 month-old ($n=6$) and 8 month-old female $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice ($n=12$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ relative to the 25% chance level (dashed line).

[$F_{(2,19)} = 1.183$, $P = 0.330$]. All WS mice showed a significant preference for the novel object ($P < 0.0001$), suggesting that in this non hippocampus-dependent test, memory remains unaffected with age in WS mice model.

3.4. Spatial reversal learning is impaired in Werner syndrome mice model

Spatial reversal learning is impaired in aged rats [23], mice [24] and human [25,26]. To evaluate whether behavioral flexibility is also altered in Werner syndrome mice, we submitted 3, 5 and 8 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice to the Morris water maze paradigm.

Fig. 5 shows the average latencies to reach the platform of WS mice at the ages of 3, 5 and 8 months. Mice were first submitted to a familiarization session consisting to swim and reach a visible platform. No significant difference was observed between 3, 5 and 8 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice (Fig. 5A; $P = 0.1668$), suggesting that all mice learned to swim to the visible platform equally. Then, mice were submitted to a 6-day learning session consisting to learn to find a hidden platform by using external cues located around the pool. A repeated measures ANOVA indicated an overall effect of session [$F_{(5,110)} = 11.21$, $P < 0.001$], group [$F_{(2,22)} = 7.81$, $P < 0.01$], but no effect session \times group [$F_{(10,110)} = 0.959$, $P = 0.483$]. These results suggested that younger $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice (3 and 5 month-old) were able to learn better this task whereas the learning function of older (8 month-old) $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice declined. Finally, no significant difference was observed in swimming speed between WS deficiency mice during learning. Twenty four hours after the last acquisition trial, mice were submitted to a probe test to evaluate spatial memory. The platform was removed from the maze and mice were allowed to search for the platform position during 1 min. As showed in Fig. 5B, all mice exhibited a preference for the quadrant where the platform was located during the training sessions (3 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$, $P < 0.05$; 5 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$, $P < 0.001$; 8 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$, $P < 0.01$). These results indi-

cated that $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice are able to remember the position of the platform 24 h later. To access to behavioral flexibility, mice were submitted to a 2-days reversal learning sessions where the hidden platform was moved to the opposite location (target 2). Again, mice learnt the new spatial position of the platform by reaching it. ANOVA revealed a significant session effect [$F_{(1,22)} = 9.976$, $P < 0.01$], a group effect [$F_{(2,22)} = 4.38$, $P < 0.05$] but no interaction between these two factors [session \times group, $F_{(2,22)} = 33.81$, $P = 0.7167$]. A probe test performed 24 h after the last reversal training session showed that 3 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice spent more time in the quadrant 2 than in the other quadrants ($P < 0.001$), suggesting that young WS mice do not exhibit deficits in behavioral flexibility (Fig. 5C). However, both 5 and 8 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice spent the same amount of time in the different quadrants revealing that these mice failed to find the new platform location ($P = 0.0694$ and $P = 0.9336$, respectively). Together, these results suggest that WS mice aged of 5 and 8 month exhibit reversal spatial memory impairment and thus decreased behavioral flexibility.

3.5. Contextual reversal learning is also impaired in Werner syndrome mice model

Fear conditioning paradigm consists for mice to associate a conditioned stimulus (CS) such as the context, to an unconditional stimulus (US) such as an electric footshock. Thereafter, when exposed to the CS, mice will show a conditioned fear response, corresponding to a species-specific defense reaction detectable as total immobility or “freezing”. The hippocampus is thought to govern primarily the processing of the contextual representation that will be associated with the US, whereas the amygdala has been shown to be mandatory for associating both the context to the US [27].

Twenty four hours after the training, the percentage of freezing was measured for 4 min (Fig. 6A). The results showed that all groups of mice have a comparable rate of freezing time [$F_{(2,24)} = 0.2372$, $P = 0.791$]. These results suggest that WS mice have no deficits in

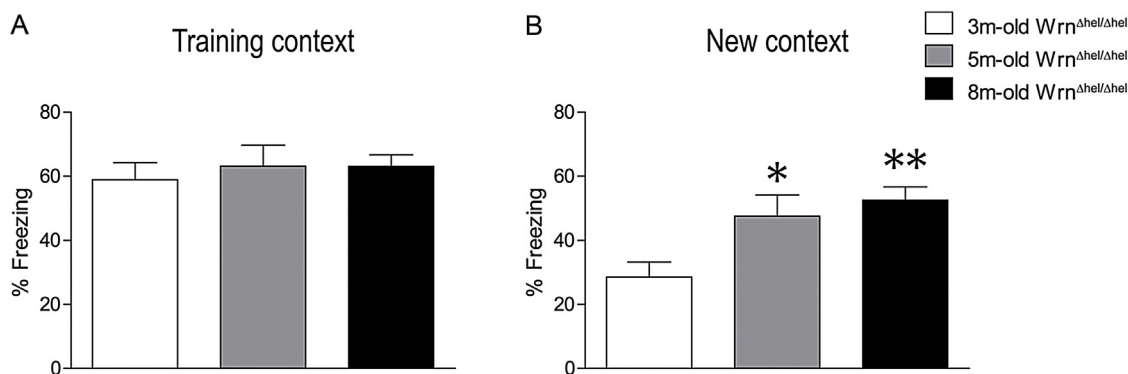


Fig. 6. Contextual fear conditioning paradigm in Werner syndrome mice. Percentage of freezing response in training context (A) and modified (new) context (B). 3 month-old ($n = 7$), 5 month-old ($n = 6$) and 8 month-old female $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice ($n = 12$). * $P < 0.05$ 5m-old vs. 3m-old WS mice. ** $P < 0.001$ 8m-old vs. 3m-old WS mice.

contextual fear memory. Then, behavioral flexibility was analyzed by submitting mice to a modified context (Fig. 6B). It is expected that mice with normal hippocampal functioning would not freeze since the context is different from the one where they received the shock. Analysis of variance showed a significant effect of the age of mice on freezing [$F_{(2,24)} = 6.381$, $P < 0.01$]. The results showed that WS mice aged of 5 and 8 months show higher level of freezing in modified context in comparison to the 3 month-old WS mice ($P < 0.01$), suggesting that these mice generalize the new context with shock. The results of behavioral flexibility both in the Morris water maze and in the fear conditioning showed that adult WS mice are unable to adapt to a changed consign.

4. Discussion

The aim of our study was to characterize the behavior of a mouse model of accelerated aging focusing on locomotion, anxiety, and memory. To our knowledge, no study has performed a behavioral investigation in mice with mutations in the *WRN* helicase gene. So we addressed the question whether the induction of premature aging in young adults can affect the central nervous system as observed in normal aged mice. Our data suggested similarities between 8 month-old WS mice and aged mice based on cognitive performances.

Because aging is characterized by a general decline in cellular function, and more particularly glucose homeostasis [3], we first performed a glucose tolerance test in WS mice. Our results revealed that 8 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice present a similar kinetic response compared to a 21 month-old C57Bl/6 mice after glucose administration. This first conclusion confirms metabolic alterations in WS mice [28,29].

As mentioned in the Table 1, our results show that WS mice, regardless of their age, exhibited normal performances in locomotor activity, anxiety-related behaviors, and in a non

hippocampo-dependant object recognition task. Interestingly, their performances were significantly impaired in hippocampo-dependent spatial memory tasks at the age of 5 months (for the displaced object task) and/or 8 months (for the displaced object and Morris water maze (learning) tasks), but not in a hippocampal version of the fear conditioning task, reflecting intact contextual memory. It is noteworthy however that the cognitive flexibility was strongly impaired in both Morris water maze and fear conditioning, which is a hallmark of brain aging.

In a first set of experiments we studied the locomotion, one parameter which is altered in aged mice (Table 2). In fact, aged mice (24 months) are characterized by diminution in locomotor activity in a test of motor behavior [30,31] and in an open field task [32,33]. It could be a problem since aged mice with an alteration of locomotor activity do not allow concluding on the results found in cognitive tests often based on mouse exploration. Our results showed that WS mice have no alteration in locomotor activity allowing us to conclude on the results found in anxiety and memory tests. Several studies gave contradictory results in anxiety-related behaviors. Some study showed decreased anxiety in aged mice (or in other words “desinhibition”), at 24 months in elevated plus maze [30], and at 21 months in elevated zero-maze [34]. Other studies showed that anxiety increased in aged mice in elevated plus maze at 29 months [35] in elevated plus maze and open field at 28 months [31]. In our study, the results in elevated plus maze showed that WS mice at different age exhibited the same level of anxiety. Altogether, our conclusions suggest that WS mice behave differently than aged mice when submitted to a locomotor and anxiety test.

We next evaluated a hippocampus independent memory task (object recognition) and the results showed no difference between the three groups of age of WS mice. Similar results were found in young and old C57/Bl6 mice [6,31,36]. On the contrary, in the displaced object hippocampus dependent test, 5 and 8 month-old WS mice are not able to identify the displaced object, suggesting that

Table 1
Summary of the results obtained in 3, 5 and 8 month-old $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice.

Behavioral task	3 m-old	5 m-old	8 m-old
Locomotion	Normal	Normal	Normal
Anxiety	No	No	No
Non hippocampus-dependent memory Object recognition task	Normal	Normal	Normal
Hippocampus-dependant memory Displaced object task	Normal	Deficit	Deficit
Hippocampus-dependant memory Morris water maze	Normal	Normal	Weak performance
Behavioral flexibility in Morris water maze	No deficit	Deficit	Deficit
Hippocampus-dependant memory Contextual fear conditioning	Normal	Normal	Normal
Behavioral flexibility in fear conditioning	Normal	Deficit	Deficit

Table 2

Some results found in the literature concerning cognitive impairments in aged mice.

Behavioral task	References	Genetic background	Sex	Age (months)	Behavioral performance
Locomotion	Benice et al. [33]	C57Bl/6	M/F	3–4	Normal
				10–12	Normal
	Frye et al. [30]	C57Bl/6	M	24	Affected
				3	Normal
	Zhao et al. [32]	C57Bl/6	F	24	Affected
				4	Normal
	Fahlstrom et al. [31]	C57Bl/6	M/F	20	Affected
4				Normal	
22				Normal	
Anxiety	Bedrosian et al. [35]	C57Bl/6	M	28	Affected
				7	No
	Frye et al. [30]	C57Bl/6	M	29	Yes
				3	No
	Fahlstrom et al. [31,36]	C57Bl/6	M/F	24	Yes
				4	No
				22	Yes
Bisaz et al. [34]	C57Bl/6	M	28	Yes	
			6–9	No	
17–21	Yes				
Non hippocampus-dependent memory	Wimmer et al. [6]	C57Bl/6	M	2–4	Normal
				22–24	Normal
	Fahlstrom et al. [31,36]	C57Bl/6	M/F	4	Normal
				22	Normal
				28	Normal
	Fahlstrom et al. [36]	C57Bl/6	F	3	Normal
				8	Normal
Benice et al. [33]	C57Bl/6	M/F	28	Normal	
			3–4	Normal	
10–12	Normal				
18–20	Normal				
Hippocampus- dependant memory: displaced object task	Wimmer et al. [6]	C57Bl/6	M/F	2–4	Normal
				22–24	Deficit
	Benice et al. [33]	C57Bl/6	M/F	3–4	Normal
				10–12	Normal
	Murai et al. [47]	CD1	M	18–20	Deficit
2				Normal	
20	Deficit				
Hippocampus- dependant memory: Morris water maze	Holschneider et al. [38]	C57Bl/6/129-sv	M	2	Normal
				7	Weak performance
				17	Weak performance
	Fu et al. [37]	CD1	M	3	Normal
				24	Weak performance
	De Fiebre et al. [40]	C57Bl/6	M	6	Normal
16				Normal	
24	Weak performance				
Behavioral flexibility in Morris water maze	Matzel et al. [39]	CD1	M	5	Normal
				18	Deficit
	De Fiebre et al. [40]	C57Bl/6	M	6	Normal
				16	Normal
				24	Deficit
	Holschneider et al. [38]	C57Bl/6/129-sv	M	2	Normal
				7	Normal
17	Deficit				
Hippocampus- dependant memory: fear conditioning	Kennard and Woodruff-Pak, [41]	CB6F1	M	8	Normal
				18	Normal
				25	Normal

WS mice show a deficit in hippocampus dependent memory. Similar results were found in 20 [33] and 24 month-old [6] mice in the same test. As indicated in the Table 1, 8 month-old WS mice could learn but less efficiently than 3 month-old WS mice in a spatial version of Morris water maze task. Lower spatial learning performances have been also observed in 24 month-old CD-1 mice [37]. We also explored another parameter that may be altered with aging which is behavioral flexibility, i.e. the capacity of the mouse to adapt its behavior to an environment/instruction change. Behavioral flexibility is altered in 17 month-old C57Bl/6 mice [38], 18 month-old CD-1 mice [39], and 22–26 month-old C57Bl/6 mice [40] as well

as in WS mice at 5 and 8 months of age in this study. Another type of hippocampus dependent memory, contextual memory, was next evaluated in WS mice. Similar to aged mice, $Wrn^{\Delta hel/\Delta hel}$ mice showed no deficit in contextual fear memory as was also found in old mice [41]. Old rats showed similar decreased behavioral flexibility in this task and cannot discriminate between the context where a foot shock was emitted and another context without foot shock [42]. Similar results were also found in the present study with WS mice. The generalization of fear response could also explain the phenotype observed in 5 and 8 month-old WS mice. Indeed, these mice could extend fear memory – previously formed dur-

ing the exposure to the conditioning context – to a new and save context. Our results suggest that 3 month-old WS mice are able to discriminate between the training context and the new context, showing a lower freezing response in the novel context. At contrary, 5 and 8 month-old WS mice fail to discriminate between these two contexts, exhibiting a high freezing response in both conditioning and novel contexts. Moreover, we cannot explain this high freezing response by an exacerbated anxiety since the 5 and 8 month-old WS mice did not exhibit different anxiety-related behavior compared to the 3 month-old group.

It is noteworthy that the mouse model of the DNA repair deficiency (mutation of a WRN helicase gene), and the senescence-accelerated mouse (SAM), and more particularly SAMP 8, show similar age-related impairments of learning and memory [43–45], suggesting that premature aging disrupts brain functions. We hypothesize that mature neurons gradually accumulate unrepaired DNA damage over time, which could potentially lead to gene expression alteration [46] and cognitive deficits [12].

In conclusion, the 8 month-old WS mice exhibit similar cognitive decline as observed in aged mice (>18 months) but not emotional and motor dysfunctions, suggesting that 8 month-old WS mice are a good model to investigate effect of aging in learning and memory.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interests.

Acknowledgments

We thank Dr M. Lebel (Centre de Recherche du CHU de Québec, Québec, Canada) for providing the WRN helicase mutant mice for this study. We are grateful to H. Halley and S. Pech for their technical assistance. We thank the ABC Facility of ANEXPLO Toulouse for the mouse husbandry. This study was supported by CNRS and University Paul Sabatier of Toulouse.

References

- [1] R.H. Houtkooper, C. Argmann, S.M. Houten, C. Canto, E.H. Jeninga, P.A. Andreux, et al., The metabolic footprint of aging in mice, *Sci. Rep.* 1 (2011) 134.
- [2] M. Luciano, R.E. Marioni, A.J. Gow, J.M. Starr, I.J. Deary, Reverse causation in the association between C-reactive protein and fibrinogen levels and cognitive abilities in an aging sample, *Psychosom. Med.* 71 (2009) 404–409.
- [3] M.P. Hermans, T.M. Peppersack, L.H. Godeaux, I. Beyer, A.P. Turc, Prevalence and determinants of impaired glucose metabolism in frail elderly patients: the Belgian Elderly Diabetes Survey (BEDS), *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 60 (2005) 241–247.
- [4] H.D. Vanguilder, W.M. Freeman, The hippocampal neuroproteome with aging and cognitive decline: past progress and future directions, *Front. Aging Neurosci.* 3 (2011) 8.
- [5] S.N. Burke, C.A. Barnes, Neural plasticity in the ageing brain, *Nat. Rev. Neurosci.* 7 (2006) 30–40.
- [6] M.E. Wimmer, P.J. Hernandez, J. Blackwell, T. Abel, Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice, *Neurobiol. Aging* 33 (2012) 2220–2224.
- [7] G. Barreto, T.T. Huang, R.G. Giffard, Age-related defects in sensorimotor activity, spatial learning, and memory in C57BL/6 mice, *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 22 (2010) 214–219.
- [8] T. Freret, J.M. Billard, P. Schumann-Bard, P. Dutar, F. Dauphin, M. Boulouard, et al., Rescue of cognitive aging by long-lasting environmental enrichment exposure initiated before median lifespan, *Neurobiol. Aging* 33 (2012) 1005–1010.
- [9] V. Gorbunova, A. Seluanov, Z. Mao, C. Hine, Changes in DNA repair during aging, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 7466–7474.
- [10] J. Vijg, Y. Suh, Genome instability and aging, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 645–668.
- [11] N.Z. Borgesius, M.C. de Waard, I. van der Pluijm, A. Omrani, G.C. Zondag, G.T. van der Horst, et al., Accelerated age-related cognitive decline and neurodegeneration, caused by deficient DNA repair, *J. Neurosci.* 31 (2011) 12543–12553.
- [12] E. Suberbielle, B. Djukic, M. Evans, D.H. Kim, P. Taneja, X. Wang, et al., DNA repair factor BRCA1 depletion occurs in Alzheimer brains and impairs cognitive function in mice, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8897.
- [13] T. Lu, Y. Pan, S.Y. Kao, C. Li, I. Kohane, J. Chan, et al., Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain, *Nature* 429 (2004) 883–891.
- [14] Z.E. Karanjawala, M.R. Lieber, DNA damage and aging, *Mech. Ageing Dev.* 125 (2004) 405–416.
- [15] C.A. Sprague, P.W. Kohnen, Martin G.M. Sirenomelia, Chromosomal breaks and abnormal associations in cultures from the fused lower limb, *Arch. Pathol.* 90 (1970) 29–30.
- [16] X. Yu, M.M. Hingorani, S.S. Patel, E.H. Egelman, DNA is bound within the central hole to one or two of the six subunits of the T7 DNA helicase, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 740–743.
- [17] A. Postiglione, A. Soricelli, E.M. Covelli, N. Iazzetta, A. Ruocco, G. Milan, et al., Premature aging in Werner's syndrome spares the central nervous system, *Neurobiol. Aging* 17 (1996) 325–330.
- [18] J.B. Leverenz, Schellenberg GD. Yu CE, Aging-associated neuropathology in Werner syndrome, *Acta Neuropathol.* 96 (1998) 421–424.
- [19] H. Mori, T. Tomiyama, N. Maeda, K. Ozawa, K. Wakasa, Lack of amyloid plaque formation in the central nervous system of a patient with Werner syndrome, *Neuropathology* 23 (2003) 51–56.
- [20] M. Lebel, P. Leder, A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 13097–13102.
- [21] L. Massip, C. Garand, R.V. Turaga, F. Deschenes, E. Thorin, M. Lebel, Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner syndrome gene homologue, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 157–168.
- [22] E. Save, B. Poucet, N. Foreman, M.C. Buhot, Object exploration and reactions to spatial and nonspatial changes in hooded rats following damage to parietal cortex or hippocampal formation, *Behav. Neurosci.* 106 (1992) 447–456.
- [23] G. Schoenbaum, S. Nugent, M.P. Saddoris, M. Gallagher, Teaching old rats new tricks: age-related impairments in olfactory reversal learning, *Neurobiol. Aging* 23 (2002) 555–564.
- [24] D.R. Zamzow, V. Elias, M. Shumaker, C. Larson, K.R. Magnusson, An increase in the association of GluN2B containing NMDA receptors with membrane scaffolding proteins was related to memory declines during aging, *J. Neurosci.* 33 (2013) 12300–12305.
- [25] R. Schoenfeld, N. Foreman, B. Leplow, Ageing and spatial reversal learning in humans: findings from a virtual water maze, *Behav. Brain Res.* 270 (2014) 47–55.
- [26] L.A. Uresti-Cabrera, R. Diaz, I. Vaca-Palomares, J. Fernandez-Ruiz, The effect of spatial working memory deterioration on strategic visuomotor learning across aging, *Behav. Neurosci.* 2015 (2015) 512617.
- [27] K.A. Goosens, S. Maren, Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats, *Learn. Mem.* 8 (2001) 148–155.
- [28] S. Chang, A.S. Multani, N.G. Cabrera, M.L. Naylor, P. Laud, D. Lombard, et al., Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome, *Nat. Genet.* 36 (2004) 877–882.
- [29] G. Moore, S. Knoblauch, K. Gollahon, P. Rabinovitch, W. Ladiges, Hyperinsulinemia and insulin resistance in Wrm null mice fed a diabetogenic diet, *Mech. Ageing Dev.* 129 (2008) 201–206.
- [30] C.A. Frye, K. Edinger, K. Sumida, Androgen administration to aged male mice increases anti-anxiety behavior and enhances cognitive performance, *Neuropsychopharmacology* 33 (2008) 1049–1061.
- [31] A. Fahlstrom, H. Zeberg, B. Ulfhake, Changes in behaviors of male C57BL/6j mice across adult life span and effects of dietary restriction, *Age* 34 (2012) 1435–1452.
- [32] H.F. Zhao, Q. Li, Y. Li, Long-term ginsenoside administration prevents memory loss in aged female C57BL/6j mice by modulating the redox status and up-regulating the plasticity-related proteins in hippocampus, *Neuroscience* 183 (2011) 189–202.
- [33] T.S. Benice, A. Rizk, S. Kohama, T. Pfankuch, J. Raber, Sex-differences in age-related cognitive decline in C57BL/6j mice associated with increased brain microtubule-associated protein 2 and synaptophysin immunoreactivity, *Neuroscience* 137 (2006) 413–423.
- [34] R. Bisaz, P. Boadas-Vaello, D. Genoux, C. Sandi, Age-related cognitive impairments in mice with a conditional ablation of the neural cell adhesion molecule, *Learn. Mem.* 20 (2013) 183–193.
- [35] T.A. Bedrosian, K.L. Herring, Z.M. Weil, R.J. Nelson, Altered temporal patterns of anxiety in aged and amyloid precursor protein (APP) transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 11686–11691.
- [36] A. Fahlstrom, Q. Yu, B. Ulfhake, Behavioral changes in aging female C57BL/6 mice, *Neurobiol. Aging* 32 (2011) 1868–1880.
- [37] A. Fu, R. Zhou, X. Xu, The synthetic thyroid hormone, levothyroxine, protects cholinergic neurons in the hippocampus of naturally aged mice, *Neural Regen. Res.* 9 (2014) 864–871.
- [38] D.P. Holschneider, O.U. Scremin, K. Chen, J.C. Shih, Lack of protection of monoamine oxidase B-deficient mice from age-related spatial learning deficits in the Morris water maze, *Life Sci.* 65 (1999) 1757–1763.
- [39] L.D. Matzel, K.R. Light, C. Wass, D. Colas-Zelin, A. Denman-Brice, A.C. Waddell, et al., Longitudinal attentional engagement rescues mice from age-related cognitive declines and cognitive inflexibility, *Learn. Mem.* 18 (2011) 345–356.
- [40] N.C. de Fiebre, N. Sumien, M.J. Forster, C.M. de Fiebre, Spatial learning and psychomotor performance of C57BL/6 mice: age sensitivity and reliability of individual differences, *Age* 28 (2006) 235–253.
- [41] J.A. Kennard, D.S. Woodruff-Pak, Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice, *Front. Aging Neurosci.* 3 (2011).

- [42] F.P. Houston, G.D. Stevenson, B.L. McNaughton, C.A. Barnes, Effects of age on the generalization and incubation of memory in the F344 rat, *Learn. Mem.* 6 (1999) 111–119.
- [43] J.F. Flood, J.E. Morley, Learning and memory in the SAMP8 mouse, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22 (1998) 1–20.
- [44] M. Miyamoto, Y. Kiyota, N. Yamazaki, A. Nagaoka, T. Matsuo, Y. Nagawa, et al., Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM), *Physiol. Behav.* 38 (1986) 399–406.
- [45] H. Yagi, S. Katoh, I. Akiguchi, T. Takeda, Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory, *Brain Res.* 474 (1988) 86–93.
- [46] R. Madabhushi, L. Pan, L.H. Tsai, DNA damage and its links to neurodegeneration, *Neuron* 83 (2014) 266–282.
- [47] T. Murai, S. Okuda, T. Tanaka, H. Ohta, 2007, Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies, *Physiol. Behav.* 90 (2017) 116–124.

Discussion :

Les résultats de cette première partie montrent pour la première fois que les souris Werner commencent à développer à partir de l'âge de 5 mois des problèmes cognitifs liés à l'âge comme ceux décrits dans la littérature pour les souris normales âgées de 18 mois. Ces problèmes touchent notamment la mémoire hippocampo-dépendante. Chez nos souris modèle du syndrome de Werner ces résultats ne semblent pas être causés par des problèmes liés à l'anxiété ou à la locomotion fréquemment observés chez des souris âgées. Sur le plan comportemental, ces résultats nous permettent de suggérer que ce modèle de vieillissement accéléré semble être un bon modèle pour étudier le vieillissement physiologique normal. Cependant, les causes de ces troubles cognitifs ne sont pas connues puisque aucune étude de ce type n'a été faite à ce jour. Il existe plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer ces problèmes. Une des hypothèses est la présence de plaques amyloïdes dans les cerveaux Werner. En effet, chez l'homme, deux études font état de résultats contradictoires au vu de la présence de plaques amyloïdes qui ont été détectées chez un patient Werner mais pas dans une autre fratrie (Leverenz et al., 1998, Mori et al., 2003). Ceci nous a orientés vers l'hypothèse que les problèmes de mémoires observés chez nos souris Werner pourraient être causés par la présence de plaques amyloïdes. Une étude immunohistochimique qualitative que nous avons menée sur les cerveaux de ces souris n'a pas montré de dépôt de plaques amyloïdes. Il faut noter que la patiente présentant des plaques était porteuse de l'allèle du gène de susceptibilité Apoε4 de la maladie d'Alzheimer. D'autre part, les problèmes cognitifs liés à l'âge peuvent découler de plusieurs changements anatomiques ou physiologiques au niveau du cerveau âgé. En effet, au cours du vieillissement, l'hippocampe subit des modifications comme la réduction du volume et un déclin de l'intégrité synaptique. Les bases moléculaires et cellulaires de ces changements incluent par exemple les agrégats de protéines (Paz Gavilan et al., 2006), la diminution de l'expression des protéines synaptiques (VanGuilder et al., 2010) et l'augmentation du stress oxydatif (Squier, 2001). Ceci suggère que le microenvironnement neural devient dérégulé au niveau de l'hippocampe de la personne âgée. Cette dérégulation peut avoir pour origine la diminution de la capacité des cellules gliales à jouer leur rôle protecteur, de soutien nutritionnel et de neurotransmission qui sont des éléments vitaux pour le maintien du bon fonctionnement de l'hippocampe dans l'apprentissage et la mémoire (Ben Achour and Pascual, 2010). La neuroinflammation est un marqueur du vieillissement normal (VanGuilder et al., 2011). Ce mécanisme est impliqué dans les déficits cognitifs et peut être associé à une dégénérescence

neuronal. Les marqueurs de l'inflammation CD7 et GFAP semblent être augmentés avec l'âge au niveau de l'hippocampe (VanGuilder et al., 2011).

Pour tester ces hypothèses chez les souris WRN, une étude par imagerie cérébrale serait nécessaire pour vérifier s'il y a une réduction du volume hippocampique. De plus une étude des marqueurs d'inflammation et d'apoptose dans les différents types cellulaires peut être envisagée afin de mieux comprendre la cause des problèmes cognitifs observés chez les souris Werner.

**Partie 2 : Etude des effets amnésiants
des agonistes des récepteurs NOP sur
la reconsolidation de la mémoire**

Introduction :

La mémoire n'est pas un processus passif par lequel nous mémorisons de façon équivalente toutes les informations du monde extérieur. En effet, le contexte dans lequel les informations sont présentées filtre, module et conditionne le stockage et la restitution ultérieure (McEwen and Sapolsky, 1995). La connotation émotionnelle de la situation présente un filtre très important dans notre vie et notre perception de l'information. Par exemple, la majorité des personnes se rappellent du lieu où elles se trouvaient quand elles ont appris l'attentat du 11 septembre 2001, tandis qu'il est difficile de se rappeler d'un détail d'un jour quelconque, sans événement marquant particulier. Donc il existe une mémoire facilitée par les émotions et nous parlerons alors de la mémoire émotionnelle. A la suite d'un événement intense à extrême, la mémoire peut être sévèrement altérée. En effet, certaines personnes qui ont vécu des événements très traumatisants développent un PTSD accompagné d'une hypermnésie de l'évènement. La personne ayant subi ce traumatisme subit alors une détresse psychologique et présente des réactions physiologiques intenses lors de l'exposition à des indices évoquant l'évènement traumatique, comme s'ils revivaient réellement cet événement. La personne développe aussi un comportement d'évitement, c'est à dire éviter toutes pensées, lieux, personnes, activités pouvant lui rappeler son trauma (Jorge, 2015).

Outre une meilleure compréhension de la biologie du PTSD, les modèles animaux ont permis de mettre en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi de développer de nouveaux traitements. Pour ce faire, les chercheurs ont modélisé le traumatisme chez les rongeurs par le test de conditionnement à la peur. L'animal doit associer un stimulus conditionnel (SC ; son ou contexte, ou son et contexte) à un stimulus aversif (choc). Après l'apprentissage, les animaux expriment une réponse de peur conditionnée lors de la réexposition au SC seul. Dans ce type de test d'association, l'hippocampe est requis pour participer à la formation de représentations configurales d'un contexte ou de représentations spatiales ou relationnelles. Pour cette tâche contextuelle, c'est l'hippocampe dorsal qui est sollicité car l'hippocampe ventral semble être moins capable que l'hippocampe dorsal de traiter les informations contextuelles. Par ailleurs, seul l'hippocampe ventral est fortement lié et directement connecté avec l'amygdale (Pitkanen et al., 2000). L'hippocampe ventral est considéré comme étant une voie de passage d'informations relatives au contexte de l'hippocampe dorsal vers l'amygdale. D'autre part, il a été admis que l'hippocampe ventral est impliqué dans le conditionnement au son, puisque plusieurs études ont montré que la lésion de cette région (Maren and Holt, 2004, Hunsaker and Kesner, 2008) ou son inactivation (Bast et

al., 2001, Maren and Holt, 2004) induisent un déficit de conditionnement au son. Ces données mettent en évidence la sollicitation de l'hippocampe et de l'amygdale dans ce test de conditionnement aversif. Un conditionnement au contexte est donc sous tendu par les noyaux amygdaliens et par l'hippocampe dorsal pour l'élaboration d'une représentation du contexte ainsi que l'hippocampe ventral pour la transmission de cette représentation à l'amygdale. Dans le conditionnement au son, l'hippocampe ventral et les noyaux amygdaliens sont tous les deux impliqués (figure 31).

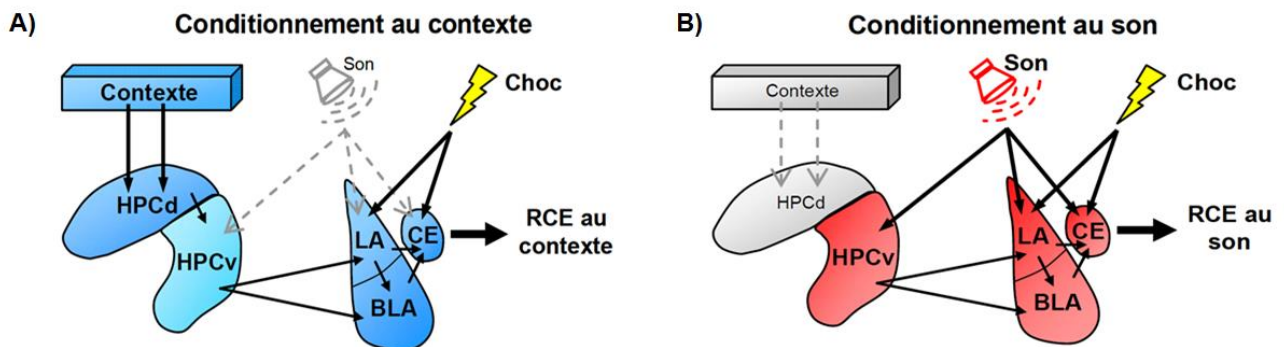


Figure 31 : Modèle des principales structures impliquées dans le conditionnement aversif : Deux types de circuits hippocampo-amygdaliens impliqués dans le conditionnement aversif. A) Conditionnement préférentiel au contexte : l'hippocampe ventral (HPCv) joue un rôle de transmetteur de l'information de l'hippocampe dorsal aux noyaux amygdaliens. B) conditionnement au son : l'hippocampe dorsal n'est pas sollicité dans cette tâche. (D'après Kaouane N., thèse de l'université de Bordeaux 2010)

Etant donné l'importance de la composante mnésique dans le PTSD, de nouvelles stratégies consistent à agir sur la dynamique de la mémoire traumatique afin d'atténuer la force du souvenir envahissant. Il existe une autre étape qui peut être ciblée ; c'est la reconsolidation mnésique. Lors de la période de plasticité transitoire induite par le rappel d'un souvenir, ce dernier peut être modulé. Dans le cadre du PTSD, interférer avec la reconsolidation permettrait de diminuer la charge émotionnelle traumatique d'un souvenir en diminuant la force même du souvenir. Il existe plusieurs stratégies pour inhiber la reconsolidation parmi lesquelles nous pouvons citer les électrochocs. Chez l'homme, l'utilisation de cette thérapie a mené à des résultats contradictoires. En effet, Squire et collaborateurs n'ont trouvé aucun effet inhibiteur sur la reconsolidation alors qu'une autre étude a montré que la mémoire épisodique émotionnelle a été perturbée après une unique séance d'électrochocs administrés après la réactivation de la mémoire (Kroes et al., 2014). Les inhibiteurs de la synthèse protéique, une stratégie permettant d'agir sur la reconsolidation, ont un effet amnésiant que ce soit chez l'animal ou chez l'homme (Besnard et al., 2012). Cependant, l'utilisation des inhibiteurs de synthèse protéique exercerait un effet toxique chez l'homme. Les chercheurs se sont également

penchés sur l'utilisation des modulateurs du système endocannabinoïde en raison de son implication dans le processus de reconsolidation d'une mémoire aversive chez l'animal. Chez l'animal, le cannabidiol ainsi que le THC exercent un effet inhibiteur lorsqu'ils sont administrés après la réactivation (Stern et al., 2012). Les inhibiteurs du système de stress ont été également utilisés pour agir sur la reconsolidation. Par exemple, l'administration de mifépristone, un antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes, après réactivation réduit la mémoire de peur (Jin et al., 2007, Tronel and Alberini, 2007, Taubenfeld et al., 2009, Pitman et al., 2011). Cependant, cet effet n'a pas été reproduit chez l'homme (Wood et al 2009). Enfin, l'utilisation des inhibiteurs du système noradrénergique comme le propranolol semble être efficace. L'effet inhibiteur de cet antagoniste des récepteurs beta adrénergiques sur la reconsolidation de la mémoire a été démontré dans plusieurs tests de mémoire chez l'animal notamment le test d'évitement passif (Villain et al., 2016), le test de labyrinthe radial (Przybylski et al., 1999) et le test de conditionnement de peur (Debiec and LeDoux, 2006, Muravieva and Alberini, 2010). Ces résultats ont mené à une première utilisation du propranolol chez des patients PTSD par Brunet et collaborateurs (Brunet et al., 2008) . Une amélioration des symptômes a été observée chez 50% de patients. Cependant Wood et al n'ont pas pu reproduire cet effet inhibiteur et n'ont observé aucune différence significative entre l'administration du propranolol sans ou avec réactivation (Wood et al., 2015).

Ceci mène à la recherche d'autres pistes thérapeutiques dans le traitement du PTSD et des patients souffrants des mémoires aversives pathologiques. Dans ce but, nous avons choisi de cibler un autre système qui est bien connu pour être impliqué dans la mémoire, le système nociceptinergique. L'activation de ce système par un agoniste induit un effet inhibiteur sur l'acquisition et la consolidation de la mémoire. Nous suggérons donc que ce système pourrait agir sur la reconsolidation de la mémoire et permettre ainsi d'atténuer la mémoire aversive dans le test de conditionnement de peur.



Activation of nociceptin/orphanin FQ receptors inhibits contextual fear memory reconsolidation



Khaoula Reki^a, Raquel Faria Da Silva^a, Morgane Colom^a, Salvatore Pacifico^b,
Nurulain T. Zaveri^c, Girolamo Calo^d, Claire Rampon^a, Bernard Frances^a,
Lionel Mouledous^{a,*}

^a Research Center on Animal Cognition, Center for Integrative Biology, Toulouse University, CNRS, UPS, France

^b Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences and LTITA, University of Ferrara, 44121 Ferrara, Italy

^c Astraea Therapeutic LLC, 320 Logue Avenue, Mountain View, CA 94043, USA

^d Department of Medical Sciences, Section of Pharmacology and National Institute of Neuroscience, University of Ferrara, 44121 Ferrara, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2017

Received in revised form

23 June 2017

Accepted 8 July 2017

Available online 10 July 2017

Keywords:

Nociceptin/orphanin FQ

NOP receptor

Contextual fear memory

Reconsolidation

Hippocampus

ABSTRACT

Several neuropeptidergic systems act as modulators of cognitive performances. Among them, nociceptin, an opioid-like peptide also known as orphanin FQ (N/OFQ), has recently gained attention. Stimulation of its receptor, the N/OFQ opioid receptor (NOP), which is expressed in brain regions involved in emotion, memory and stress response, has inhibitory effects on the acquisition and/or consolidation of spatial and emotional memory in rodents. Recently, N/OFQ was also proposed to be linked to the pathogenesis of Post-Traumatic Stress Disorder in humans. However, until now the effect of the activation of the N/OFQ-NOP system on already consolidated memory, such as during retrieval and reconsolidation phases, has never been explored. In the present study, we investigated the consequences of systemic injection of NOP agonists or i.c.v. injection of the N/OFQ peptide on the retrieval and the reconsolidation of contextual fear memory in mice. We demonstrate that the activation of the N/OFQ system impairs the reconsolidation of context-dependent but not cue-dependent aversive memories. We also show that this amnesic effect is associated with decreased c-Fos expression in the hippocampus and amygdala. Our data thus provide the first evidence that the NOP receptor could be targeted during the reconsolidation process to weaken maladaptive memories. The N/OFQ-NOP system might constitute in the future an interesting pharmacological target for interfering with so-called “pathological memories”, in particular those involving maladaptive contextual memories.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Long-term memory is a dynamic process. During memory retrieval the memory trace returns to a labile state and has then to be re-stabilized or reconsolidated to ensure long-term storage (Alberini and Ledoux, 2013; Nader, 2015; Nader et al., 2000). Interfering with the reconsolidation process is thus a way to alter the original memory. In humans, inhibiting reconsolidation is a promising strategy to treat disorders that involve maladaptive memories such as post-traumatic stress disorder (PTSD), phobia or addiction (Parsons and Ressler, 2013; Schwabe et al., 2014).

Targeting reconsolidation using pharmacological agents, such as adrenergic antagonists, has been successful in attenuating memories in animal models of aversive or appetitive conditioning (Reichelt and Lee, 2013). This approach has also shown promising results in humans suffering from PTSD or phobia. However its effectiveness has also been questioned in some clinical populations (Kroes et al., 2016), highlighting the necessity to better understand the mechanism of memory reconsolidation and to identify new pharmacological targets to attenuate maladaptive memories in humans.

Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) is a 17-amino acid neuropeptide related to the opioid family (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). However it does not interact with classical mu, delta and kappa opioid receptors but with another opioid-like G-protein-coupled receptor called ORL1 or NOP (Meunier et al., 2000).

* Corresponding author. CRCA/UMR 5169, CNRS/Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne, 31062, Toulouse Cedex 9, France.

E-mail address: lionel.mouledous@univ-tlse3.fr (L. Mouledous).

Consistent with its widespread distribution in the central nervous system N/OFQ has been shown to modulate many physiological functions in rodents such as pain, feeding, cardiovascular control, reward, stress/anxiety and depression-like behavior (Calo et al., 2000; Lambert, 2008; Zaveri, 2016). In addition, it has been suggested that endogenous N/OFQ could negatively modulate learning and memory processes (Manabe et al., 1998). Supporting this idea, NOP agonists have been shown to interfere with memory acquisition and consolidation in many learning tasks in pre-clinical animal models (Ouagazzal, 2015; Andero, 2015). More specifically, the injection of N/OFQ i.c.v. or of small molecule NOP agonists i.p. inhibits memory acquisition and/or consolidation in spatial, contextual and recognition memory tasks such as the Morris water maze (Higgins et al., 2002; Kuzmin et al., 2009), fear conditioning (Andero et al., 2013; Fornari et al., 2008; Goeldner et al., 2009; Mamiya et al., 2003), passive avoidance (Hiramatsu and Inoue, 1999; Liu et al., 2007; Mamiya et al., 1999) and novel object recognition (Goeldner et al., 2008). N/OFQ was also found to impair learning when injected directly in the dorsal hippocampus (Goeldner et al., 2008; Redrobe et al., 2000; Sandin et al., 1997, 2004) or the amygdala (Andero et al., 2013; Roozendaal et al., 2007). Moreover, alterations in the endogenous N/OFQ system have been described in mouse and rat models of PTSD (Andero et al., 2013; Zhang et al., 2012, 2015). Finally, a recent study identified a single-nucleotide polymorphism of the NOP receptor associated with increased PTSD symptoms in individuals exposed to child abuse (Andero et al., 2013). Altogether, these data suggest that the N/OFQ system could be targeted to interfere with maladaptive memories associated with PTSD. However, to further validate this hypothesis, the efficacy of NOP agonists to inhibit memory reconsolidation remains to be determined. While consolidation and reconsolidation processes show many similarities, they also involve specific molecular mechanisms, which take place in distinct brain regions according to different kinetics (Alberini, 2005; Li et al., 2013; von Herten and Giese, 2005). Therefore, in the present study we tested whether, similarly to their well-characterized effect on learning and memory consolidation, NOP agonists are able to interfere with the reconsolidation of fear memory.

2. Materials and methods

2.1. Animals

A total of 176 C57BL/6 male mice (10–12 week-old, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were used. They were housed in collective cages (5 per cage) in a room with controlled temperature (21–23 °C), and a 12-h light/dark cycle (8.00 a.m.–8.00 p.m.). Food and water were provided *ad libitum*. All experiments were carried out in strict accordance with the European guidelines for the care of laboratory animals (European Communities Council Directive 86/609/ECC) and approved by the local ethical committee and the French Ministry of Education and Research (#1992–201509291113438). All efforts were made to minimize animal discomfort and to reduce the number of animals used.

2.2. Drugs

Ro 65–6570 and N/OFQ were synthesized and purified in house (University of Ferrara) using previously described protocols (Guerrini et al., 1997; Wichmann et al., 1999). AT-403 was synthesized at AstraZenca Therapeutics. MK-801 was purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). All small molecules were first prepared as stock solutions in 100% DMSO then diluted in saline (0.9% NaCl, maximal final DMSO concentration was 2%). For each experiment, vehicle refers to the control saline solution with an

equivalent percentage of DMSO. The volume for intra-peritoneal (i.p.) injections was 10 ml/kg. N/OFQ peptide was prepared fresh in saline for intra-cerebro-ventricular (i.c.v.) injections. The volume for i.c.v. injections was 2 μ l.

2.3. Surgery

The mice were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotactic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Guide cannulae were implanted into the lateral ventricle according to the following coordinates: AP 0 mm, Lat \pm 1 mm from bregma, and DV–2 mm from skull as previously described (Mouledous et al., 2010). After surgery, animals were allowed to recover for 7–9 days in their home cage before the start of the behavioral experiments. At the end of the behavioral experiments, all mice were deeply anaesthetized with an overdose of pentobarbital (Ceva Santé Animale, Libourne, France) and their brains removed for histological verification of cannulae placement as previously described (Massaly et al., 2013).

2.4. Fear conditioning

Conditioning was done in a rectangular conditioning chamber (length 35 cm, width 20 cm, height 25 cm) with a stainless steel rod floor as previously described (Daumas et al., 2004). The experimental device was lit by a 60-W white bulb. Two black-and-white patterns faced the conditioning chamber. The conditioning chamber was cleaned with 70% aqueous ethanol before each training session. For the consolidation experiment, conditioning consisted in a single session with two trials. After a 120 s exploration period, the sound (85 dB) was emitted for 30 s and a foot shock (0.7 mA) was superposed during the last 2 s of the tone. This sequence was repeated twice. Thirty seconds after the last foot shock, the mice were removed from the chamber and returned to their home cage. Twenty-four hours after, the mice were individually tested for freezing to the context in the conditioning chamber for 4 min. Two hours later, they were tested for freezing to the tone in a modified context consisting in a triangular chamber, with white Plexiglas walls and floor. The new chamber was washed with 1% acetic acid and lit by a 40 W red bulb. Two minutes after their placement in the modified context, the tone was presented for 2 min. All experiments were videotaped. Freezing, defined as the lack of all movement other than respiration and heart-beat, was scored manually in 5 s bins by an experimenter blind to the treatment groups.

For the contextual fear memory reconsolidation experiments, conditioning was similar except that no sound was emitted. Twenty-four hours after learning, the mice were subjected to a memory retrieval session by exposing them to the conditioning context for 2 min. This retrieval session was immediately followed by drug treatment. Twenty-four hours after memory retrieval, mice were individually checked for freezing to the context in the conditioning chamber for 4 min. Freezing was scored during both the 2 min retrieval and the 4 min test sessions.

For the tone fear memory reconsolidation experiment, another set-up was used that allowed the use of 3 different contexts. Conditioning was done inside a white chamber in a squared box (25 \times 25 cm, height 34.5 cm) with a stainless steel rod floor and cleaned with 70% ethanol between each mouse. It consisted in a single session with two trials as described above.

Twenty-four hours after, the recall was performed inside a grey box in a cylinder (diameter 25 cm, height 34.5 cm) with a smooth floor and cleaned with 1% acetic acid between each mouse. The mice were subjected to this memory retrieval session by letting them explore the context for 1 min then exposing them to the sound for 30 s. This retrieval session was immediately followed by

drug treatment. Twenty-four hours after memory retrieval, mice were individually tested for freezing to the sound in a third context, consisting in a triangular box (width 25 cm, length 31 cm, height 34.5 cm) with rough floor and black and white striped walls, cleaned with water between each mouse. During this test, the mice were exposed for 1 min to the context alone, and then for 2 min to the sound. Freezing was scored automatically using the PolyFear 5.4 tight infrared frame-based software (Imetronic, Pessac, France).

2.5. Rotarod

Rotarod performance was measured using an Ugo Basile rotarod apparatus (Gemonio, Italy, length, 8.5 cm; diameter, 7 cm). On day 1, mice were trained to remain on the rotarod rotating at 12 rpm for 120 s. On day 2, mice were given three trials (12 rpm, up to a maximum of 120 s) 20 min after agonist treatment and the average score (time before falling from the rod) was used in the final analysis.

2.6. Elevated plus maze

The apparatus (Imetronic, Pessac, France) consisted of a plus-shaped track with 2 closed and 2 open arms (30 × 10 × 20 cm) that extended from a central platform (10 × 10 cm). The apparatus was elevated 50 cm above the floor. Each trial began when the mouse was placed in the central zone and lasted 5 min. The number of entries into closed and open arms and the time spent in each arm were monitored automatically based on infrared beam crossing. The maze was cleaned with 70% ethanol between each mouse to remove olfactory cues.

2.7. Immunohistochemistry

c-Fos immunohistochemistry was performed as previously described (Mouledous et al., 2010) with slight modifications. Briefly, mice were overdosed with pentobarbital 90 min after memory retrieval and perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde (Prolabo, Paris, France). The brains were postfixed overnight at 4 °C then transferred in 0.1 M phosphate buffer containing 40% (w/v) sucrose and 0.1% (w/v) sodium azide at 4 °C. 40 μm thick coronal sections were cut in a SM2010 R microtome (Leica biosystems, Nanterre, France) and stored in cryoprotectant at –20 °C. Sections were incubated with 0.3% H₂O₂ in PBS for 30 min at room temperature then blocking was performed for 2 h in PBS containing 0.25% Triton X-100 and 3% normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were then incubated with rabbit anti-c-Fos antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:5000 in the same buffer for 48 h at 4 °C. After washing with PBS, sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit antibody (Vector Laboratories) diluted 1:600 in blocking solution for 2 h at room temperature. Sections were then placed in horseradish peroxidase avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) diluted in PBS 0.5% Triton X-100 for 1 h at room temperature. Sections were finally stained in 3,3'-diaminobenzidine substrate kit (Vectastain DAB kit, Vector Laboratories) for 6 min according to manufacturer instructions. Sections were mounted on gelatin-coated slides and counterstained with Nuclear fast red (Vector Laboratories). Sections were viewed under a Leica CTR 600 wide-field microscope (Nanterre, France) and the Mercator software (Explora Nova, La Rochelle, France) was used to delimit the areas of interest (x5 objective) and count c-Fos positive nuclei (40x objective). For each region, 6 sections per animal were analyzed by an experimenter blind to the treatment groups.

2.8. Statistics

All results are presented as means ± SEM. Data were analyzed by Student *t*-test, one- or two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* as indicated in figure legends, using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, version, 5.01).

3. Results

3.1. Systemic NOP agonist treatment inhibits contextual fear memory consolidation

We first verified that, similarly to other NOP agonists, the full agonist Ro 65–6570 (Asth et al., 2016; Wichmann et al., 1999) was able to inhibit contextual fear memory consolidation. Mice were submitted to a fear conditioning protocol consisting in 2 pairings of an auditory CS with a footshock immediately followed by systemic (i.p.) administration of vehicle or Ro 65–6570 at the dose of 0.1 or 1 mg/kg (Fig. 1A). On the next day, freezing to the conditioning context was evaluated. A one-way ANOVA revealed an effect of drug treatment ($F_{2,27} = 3.548$, $p = 0.043$) and post-hoc tests demonstrated a significant decrease in freezing ($p < 0.05$) in animals that had received the 1 mg/kg but not 0.1 mg/kg dose (Fig. 1B). Two hours after contextual memory testing, animals were exposed to the auditory CS in a modified context. The level of freezing to the tone was similar between the 3 groups of mice (One-way ANOVA, $F_{2,27} = 0.094$, $p = 0.91$) (Fig. 1C). Based on this last observation we decided to focus our investigations on the reconsolidation of contextual, rather than auditory, fear memory.

3.2. NOP agonist treatment inhibits contextual fear memory reconsolidation

Mice were trained to associate the context to the footshocks without auditory CS. The day after training, mice were exposed to the conditioning context for 2 min in order to reactivate the memory trace. Drugs were injected immediately after this retrieval session with the aim to interfere with the reconsolidation process. Memory strength was evaluated 24 h later, by measuring the freezing to the conditioning context (Fig. 2A). In addition to Ro 65–6570 (1 mg/kg), the NMDA receptor antagonist MK-801 (0.1 mg/kg) was also tested as a positive control (Charlier and Tirelli, 2011). Both treatments induced a significant decrease in freezing during the retention test whereas there was no difference between groups in the level of freezing during the memory retrieval session (Fig. 2B). A two-way repeated measures ANOVA revealed a significant interaction between time and drug treatment ($F_{2,21} = 3.24$, $p = 0.048$) and a significant effect of time ($F_{1,21} = 45.24$, $p < 0.001$) but no significant effect of drug treatment ($F_{2,21} = 2.908$, $p = 0.077$). Post-hoc tests demonstrated a significant decrease in freezing in animals treated during the reconsolidation period with MK-801 ($p < 0.05$) or Ro 65–6570 ($p < 0.01$) and no difference between MK-801 and Ro 65–6570 treated groups ($p > 0.05$). Importantly, Ro 65–6570 treatment was ineffective if the retrieval session was omitted (Fig. 2C, unpaired *t*-test, $p = 0.933$), indicating that memory reconsolidation had to be triggered in order to observe the amnesic effect of the NOP agonist. Since NOP agonists are known to exert anxiolytic effects (Witkin et al., 2014) that could interfere with the expression of freezing behavior, we also looked for a putative residual anxiolytic effect of Ro 65–6570 24 h after treatment. Ro 65–6570 treated mice behaved as controls in the elevated plus-maze test (Suppl Fig. 1), in agreement with the fact that treatment without memory reactivation does not affect freezing. Next, we conducted another experiment to test a lower dose of 0.1 mg/kg together with the effective 1 mg/kg dose (Fig. 2D).

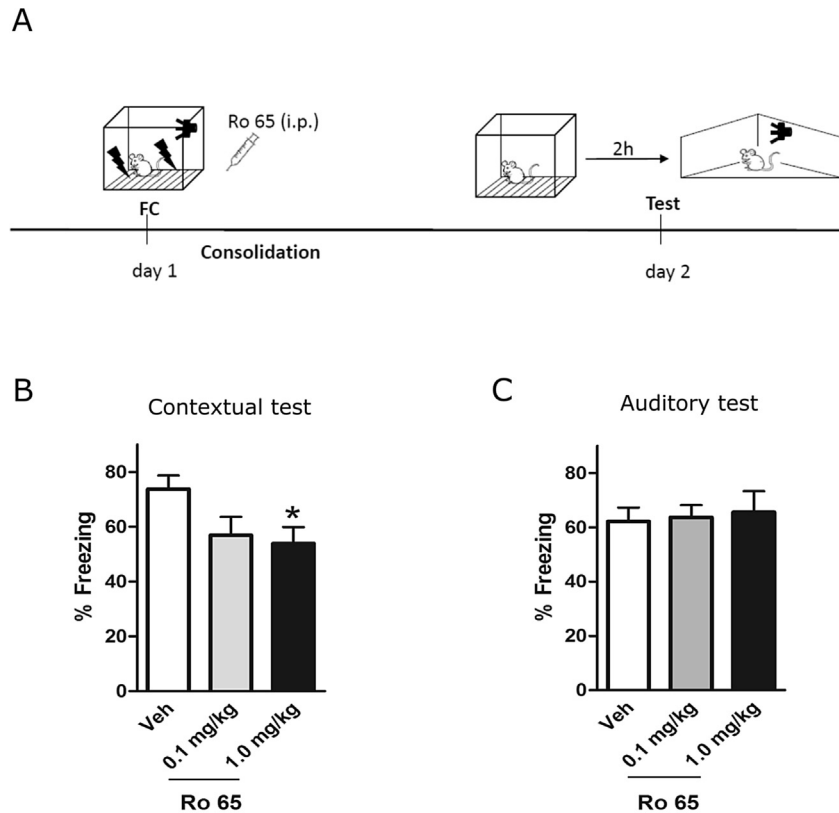


Fig. 1. Post-training treatment with Ro 65–6570 inhibits contextual fear memory consolidation. (A) Schematic representation of the procedure. FC, fear conditioning; Ro65, Ro 65–6570. (B) The percentage of time spent freezing during exposure to the conditioning context is significantly reduced in mice treated with 1 mg/kg of NOP agonist immediately after conditioning. (C) Freezing to the tone is not affected. Vehicle (n = 12), Ro 65–6570 0.1 mg/kg (n = 10), and Ro 65–6570 1 mg/kg (n = 8). Bars represent mean \pm SEM. *, $p < 0.05$ compared to vehicle, one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

A one-way ANOVA analysis revealed a significant effect of drug treatment ($F_{2,21} = 3.661$, $p = 0.043$). Post-hoc tests demonstrated a significant decrease in freezing of animals treated with Ro 65–6570 at 1 mg/kg ($p < 0.05$) but not at 0.1 mg/kg ($p > 0.05$). Higher doses were not tested since preliminary experiments showed that they induced a sedative effect. This effect was evident in the rotarod test for a dose of 3 mg/kg, whereas the 1 mg/kg dose did not induce motor impairment (Suppl Fig. 2). Finally, mice treated with vehicle or 1 mg/kg Ro 65–6570 were exposed again to the conditioning context 7 days after the first memory test (Fig. 2E). The level of freezing remained significantly lower in the Ro 65–6570-treated group (unpaired t -test, $p = 0.045$), indicating that the amnesic effect was stable for at least one week.

In order to further confirm that the NOP receptor can be targeted to inhibit memory reconsolidation, we tested two other highly selective NOP agonists unrelated to Ro 65–6570, using the same procedure as the one described in Fig. 2A (Fig. 3A). In a first experiment we injected the N/OFQ peptide itself in the lateral ventricle immediately after memory retrieval (Fig. 3B). A one-way ANOVA revealed an effect of drug treatment ($F_{2,24} = 4.65$, $p = 0.019$) and post-hoc tests demonstrated a significant decrease in freezing ($p < 0.05$) in animals that had received 3 nmoles of the peptide. Although animals treated with 1 nmole of the peptide showed less freezing than control mice this decrease was not statistically significant ($p > 0.05$). In a second experiment, we tested i.p. administration of a new highly potent and selective small molecule NOP agonist AT-403 (Fig. 3C). AT-403 has high binding affinity for the NOP receptor (K_i 1.13 nM), >100-fold selectivity

versus the other opioid receptors, and is a full agonist at the NOP receptor (Ferrari et al., 2017). A one-way ANOVA revealed an effect of drug treatment ($F_{2,22} = 4.846$, $p = 0.018$) and post-hoc tests demonstrated a significant decrease in freezing ($p < 0.05$) in animals that had received the 0.1 mg/kg dose as well as a significant difference between the 0.1 mg/kg and 0.03 mg/kg groups ($p < 0.05$) but not between the 0.03 mg/kg and vehicle groups ($p > 0.05$). Altogether these results demonstrate that activating central NOP receptors during memory reconsolidation interferes with this process, thus resulting in a significant decrease in contextual fear memory retention.

3.3. NOP agonist treatment does not interfere with contextual fear memory retrieval

The memory impairments that we observed thus far following Ro65–6570 administration cannot be attributed to a drug effect on memory acquisition or retrieval since it was injected after learning (consolidation experiment) or after memory recall (reconsolidation experiment). In the next experiment we asked whether NOP agonist administration could interfere with memory retrieval by injecting Ro 65–6570 20 min before, instead of immediately after, animal re-exposure to the conditioning context (Fig. 4A). Memory strength was also evaluated 24 h later, by measuring the freezing to the conditioning context. Freezing levels during the retrieval session were similar between NOP agonist and vehicle-injected mice (Fig. 4B). When tested for memory retention 24 h later, Ro 65–6570-treated mice showed a lower level of freezing compared to control

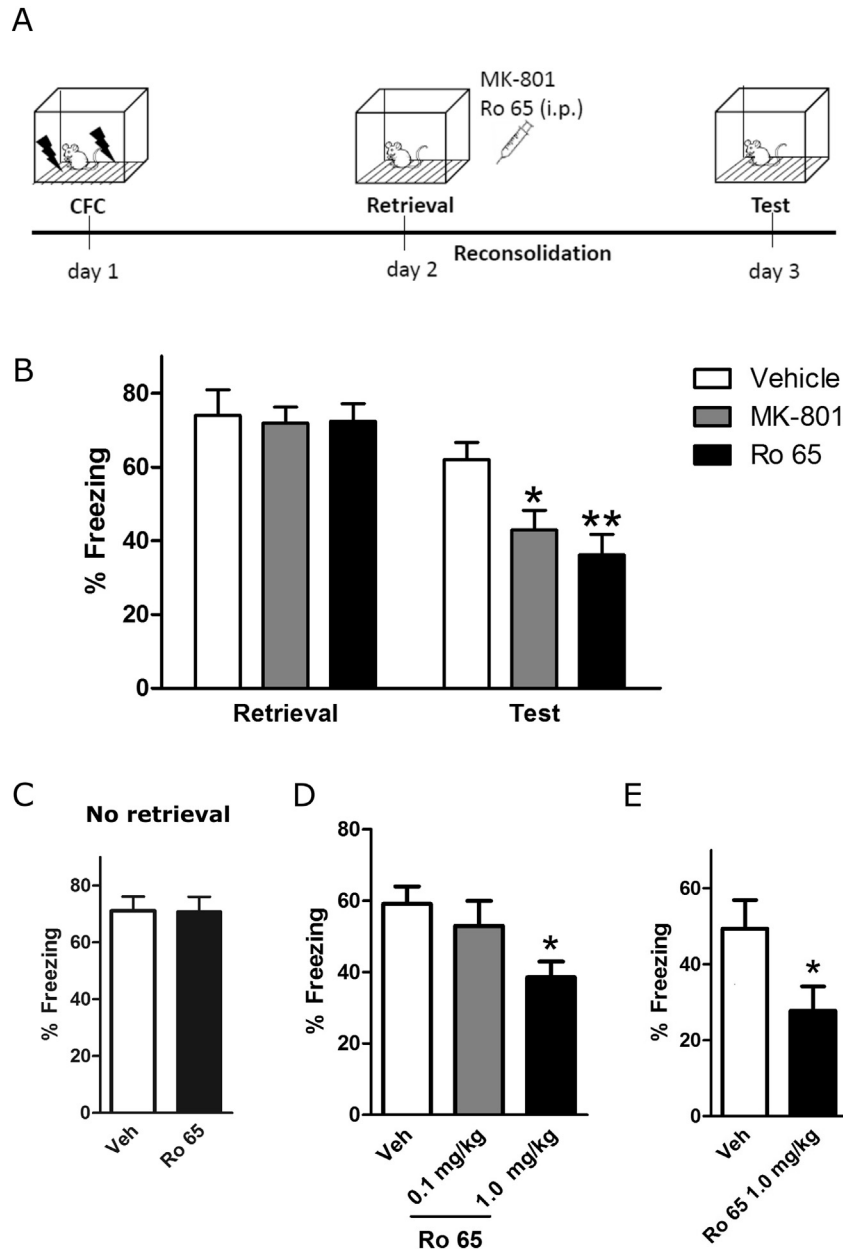


Fig. 2. Post-retrieval treatment with Ro 65–6570 inhibits contextual fear memory reconsolidation. (A) Schematic representation of the procedure. CFC, contextual fear conditioning; Ro65, Ro 65–6570. (B) The percentage of time spent freezing during exposure to the conditioning context is significantly reduced in mice treated with 0.1 mg/kg of NMDA antagonist (MK-801) or 1 mg/kg of NOP agonist immediately after memory retrieval. Vehicle ($n = 8$), MK-801 0.1 mg/kg ($n = 8$), and Ro 65–6570 1 mg/kg ($n = 8$). (C) Memory retention is not affected if the memory retrieval session is omitted. Vehicle ($n = 8$) and Ro 65–6570 1 mg/kg ($n = 8$). (D) A lower dose of 0.1 mg/kg of Ro 65–6570 is ineffective. Vehicle ($n = 8$), Ro 65–6570 0.1 mg/kg ($n = 8$), and Ro 65–6570 1 mg/kg ($n = 8$). (E) Mice treated with 1 mg/kg of Ro 65–6570 after memory retrieval still show reduced freezing when tested again 7 days after the first memory assessment. Vehicle ($n = 8$), Ro 65–6570 1 mg/kg ($n = 8$). Bars represent mean \pm SEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared to vehicle, two- (B) or one-way (D) ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, or unpaired Student *t*-test (E).

mice. However, unlike for the post-retrieval injection experiment, a two-way repeated measures ANOVA revealed a significant effect of time ($F_{1,18} = 15.24$, $p < 0.01$) but no significant interaction between time and drug treatment ($F_{1,18} = 0.763$, $p = 0.394$), and only a trend for a significant effect of treatment ($F_{1,18} = 4.357$, $p = 0.051$). Overall these data suggest that Ro 65–6570 injection prior to re-exposure to the conditioning context does not affect memory retrieval. Moreover, we could not demonstrate a significant inhibitory effect on memory reconsolidation under these administration conditions.

3.4. NOP agonist treatment following memory retrieval inhibits *c-Fos* expression in the hippocampus and the amygdala

The NOP receptor is widely distributed in the central nervous system (Mollereau and Mouledous, 2000) and therefore the application of NOP agonist in our experiments could interfere with neuronal processes in different brain regions involved in contextual fear memory. To address this issue we investigated the effect of post-retrieval Ro 65–6570 administration in the two main brain areas associated with contextual and emotional memory, namely

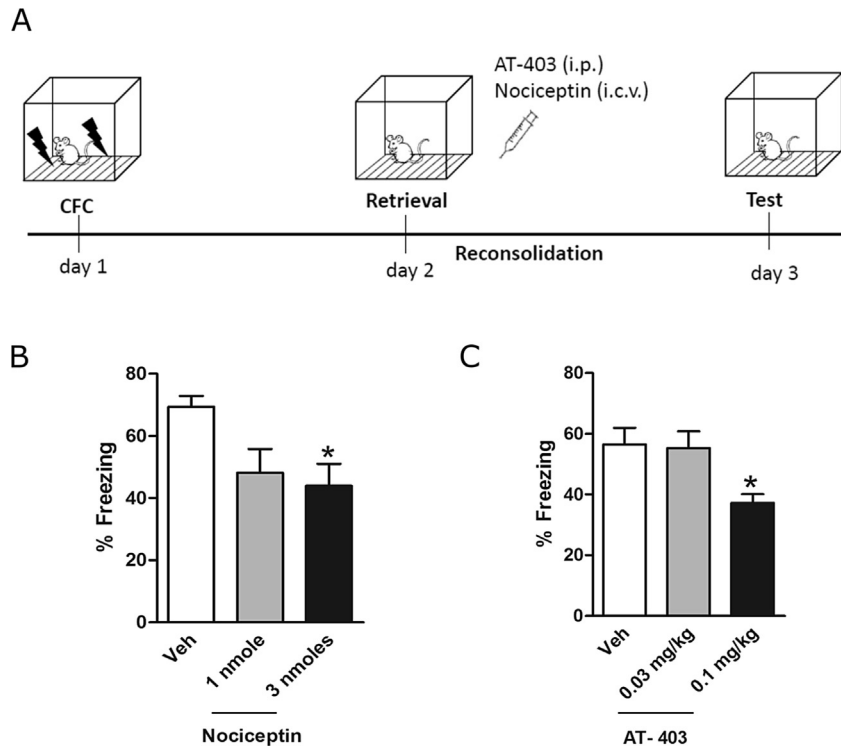


Fig. 3. Post-retrieval treatment with other NOP agonists inhibits contextual fear memory reconsolidation. (A) Schematic representation of the procedure. CFC, contextual fear conditioning. (B) The percentage of time spent freezing during exposure to the conditioning context is significantly reduced in mice treated with N/OFQ i.c.v. immediately after memory retrieval. Vehicle ($n = 9$), N/OFQ 1 nmole ($n = 9$), and N/OFQ 3 nmoles ($n = 9$). (C) The percentage of time spent freezing during exposure to the conditioning context is significantly reduced in mice treated with the NOP agonist AT-403 i.p. immediately after memory retrieval. Vehicle ($n = 8$), AT-403 0.03 mg/kg ($n = 9$), and AT-403 0.1 mg/kg ($n = 8$). Bars represent mean \pm SEM. *, $p < 0.05$ compared to vehicle, one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

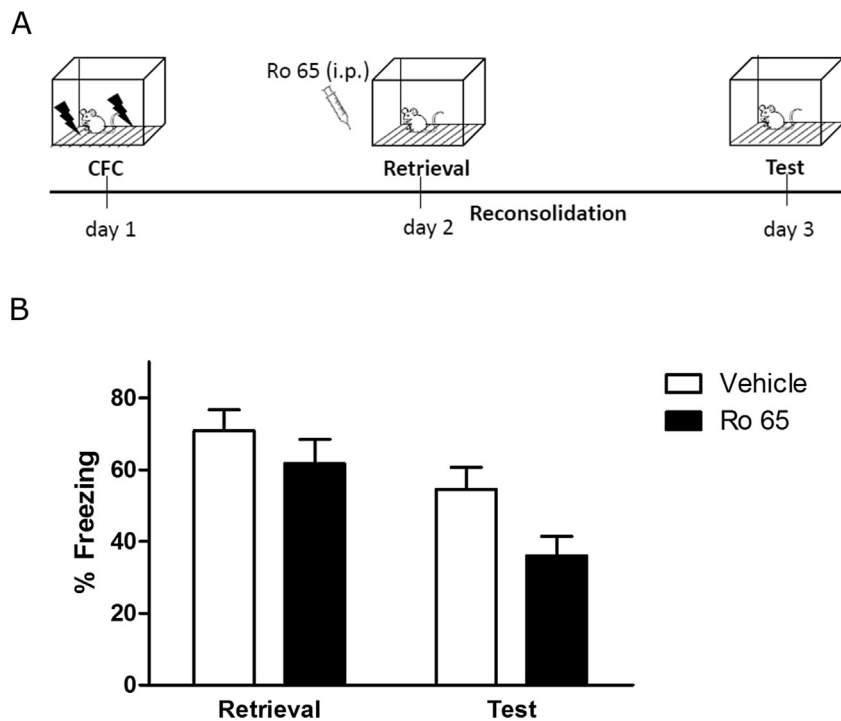


Fig. 4. Pre-treatment with Ro 65–6570 does not interfere with contextual fear memory retrieval. (A) Schematic representation of the procedure. CFC, contextual fear conditioning; Ro65, Ro 65–6570. (B) The percentage of time spent freezing during the memory retrieval session is similar in mice pre-treated with vehicle or 1 mg/kg of NOP agonist. Mice pre-treated with Ro 65–6570 show a non-significant decrease in memory retention when tested 24 h later. Vehicle ($n = 10$), Ro 65–6570 1 mg/kg ($n = 10$). Bars represent mean \pm SEM.

the hippocampus and the amygdala respectively (Baldi and Bucherelli, 2015; Izquierdo et al., 2016). Conditioning and drug administration procedures were similar to those in the reconsolidation experiment (Fig. 2A) except that animals were sacrificed 90 min after memory retrieval. Expression of the immediate early gene c-Fos was detected by immunohistochemistry as a molecular correlate of neuronal plasticity. In the dorsal hippocampus, Ro 65-6570 administration resulted in a significant decrease in the density of c-Fos positive cells in the CA3 (37.3%, $p = 0.034$) and CA1 (61.9%, $p = 0.041$) regions but not in the dentate gyrus (DG, $p = 0.25$) (Fig. 5A). In the ventral hippocampus, NOP agonist

treatment significantly reduced densities of c-Fos cells in CA1 (48.2%, $p = 0.029$) but not in CA3 ($p = 0.202$) nor in the DG ($p = 0.668$) (Fig. 5B). In the amygdala, Ro 65-6570-induced decrease in the density of c-Fos positive cells was significant in the central region (CeA, 54.5%, $p = 0.016$) whereas in the basolateral part (BLA) the 47.5% decrease did not reach statistical significance ($p = 0.056$) (Fig. 5B). Our data show that impaired contextual memory reconsolidation triggered by NOP receptor activation is associated with a reduction in c-Fos expression in brain regions that support fear memory formation and storage.

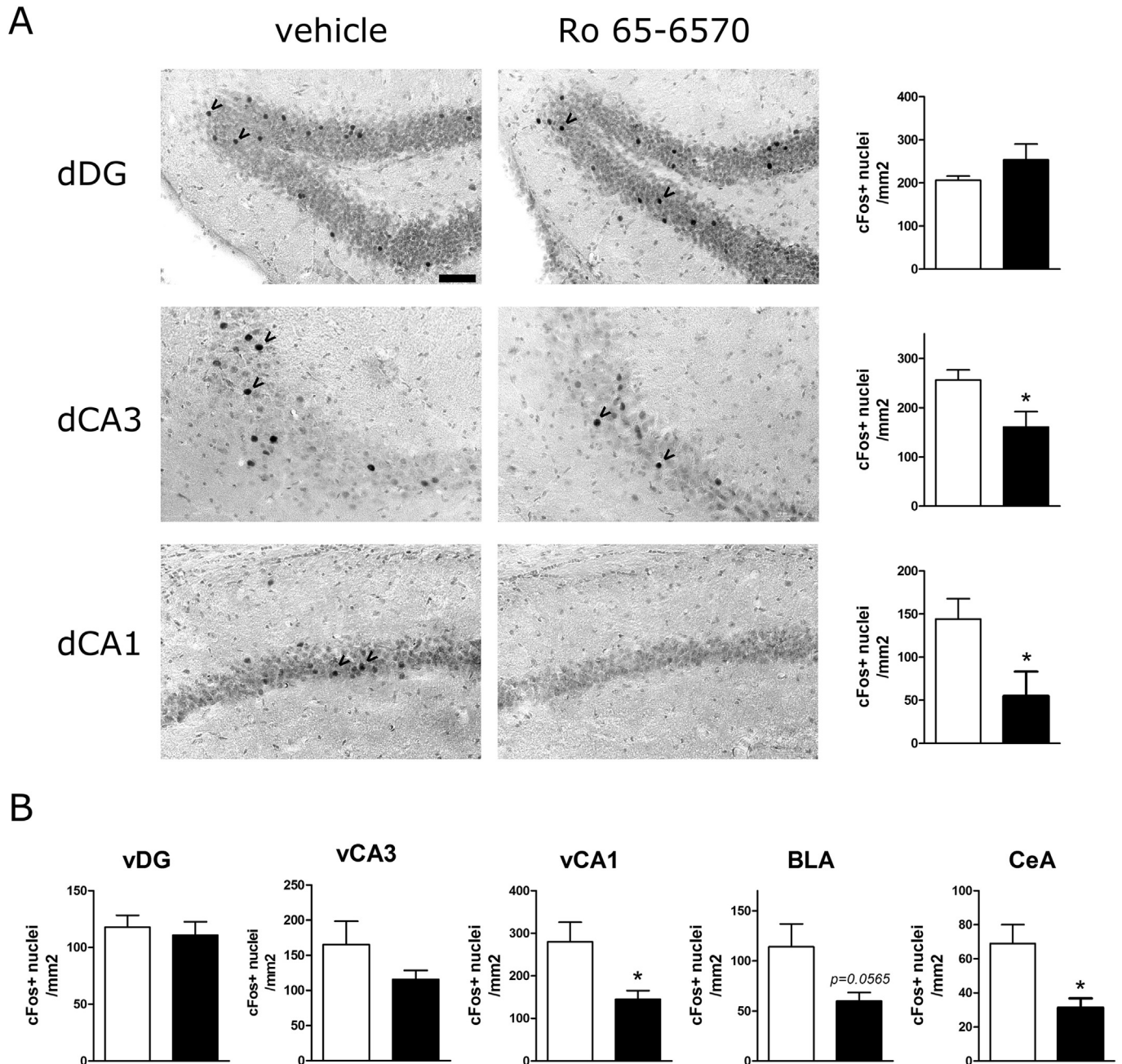


Fig. 5. Post-retrieval treatment with Ro 65–6570 inhibits neuronal activity in sub-regions of the hippocampus and the amygdala. (A) Left panel: representative images of c-Fos staining in the dorsal hippocampus. Scale bar = 50 μm . Examples of positive cells are indicated by arrowheads. Right panel: corresponding quantification of c-Fos positive nuclei. (B) Quantification of c-Fos positive nuclei in the ventral hippocampus and the amygdala. Vehicle (white, $n = 5$), Ro 65–6570 1 mg/kg (black, $n = 5$). Bars represent mean \pm SEM of c-Fos positive nuclei per mm^2 . *, $p < 0.05$ compared to vehicle, Student t -test.

3.5. NOP agonist treatment does not inhibit cue-dependent fear memory reconsolidation

Ro 65–6570 treatment reduces c-Fos expression not only in the hippocampus but also in the amygdala. This suggests that NOP agonists might also be able to interfere with amygdala-dependent hippocampus-independent memory reconsolidation. To test this hypothesis, mice were trained to associate an auditory CS to the footshocks in a first context. The next day, mice were exposed to the CS in another context in order to reactivate the memory trace. Drugs were injected immediately after this retrieval session. Memory strength was evaluated 24 h later, by measuring freezing to the CS in a third context (Fig. 6A). Both during retrieval and test sessions, the level of freezing was similar between mice treated with vehicle, Ro 65–6570 (1 mg/kg) or AT-403 (0.1 mg/kg) (Fig. 6B). A two-way repeated measures ANOVA revealed no significant interaction between time and drug treatment ($F_{2,22} = 1.322$, $p = 0.287$) and no significant effect of time ($F_{1,22} = 1.612$, $p = 0.217$) or drug treatment ($F_{2,22} = 1.344$, $p = 0.281$). Therefore, similarly to their effect on memory consolidation, the NOP agonists tested in this study inhibit selectively the reconsolidation of context- but not cue-dependent fear memory.

4. Discussion

Previous studies have shown that NOP agonists negatively regulate memory acquisition and consolidation in rodents (Abdel-Moultalib, 2015; Andero, 2015). More specifically, i.c.v. injection of N/OFQ peptide (Mamiya et al., 2003) or i.p. administration of small molecule NOP agonists (Andero et al., 2013; Goeldner et al., 2009) inhibit fear memory acquisition and/or consolidation in mice. Our results validate and extend these findings using another

small molecule agonist, Ro 65–6570 (Wichmann et al., 1999), closely related to the Ro 64–6198 compound used by Goeldner et al. (2009). These two agonists were effective in inhibiting contextual fear memory consolidation at equivalent systemic doses. The same doses were inactive on tone fear conditioning thus confirming previous evidence that NOP receptor activation was more efficient in interfering with contextual than cued fear memory (Fornari et al., 2008; Goeldner et al., 2009; Mamiya et al., 2003). Overall the fact that Ro 65–6570 induced amnesia for the conditioning context when injected immediately after the acquisition session confirms that systemic treatment with NOP agonists can inhibit the consolidation phase of contextual memory. Previous studies have also shown that treatment with NOP agonists does not affect the retrieval of hippocampus-dependent memories (Fornari et al., 2008; Goeldner et al., 2008, 2009). Again, we confirm these previous findings in this study by showing that systemic administration of Ro 65–6570 before re-exposing the animals to the conditioning context does not modify the expression of the conditioned freezing behavior.

Our demonstration that NOP agonist treatment inhibits fear memory consolidation together with previous converging evidence (Andero et al., 2013) suggest that the N/OFQ system could be targeted to attenuate traumatic memory, for example in PTSD patients. However, in order to validate this hypothesis, it was necessary to study the effect of NOP agonists on the memory reconsolidation process for two main reasons. First, in many cases, therapeutic interventions occur at a time point when traumatic memory has already been consolidated, and therefore it is the reconsolidation phase that is targeted by the treatment (Parsons and Ressler, 2013; Schwabe et al., 2014). Second, the consolidation and reconsolidation processes show many similarities but also involve distinct molecular mechanisms (Alberini, 2005). For

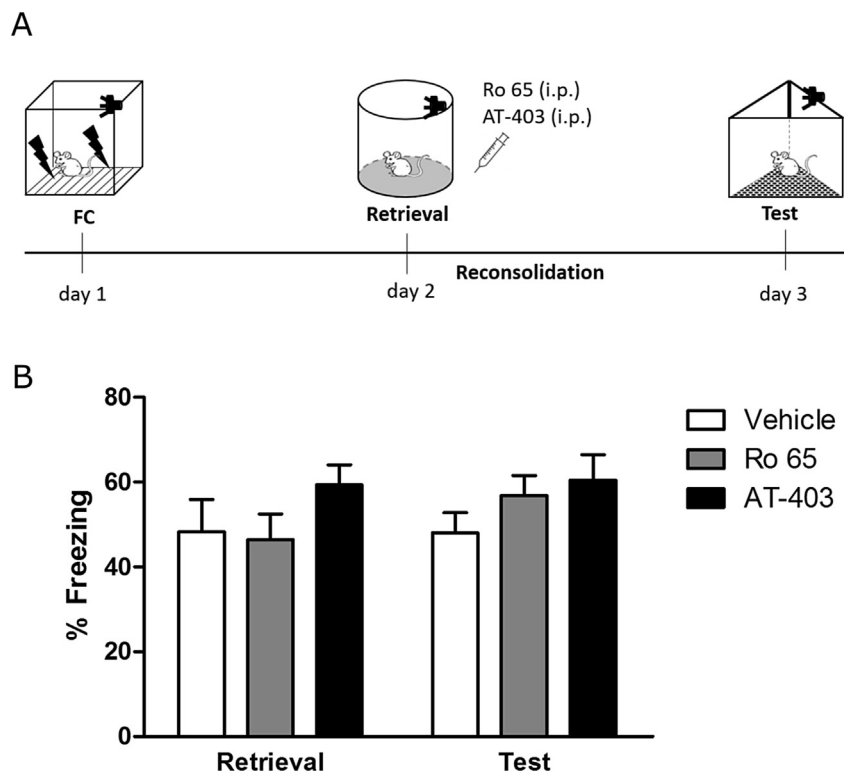


Fig. 6. Post-retrieval treatment with NOP agonists does not inhibit cue-dependent fear memory reconsolidation. (A) Schematic representation of the procedure. FC, fear conditioning; Ro65, Ro 65–6570. (B) The percentage of time spent freezing during exposure to the CS during the test session is similar in mice treated with vehicle or NOP agonists immediately after memory retrieval. Vehicle ($n = 8$), Ro 65–6570 1 mg/kg ($n = 9$), AT-403 0.1 mg/kg ($n = 8$).

example, BDNF down-regulation in the hippocampus (Lee et al., 2004), or blocking of histamine H₃ or muscarinic receptors in the BLA (Bucherelli et al., 2006), inhibit fear memory consolidation but not reconsolidation. Therefore, the main goal of the present study was to test whether NOP agonists were able to interfere with aversive memory reconsolidation.

After confirming that NOP agonists were more effective in modulating contextual than cued fear memory, we decided to focus initially on the reconsolidation of contextual fear memory. We first validated the fact that our memory reactivation procedure (2 min re-exposure to the context) was indeed sufficient to destabilize the memory trace. To do so, we used the non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801 which was shown to disrupt contextual fear memory reconsolidation after systemic or intra-hippocampal administration (Charlier and Tirelli, 2011; Lee and Hynds, 2013). Indeed treatment with MK-801 immediately after memory retrieval resulted in a decrease in memory retention when tested 24 h later. The main observation of the present study is that the NOP receptor agonist Ro 65–6570 produced the same amnesic effect. The memory retrieval session was mandatory for Ro 65–6570 to reduce freezing to the context and this decrease in freezing could not be attributed to any residual anxiolytic effect. We can therefore conclude that Ro 65–6570 acted by inhibiting the memory reconsolidation process. This decrease in memory retention was also observed when animals were treated immediately after memory retrieval by either i.c.v. N/OFQ or i.p. AT-403. The N/OFQ peptide being an endogenous ligand of the NOP receptor displays very high selectivity (Toll et al., 2016). Similarly the recently discovered small molecule agonist AT-403 is one of the best NOP agonists in terms of potency and selectivity (Ferrari et al., 2017). The similar effects of three chemically unrelated NOP-selective ligands thus confirm that the NOP receptor is indeed mediating the inhibition of contextual memory reconsolidation observed in this study. The effect was achieved with intermediate doses of Ro 65–6570 compared to its lower anxiolytic (Asth et al., 2016) and higher sedative doses (present rotarod results, (Rizzi et al., 2016)). Importantly, doses of Ro 65–6570 and AT-403 that were efficient in inhibiting contextual memory reconsolidation had no effect on tone fear memory when the drugs were injected immediately after cue-induced memory reactivation. This suggests that hippocampus-dependent contextual memory traces are more prone to destabilization by NOP agonists than amygdala-dependent simple associations.

Providing further insights into the potential cellular mechanisms supporting the effect of Ro 65–6570 on fear memory reconsolidation, we found that post-retrieval administration of this drug reduced c-Fos expression in CA1 and CA3 regions of the dorsal hippocampus. These sub-regions are known to be associated with the reactivation and reconsolidation of contextual fear memory (Besnard et al., 2014; Hall et al., 2001; Inaba et al., 2015; Mamiya et al., 2009). Interestingly, it was recently demonstrated that the inhibition of dorsal CA1 pyramidal cells following contextual fear memory retrieval was sufficient to impair memory reconsolidation (Lux et al., 2017). Ro 65–6570 could therefore exert a direct inhibitory effect on the plasticity of pyramidal hippocampal neurons which express NOP receptors (Mollereau and Mouldous, 2000; Ozawa et al., 2015). The observed reduction in c-Fos positive neurons could be related to a pre- and/or post-synaptic inhibition of NMDA-dependent plasticity (Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007; Goeldner et al., 2008, 2009; Mamiya et al., 2003; Manabe et al., 1998). Post-retrieval Ro 65–6570 administration also significantly reduced c-Fos expression in the CA1 region of the ventral hippocampus as well as in the central part of the amygdala, two regions that are activated following fear memory retrieval (Besnard et al., 2014; Chia and Otto, 2013; Hall et al., 2001;

Mamiya et al., 2009). At the cellular level, the inhibitory effect of the NOP agonist is therefore not restricted to the contextual part of the fear memory circuitry but also concerns its emotional part (Izquierdo et al., 2016). However it is worth noting that the inhibition was not significant in the BLA which is the major region for CS-US association in the fear conditioning paradigm. This is consistent with the notion that systemic NOP agonist administration is more efficient in interfering with fear memory associated with a context (disruption of hippocampal plasticity) than with discrete cues (less efficient disruption of amygdalar plasticity) (Fornari et al., 2008; Goeldner et al., 2009; Mamiya et al., 2003). However, NOP receptors are present in the amygdala and, similarly to the hippocampus, Ro 65–6570 could produce its effect in this region by interfering directly with glutamate signaling (Kallupi et al., 2014). Finally, inhibitory NOP receptors expressed in almost all aminergic and cholinergic nuclei (Mollereau and Mouldous, 2000) could also exert an indirect modulatory influence on fear memory processing (Izquierdo et al., 2016). Altogether, post-retrieval Ro 65–6570 silencing effects are consistent with the anatomical and functional distribution of NOP receptors and nicely support our behavioral data. The strong inhibition observed in the dorsal hippocampus also suggests that NOP agonists could be efficient in interfering with the reconsolidation of other types of context-dependent memories such as drug-induced place preference (Reichelt and Lee, 2013).

Targeting reconsolidation using pharmacological agents is a promising approach to treat pathological memories in humans. Our data suggest that NOP agonists could be used to disrupt some types of maladaptive memories. However more preclinical studies are needed to fully validate their usefulness. The magnitude of the effect of NOP agonists on contextual fear memory was similar to that of the NMDA receptor antagonist MK-801. It was also equivalent to the efficacy of the β -adrenergic receptor antagonist propranolol reported in the literature (Abrari et al., 2008; Muravieva and Alberini, 2010). However, contextual fear memory was not fully erased and we could not demonstrate a significant effect when Ro 65–6570 was injected before memory retrieval. Further studies are therefore warranted to improve treatment efficacy, for example using agonists with a longer duration of action or performing additional reactivation sessions. It would also be informative to assess the effect of NOP ligands on stronger and older memories and to study the duration of the amnesic effect at later time points. Finally, a possible limitation of the usefulness of NOP agonists in the clinic comes from the observation of their lack of effect on auditory cue-dependent fear memory reconsolidation. However, it is worth mentioning that fear conditioning in rodents does not recapitulate all aspects of pathological traumatic memories in humans. Therefore, it is difficult to predict drugs' efficacy in patients simply based on their effect or a lack of effect in preclinical models of aversive memory. For example, propranolol treatment led to promising results in humans suffering from PTSD or phobia (Kroes et al., 2016) although its effect on tone fear memory reconsolidation in mouse has been challenged (Vetere et al., 2013). Additional experiments using animal models with better predictive validity are therefore needed (Borghans and Homberg, 2015; Bowers and Ressler, 2015).

In conclusion, this study provides the first demonstration that NOP receptors can be targeted to prevent memory reconsolidation. In that sense, it might open new avenues to improve the treatment of pathological forms of memories, in particular those associated with impaired context processing (Careaga et al., 2016; Liberzon and Abelson, 2016).

Funding and disclosure

K.R. was supported by Laboratoires Phodé. This work was

supported by funds from CNRS (to B.F. and L.M.), University Paul Sabatier Toulouse (to B.F. and L.M.), University of Ferrara (2015 grant to G.C.), and the Italian Ministry of Research (PRIN 2015WX8Y5B grant to G.C.). The authors declare no competing financial interests in relation to the work described.

Acknowledgements

We thank Pr Pascal Rouillet for helpful discussions and Dr Sébastien Lopez for technical advice. We also thank the ABC facility and ANEXPLO Toulouse for housing mice.

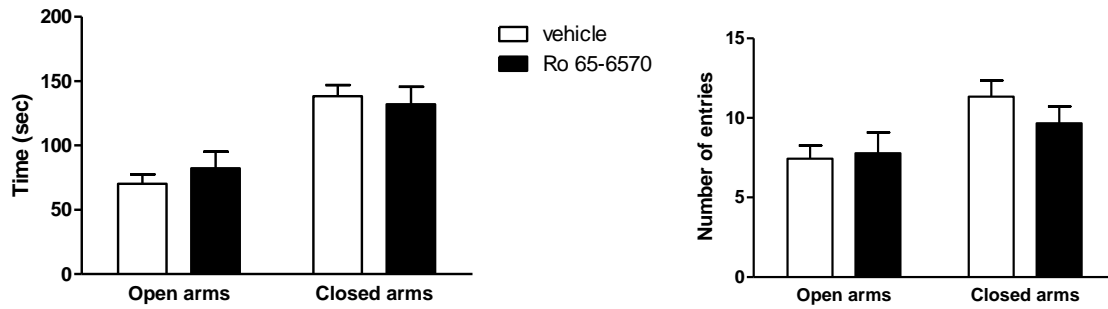
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.006>.

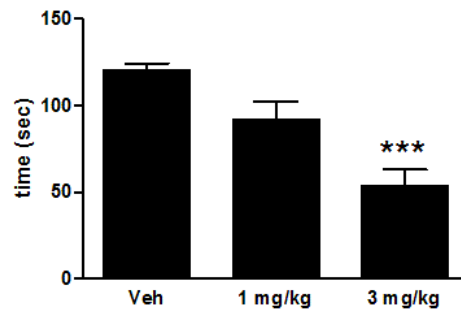
References

- Abbravi, K., Rashidy-Pour, A., Semnani, S., Fathollahi, Y., 2008. Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: dependence upon training intensity. *Neurobiol. Learn Mem.* 89, 178–184.
- Alberini, C.M., 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci.* 28, 51–56.
- Alberini, C.M., Ledoux, J.E., 2013. Memory reconsolidation. *Curr. Biol.* 23, R746–R750.
- Andero, R., 2015. Nociceptin and the nociceptin receptor in learning and memory. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry* 62, 45–50.
- Andero, R., Brothers, S.P., Jovanovic, T., Chen, Y.T., Salah-Uddin, H., Cameron, M., Bannister, T.D., Almlı, L., Stevens, J.S., Bradley, B., Binder, E.B., Wahlestedt, C., Ressler, K.J., 2013. Amygdala-dependent fear is regulated by Opr1 in mice and humans with PTSD. *Sci. Transl. Med.* 5, 188ra173.
- Asth, L., Ruzza, C., Malfacini, D., Medeiros, I., Guerrini, R., Zaveri, N.T., Gavioli, E.C., Calo, G., 2016. Beta-arrestin 2 rather than G protein efficacy determines the anxiolytic-versus antidepressant-like effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands. *Neuropharmacology* 105, 434–442.
- Baldi, E., Bucherelli, C., 2015. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 53, 160–190.
- Besnard, A., Laroche, S., Caboche, J., 2014. Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. *Brain Struct. Funct.* 219, 415–430.
- Bongsebandhu-phubhakdi, S., Manabe, T., 2007. The neuropeptide nociceptin is a synaptically released endogenous inhibitor of hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 27, 4850–4858.
- Borghans, B., Homberg, J.R., 2015. Animal models for posttraumatic stress disorder: an overview of what is used in research. *World J. Psychiatry* 5, 387–396.
- Bowers, M.E., Ressler, K.J., 2015. An overview of translationally informed treatments for posttraumatic stress disorder: animal models of pavlovian fear conditioning to human clinical trials. *Biol. Psychiatry* 78, E15–E27.
- Bucherelli, C., Baldi, E., Mariottini, C., Passani, M.B., Blandina, P., 2006. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learn Mem.* 13, 426–430.
- Calo, G., Guerrini, R., Rizzi, A., Salvadori, S., Regoli, D., 2000. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1261–1283.
- Careaga, M.B., Girardi, C.E., Suchecki, D., 2016. Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 71, 48–57.
- Charlier, Y., Tirelli, E., 2011. Differential effects of histamine H(3) receptor inverse agonist thioperamide, given alone or in combination with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dizocipine, on reconsolidation and consolidation of a contextual fear memory in mice. *Neuroscience* 193, 132–142.
- Chia, C., Otto, T., 2013. Hippocampal Arc (Arg3.1) expression is induced by memory recall and required for memory reconsolidation in trace fear conditioning. *Neurobiol. Learn Mem.* 106, 48–55.
- Daumas, S., Halley, H., Lassalle, J.M., 2004. Disruption of hippocampal CA3 network: effects on episodic-like memory processing in C57BL/6j mice. *Eur. J. Neurosci.* 20, 597–600.
- Ferrari, F., Malfacini, D., Journigan, B.V., Bird, M.F., Guerrini, R., Lambert, D.G., Calo, G., Zaveri, N.T., 2017. In vitro pharmacological characterization of a novel unbiased NOP receptor-selective nonpeptide agonist AT-403. *Pharmacol. Res. Perspect.* 4 (4), e00247.
- Fornari, R.V., Soares, J.C., Ferreira, T.L., Moreira, K.M., Oliveira, M.G., 2008. Effects of nociceptin/orphanin FQ in the acquisition of contextual and tone fear conditioning in rats. *Behav. Neurosci.* 122, 98–106.
- Goeldner, C., Reiss, D., Wichmann, J., Kieffer, B.L., Ouagazzal, A.M., 2009. Activation of nociceptin opioid peptide (NOP) receptor impairs contextual fear learning in mice through glutamatergic mechanisms. *Neurobiol. Learn Mem.* 91, 393–401.
- Goeldner, C., Reiss, D., Wichmann, J., Meziane, H., Kieffer, B.L., Ouagazzal, A.M., 2008. Nociceptin receptor impairs recognition memory via interaction with NMDA receptor-dependent mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in the hippocampus. *J. Neurosci.* 28, 2190–2198.
- Guerrini, R., Calo, G., Rizzi, A., Bianchi, C., Lazarus, L.H., Salvadori, S., Temussi, P.A., Regoli, D., 1997. Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure-activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J. Med. Chem.* 40, 1789–1793.
- Hall, J., Thomas, K.L., Everitt, B.J., 2001. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J. Neurosci.* 21, 2186–2193.
- Higgins, G.A., Kew, J.N., Richards, J.G., Takeshima, H., Jenck, F., Adam, G., Wichmann, J., Kemp, J.A., Grottick, A.J., 2002. A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. *Eur. J. Neurosci.* 15, 911–922.
- Hiramatsu, M., Inoue, K., 1999. Effects of nocistatin on nociceptin-induced impairment of learning and memory in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 367, 151–155.
- Inaba, H., Tsukagoshi, A., Kida, S., 2015. PARP-1 activity is required for the reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *Mol. Brain* 8, 63.
- Izquierdo, I., Furini, C.R., Myskiw, J.C., 2016. Fear memory. *Physiol. Rev.* 96, 695–750.
- Kallupi, M., Varodayan, F.P., Oleata, C.S., Correia, D., Luu, G., Roberto, M., 2014. Nociceptin/orphanin FQ decreases glutamate transmission and blocks ethanol-induced effects in the central amygdala of naive and ethanol-dependent rats. *Neuropsychopharmacology* 39, 1081–1092.
- Kroes, M.C., Schiller, D., LeDoux, J.E., Phelps, E.A., 2016. Translational approaches targeting reconsolidation. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 28, 197–230.
- Kuzmin, A., Madjid, N., Johansson, B., Terenius, L., Ogren, S.O., 2009. The nociceptin system and hippocampal cognition in mice: a pharmacological and genetic analysis. *Brain Res.* 1305 (Suppl.), S7–S19.
- Lambert, D.G., 2008. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 694–710.
- Lee, J.L., Everitt, B.J., Thomas, K.L., 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304, 839–843.
- Lee, J.L., Hynds, R.E., 2013. Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 23, 233–244.
- Li, Y., Meloni, E.G., Carlezon Jr., W.A., Milad, M.R., Pitman, R.K., Nader, K., Bolshakov, V.Y., 2013. Learning and reconsolidation implicate different synaptic mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4798–4803.
- Liberzon, I., Abelson, J.L., 2016. Context processing and the neurobiology of post-traumatic stress disorder. *Neuron* 92, 14–30.
- Liu, E.H., Lee, T.L., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Tachibana, S., 2007. Nocistatin and its derivatives antagonize the impairment of short-term acquisition induced by nociceptin. *Neurosci. Lett.* 416, 155–159.
- Lux, V., Maseck, O.A., Herlitze, S., Sauvage, M.M., 2017. Optogenetic destabilization of the memory trace in CA1: insights into reconsolidation and retrieval processes. *Cereb. Cortex* 27, 841–851.
- Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P.W., Kida, S., 2009. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J. Neurosci.* 29, 402–413.
- Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H., Nabeshima, T., 1999. Nociceptin system plays a role in the memory retention: involvement of naloxone benzoylhydrazone binding sites. *Neuroreport* 10, 1171–1175.
- Mamiya, T., Yamada, K., Miyamoto, Y., Konig, N., Watanabe, Y., Noda, Y., Nabeshima, T., 2003. Neuronal mechanism of nociceptin-induced modulation of learning and memory: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Psychiatry* 8, 752–765.
- Manabe, T., Noda, Y., Mamiya, T., Katagiri, H., Houtani, T., Nishi, M., Noda, T., Takahashi, T., Sugimoto, T., Nabeshima, T., Takeshima, H., 1998. Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature* 394, 577–581.
- Massaly, N., Dahan, L., Baudonnet, M., Hovnanian, C., Rekek, K., Solinas, M., David, V., Pech, S., Zajac, J.M., Rouillet, P., Mouldous, L., Frances, B., 2013. Involvement of protein degradation by the ubiquitin proteasome system in opiate addictive behaviors. *Neuropsychopharmacology* 38, 596–604.
- Meunier, J., Mouldous, L., Topham, C.M., 2000. The nociceptin (ORL1) receptor: molecular cloning and functional architecture. *Peptides* 21, 893–900.
- Meunier, J.C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinier, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monsarrat, B., et al., 1995. Isolation and Structure of the Endogenous Agonist of Opioid Receptor-like ORL1 Receptor. *Nature*, vol. 377, pp. 532–535.
- Mollereau, C., Mouldous, L., 2000. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* 21, 907–917.
- Mouldous, L., Frances, B., Zajac, J.M., 2010. Modulation of basal and morphine-induced neuronal activity by a NPFF(2) selective agonist measured by c-Fos mapping of the mouse brain. *Synapse* 64, 672–681.
- Muravieva, E.V., Alberini, C.M., 2010. Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories. *Learn Mem.* 17, 306–313.
- Nader, K., 2015. Reconsolidation and the dynamic nature of memory. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Nader, K., Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–726.

- Ouagazzal, A.M., 2015. Nociceptin/orphanin-fq modulation of learning and memory. *Vitam. Horm.* 97, 323–345.
- Ozawa, A., Brunori, G., Mercatelli, D., Wu, J., Cippitelli, A., Zou, B., Xie, X.S., Williams, M., Zaveri, N.T., Low, S., Scherrer, G., Kieffer, B.L., Toll, L., 2015. Knock-in mice with NOP-eGFP receptors identify receptor cellular and regional localization. *J. Neurosci.* 35, 11682–11693.
- Parsons, R.G., Ressler, K.J., 2013. Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nat. Neurosci.* 16, 146–153.
- Redrobe, J.P., Calo, G., Guerrini, R., Regoli, D., Quirion, R., 2000. [Nphe(1)]-Nociceptin (1-13)-NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1379–1384.
- Reichelt, A.C., Lee, J.L., 2013. Memory reconsolidation in aversive and appetitive settings. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 118.
- Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma Jr., F.J., Civelli, O., 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270, 792–794.
- Rizzi, A., Cerlesi, M.C., Ruzza, C., Malfacini, D., Ferrari, F., Bianco, S., Costa, T., Guerrini, R., Trapella, C., Calo, G., 2016. Pharmacological characterization of cebranopadol a novel analgesic acting as mixed nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist. *Pharmacol. Res. Perspect.* 4, e00247.
- Roosendaal, B., Lengvilas, R., McGaugh, J.L., Civelli, O., Reinscheid, R.K., 2007. Orphanin FQ/nociceptin interacts with the basolateral amygdala noradrenergic system in memory consolidation. *Learn Mem.* 14, 29–35.
- Sandin, J., Georgieva, J., Schott, P.A., Ogren, S.O., Terenius, L., 1997. Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur. J. Neurosci.* 9, 194–197.
- Sandin, J., Ogren, S.O., Terenius, L., 2004. Nociceptin/orphanin FQ modulates spatial learning via ORL-1 receptors in the dorsal hippocampus of the rat. *Brain Res.* 997, 222–233.
- Schwabe, L., Nader, K., Pruessner, J.C., 2014. Reconsolidation of human memory: brain mechanisms and clinical relevance. *Biol. Psychiatry* 76, 274–280.
- Toll, L., Bruchas, M.R., Calo, G., Cox, B.M., Zaveri, N.T., 2016. Nociceptin/orphanin FQ receptor structure, signaling, ligands, functions, and interactions with opioid systems. *Pharmacol. Rev.* 68, 419–457.
- Vetere, G., Piserchia, V., Borreca, A., Novembre, G., Aceti, M., Ammassari-Teule, M., 2013. Reactivating fear memory under propranolol resets pre-trauma levels of dendritic spines in basolateral amygdala but not dorsal hippocampus neurons. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 211.
- von Herten, L.S., Giese, K.P., 2005. Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J. Neurosci.* 25, 1935–1942.
- Wichmann, J., Adam, G., Rover, S., Cesura, A.M., Dautzenberg, F.M., Jenck, F., 1999. 8-acenaphthen-1-yl-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one derivatives as orphanin FQ receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 2343–2348.
- Witkin, J.M., Statnick, M.A., Rorick-Kehn, L.M., Pintar, J.E., Ansonoff, M., Chen, Y., Tucker, R.C., Ciccocioppo, R., 2014. The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence. *Pharmacol. Ther.* 141, 283–299.
- Zaveri, N.T., 2016. Nociceptin opioid receptor (NOP) as a therapeutic target: progress in translation from preclinical research to clinical utility. *J. Med. Chem.* 59, 7011–7028.
- Zhang, Y., Gandhi, P.R., Standifer, K.M., 2012. Increased nociceptive sensitivity and nociceptin/orphanin FQ levels in a rat model of PTSD. *Mol. Pain* 8, 76.
- Zhang, Y., Simpson-Durand, C.D., Standifer, K.M., 2015. Nociceptin/orphanin FQ peptide receptor antagonist JTC-801 reverses pain and anxiety symptoms in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Br. J. Pharmacol.* 172, 571–582.



Supplementary Figure 1. Lack of effect of Ro 65-6570 administration in the elevated plus-maze 24h after treatment. There is no difference in the time spent in closed and open arms (left) (unpaired t tests, $p=0.438$ for open arms, $p=0.701$ for closed arms) nor in the number of entries in each arm (right) between vehicle and Ro 65-6570 treated mice (unpaired t tests, $p=0.831$ for open arms, $p=0.270$ for closed arms). $n=9$ per group.



Supplementary Figure 2. A high dose of Ro 65-6570 affects motor coordination.

Treatment with 3 mg/kg of Ro 65-6570, but not 1 mg/kg, significantly reduces the time spent on the rotarod compared to vehicle-treated mice. ***, $p<0.001$ compared to vehicle, one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test ($F_{2,18}=15.35$, $p=0.0001$). $n=7$ per group.

Discussion :

Le conditionnement de peur est utilisé pour étudier les mécanismes associatifs pavloviens. Il s'agit d'un paradigme à l'interface entre processus mnésiques et émotionnels. Le freezing qui est la réaction comportementale de peur chez la souris s'exprime en réponse au contexte où l'animal avait reçu les chocs électriques. Cette réaction est le reflet d'une trace mnésique émotionnelle aversive contextuelle. Dans le protocole classique, le choc est précédé d'un signal sonore. Dans ce cas, les deux composantes qui permettent la mémorisation de la tâche peuvent être dissociées et étudiées séparément soit en réexposant l'animal après 24 heures au signal sonore uniquement (SC) ou au contexte du conditionnement seul.

L'activation des récepteurs NOP par le Ro65-6570 après le conditionnement perturbe la consolidation de la mémoire contextuelle mais n'affecte pas la mémoire liée au son. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature qui rapportent que l'administration du Ro64-6189 en i.p. ou de N/OFQ en i.c.v. perturbe le développement de la peur conditionnée contextuelle 24 heures après l'apprentissage c'est-à-dire la phase de consolidation de la mémoire, dans les tests de peur conditionnée ou d'évitement passif (Mamiya et al. 1999, Mamiya et al. 2003, Goeldner et al. 2008). Suite à ces résultats nous avons dans un premier temps exclu la composante au son dans notre étude sur la reconsolidation de la mémoire. Les résultats ont montré que l'agoniste Ro65-6570 a perturbé la reconsolidation de la mémoire contextuelle. Les déficits de peur contextuelle induits par cet agoniste pourraient refléter une action anxiolytique de cette drogue (Mallimo et al. 2013, Asth et al. 2015), capable de diminuer le caractère aversif anxiogène de la tâche. En effet, l'agoniste des récepteurs NOP pourrait agir sur des structures effectrices des réponses comportementales de défense et de peur riches en récepteur NOP (Florin et al. 2000), comme la substance grise périaqueducule (Kyuhou et al. 1999) et l'hypothalamus, pour diminuer l'expression du comportement d'immobilité. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la dose amnésiante de Ro65-6570 de 1 mg/kg n'influence pas les comportements anxieux évalués dans le labyrinthe en croix surélevé. Par ailleurs, ces déficits de peur conditionnée induits par l'agoniste testé, pourraient refléter une action de sédation inhibitrice sur la locomotion et la coordination motrice chez l'animal (Micheli et al. 2015) capable de moduler la réaction de l'animal. Nous avons donc testé la dose amnésiante sur la coordination motrice dans le rotarod et montré une absence d'effet. Quoiqu'il en soit, l'effet amnésiant nécessite impérativement que la mémoire soit réactivée ce qui démontre bien un effet sur la reconsolidation plutôt que sur la locomotion ou l'anxiété de l'animal.

Lors de notre étude nous avons montré également un effet inhibiteur d'un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA sur la reconsolidation de la mémoire. La formation de la mémoire nécessite la LTP qui implique l'activation de ERK dépendante des récepteurs NMDA (Sweatt 2004, Thomas & Huganir 2004). Il a été démontré que les récepteurs NMDA sont impliqués dans la formation de la représentation du contexte (Cravens et al, 2006, Roesler et al, 2005 ; Stote & Fanselow 2004, Goeldner et al., 2008) et que les déficits de mémoire émotionnelle aversive consécutifs à l'activation des récepteurs NOP reflètent une perturbation de la fonction glutamatergique mise en jeu lors de la formation de la mémoire contextuelle (Goeldner, Reiss et al. 2008). En effet, la coadministration de doses sub-efficaces de Ro64-6498 (0.5 mg/kg) et de MK801 (antagoniste des récepteurs NMDA, 0.05 mg/kg) avant le conditionnement classique, révèle un effet synergique de ces deux drogues sur le développement de la peur conditionnée contextuelle suggérant que le système nociceptinergique s'oppose à l'action glutamatergique facilitatrice nécessaire à la réalisation de tâches mnésiques dépendantes des fonctions hippocampiques (Goeldner, Reiss et al. 2008). D'autre part, nous avons montré une corrélation entre la diminution de la réaction comportementale et l'expression du gène précoce c-fos. Comme décrit dans l'introduction, la formation de la mémoire émotionnelle contextuelle fait appel à des processus mnésiques complexes nécessitant une coopération hippocampique-amygdalienne ce qui est en accord avec la baisse de l'expression de c-fos au niveau hippocampique et au niveau de l'amygdale après un traitement par l'agoniste NOP. L'activation de ce facteur de transcription reflète l'activité neuronale et découle d'une cascade de signalisation via les récepteurs glutamatergiques. Par analogie avec les données obtenues en consolidation (Goeldner, Reiss et al. 2008), nous suggérons donc que cet effet inhibiteur de Ro65-6570 sur la reconsolidation de la mémoire contextuelle pourrait être médié par une inhibition de la transmission glutamatergique avec notamment une diminution de l'activation de ERK. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de tester la co-administration de doses sub-effectives de MK 801 et Ro65-6570 afin de voir si on retrouve une synergie d'effet des deux composés qui se manifesterait par une diminution plus importante de la mémoire reconsolidée. Ensuite, il serait intéressant d'étudier l'effet du Ro65-6570 sur la voie MAPK comme par exemple l'impact sur l'activation de ERK lors de la phase de reconsolidation. En parallèle, si nous mettions en évidence une inhibition de ERK, nous pourrions essayer de la corrélérer avec une baisse de glutamate dans la fente synaptique. Pour ce faire une étude par microdialyse permettrait de mesurer le taux du glutamate libéré.

L'effet inhibiteur du Ro65-6570 est spécifique de la reconsolidation de la mémoire contextuelle ce qui suggère une influence préférentielle du système nociceptinergique sur la formation de la mémoire contextuelle aversive. En effet, nous avons testé l'effet de cet agoniste sur la reconsolidation de la mémoire au son mais aucun effet inhibiteur n'a été observé. Suite à ces travaux basés sur le conditionnement de peur, nous avons utilisé un autre paradigme hippocampo-dépendant qui évalue cette fois-ci la mémoire spatiale. En effet, dans le but de vérifier que l'effet inhibiteur de l'agoniste NOP sur la reconsolidation est hippocampo-dépendant, nous avons testé l'effet de la drogue sur ce mécanisme dans le test de l'objet déplacé, un test non aversif. Pour rappel, dans ce test, le jour 1 l'animal est mis en présence de deux objets identiques. Le lendemain, l'animal est soumis à une réexposition brève aux deux objets afin de réactiver la trace mnésique et déclencher la reconsolidation (Figure 32). Le jour du test un des deux objets est déplacé. Une souris qui a bien appris la tâche passe plus de temps à explorer l'objet déplacé car la configuration lui apparaît comme nouvelle.

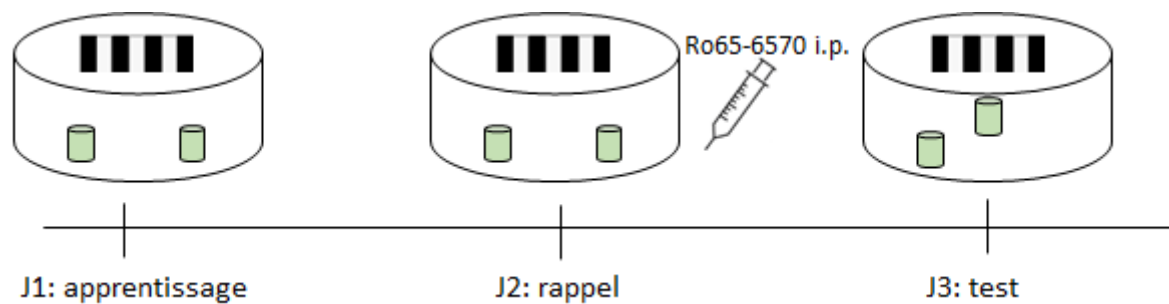


Figure 32 : Déroulement de l'expérience pour l'étude de la reconsolidation dans le test d'objet déplacé

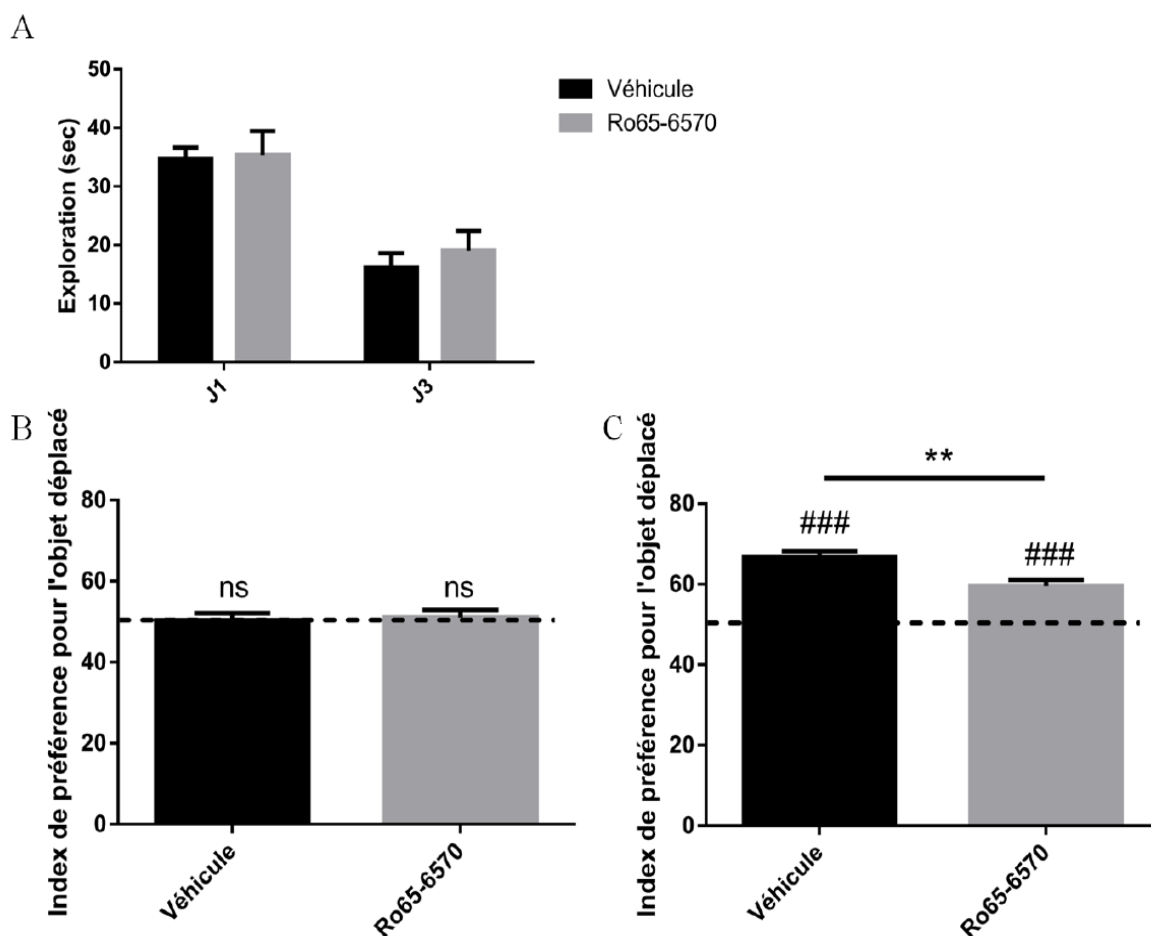


Figure 33 : Effet de Ro65-6570 sur la reconsolidation de la mémoire dans le test d'objet déplacé: (A) Exploration totale des objets en secondes \pm SEM des souris lors de la familiarisation (J1) et lors du test (J3) de Localisation d'Objets. Le temps d'exploration est le même pour les deux groupes. Une différence significative est observée entre le temps d'exploration du J1 et le temps d'exploration du J3 pour les deux groupes. (B) Index de préférence en pourcentage \pm SEM des deux groupes de souris pendant la familiarisation pour l'objet qui sera déplacé lors du test. Les deux groupes de souris ne manifestent aucune préférence naturelle pour l'un des objets. (C) Index de préférence en pourcentage \pm SEM des deux groupes pendant le test pour l'objet déplacé. La préférence pour l'objet déplacé est significativement moindre pour le groupe injecté avec du Ro65-6570. [** $p < 0.01$ véhicule vs Ro65-6570, ### $p < 0.001$ vs 50%].

Dans cette étude nous avons quantifié dans un premier temps l'exploration des deux objets le jour 1 (phase d'apprentissage). Les résultats montrent qu'au cours de l'apprentissage, les deux groupes de souris passent le même temps à explorer les 2 objets [t-test non apparié, $p = 0.8945$] (J1, Figure 33A) et n'ont pas de préférence naturelle pour un des 2 objets [One sample t-test vs 50%, groupe véhicule $p = 0.8472$, groupe Ro65-6570 $p = 0.6139$] (Figure 33B). Au cours de la phase du rappel qui correspond au J2, les souris peuvent explorer les deux objets dans la même configuration qu'au J1 pendant 3 minutes. Aucun paramètre n'a été évalué. Le jour du test (J3), les deux groupes ne montrent pas de différence d'exploration en terme de

temps total suggérant que l'agoniste n'a pas eu d'effet sur l'activité exploratrice de l'animal [t-test non apparié, $p=0.5075$] (J3 figure 33A). Les résultats de ce même jour montrent que les deux groupes préfèrent l'objet déplacé et l'explorent significativement plus que l'objet non déplacé [One sample t-test vs 50%, $p<0.001$]. Cependant cette préférence est significativement atténuée chez les souris Ro65-6570 [t-test non apparié, $p=0.0033$] (Figure 33C). L'injection d'agoniste Ro65-6570 après le rappel a donc permis de perturber partiellement la rétention de cette mémoire hippocampo-dépendante. Ceci suggère donc un effet inhibiteur de l'agoniste sur la reconsolidation de la mémoire. Cette baisse de préférence est du même ordre de grandeur que la baisse de freezing observée dans les expériences précédentes (environ 50%). Suite à ces résultats préliminaires nous pouvons suggérer un effet inhibiteur de l'activation du système nociceptinergique par un agoniste sur la reconsolidation de la mémoire hippocampo-dépendante que ce soit dans des conditions aversives ou non aversives. Afin de confirmer cette hypothèse un contrôle sans rappel sera nécessaire afin de vérifier que cet effet dépend bien de la reconsolidation. Il faudra aussi démontrer que cet effet est bien spécifique des récepteurs NOP en testant d'autres agonistes comme le AT-403 ou la nociceptine. S'il est confirmé que l'effet inhibiteur du système nociceptinergique sur la reconsolidation de la mémoire hippocampo-dépendante ne se limite pas aux tâches aversives il sera intéressant d'étudier cet effet dans le test de préférence de place conditionnée par les drogues. En effet l'addiction est un autre domaine dans lequel la reconsolidation de la mémoire offre des pistes thérapeutiques (Torregrossa et al. 2016).

Partie 3 : Etude des effets
promnésiques d'un antagoniste des
récepteurs NOP

Introduction :

Les études du système nociceptinergique ont mis en évidence l'effet inhibiteur du complexe **agoniste**/récepteur sur différents types de mémoire dans différents tests chez le rongeur. Très peu d'études ont par contre abordé l'effet des antagonistes du récepteur NOP sur la mémoire. Roozendaal et collaborateurs ont montré que l'injection de [Nphe(1)]nociceptin(1-13)NH(2)] dans l'amygdale basolatérale améliore la mémoire dans le test d'évitement passif chez le rat (Roozendaal et al. 2007). L'injection de J-113397, un autre antagoniste des récepteurs NOP, améliore la mémoire contextuelle dans le test de conditionnement à la peur (Ouagazzal 2015).

Les chercheurs ont également étudié l'effet de la délétion des récepteurs NOP ou du précurseur du peptide sur la mémoire. Il a été démontré que la délétion du récepteur de la nociceptine améliore la LTP NMDA dépendante dans la corne d'Ammon hippocampique (CA1). Cette amélioration est accompagnée par une amélioration de la mémoire hippocampo-dépendante dans le test de la piscine de Morris (Mamiya et al. 1998, Taverna et al. 2005). La délétion du gène qui code pour le précurseur de la nociceptine (Pnoc) induit des effets similaires avec notamment une amélioration de la mémoire spatiale dans le test de piscine de Morris (Higgins et al. 2002, Kuzmin et al. 2009).

L'utilisation des antagonistes des récepteurs à la nociceptine pourrait donc être une piste pour améliorer les performances mnésiques dans certaines pathologies liées à la mémoire comme la maladie d'Alzheimer.

1) La maladie d'Alzheimer :

La maladie d'Alzheimer (AD) est la principale cause de démence chez les personnes âgées, représentant 65 à 75% des cas et la quatrième cause de décès dans les pays développés (après les maladies cardiaques, les cancers et les accidents vasculaires cérébraux ;(Hofman et al. 1991, Skoog et al. 1993, Bianchetti et al. 2001). L'évolution de la maladie est progressive et continue. Cette pathologie est caractérisée par un déficit cognitif, une détérioration de la capacité d'exercer des activités de la vie quotidienne et l'apparition de troubles comportementaux. Le principal symptôme de la maladie est l'altération de la mémoire (Geldmacher et al. 1996, Bianchetti and Trabucchi 2001). Dans un premier stade, la mémoire épisodique est affectée avec un oubli des événements quotidiens. Les patients Alzheimer développent aussi des symptômes neuropsychiatriques comme l'anxiété et la dépression (Weiner et al. 2017).

Les problèmes comportementaux observés chez les malades sont associés à des atteintes au niveau cérébral. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une atrophie dans différentes régions du cerveau et notamment au niveau de l'hippocampe ce qui explique les problèmes de mémoire (Sorensen et al. 2016, Weiner, Veitch et al. 2017). Parmi les mécanismes neurobiologiques impliqués dans cette maladie neurodégénérative, il y a la théorie des peptides amyloïdes, de la protéine tau, les systèmes cholinergique et glutamatergique ainsi que l'implication du stress oxydatif et le calcium (Sanabria-Castro et al. 2017).

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation des plaques amyloïdes, formées de protéines agrégées avec différentes formes du peptide A β . Ce peptide est issu de la protéine APP après un clivage par la β -sécrétase puis la γ -sécrétase. Au contraire le clivage par la α -sécrétase libère un peptide court qui ne s'agrège pas, contrairement au clivage par β -sécrétase qui donne des peptides capables de former des oligomères. Ce peptide A β qui est neurotoxique s'accumule dans des plaques séniles entraînant une réaction inflammatoire provoquant la mort neuronale (Malaplate-Armand et al. 2009).

Malgré le rôle central du peptide amyloïde et/ou de la protéine tau hyperphosphorylée, les systèmes ciblés à l'heure actuelle pour atténuer les symptômes de la maladie sont les systèmes cholinergiques et glutamatergiques. L'altération du système cholinergique au cours de la maladie d'Alzheimer a été décrite il y a 30 ans. Une perte des neurones cholinergiques est observée au niveau de l'hippocampe, du cortex frontal, de l'amygdale, du noyau basalis, du septum médian qui sont des structures fortement impliquées dans la mémoire, l'apprentissage et l'attention (Terry et al. 2003, Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). Cette altération génère la down-régulation des marqueurs cholinergiques tels que l'acétylcholine estérase et l'acétylcholine transférase (Schaeffer et al. 2008, Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). Des études immunohistochimiques et de neuroimagerie ont montré que les patients Alzheimer présentent une réduction des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 7$ des récepteurs nicotiques dans le cortex et l'hippocampe (Ellis et al. 2006, Wu et al. 2010, Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). Les patients Alzheimer montrent également des altérations au niveau du système glutamatergique. La transmission anormale du glutamate est observée au niveau du cortex entorhinal, de l'hippocampe, de l'amygdale, du cortex frontal et du cortex pariétal (Mohandas et al. 2009, Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). La neurotransmission physiologique du glutamate au niveau de l'hippocampe induit l'augmentation cytosolique du calcium qui induit le mécanisme de LTP et donc la consolidation de la mémoire (Lynch 2004, Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). Une

hyperactivation des récepteurs glutamatergiques est associée à une dépolarisation excessive de la membrane post-synaptique induisant alors le processus de dégénérescence et la mort neuronale (Fan et al. 2007, Ndountse et al. 2009, Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). Au niveau synaptique, l'absence d'enzymes responsables de la dégradation du glutamate mobilise les transporteurs à la fois au niveau neuronal et au niveau glial afin de recapter le glutamate en excès (Butterfield et al. 2003, Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). Dans la maladie d'Alzheimer, l'inhibition de ces transporteurs (Doraiswamy 2002), avec la réduction de l'activité de la glutamine synthétase qui convertit le glutamate en glutamine (Walton et al. 2007) favorise la présence prolongée du glutamate et l'activation continue des récepteurs provoquant l'excitotoxicité (Butterfield and Pocernich 2003, Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). L'altération des deux systèmes cholinergique et glutamatergique est fortement liée aux problèmes cognitifs observés chez les patients de la maladie d'Alzheimer.

Parmi les modèles transgéniques murins de l'AD, une des lignées les plus étudiées est la Tg2576, qui exprime une forme mutée de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) retrouvée dans une famille suédoise (Hsiao et al. 1996). C'est cette lignée que nous utilisons au laboratoire. Ce modèle a la particularité de montrer des déficits mnésiques progressifs à partir de l'âge de 3 mois notamment dans le test de localisation d'objet, dans le test du conditionnement de peur et dans le labyrinthe en Y (Jacobsen et al. 2006, D'Amelio et al. 2011, Duffy et al. 2015). Les souris Tg2576 développent des plaques séniles à partir de l'âge de 9 mois (Kawarabayashi et al. 2001, Jacobsen, Wu et al. 2006). Ces souris montrent également des altérations de la neurogénèse adulte et des altérations synaptiques structurales et fonctionnelles dans l'hippocampe (Jacobsen, Wu et al. 2006, D'Amelio, Cavallucci et al. 2011, Verret et al. 2013, Bezzina et al. 2015, Duffy, Morales-Corraliza et al. 2015).

2) PTSD et Extinction :

Comme décrit dans l'introduction générale, le stress post traumatique induit des reviviscences du choc par une simple présentation d'un indice présent lors de l'évènement traumatique. Cette pathologie peut être traitée en inhibant la reconsolidation lors de phases de rappel de l'évènement traumatique. Un autre mécanisme peut entrer en compétition avec cette phase de reconsolidation de la trace : l'extinction. L'extinction est définie comme une diminution des réponses de peur conditionnée suite à une procédure au cours de laquelle les sujets sont exposés à des présentations répétitives de stimuli conditionnés (CS) seuls (Nader et al. 2013, An et al. 2017). Ce type de « mémoire » peut être modulé par une inhibition ou une

potentialisation des neuromodulateurs impliqués. Des études ont montré par exemple que l'activation des récepteurs noradrénergiques améliore l'extinction de la mémoire (Lissek et al. 2015) tandis que la délétion de ces récepteurs induit des problèmes d'extinction (Mason et al. 1975, Mason et al. 1978, Lissek, Glaubitz et al. 2015). Un autre neuromodulateur, l'acétylcholine, est impliqué dans le processus d'extinction de la mémoire. Des interventions pharmacologiques à l'aide d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs muscariniques ont montré l'implication du système cholinergique dans l'acquisition et la consolidation de l'extinction de la mémoire (Wilson et al. 2017).

Etant donné que le système nociceptine inhibe la consolidation de la mémoire hippocampo-dépendante et régule de façon négative la libération des neuromodulateurs associés (glutamate, acétylcholine, noradrénaline) nous avons testé l'hypothèse d'un effet promnésique du blocage des récepteurs NOP. L'objectif de notre étude dans ce dernier chapitre a été de tester dans un premier temps l'effet de l'antagoniste NOP SB612111 sur la mémoire spatiale non aversive dans le test d'objet déplacé chez des souris transgéniques Tg2576 modèle de la maladie d'Alzheimer âgées de 8 mois. Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de l'antagoniste sur l'extinction de la mémoire aversive dans un test de conditionnement de peur au contexte.

Résultats :

1) Effet de l'antagoniste SB612111 sur la mémoire spatiale chez les souris transgéniques Tg2576 :

Dans cette sous partie nous avons étudié l'effet de l'antagoniste sur la mémoire chez des souris Tg2576 modèles de la maladie d'Alzheimer. L'antagoniste a été injecté par voie i.p. à la dose de 5 mg/kg 10 minutes avant l'apprentissage.

Les résultats montrent que les souris transgéniques traitées ou non traitées ont tendance à explorer moins les objets que les souris contrôles non transgéniques (NTg) le jour de l'apprentissage (Figure 34A). Les trois groupes explorent autant de temps les deux objets et ne montrent aucune préférence pour l'un des deux (Figure 34B).

Au cours du test, en termes de temps d'exploration total, les résultats montrent que les trois groupes explorent les objets de façon équivalente (Figure 34C). Nous avons ensuite calculé le pourcentage de préférence pour l'objet déplacé par rapport à l'objet non déplacé. Les résultats montrent que les souris contrôles explorent significativement plus l'objet déplacé que l'objet non déplacé (Figure 34D). Par contre les souris transgéniques injectées avec le véhicule explorent autant de temps l'objet déplacé que l'objet non déplacé. Ces résultats montrent que notre modèle présente bien des déficits de mémoire spatiale. Ce déficit est en partie réversé par le traitement avec l'antagoniste des récepteurs NOP. En effet, les souris traitées avec le SB612111 montrent une préférence pour l'objet déplacé significativement différente de 50%. Par contre, lorsqu'on analyse les résultats en comparant les temps d'exploration lors de l'apprentissage et lors du test (Figure 34E) seules les souris NTg présentent une augmentation significative de la préférence pour l'objet déplacé. Ces résultats permettent cependant de suggérer que l'antagoniste testé a induit un effet promnésique sur l'acquisition et/ou la consolidation de la mémoire spatiale chez les souris pathologiques modèles de la maladie d'Alzheimer.

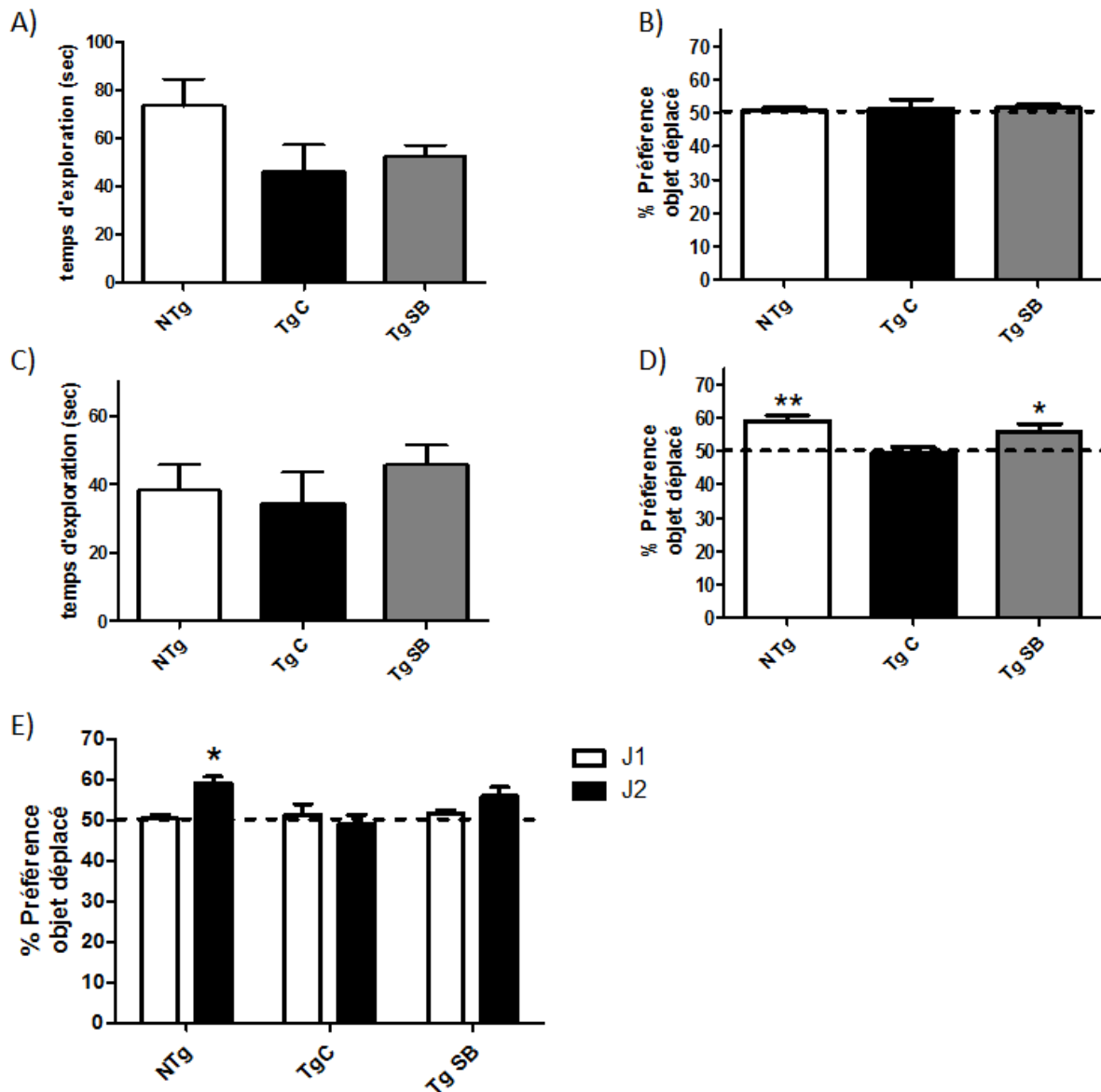


Figure 34 : Effet de l'antagoniste NOP SB612111 sur la mémoire spatiale dans le test de la localisation d'objet : A) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM du temps d'exploration des deux objets le jour de la familiarisation. B) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM de l'indice de préférence pour l'objet déplacé le jour de la familiarisation. C) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM du temps d'exploration des deux objets en seconde le jour du test. D) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM de l'indice de préférence pour l'objet déplacé le jour du test. * $p < 0.05$ significativement différent de la valeur de 50% (test de Student). E) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM de l'indice de préférence pour l'objet déplacé en seconde le jour de la familiarisation et le jour du test. NTg (N=7), Tg C (N=8) et Tg SB (N=9). ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post-hoc de Bonferroni, * $p < 0.05$ j1 vs j2.

2) Effet de l'antagoniste NOP SB612111 sur l'extinction de la mémoire aversive contextuelle :

2.1 Mise en place du protocole expérimental pour étudier l'extinction :

Dans un premier temps, nous avons mis en place un protocole expérimental pour étudier l'extinction dans le test de conditionnement de peur au contexte. Dans ce protocole, le premier jour la souris est conditionnée pour associer un contexte à un choc électrique. Ensuite, un protocole d'extinction est mis en place. La souris est injectée (ici avec la solution contrôle véhicule i.p.) 15 minutes avant d'être placée 10 minutes dans le dispositif de conditionnement sans recevoir de choc électrique. Cette procédure est répétée sur quatre jours et chaque jour correspond à une session. Durant chaque session le « freezing » a été quantifié par périodes de deux minutes (Figure 35A).

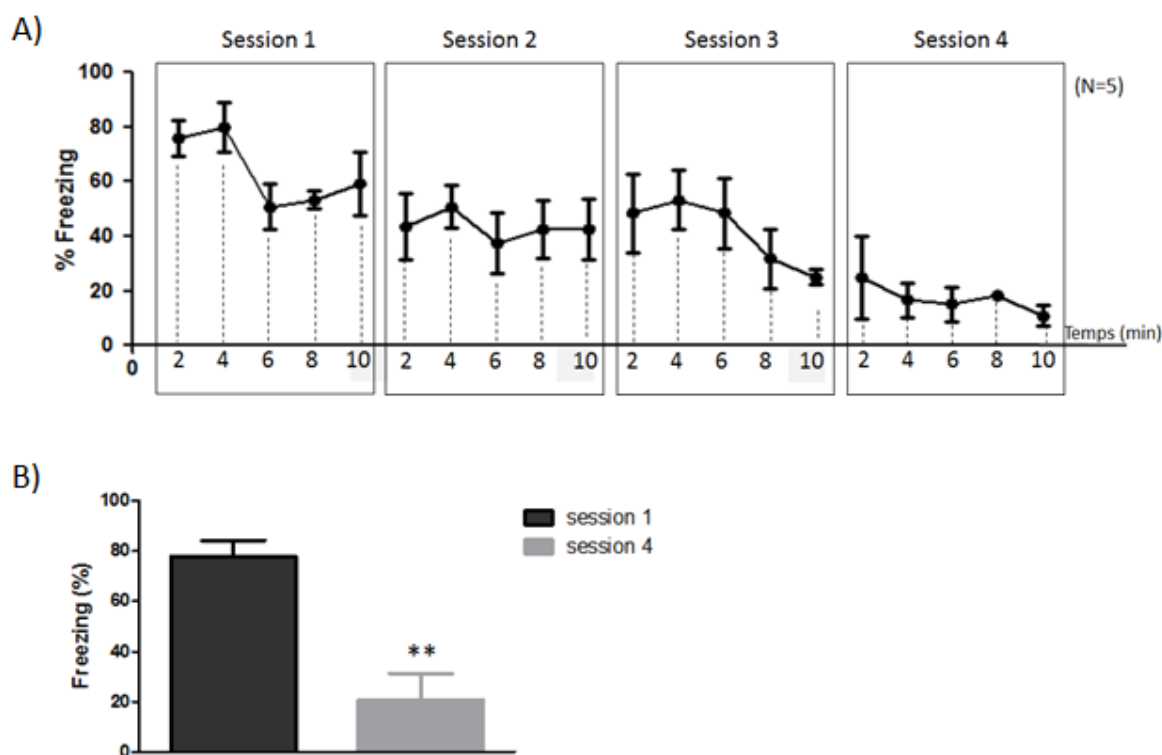


Figure 35 : Mise au point du protocole d'extinction : A) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM du taux de « freezing » par tranches de 2 minutes et son évolution pendant 10 minutes sur 4 jours. B) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM du « freezing » sur les 4 premières minutes de la session 1 et de la session 4, ** $p < 0.01$, test t de Student.

Les résultats montrent que lors de la première session, particulièrement pendant les quatre premières minutes (correspondant à la période pendant laquelle est évaluée la rétention de la mémoire dans un test classique), les souris montrent un niveau élevé de « freezing » de l'ordre de 77%, ce qui montre que les souris ont bien acquis la tâche. Ce niveau de « freezing »

baisse régulièrement tout au long des sessions d'extinction pour attendre finalement une valeur proche de 20%. Les analyses statistiques montrent une différence significative du niveau de « freezing » entre la session 1 et la session 4 (Figure 35B). Cette première expérience a permis la mise en place d'un protocole pour étudier l'extinction et notamment pour tester si l'antagoniste exerçait un effet promnésique sur l'acquisition et/ou la consolidation de l'extinction.

2.2 Etude de l'effet de l'antagoniste SB612111 sur l'extinction de la mémoire :

Les résultats montrent que les deux groupes ont bien appris l'association choc/contexte. Ceci se traduit par un niveau de « freezing » d'environ 70-80% en début de session 1. La diminution du « freezing » au cours des sessions est comparable entre les 2 groupes (Figure 36A). Lors de la quatrième session les deux groupes montrent une baisse de « freezing » par rapport à la première session (Figure 36B). Une analyse ANOVA à 2 facteurs montre un effet significatif du temps ($F_{1,14}=9.161$, $p<0.001$) mais pas d'effet du traitement ($F_{1,14}=0.831$, $p>0.05$) ni de l'interaction ($F_{1,14}=0.724$, $p>0.05$). L'injection de l'antagoniste NOP à la dose de 5 mg/kg avant chaque séance n'a donc pas facilité le processus d'extinction.

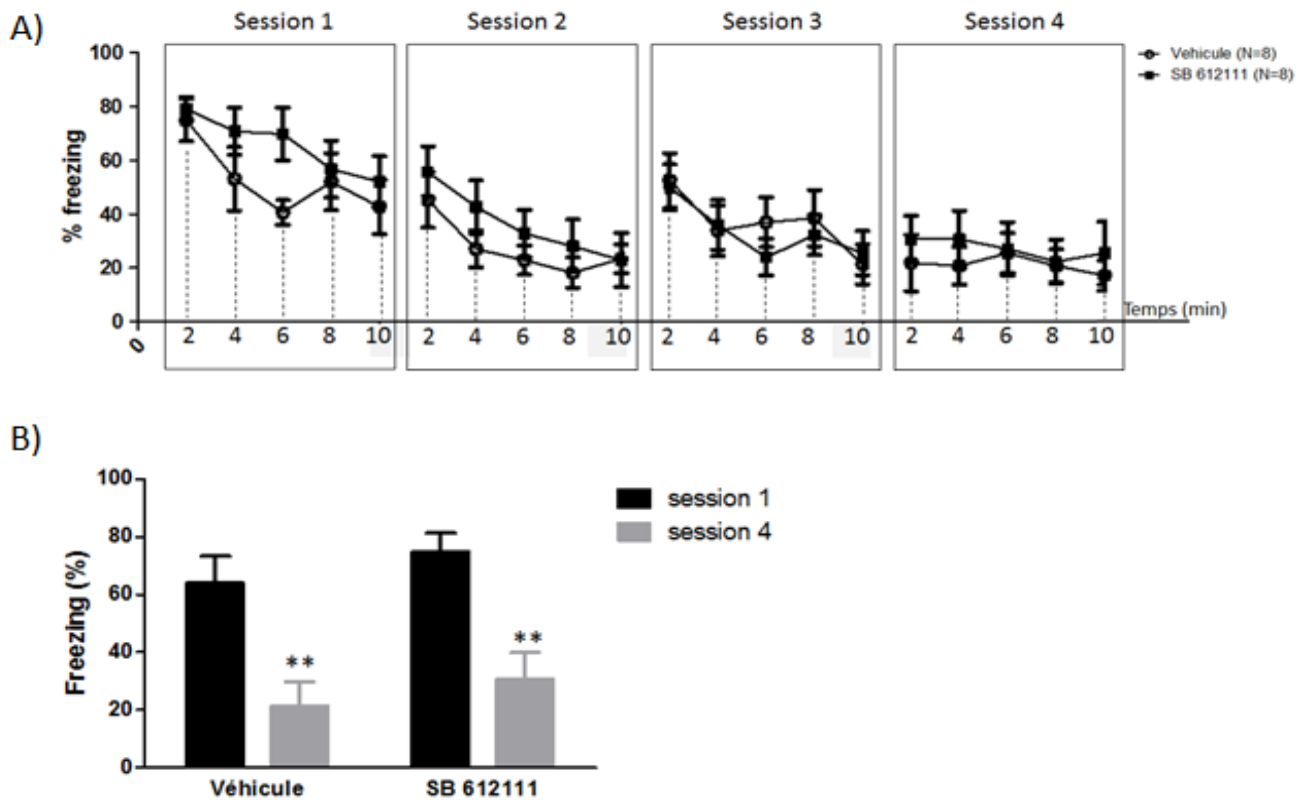


Figure 36 : Effet de l'antagoniste NOP SB612111 sur l'extinction de la mémoire aversive :
A) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM du taux de « freezing » par tranches de 2 minutes et son évolution pendant 10 minutes sur 4 jours pour les groupes contrôles et traités avec l'antagoniste. B) les valeurs représentent les moyennes \pm SEM du « freezing » sur les 4 premières minutes de la session 1 (j1) et de la session 4 (j4), ** $p < 0.01$ j1 vs j4.

Discussion :

Dans cette étude préliminaire, nous avons cherché à mettre en évidence des effets promnésiques du blocage des récepteurs NOP. Contrairement aux effets amnésiants des agonistes, les effets positifs sur la mémoire des antagonistes ont été jusqu'à présent peu décrits (Rooszendaal, Lengvilas et al. 2007, Ouagazzal 2015). Il est possible qu'ils soient plus difficiles à mettre en évidence car ils dépendent de la libération de nociceptine endogène. On ne s'attend donc à voir un effet que dans des conditions expérimentales qui produisent cette libération. Ici nous avons montré un effet promnésique de l'antagoniste du récepteur NOP sur une mémoire altérée chez des souris Tg2576 dans le test de localisation d'objet mais pas sur l'extinction de la mémoire de peur au contexte chez des souris C57/Bl6.

L'étude sur l'extinction était la suite logique de l'étude sur la reconsolidation de la mémoire de peur au contexte. Comme l'extinction correspond en fait à un nouvel apprentissage on pouvait supposer que celui-ci serait facilité par l'antagoniste NOP. Cependant il semble que le blocage des récepteurs NOP pendant les sessions d'extinction de la mémoire contextuelle ne facilite pas le processus. Il est possible comme nous l'avons dit plus haut qu'il n'y ait pas de nociceptine libérée pendant l'extinction, ce qui expliquerait l'absence d'effet de l'antagoniste. Il est possible également que les performances des souris contrôle soient déjà optimales dans nos conditions expérimentales ce qui empêcherait de mettre en évidence une amélioration. L'étude des souris Tg2576 permet d'éviter ce problème d'effet plafond puisque dans ce cas on sait que les performances d'apprentissage et de mémoire ne sont pas optimales et peuvent être améliorées. Nous avons ainsi pu montrer que l'injection d'un antagoniste des récepteurs NOP avant l'apprentissage restaurait la capacité des souris Tg2576 à mémoriser la configuration spatiale des objets sans affecter le temps d'exploration des objets le jour de l'acquisition. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Ouagazzal et al (2015) qui ont montré que l'injection systémique d'un antagoniste NOP facilitait l'apprentissage contextuel chez la souris. Nos résultats, bien que préliminaires, renforcent donc l'idée que les antagonistes NOP pourraient être efficaces pour améliorer la mémoire hippocampo-dépendante (épisode chez l'homme), notamment dans des conditions pathologiques comme la maladie d'Alzheimer. Dans le cadre de notre modèle Tg2576 de nombreuses expériences peuvent maintenant être envisagées. On pourrait par exemple tester l'antagoniste dans d'autres paradigmes plus stressants comme la piscine de Morris et aussi évaluer son efficacité sur la mémoire de travail qui est aussi perturbée chez les souris Tg2576 (labyrinthe en Y, Jacobsen, Wu et al. 2006). Il

serait aussi intéressant d'évaluer l'effet d'un traitement chronique par l'antagoniste sur les performances mnésiques des souris.

Discussion générale

1) Les souris Werner, un modèle pour étudier le vieillissement cognitif :

Dans la première partie de la thèse, nous avons étudié les performances cognitives des souris Werner modèle de vieillissement accéléré et nous avons montré que ces souris présentent des problèmes de mémoire notamment hippocampo-dépendante dès l'âge de 8 mois, problèmes semblables à ceux décrits chez des souris normales au cours du vieillissement. L'avantage de ce modèle est qu'il ne présente pas les problèmes moteurs et d'anxiété que nous trouvons chez des souris âgées et qui nous empêchent de conclure sur les déficits de mémoire observés. Sur le plan comportemental, ce modèle de vieillissement accéléré semble donc être un bon modèle pour étudier la composante mnésique du vieillissement physiologique. Au niveau cellulaire, une étude sera nécessaire dans le but de comprendre les causes des troubles de mémoire observés. La personne âgée se caractérise par des atteintes cognitives associées à des atteintes cérébrales comme par exemple la neurogénèse qui décline avec l'âge. L'intérêt du modèle Werner serait renforcé si l'on mettait en évidence des atteintes similaires au niveau de l'hippocampe.

Outre ce modèle, il existe d'autres modèles de vieillissement prématuré comme les souris télomérase knockout chez lesquelles le gène qui code pour mTerc a été délété par recombinaison homologue (Chang 2005). Il serait intéressant de caractériser leur phénotype du point de vue cognitif, ce qui à notre connaissance n'a jamais été fait. Par ailleurs, il existe un autre modèle de vieillissement accéléré Ercc1 sur lequel des tests cognitifs ont été réalisés notamment des tests de mémoire (Borgesius et al. 2011). Il s'agit d'une mutation d'une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN qui induit l'accumulation des cassures double brins spécifiquement dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur. Ce modèle serait un bon modèle de vieillissement puisqu'il présente des problèmes dégénératifs observés au cours du vieillissement normal. Les déficits semblent plus sévères que chez les souris Werner avec une baisse de performances dans le test de la piscine de Morris et le conditionnement de peur au contexte dès 6 mois.

Nous pouvons finalement conclure que les souris Werner, ainsi que les autres modèles de vieillissement accéléré, peuvent constituer des modèles pratiques pour étudier certains aspects du vieillissement cognitif, en particulier les problèmes de mémoire hippocampo-dépendante. Leur avantage principal est que les troubles se développent de façon plus précoce que chez les souris normales. Ils pourraient aussi être utilisés pour tester l'efficacité de traitements pro-mnésiques. Il serait par exemple intéressant de tester les effets des antagonistes des récepteurs NOP et de voir si on corrige les déficits de mémoire observés et de tester ensuite

les effets de ces molécules au niveau cellulaire. Cependant, il faut tenir compte de la difficulté d'obtenir ce type de souris transgéniques notamment les souris Werner.

2) Effet du système nociceptinergique sur la mémoire :

L'étude de l'effet du système nociceptinergique sur la mémoire a été abordée dans les différents processus notamment l'acquisition, la consolidation et la reconsolidation. L'activation des récepteurs nociceptinergiques par un **agoniste** exerce un **effet inhibiteur** sur l'**acquisition** et la **consolidation** de la **mémoire spatiale** dans le test de la piscine de Morris. Cet effet a été également observé sur l'acquisition et la consolidation de la **mémoire aversive** dans le test de l'évitement passif et dans le test du conditionnement de peur. Dans notre étude nous avons montré un **effet inhibiteur** des agonistes des récepteurs NOP sur la **reconsolidation** de la mémoire **hippocampo-dépendante**.

Un effet promnésique des antagonistes des récepteur NOP sur l'acquisition de la mémoire a été mis en évidence dans un test de mémoire contextuelle (après injection systémique) (Ouagazzal 2015) et dans le paradigme d'évitement passif (après injection intra-BLA) (Roozendaal et al. 2007). Les souris KO pour le récepteur ou le précurseur de la nociceptine présentent également des capacités d'apprentissage accrues (Ouagazzal 2015). Durant notre étude, nos données préliminaires suggèrent un **effet promnésique** de l'**antagoniste** chez la souris Tg2576 modèle de la **maladie d'Alzheimer sur l'acquisition ou la consolidation de la mémoire déjà altérée**.

Par quels mécanismes d'action et à quel niveau (hippocampe, amygdale ou autre) les ligands NOP agissent-ils ?

2.1 L'hippocampe :

Le système nociceptinergique est exprimé dans l'hippocampe précisément au niveau du CA1, CA3 et gyrus denté. Cette structure cérébrale est indispensable dans l'encodage et la formation de la mémoire spatiale et contextuelle. L'effet inhibiteur de la nociceptine sur la reconsolidation de la mémoire pourrait être expliqué par deux mécanismes : effet sur l'élément post-synaptique et effet pré-synaptique. Au contraire les effets promnésiques des antagonistes pourraient venir du blocage de l'effet inhibiteur de la nociceptine endogène au niveau des mêmes synapses.

2.1.1 Effets post-synaptiques :

Après avoir observé un effet inhibiteur de N/OFQ sur la mémoire, les chercheurs ont recherché les causes possibles de cet effet. Pour cela ils ont examiné l'effet de la nociceptine

sur la LTP, le mécanisme essentiel pour la formation de la trace mnésique. Des études *in vitro* sur des coupes de cerveaux ont montré que l'application de la nociceptine inhibe l'induction de la LTP dans la région CA1 et dans le gyrus denté de l'hippocampe (Yu et al. 1998). Ces résultats sont en accord avec les résultats comportementaux observés chez le rat (Sandin et al. 1997). Ces résultats suggèrent que la nociceptine module négativement la mémoire hippocampo-dépendante en inhibant ce mécanisme de LTP. Ces données ont été confirmées par l'étude des conséquences de la délétion du récepteur NOP. Cette délétion améliore la mémoire au niveau comportemental ainsi que la LTP au niveau de la région CA1 de l'hippocampe (Manabe et al. 1998). Afin de vérifier que cet effet résulte d'une inhibition post-synaptique et pas d'une diminution de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, des études ont montré que la nociceptine inhibe le courant excitateur post synaptique évoqué par une stimulation électrique (Yu and Xie 1998). Un autre mécanisme indispensable pour la formation de la mémoire qui est aussi altéré par l'activation du système nociceptinergique est la LTD. Un effet inhibiteur de N/OFQ sur la LTD a été mis en évidence par Wei et Xie (1999). Cette inhibition de la LTP et de la LTD par la nociceptine pourrait expliquer l'effet inhibiteur sur la reconsolidation de la mémoire. Un effet inhibiteur post-synaptique sur ces deux mécanismes peut être expliqué par un effet direct sur les canaux potassiques GIRK (hyperpolarisation du neurone post-synaptique) et par une modulation indirecte de la signalisation des récepteurs au glutamate. **Les récepteurs NMDA** peuvent être cibles de cet effet car il a été montré que dans les deux cas de la LTP et la LTD ces récepteurs sont fortement impliqués dans cette inhibition. Un effet inhibiteur de N/OFQ sur le courant synaptique dépendant des récepteurs NMDA au cours de la LTD a été mis en évidence par Wei (1999). De la même façon, l'inhibition de la LTP est accompagnée d'une dérégulation de l'activité des récepteurs NMDA (Mamiya, Yamada et al. 2003). Cette dérégulation peut être expliquée par le fait que N/OFQ, en induisant une hyperpolarisation, peut renforcer le blocage des récepteurs NMDA par les ions Mg^{2+} (Yu and Xie 1998). Les agonistes NOP pourraient aussi agir sur les cascades de signalisation régulées par les récepteurs NMDA comme la CaMKII (Mamiya, Yamada et al. 2003). Au contraire, les souris KO NOP montrent une hyperactivité des récepteurs NMDA avec une augmentation de la phosphorylation de la CaMKII. Une diminution de la phosphorylation de ERK, une protéine qui dépend de l'activité des récepteurs NMDA, a également été observée suite au traitement par l'agoniste des récepteurs NOP dans le test de reconnaissance d'objet (Goeldner, Reiss et al. 2008, Goeldner et al. 2009).

En plus du système glutamatergique, le système noradrénergique est également impliqué dans le renforcement de la LTP (O'Dell et al. 2015). La formation de la mémoire aversive active le système adrénérgique, un système exprimé au niveau de l'hippocampe. L'activation des récepteurs adrénérgiques notamment au cours de la formation de la mémoire renforce la trace mnésique. En effet, la fixation de l'agoniste sur le récepteur noradrénergique active la PKA qui inhibe la protéine phosphatase 1 facilitant ainsi l'activation des protéines kinases comme la CamKII qui est impliquée dans la LTP (O'Dell, Connor et al. 2015). De plus, ce système est impliqué dans la modulation de la signalisation des récepteurs NMDA. L'activation des PKA par les récepteurs adrénérgiques phosphoryle les récepteurs NMDA aux niveaux de sites facilitant l'ouverture des canaux (Leonard and Hell 1997, Murphy 2014). Cette PKA augmente aussi la perméabilité aux ions Ca^{2+} (Aman et al 2014, Murphy et al 2014). En inhibant l'adénylyl cyclase et donc la production d'AMPC, la nociceptine pourrait atténuer l'activation de la PKA par le système adrénérgique.

2.1.2 Effets pré-synaptiques :

Le système nociceptinergique peut agir sur l'élément pré-synaptique comme sur l'élément post-synaptique. Le mécanisme principal qui pourrait expliquer l'effet inhibiteur de la nociceptine sur la reconsolidation de la mémoire au niveau pré-synaptique est l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs impliqués dans ce processus mnésique. En effet, au niveau pré-synaptique, l'activation du système nociceptinergique inhibe les canaux calciques voltage-dépendants qui permettent de déclencher la libération des neurotransmetteurs (Knoflach et al. 1996).

La nociceptine inhibe la libération de glutamate dans plusieurs régions cérébrales (Nicol et al. 2002). Cependant aucune étude n'a montré de façon directe l'effet de la nociceptine sur la libération de glutamate dans l'hippocampe. L'hypothèse liée à la LTP et/ou à la LTD permet cependant de suggérer un effet inhibiteur de la nociceptine sur la libération du glutamate.

Les effets des ligands NOP sur la libération d'acétylcholine sont variables d'une étude à l'autre. Il a été montré que l'injection de N/OFQ en i.c.v. augmente l'acétylcholine au niveau de l'hippocampe chez des souris traitées par mecamlamine (Hiramatsu et al. 2008) alors qu'une autre étude n'a pas montré d'interaction entre les deux systèmes dans la mémoire de reconnaissance (Reiss et al. 2012). D'autre part, la délétion du récepteur NOP augmente la libération de l'acétylcholine au niveau hippocampique (Uezu et al. 2005). Il est possible que ces données contradictoires soient liées à des effets indépendants des récepteurs NOP (Miwa et al. 2010) ou bien à l'utilisation de différentes doses d'agonistes dans des paradigmes différents.

Dans notre étude, une augmentation de l'acétylcholine via le blocage des récepteurs NOP pourrait expliquer l'effet promnésique de l'antagoniste SB612111 sur la mémoire altérée chez les souris Tg2576 modèles de la maladie d'Alzheimer. La neurotransmission cholinergique est fortement altérée dès les stades précoces de la maladie chez les patients et chez les souris modèles de la maladie d'Alzheimer (Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria et al. 2017). Un traitement avec un inhibiteur de l'acétylcholine estérase permet de corriger la concentration de l'acétylcholine au niveau de la fente synaptique et induit un effet promnésique chez les patients ou chez les souris (Mohammad et al. 2017).

2.2 L'amygdale :

Cette structure joue un rôle important dans la formation de la mémoire aversive contextuelle et non contextuelle et représente un site d'expression du système nociceptinergique (Mollereau et al. 2000). Des études ont montré que la nociceptine au niveau local inhibe la libération de noradrénaline au niveau de la BLA (Kawahara et al. 2004). Il a également été montré que la nociceptine inhibait la transmission glutamatergique dans l'amygdale latérale (Meis et al. 2001) et centrale (Kallupi et al. 2014). De façon logique, l'injection locale de nociceptine au niveau de la BLA inhibe la mémoire aversive dans le test d'évitement passif, alors qu'un antagoniste augmente la consolidation (Roosendaal, Lengvilas et al. 2007). Paradoxalement, les agonistes injectés par voie systémique ont des effets variables selon les études sur les mémoires amygdalo-dépendantes indépendantes de l'hippocampe. La plupart des travaux montrent par exemple une absence d'effet dans le test de conditionnement de peur au son (Mamiya, Yamada et al. 2003, Goeldner, Reiss et al. 2009) mais dans certains cas les agonistes sont efficaces (Fornari et al. 2008, Andero et al. 2013). Nos résultats sur la composante au son dans le test de conditionnement de peur montrent une absence d'effet des agonistes sur la reconsolidation. L'absence d'effet dans nos expériences peut être expliquée par le fait que, contrairement aux injections locales citées plus haut, la dose injectée par voie systémique peut ne pas être suffisante pour induire un effet alors que notre choix de dose était basé sur l'absence d'un effet sédatif. Il est d'ailleurs intéressant de noter que dans les expériences de Fornari et al, les doses intermédiaires de N/OFQ icv inhibent l'acquisition de la mémoire de peur au contexte alors que seule la dose la plus forte interfère avec la mémoire de peur au son. Il est aussi possible que, après administration systémique, des effets dans d'autres structures cérébrales contrebalancent les effets inhibiteurs directs produits par les agonistes NOP dans l'amygdale.

2.3 Autres structures cérébrales :

Bien que notre étude et l'interprétation de nos résultats soient essentiellement focalisées sur l'hippocampe et l'amygdale, l'activité de ces régions est modulée par un ensemble d'afférences provenant en particulier des noyaux aminergiques (voir introduction générale). Le système nociceptinergique est notamment exprimé dans les noyaux du raphé (sérotonine), l'aire tegmentale ventrale (VTA) (dopamine), le locus coeruleus (noradrénaline) et les noyaux cholinergiques du télencéphale (Mollereau and Mouledous 2000). Dans certaines de ces structures comme la VTA (Murphy et al. 1999), le noyau dorsal du raphé (Vaughan et al. 1996) et le locus coeruleus (Connor et al. 1999), un effet inhibiteur direct de la nociceptine a été démontré. Il est donc possible qu'une partie des effets des ligands administrés par voie systémique observés dans nos études soient liés à une action inhibitrice au niveau de ces centres neuromodulateurs.

Le fait que le récepteur NOP soit exprimé très largement dans le cerveau et que sa distribution cellulaire soit mal connue rend difficile l'interprétation des résultats comportementaux. Les hypothèses présentées ci-dessus pourraient être testées en réalisant des injections locales et en combinant les ligands NOP à des molécules ciblant les systèmes glutamatergiques et monoaminergiques. Le développement de modèles génétiques permettant un KO conditionnel du récepteur dans des régions cérébrales ou des types cellulaires précis, constituerait un outil de choix pour décortiquer les mécanismes d'action de la nociceptine dans la consolidation et la reconsolidation de la mémoire.

3) Implications thérapeutiques pour le traitement des pathologies liées à la mémoire :

Certaines molécules agonistes des récepteurs NOP sont déjà testées chez l'homme, notamment le Cebranopadol, un agoniste mixte NOP/mu opioïde qui est en phase clinique 2 pour le traitement des douleurs chroniques (Christoph et al. 2017). La dose analgésique administrée aux patients qui est de 600 microgrammes n'a pas induit d'effet toxique chez l'homme. D'autre part, LY2940094, un antagoniste des récepteurs NOP a été testé en phase 2 chez des patients dépressifs avec des résultats prometteurs. Cet antagoniste ne développe pas d'effets toxiques chez l'homme (Post et al. 2016). Ceci montre que le développement des médicaments agonistes et antagonistes des récepteurs NOP dans le but de traiter des troubles liés à la mémoire pourrait être envisagé sans craindre d'éventuels effets toxiques.

Nos résultats suggérant des effets promnésiques chez les souris modèles de la maladie Alzheimer restent très préliminaires et nécessitent des séries d'expériences complémentaires.

Les antagonistes NOP devront être évalués dans d'autres tests de mémoire hippocampo-dépendante mais aussi de mémoire de travail. Chez les souris Alzheimer, il serait nécessaire d'évaluer si le système nociceptinergique (expression du peptide et des récepteurs) est perturbé dans les structures impliquées dans la mémoire. Une microdialyse pour mesurer la concentration de l'acétylcholine serait nécessaire et pourrait expliquer l'effet promnésique observé. Il sera également important d'étudier les effets d'un traitement chronique par l'antagoniste NOP. En effet, l'inhibition chronique du système NOP pourrait avoir des conséquences sur l'expression de protéines clés des mécanismes de plasticité. Il a par exemple été montré *in vitro* que l'application de nociceptine est associée à une augmentation des GLAST, un type de transporteurs de la recapture du glutamate (Meyer LC 2017). La maladie d'Alzheimer est associée à une dégénérescence neuronale qui pourrait également être modulée par le système nociceptinergique. En effet, il a déjà été démontré que le système nociceptinergique joue un rôle antiparkinsonien suite au blocage des récepteurs par un antagoniste (Marti et al. 2005). Plus récemment, il a été montré que l'antagoniste SB612111 que nous avons utilisé dans notre étude diminue la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques chez des souris modèles de la maladie de Parkinson (Arcuri et al. 2016). Il serait donc intéressant de tester les effets neuroprotecteurs des antagonistes administrés en chronique notamment sur la neurodégénérescence et sur l'homéostasie du glutamate. Il existe de nombreux modèles de la maladie d'Alzheimer mais aucun ne reproduit exactement la pathologie humaine. Certains modèles présentent des déficits mnésiques un peu plus tôt que d'autres (le modèle APP23 présente par exemple des déficits mnésiques dès 3 mois contre 6 mois pour les souris Tg2576) (Sturchler-Pierrat et al. 1997, Kawarabayashi et al. 2001). D'autre part, nous trouvons aussi un décalage entre certains modèles dans l'apparition des plaques amyloïdes, la signature de la maladie d'Alzheimer. Ces déficits mnésiques avec le dépôt des plaques amyloïdes apparaissent à un âge avancé chez l'homme. Il serait donc nécessaire de ne pas se limiter aux souris Tg2576 et de tester les antagonistes des récepteurs NOP pour voir si on retrouve des effets promnésiques chez d'autres modèles de la maladie.

Au cours de notre étude nous avons montré un effet inhibiteur des agonistes des récepteurs NOP sur la reconsolidation de la mémoire dans le conditionnement de peur. Il s'agit d'une première indication que ces agonistes pourraient être une alternative au propranolol pour le traitement du PTSD. Ce beta bloquant a permis une amélioration des symptômes qui n'a été observée que chez 50% de patients. De plus, ces effets n'ont pas été reproduits par Wood et collaborateurs (Wood et al. 2015) d'où l'intérêt thérapeutique de la mise en évidence de l'effet

inhibiteur des agonistes du récepteur NOP sur la reconsolidation de la mémoire. Cependant, ces agonistes semblent agir sur l'aspect hippocampo-dépendant mais pas sur l'aspect amygdalo-dépendant alors que chez le patient PTSD, le but serait plutôt d'agir sur la mémoire émotionnelle en préservant la mémoire épisodique, c'est-à-dire dissocier l'hippocampe responsable de la mémoire épisodique de l'amygdale responsable de la mémoire émotionnelle car c'est l'aspect émotionnel qui est le responsable du handicap chez le patient PTSD. Dans notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet inhibiteur sur l'aspect émotionnel indépendamment de l'hippocampe (conditionnement au son).

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale, le PTSD est associé à une hypermnésie et à une amnésie. D'après Layton et Krikorian (2002), le paradigme du conditionnement de peur ne permet que de modéliser l'hypermnésie qui est le rappel accru et persistant du choc électrique mais pas l'amnésie c'est-à-dire le déficit mnésique vis-à-vis des éléments contextuels du trauma, suggérant que ce paradigme n'est pas un bon modèle du PTSD. Il existe d'autres modèles de PTSD dans lesquels les agonistes NOP pourraient être testés comme le modèle d'exposition à un prédateur, le modèle d'évitement passif, le modèle d'injection de corticostérone associée au conditionnement de peur (Desmedt et al. 2015).

En tenant compte de l'effet inhibiteur des agonistes sur la reconsolidation, l'effet observé est partiel c'est-à-dire qu'on ne revient pas à un état basal inférieur ou égal à 20% de « freezing ». En d'autres termes le souvenir ne semble pas être totalement effacé dans nos conditions expérimentales. Comme chez l'homme (Brunet et al. 2014), une multiplication du nombre de séances de réactivation associées à une injection de l'agoniste pourrait être suggérée dans le but d'augmenter l'effet amnésiant. Des séances répétées pourraient également permettre d'atteindre des mémoires émotionnelles dépendantes de l'amygdale.

Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, la formation de la trace mnésique subit une consolidation synaptique et une consolidation systémique qui impliquent des régions cérébrales différentes au cours du temps. Il serait donc intéressant de tester si les agonistes NOP sont capables d'agir sur des mémoires anciennes.

La reconsolidation n'est pas seulement une cible pour traiter la mémoire aversive liée au PTSD mais peut aussi être ciblée dans le traitement d'autres types de mémoire maladaptées comme la mémoire liée à l'addiction. Récemment, agir sur la reconsolidation de la mémoire a représenté une piste thérapeutique pour traiter la mémoire pathologique liée à la toxicomanie (Rich et al. 2017, Stern et al. 2017). Les toxicomanes développent une réponse émotionnelle accrue aux signaux associés à la prise de la drogue, conduisant à des comportements compulsifs

de consommation de cette drogue (Koob et al. 2010). Au cours de notre étude nous avons montré un effet inhibiteur de l'agoniste NOP sur la reconsolidation de la mémoire dans le test d'objet déplacé. Ceci suggère que l'inhibition de la reconsolidation via ce système ne se limite pas aux mémoires aversives mais pourrait être utilisée pour atténuer les associations entre les drogues et les indices de l'environnement qui jouent un rôle crucial dans le phénomène de rechute (Lee et al. 2006, Guillem et al. 2017).

Ainsi, il serait intéressant de tester les agonistes des récepteurs NOP sur la reconsolidation de la mémoire dans le test de préférence de place (Marchand et al. 2006). Il s'agit d'associer l'injection d'une drogue comme la morphine ou la cocaïne à un compartiment particulier sur plusieurs sessions. Ensuite une séance de réactivation suivie d'une injection de l'agoniste serait réalisée. Le test de préférence serait effectué 24 h après la réactivation. Si l'agoniste bloquait la préférence pour le compartiment dans lequel l'animal a été conditionné ceci montrerait son effet amnésiant sur la mémoire associative liée à la prise de drogue. En cas de résultat positif il conviendrait alors de tester les agonistes NOP sur la reconsolidation de la mémoire pour les indices associés à la drogue dans le test d'auto-administration qui représente un modèle d'addiction plus complexe mais aussi plus valide que la préférence de place (Massaly et al. 2013).

Références bibliographiques :

-A-

Abdulla, F. A. and P. A. Smith (1998). "Axotomy reduces the effect of analgesic opioids yet increases the effect of nociceptin on dorsal root ganglion neurons." *J Neurosci* **18**(23): 9685-9694.

Agranoff, B. W. (1965). "Molecules and memories." *Perspect Biol Med* **9**(1): 13-22.

Akam, E. C., R. A. Challiss and S. R. Nahorski (2001). "G(q/11) and G(i/o) activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors: dependence on agonist as well as receptor-subtype." *Br J Pharmacol* **132**(4): 950-958.

Akiki, T. J., C. L. Averill and C. G. Abdallah (2017). "A Network-Based Neurobiological Model of PTSD: Evidence From Structural and Functional Neuroimaging Studies." *Curr Psychiatry Rep* **19**(11): 81.

Akiki, T. J., C. L. Averill, K. M. Wrocklage, B. Schweinsburg, J. C. Scott, B. Martini, L. A. Averill, S. M. Southwick, J. H. Krystal and C. G. Abdallah (2017). "The Association of PTSD Symptom Severity with Localized Hippocampus and Amygdala Abnormalities." *Chronic Stress (Thousand Oaks)* **1**.

Alberini, C. M. (2005). "Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes?" *Trends Neurosci* **28**(1): 51-56.

Albuquerque, E. X., E. F. R. Pereira, M. Alkondon and S. W. Rogers (2009). "Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function." *Physiological Reviews* **89**(1): 73-120.

Aleph Prieto, G. (2017). "Abnormalities of Dopamine D3 Receptor Signaling in the Diseased Brain." *J Cent Nerv Syst Dis* **9**: 1179573517726335.

Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." *Neuroscience* **31**(3): 571-591.

Amtul, Z. and R. Atta Ur (2015). "Neural plasticity and memory: molecular mechanism." *Rev Neurosci* **26**(3): 253-268.

An, B., J. Kim, K. Park, S. Lee, S. Song and S. Choi (2017). "Amount of fear extinction changes its underlying mechanisms." *Elife* **6**.

Anagnostaras, S. G., S. Maren and M. S. Fanselow (1999). "Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination." *J Neurosci* **19**(3): 1106-1114.

Andero, R., S. P. Brothers, T. Jovanovic, Y. T. Chen, H. Salah-Uddin, M. Cameron, T. D. Bannister, L. Almli, J. S. Stevens, B. Bradley, E. B. Binder, C. Wahlestedt and K. J. Ressler (2013). "Amygdala-Dependent Fear Is Regulated by Oprl1 in Mice and Humans with PTSD." *Science Translational Medicine* **5**(188).

Andreano, J. M. and L. Cahill (2006). "Glucocorticoid release and memory consolidation in men and women." *Psychological Science* **17**(6): 466-470.

Anwyl, R. (2006). "Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression." *Prog Neurobiol* **78**(1): 17-37.

Arcuri, L., R. Viaro, S. Bido, F. Longo, M. Calcagno, P. O. Fernagut, N. T. Zaveri, G. Calo, E. Bezard and M. Morari (2016). "Genetic and pharmacological evidence that endogenous nociceptin/orphanin FQ contributes to dopamine cell loss in Parkinson's disease." *Neurobiology of Disease* **89**: 55-64.

Arduin, M., B. Spagnolo, G. Calo, R. Guerrini, G. Carra, C. Fischetti, C. Trapella, E. Marzola, J. McDonald, D. G. Lambert, D. Regoli and S. Salvadori (2007). "Synthesis and biological activity of nociceptin/orphanin FQ analogues substituted in position 7 or 11 with C alpha,alpha-dialkylated amino acids." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**(13): 4434-4443.

Artinian, J., A. M. T. McGauran, X. De Jaeger, L. Mouldous, B. Frances and P. Rouillet (2008). "Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation." *European Journal of Neuroscience* **27**(11): 3009-3019.

Asth, L., N. Correia, B. Lobao-Soares, T. C. De Lima, R. Guerrini, G. Calo, V. P. Soares-Rachetti and E. C. Gavioli (2015). "Nociceptin/orphanin FQ induces simultaneously anxiolytic and amnesic effects in the mouse elevated T-maze task." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **388**(1): 33-41.

-B-

Baker, J. D. and J. L. Azorlosa (1996). "The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of pavlovian fear conditioning." *Behavioral Neuroscience* **110**(3): 618-620.

Baldi, E. and C. Bucherelli (2014). "Entorhinal cortex contribution to contextual fear conditioning extinction and reconsolidation in rats." *Neurobiol Learn Mem* **110**: 64-71.

Baldi, E. and C. Bucherelli (2015). "Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **53**: 160-190.

Bannerman, D. M., J. N. P. Rawlins, S. B. McHugh, R. M. J. Deacon, B. K. Yee, T. Bast, W. N. Zhang, H. H. J. Pothuizen and J. Feldon (2004). "Regional dissociations within the hippocampus - memory and anxiety." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **28**(3): 273-283.

Barnes, C. A. (1979). "Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat." *J Comp Physiol Psychol* **93**(1): 74-104.

Barnes, C. A. and B. L. Mcnaughton (1985). "An Age Comparison of the Rates of Acquisition and Forgetting of Spatial Information in Relation to Long-Term Enhancement of Hippocampal Synapses." *Behavioral Neuroscience* **99**(6): 1040-1048.

Barondes, S. H. and H. D. Cohen (1967). "Delayed and sustained effect of acetoxycycloheximide on memory in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(1): 157-164.

Barreto, G., T. T. Huang and R. G. Giffard (2010). "Age-related Defects in Sensorimotor Activity, Spatial Learning, and Memory in C57BL/6 Mice." *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* **22**(3): 214-219.

Barrett, D. and F. Gonzalez-Lima (2004). "Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction." *Neuroscience Letters* **371**(2-3): 91-96.

Bast, T., W. N. Zhang and J. Feldon (2001). "The ventral hippocampus and fear conditioning in rats - Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA(A) agonist muscimol." *Experimental Brain Research* **139**(1): 39-52.

Bedrosian, T. A., K. L. Herring, Z. M. Weil and R. J. Nelson (2011). "Altered temporal patterns of anxiety in aged and amyloid precursor protein (APP) transgenic mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(28): 11686-11691.

Beedle, A. M., J. E. McRory, O. Poirot, C. J. Doering, C. Altier, C. Barrere, J. Hamid, J. Nargeot, E. Bourinet and G. W. Zamponi (2004). "Agonist-independent

modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors." *Nat Neurosci* **7**(2): 118-125.

Beitel, R. E. and P. B. Porter (1968). "Deficits in retention and impairments in learning induced by severe hypothermia in mice." *J Comp Physiol Psychol* **66**(1): 53-59.

Ben Achour, S. and O. Pascual (2010). "Glia: the many ways to modulate synaptic plasticity." *Neurochem Int* **57**(4): 440-445.

Bernardi, R. E., K. M. Lattal and S. P. Berger (2006). "Postretrieval propranolol disrupts a cocaine conditioned place preference." *Neuroreport* **17**(13): 1443-1447.

Bernardi, R. E., A. E. Ryabinin, S. P. Berger and K. M. Lattal (2009). "Post-retrieval disruption of a cocaine conditioned place preference by systemic and intrabasolateral amygdala beta2- and alpha1-adrenergic antagonists." *Learn Mem* **16**(12): 777-789.

Besnard, A., J. Caboche and S. Laroche (2012). "Reconsolidation of memory: A decade of debate." *Progress in Neurobiology* **99**(1): 61-80.

Bevilaqua, L. R., J. I. Rossato, J. H. Clarke, J. H. Medina, I. Izquierdo and M. Cammarota (2007). "Inhibition of c-Jun N-terminal kinase in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks extinction of inhibitory avoidance memory." *Behav Pharmacol* **18**(5-6): 483-489.

Bezzina, C., L. Verret, C. Juan, J. Remaud, H. Halley, C. Rampon and L. Dahan (2015). "Early Onset of Hypersynchronous Network Activity and Expression of a Marker of Chronic Seizures in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Plos One* **10**(3).

Bianchetti, A. and M. Trabucchi (2001). "Clinical aspects of Alzheimer's disease." *Aging (Milano)* **13**(3): 221-230.

Bianchi, C., L. Marani, M. Barbieri, S. Marino, L. Beani and A. Siniscalchi (2004). "Effects of nociceptin/orphanin FQ and endomorphin-1 on glutamate and GABA release, intracellular [Ca²⁺] and cell excitability in primary cultures of rat cortical neurons." *Neuropharmacology* **47**(6): 873-883.

Bigoni, R., G. Calo, A. Rizzi, R. Guerrini, C. De Risi, Y. Hashimoto, E. Hashiba, D. G. Lambert and D. Regoli (2000). "In vitro characterization of J-113397, a non-peptide nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**(5): 565-568.

- Blake, M. G., M. C. Krawczyk, C. M. Baratti and M. M. Boccia (2014). "Neuropharmacology of memory consolidation and reconsolidation: Insights on central cholinergic mechanisms." *J Physiol Paris* **108**(4-6): 286-291.
- Blundell, J., C. A. Blaiss, D. C. Lagace, A. J. Eisch and C. M. Powell (2011). "Block of glucocorticoid synthesis during re-activation inhibits extinction of an established fear memory." *Neurobiol Learn Mem* **95**(4): 453-460.
- Bocchio, M., S. Nabavi and M. Capogna (2017). "Synaptic Plasticity, Engrams, and Network Oscillations in Amygdala Circuits for Storage and Retrieval of Emotional Memories." *Neuron* **94**(4): 731-743.
- Boccia, M. M., G. B. Acosta, M. G. Blake and C. M. Baratti (2004). "Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: Effects of ICV injections of hemicholinium-3." *Neuroscience* **124**(4): 735-741.
- Bongsebandhu-Phubhakdi, S. and T. Manabe (2007). "The neuropeptide nociceptin is a synaptically released endogenous inhibitor of hippocampal long-term potentiation." *Journal of Neuroscience* **27**(18): 4850-4858.
- Bonini, J. S., W. C. Da Silva, C. K. Da Silveira, C. A. Kohler, I. Izquierdo and M. Cammarota (2011). "Histamine facilitates consolidation of fear extinction." *Int J Neuropsychopharmacol* **14**(9): 1209-1217.
- Bontempi, B., C. Laurent-Demir, C. Destrade and R. Jaffard (1999). "Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage." *Nature* **400**(6745): 671-675.
- Borgesius, N. Z., M. C. de Waard, I. van der Pluijm, A. Omrani, G. C. M. Zondag, G. T. J. van der Horst, D. W. Melton, J. H. J. Hoeijmakers, D. Jaarsma and Y. Elgersma (2011). "Accelerated Age-Related Cognitive Decline and Neurodegeneration, Caused by Deficient DNA Repair." *Journal of Neuroscience* **31**(35): 12543-12553.
- Boric, K., P. Munoz, M. Gallagher and A. Kirkwood (2008). "Potential adaptive function for altered long-term potentiation mechanisms in aging hippocampus." *Journal of Neuroscience* **28**(32): 8034-8039.
- Bos, M. G. N., J. Schuijjer, F. Lodestijn, T. Beckers and M. Kindt (2014). "Stress enhances reconsolidation of declarative memory." *Psychoneuroendocrinology* **46**: 102-113.
- Bozon, B., S. Davis and S. Laroche (2003). "A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval." *Neuron* **40**(4): 695-701.

- Bramham, C. R. and E. Messaoudi (2005). "BDNF function in adult synaptic plasticity: The synaptic consolidation hypothesis." *Progress in Neurobiology* **76**(2): 99-125.
- Bramham, C. R., P. F. Worley, M. J. Moore and J. F. Guzowski (2008). "The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function." *J Neurosci* **28**(46): 11760-11767.
- Breslau, N., G. C. Davis, P. Andreski and E. Peterson (1991). "Traumatic Events and Posttraumatic-Stress-Disorder in an Urban-Population of Young-Adults." *Archives of General Psychiatry* **48**(3): 216-222.
- Brightwell, J. J., M. Gallagher and P. J. Colombo (2004). "Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments." *Neurobiology of Learning and Memory* **81**(1): 19-26.
- Bruel-Jungerman, E., S. Davis and S. Laroche (2007). "Brain plasticity mechanisms and memory: A party of four." *Neuroscientist* **13**(5): 492-505.
- Brunet, A., S. P. Orr, J. Tremblay, K. Robertson, K. Nader and R. K. Pitman (2008). "Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder." *J Psychiatr Res* **42**(6): 503-506.
- Brunet, A., E. Thomas, D. Saumier, A. R. Ashbaugh, A. Azzoug, R. K. Pitman, S. P. Orr and J. Tremblay (2014). "Trauma Reactivation Plus Propranolol Is Associated With Durably Low Physiological Responding During Subsequent Script-Driven Traumatic Imagery." *Canadian Journal of Psychiatry-Revue Canadienne De Psychiatrie* **59**(4): 228-232.
- Bures, J., A. A. Fenton, Y. Kaminsky and L. Zinyuk (1997). "Place cells and place navigation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(1): 343-350.
- Burgos-Robles, A., I. Vidal-Gonzalez, E. Santini and G. J. Quirk (2007). "Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex." *Neuron* **53**(6): 871-880.
- Butterfield, D. A. and C. B. Pocernich (2003). "The glutamatergic system and Alzheimer's disease - Therapeutic implications." *Cns Drugs* **17**(9): 641-652.
- Byford, A. J., A. Anderson, P. S. Jones, R. Palin and A. K. Houghton (2007). "The hypnotic, electroencephalographic, and antinociceptive properties of nonpeptide ORL1 receptor agonists after intravenous injection in rodents." *Anesthesia and Analgesia* **104**(1): 174-179.

-C-

Cahill, L., C. A. Pham and B. Setlow (2000). "Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade." *Neurobiol Learn Mem* **74**(3): 259-266.

Calabrese, V., G. Scapagnini, A. Ravagna, C. Colombrita, F. Spadaro, D. A. Butterfield and A. M. G. Stella (2004). "Increased expression of heat shock proteins in rat brain during aging: relationship with mitochondrial function and glutathione redox state." *Mechanisms of Ageing and Development* **125**(4): 325-335.

Calo', G., R. Guerrini, R. Bigoni, A. Rizzi, C. Bianchi, D. Regoli and S. Salvadori (1998). "Structure-activity study of the nociceptin(1-13)-NH₂ N-terminal tetrapeptide and discovery of a nociceptin receptor antagonist." *Journal of Medicinal Chemistry* **41**(18): 3360-3366.

Calo, G., R. Bigoni, A. Rizzi, R. Guerrini, S. Salvadori and D. Regoli (2000). "Nociceptin/orphanin FQ receptor ligands." *Peptides* **21**(7): 935-947.

Calo, G., R. Guerrini, R. Bigoni, A. Rizzi, G. Marzola, H. Okawa, C. Bianchi, D. G. Lambert, S. Salvadori and D. Regoli (2000). "Characterization of [Nphe(1)]nociceptin(1-13)NH₂, a new selective nociceptin receptor antagonist." *Br J Pharmacol* **129**(6): 1183-1193.

Calo, G., R. Guerrini, A. Rizzi, S. Salvadori, M. Burmeister, D. R. Kapusta, D. G. Lambert and D. Regoli (2005). "UFP-101, a peptide antagonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor." *CNS Drug Rev* **11**(2): 97-112.

Calo, G., A. Rizzi, R. Bigoni, R. Guerrini, S. Salvadori and D. Regoli (2002). "Pharmacological profile of nociceptin/orphanin FQ receptors." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**(3): 223-228.

Cannich, A., C. T. Wotjak, K. Kamprath, H. Hermann, B. Lutz and G. Marsicano (2004). "CB1 cannabinoid receptors modulate kinase and phosphatase activity during extinction of conditioned fear in mice." *Learn Mem* **11**(5): 625-632.

Cecom, J., H. Halley, S. Daumas and J. M. Lassalle (2014). "A specific role for hippocampal mossy fiber's zinc in rapid storage of emotional memories." *Learn Mem* **21**(5): 287-297.

Cenquizca, L. A. and L. W. Swanson (2007). "Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex." *Brain Research Reviews* **56**(1): 1-26.

Chang, S. (2005). "Modeling premature aging syndromes with the telomerase knockout mouse." *Curr Mol Med* **5**(2): 153-158.

Chee, M. J., C. J. Price, M. A. Statnick and W. F. Colmers (2011). "Nociceptin/orphanin FQ suppresses the excitability of neurons in the ventromedial nucleus of the hypothalamus." *Journal of Physiology-London* **589**(13): 3103-3114.

Chowdhury, S., J. D. Shepherd, H. Okuno, G. Lyford, R. S. Petralia, N. Plath, D. Kuhl, R. L. Huganir and P. F. Worley (2006). "Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking." *Neuron* **52**(3): 445-459.

Christoph, A., M. H. Eerdekens, M. Kok, G. Volkers and R. Freynhagen (2017). "Cebranopadol, a novel first-in-class analgesic drug candidate: first experience in patients with chronic low back pain in a randomized clinical trial." *Pain* **158**(9): 1813-1824.

Clopath, C. (2012). "Synaptic consolidation: an approach to long-term learning." *Cogn Neurodyn* **6**(3): 251-257.

Cohen, H., Z. Kaplan, O. Koresh, M. A. Matar, A. B. Geva and J. Zohar (2011). "Early post-stressor intervention with propranolol is ineffective in preventing posttraumatic stress responses in an animal model for PTSD." *European Neuropsychopharmacology* **21**(3): 230-240.

Cole, A. J., D. W. Saffen, J. M. Baraban and P. F. Worley (1989). "Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation." *Nature* **340**(6233): 474-476.

Collingridge, G. L., J. T. Isaac and Y. T. Wang (2004). "Receptor trafficking and synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* **5**(12): 952-962.

Connor, M., C. W. Vaughan, E. A. Jennings, R. G. Allen and M. J. Christie (1999). "Nociceptin, Phe(1)psi-nociceptin(1 - 13), nocistatin and prepronociceptin(154 - 181) effects on calcium channel currents and a potassium current in rat locus coeruleus in vitro." *Br J Pharmacol* **128**(8): 1779-1787.

-D-

D'Amelio, M., V. Cavallucci, S. Middei, C. Marchetti, S. Pacioni, A. Ferri, A. Diamantini, D. De Zio, P. Carrara, L. Battistini, S. Moreno, A. Bacci, M. Ammassari-Teule, H. Marie and F. Cecconi (2011). "Caspase-3 triggers early synaptic

dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nature Neuroscience* **14**(1): 69-U97.

Daftary, S. S., G. Calderon and M. Rios (2012). "Essential Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Regulation of Serotonin Transmission in the Basolateral Amygdala." *Neuroscience* **224**: 125-134.

Das, B., G. Modi and A. Dutta (2015). "Dopamine D3 agonists in the treatment of Parkinson's disease." *Curr Top Med Chem* **15**(10): 908-926.

Daumas, S., H. Halley, B. Frances and J. M. Lassalle (2005). "Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: Differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions." *Learning & Memory* **12**(4): 375-382.

Dautzenberg, F. M., J. Wichmann, J. Higelin, G. Py-Lang, C. Kratzeisen, P. Malherbe, G. J. Kilpatrick and F. Jenck (2001). "Pharmacological characterization of the novel nonpeptide orphanin FQ/nociceptin receptor agonist Ro 64-6198: Rapid and reversible desensitization of the ORL1 receptor in vitro and lack of tolerance in vivo." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **298**(2): 812-819.

Davis, S. E. and E. P. Bauer (2012). "L-type voltage-gated calcium channels in the basolateral amygdala are necessary for fear extinction." *J Neurosci* **32**(39): 13582-13586.

De Kloet, E. R., E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl and M. Joels (1998). "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease." *Endocr Rev* **19**(3): 269-301.

de la Fuente, V., R. Freudenthal and A. Romano (2011). "Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval." *J Neurosci* **31**(15): 5562-5573.

de Quervain, D., L. Schwabe and B. Roozendaal (2017). "Stress, glucocorticoids and memory: implications for treating fear-related disorders." *Nature Reviews Neuroscience* **18**(1): 7-19.

de Quervain, D. J., A. Aerni, G. Schelling and B. Roozendaal (2009). "Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease." *Front Neuroendocrinol* **30**(3): 358-370.

Debiec, J. and J. E. LeDoux (2006). "Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory - Treatment implications for PTSD." *Psychobiology of Posttraumatic Stress Disorder: A Decade of Progress* **1071**: 521-524.

Debiec, J., J. E. LeDoux and K. Nader (2002). "Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus." *Neuron* **36**(3): 527-538.

Deng, W., J. B. Aimone and F. H. Gage (2010). "New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?" *Nat Rev Neurosci* **11**(5): 339-350.

Desmedt, A., A. Marighetto and P. V. Piazza (2015). "Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder." *Biol Psychiatry* **78**(5): 290-297.

Desmedt, A., A. Marighetto and P. V. Piazza (2015). "Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder." *Biological Psychiatry* **78**(5): 290-297.

Diamond, D. M., M. C. Bennett, M. Fleshner and G. M. Rose (1992). "Inverted-U Relationship between the Level of Peripheral Corticosterone and the Magnitude of Hippocampal Primed Burst Potentiation." *Hippocampus* **2**(4): 421-430.

Diamond, D. M. and G. M. Rose (1994). "Stress Impairs Ltp and Hippocampal-Dependent Memory." *Brain Corticosteroid Receptors* **746**: 411-414.

Dineley, K. T., A. A. Pandya and J. L. Yakel (2015). "Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders." *Trends in Pharmacological Sciences* **36**(2): 96-108.

Do Monte, F. H., R. R. Souza, T. T. Wong and A. D. Carobrez (2013). "Systemic or intra-prelimbic cortex infusion of prazosin impairs fear memory reconsolidation." *Behavioural Brain Research* **244**: 137-141.

Dong, H. W., L. W. Swanson, L. Chen, M. S. Fanselow and A. W. Toga (2009). "Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(28): 11794-11799.

Doraiswamy, P. M. (2002). "Non-cholinergic strategies for treating and preventing Alzheimer's disease." *Cns Drugs* **16**(12): 811-824.

Drake, C. T. and T. A. Milner (2002). "Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations." *Hippocampus* **12**(2): 119-136.

Dudai, Y. (2004). "The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?" *Annu Rev Psychol* **55**: 51-86.

Duffy, A. M., J. Morales-Corraliza, K. M. Bermudez-Hernandez, M. J. Schaner, A. Magagna-Poveda, P. M. Mathews and H. E. Scharfman (2015). "Entorhinal cortical

defects in Tg2576 mice are present as early as 2-4 months of age." *Neurobiology of Aging* **36**(1): 134-148.

Duvarci, S., K. Nader and J. E. LeDoux (2005). "Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning." *Eur J Neurosci* **21**(1): 283-289.

Duvarci, S. and D. Pare (2014). "Amygdala microcircuits controlling learned fear." *Neuron* **82**(5): 966-980.

Duzzioni, M., F. S. Duarte, L. R. Leme, E. C. Gavioli and T. C. M. De Lima (2011). "Anxiolytic-like effect of central administration of NOP receptor antagonist UFP-101 in rats submitted to the elevated T-maze." *Behavioural Brain Research* **222**(1): 206-211.

-E-

Edelmann, E., V. Lessmann and T. Brigadski (2014). "Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity." *Neuropharmacology* **76 Pt C**: 610-627.

Ellis, J. R., K. A. Ellis, C. F. Bartholomeusz, B. J. Harrison, K. A. Wesnes, F. F. Erskine, L. Vitetta and P. J. Nathan (2006). "Muscarinic and nicotinic receptors synergistically modulate working memory and attention in humans." *International Journal of Neuropsychopharmacology* **9**(2): 175-189.

Epstein, C. J., G. M. Martin, A. L. Schultz and A. G. Motulsky (1966). "Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process." *Medicine (Baltimore)* **45**(3): 177-221.

Erickson, K. I., R. S. Prakash, M. W. Voss, L. Chaddock, S. Heo, M. McLaren, B. D. Pence, S. A. Martin, V. J. Vieira, J. A. Woods, E. McAuley and A. F. Kramer (2010). "Brain-Derived Neurotrophic Factor Is Associated with Age-Related Decline in Hippocampal Volume." *Journal of Neuroscience* **30**(15): 5368-5375.

-F-

Fan, M. M. Y. and L. A. Raymond (2007). "N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease." *Progress in Neurobiology* **81**(5-6): 272-293.

- Fanselow, M. S. and H. W. Dong (2010). "Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures?" *Neuron* **65**(1): 7-19.
- Fanselow, M. S. and A. M. Poulos (2005). "The neuroscience of mammalian associative learning." *Annu Rev Psychol* **56**: 207-234.
- Fantin, M., C. Fischetti, C. Trapella and M. Morari (2007). "Nocistatin inhibits 5-hydroxytryptamine release in the mouse neocortex via presynaptic G(i/o) protein linked pathways." *British Journal of Pharmacology* **152**(4): 549-555.
- Felix-Ortiz, A. C., A. Beyeler, C. Seo, C. A. Leppla, C. P. Wildes and K. M. Tye (2013). "BLA to vHPC Inputs Modulate Anxiety-Related Behaviors." *Neuron* **79**(4): 658-664.
- Fiorenza, N. G., J. Rosa, I. Izquierdo and J. C. Myskiw (2012). "Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas." *Behavioural Brain Research* **232**(1): 210-216.
- Fischer, A., M. Radulovic, C. Schrick, F. Sananbenesi, J. Godovac-Zimmermann and J. Radulovic (2007). "Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior." *Neurobiol Learn Mem* **87**(1): 149-158.
- Fischetti, C., V. Camarda, A. Rizzi, M. Pela, C. Trapella, R. Guerrini, J. McDonald, D. G. Lambert, S. Salvadori, D. Regoli and G. Calo (2009). "Pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor non peptide antagonist Compound 24." *European Journal of Pharmacology* **614**(1-3): 50-57.
- Florin, S., J. Meunier and J. Costentin (2000). "Autoradiographic localization of [3H]nociceptin binding sites in the rat brain." *Brain Res* **880**(1-2): 11-16.
- Fonseca, R., R. M. Vabulas, F. U. Hartl, T. Bonhoeffer and U. V. Nagerl (2006). "A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP." *Neuron* **52**(2): 239-245.
- Fornari, R. V., J. C. Soares, T. L. Ferreira, K. M. Moreira and M. G. Oliveira (2008). "Effects of nociceptin/orphanin FQ in the acquisition of contextual and tone fear conditioning in rats." *Behav Neurosci* **122**(1): 98-106.
- Foster, T. C. (1999). "Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline." *Brain Res Brain Res Rev* **30**(3): 236-249.
- Frankland, P. W. and B. Bontempi (2005). "The organization of recent and remote memories." *Nature Reviews Neuroscience* **6**(2): 119-130.

-G-

Gais, S. and J. Born (2004). "Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(7): 2140-2144.

Gallagher, M., B. S. Kapp, R. E. Musty and P. A. Driscoll (1977). "Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdala." *Science* **198**(4315): 423-425.

Gavioli, E. C. and G. Calo (2006). "Antidepressant- and anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**(5): 319-330.

Gavioli, E. C., C. W. Vaughan, G. Marzola, R. Guerrini, V. A. Mitchell, S. Zucchini, T. C. De Lima, G. A. Rae, S. Salvadori, D. Regoli and G. Calo (2004). "Antidepressant-like effects of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101: new evidence from rats and mice." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**(6): 547-553.

Gazarini, L., C. A. Stern, A. P. Carobrez and L. J. Bertoglio (2013). "Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting alpha1- and beta-adrenergic receptors." *Learn Mem* **20**(4): 210-219.

Geinisman, Y., L. Detoledomorrell and F. Morrell (1986). "Loss of Perforated Synapses in the Dentate Gyrus - Morphological Substrate of Memory Deficit in Aged Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**(9): 3027-3031.

Geldmacher, D. S. and P. J. Whitehouse (1996). "Evaluation of dementia." *N Engl J Med* **335**(5): 330-336.

Goeldner, C., D. Reiss, J. Wichmann, B. L. Kieffer and A. M. Ouagazzal (2009). "Activation of nociceptin opioid peptide (NOP) receptor impairs contextual fear learning in mice through glutamatergic mechanisms." *Neurobiology of Learning and Memory* **91**(4): 393-401.

Goeldner, C., D. Reiss, J. Wichmann, H. Meziane, B. L. Kieffer and A. M. Ouagazzal (2008). "Nociceptin receptor impairs recognition memory via interaction with NMDA receptor-dependent mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in the hippocampus." *J Neurosci* **28**(9): 2190-2198.

Goh, J. J. and D. Manahan-Vaughan (2013). "Spatial object recognition enables endogenous LTD that curtails LTP in the mouse hippocampus." *Cereb Cortex* **23**(5): 1118-1125.

Gooney, M. and M. A. Lynch (2001). "Long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus is accompanied by brain-derived neurotrophic factor-induced activation of TrkB." *J Neurochem* **77**(5): 1198-1207.

Goto, M., K. Tanimoto, Y. Horiuchi and T. Sasazuki (1981). "Family analysis of Werner's syndrome: a survey of 42 Japanese families with a review of the literature." *Clin Genet* **19**(1): 8-15.

Goto, Y., S. Arai-Otsuki, Y. Tachibana, D. Ichikawa, S. Ozaki, H. Takahashi, Y. Iwasawa, O. Okamoto, S. Okuda, H. Ohta and T. Sagara (2006). "Identification of a novel spiropiperidine opioid receptor-like 1 antagonist class by a focused library approach featuring 3D-pharmacophore similarity." *Journal of Medicinal Chemistry* **49**(3): 847-849.

Gottmann, K., T. Mittmann and V. Lessmann (2009). "BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses." *Exp Brain Res* **199**(3-4): 203-234.

Green, A., K. A. Ellis, J. Ellis, C. F. Bartholomeusz, S. Ilic, R. J. Croft, K. L. Phan and P. J. Nathan (2005). "Muscarinic and nicotinic receptor modulation of object and spatial n-back working memory in humans." *Pharmacol Biochem Behav* **81**(3): 575-584.

Guerrini, R., E. Marzola, C. Trapella, M. Pela', S. Molinari, M. C. Cerlesi, D. Malfacini, A. Rizzi, S. Salvadori and G. Calo' (2014). "A novel and facile synthesis of tetra branched derivatives of nociceptin/orphanin FQ." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **22**(14): 3703-3712.

Guillem, K. and S. H. Ahmed (2017). "Incubation of Accumbal Neuronal Reactivity to Cocaine Cues During Abstinence Predicts Individual Vulnerability to Relapse." *Neuropsychopharmacology*.

Guzowski, J. F., G. L. Lyford, G. D. Stevenson, F. P. Houston, J. L. McGaugh, P. F. Worley and C. A. Barnes (2000). "Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory." *J Neurosci* **20**(11): 3993-4001.

Guzowski, J. F., B. L. McNaughton, C. A. Barnes and P. F. Worley (1999). "Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles." *Nature Neuroscience* **2**(12): 1120-1124.

-H-

Haam, J. and J. L. Yakel (2017). "Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function." *J Neurochem* **142 Suppl 2**: 111-121.

Hall, J., K. L. Thomas and B. J. Everitt (2001). "Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala." *Eur J Neurosci* **13**(7): 1453-1458.

Hayes, J. P., S. Hayes, D. R. Miller, G. Lafleche, M. W. Logue and M. Verfaellie (2017). "Automated measurement of hippocampal subfields in PTSD: Evidence for smaller dentate gyrus volume." *J Psychiatr Res* **95**: 247-252.

Hellemans, K. G. C., B. J. Everitt and J. L. C. Lee (2006). "Disrupting reconsolidation of conditioned withdrawal memories in the basolateral amygdala reduces suppression of heroin seeking in rats." *Journal of Neuroscience* **26**(49): 12694-12699.

Hernandez, P. J., K. Sadeghian and A. E. Kelley (2002). "Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens." *Nature Neuroscience* **5**(12): 1327-1331.

Herry, C., P. Trifilieff, J. Micheau, A. Luthi and N. Mons (2006). "Extinction of auditory fear conditioning requires MAPK/ERK activation in the basolateral amygdala." *Eur J Neurosci* **24**(1): 261-269.

Higgins, G. A., A. J. Grottick, T. M. Ballard, J. G. Richards, J. Messer, H. Takeshima, M. Pauly-Evers, F. Jenck, G. Adam and J. Wichmann (2001). "Influence of the selective ORL1 receptor agonist, Ro64-6198, on rodent neurological function." *Neuropharmacology* **41**(1): 97-107.

Higgins, G. A., J. N. Kew, J. G. Richards, H. Takeshima, F. Jenck, G. Adam, J. Wichmann, J. A. Kemp and A. J. Grottick (2002). "A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory." *Eur J Neurosci* **15**(5): 911-922.

Hiramatsu, M. and K. Inoue (2000). "Improvement by low doses of nociceptin on scopolamine-induced impairment of learning and/or memory." *Eur J Pharmacol* **395**(2): 149-156.

Hiramatsu, M., M. Miwa, K. Hashimoto, S. Kawai and N. Nomura (2008). "Nociceptin/orphanin FQ reverses mecamylamine-induced learning and memory

impairment as well as decrease in hippocampal acetylcholine release in the rat." *Brain Research* **1195**: 96-103.

Hofman, A., W. A. Rocca, C. Brayne, M. M. Breteler, M. Clarke, B. Cooper, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, A. da Silva Droux, O. Hagnell and et al. (1991). "The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group." *Int J Epidemiol* **20**(3): 736-748.

Holloway, C. M. and C. K. McIntyre (2011). "Post-training disruption of Arc protein expression in the anterior cingulate cortex impairs long-term memory for inhibitory avoidance training." *Neurobiology of Learning and Memory* **95**(4): 425-432.

Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang and G. Cole (1996). "Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." *Science* **274**(5284): 99-102.

Hunsaker, M. R. and R. P. Kesner (2008). "Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear." *Neurobiology of Learning and Memory* **89**(1): 61-69.

-I-

Im, J. J., E. Namgung, Y. Choi, J. Y. Kim, S. J. Rhie and S. Yoon (2016). "Molecular Neuroimaging in Posttraumatic Stress Disorder." *Experimental Neurobiology* **25**(6): 277-295.

Izquierdo, I., J. H. Medina, L. A. Izquierdo, D. M. Barros, M. M. de Souza and T. Mello e Souza (1998). "Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain." *Neurobiol Learn Mem* **69**(3): 219-224.

-J-

Jacobs, B. L., H. van Praag and F. H. Gage (2000). "Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression." *Mol Psychiatry* **5**(3): 262-269.

Jacobsen, J. S., C. C. Wu, J. M. Redwine, T. A. Comery, R. Arias, M. Bowlby, R. Martone, J. H. Morrison, M. N. Pangalos, P. H. Reinhart and F. E. Bloom (2006). "Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(13): 5161-5166.

Jarome, T. J., C. T. Werner, J. L. Kwapis and F. J. Helmstetter (2011). "Activity Dependent Protein Degradation Is Critical for the Formation and Stability of Fear Memory in the Amygdala." *Plos One* **6**(9).

Jenck, F., J. Wichmann, F. M. Dautzenberg, J. L. Moreau, A. M. Ouagazzal, J. R. Martin, K. Lundstrom, A. M. Cesura, S. M. Poli, S. Roeber, S. Kolczewski, G. Adam and G. Kilpatrick (2000). "A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: Anxiolytic profile in the rat." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(9): 4938-4943.

Ji, J. and S. Maren (2007). "Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction." *Hippocampus* **17**(9): 749-758.

Jin, S. X., J. Arai, X. Tian, R. Kumar-Singh and L. A. Feig (2013). "Acquisition of contextual discrimination involves the appearance of a RAS-GRF1/p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase-mediated signaling pathway that promotes long term potentiation (LTP)." *J Biol Chem* **288**(30): 21703-21713.

Jin, X. C., Y. F. Lu, X. F. Yang, L. Ma and B. M. Li (2007). "Glucocorticoid receptors in the basolateral nucleus of amygdala are required for postreactivation reconsolidation of auditory fear memory." *European Journal of Neuroscience* **25**(12): 3702-3712.

Jorge, R. E. (2015). "Posttraumatic stress disorder." *Continuum (Minneapolis, Minn)* **21**(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry): 789-805.

Juarez, B. and M. H. Han (2016). "Diversity of Dopaminergic Neural Circuits in Response to Drug Exposure." *Neuropsychopharmacology* **41**(10): 2424-2446.

-K-

Kaczmarek, L. and A. Chaudhuri (1997). "Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity." *Brain Res Brain Res Rev* **23**(3): 237-256.

Kahne, T., A. Kolodziej, K. H. Smalla, E. Eisenschmidt, U. U. Haus, R. Weismantel, S. Kropf, W. Wetzel, F. W. Ohl, W. Tischmeyer, M. Naumann and E. D. Gundelfinger (2012). "Synaptic proteome changes in mouse brain regions upon auditory discrimination learning." *Proteomics* **12**(15-16): 2433-2444.

Kallupi, M., F. P. Varodayan, C. S. Oleata, D. Correia, G. Luu and M. Roberto (2014). "Nociceptin/orphanin FQ decreases glutamate transmission and blocks ethanol-induced effects in the central amygdala of naive and ethanol-dependent rats." *Neuropsychopharmacology* **39**(5): 1081-1092.

Karl, A., M. Schaefer, L. S. Malta, D. Dorfel, N. Rohleder and A. Werner (2006). "A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **30**(7): 1004-1031.

Kawahara, Y., M. B. Hesselink, G. van Scharrenburg and B. H. Westerink (2004). "Tonic inhibition by orphanin FQ/nociceptin of noradrenaline neurotransmission in the amygdala." *Eur J Pharmacol* **485**(1-3): 197-200.

Kawamoto, H., S. Ozaki, Y. Itoh, M. Miyaji, S. Arai, H. Nakashima, T. Kato, H. Ohta and Y. Iwasawa (1999). "Discovery of the first potent and selective small molecule opioid receptor-like (ORL1) antagonist: 1-[(3R,4R)-1-cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one (J-113397)." *Journal of Medicinal Chemistry* **42**(25): 5061-5063.

Kawarabayashi, T., L. H. Younkin, T. C. Saido, M. Shoji, K. H. Ashe and S. G. Younkin (2001). "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* **21**(2): 372-381.

Kawarabayashi, T., L. H. Younkin, T. C. Saido, M. Shoji, K. H. Ashe and S. G. Younkin (2001). "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid beta protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Journal of Neuroscience* **21**(2): 372-381.

Kelly, A., S. Laroche and S. Davis (2003). "Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory." *Journal of Neuroscience* **23**(12): 5354-5360.

Kemp, A. and D. Manahan-Vaughan (2007). "Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes?" *Trends in Neurosciences* **30**(3): 111-118.

Kemp, A., W. Tischmeyer and D. Manahan-Vaughan (2013). "Learning-facilitated long-term depression requires activation of the immediate early gene, c-fos, and is transcription dependent." *Behavioural Brain Research* **254**: 83-91.

Kempton, M. J., Z. Salvador, M. R. Munafo, J. R. Geddes, A. Simmons, S. Frangou and S. C. Williams (2011). "Structural neuroimaging studies in major depressive disorder. Meta-analysis and comparison with bipolar disorder." *Arch Gen Psychiatry* **68**(7): 675-690.

Kheirbek, M. A., K. C. Klemenhagen, A. Sahay and R. Hen (2012). "Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders." *Nat Neurosci* **15**(12): 1613-1620.

- Kida, S., S. A. Josselyn, S. Pena de Ortiz, J. H. Kogan, I. Chevere, S. Masushige and A. J. Silva (2002). "CREB required for the stability of new and reactivated fear memories." *Nat Neurosci* **5**(4): 348-355.
- Kiguchi, N., H. Ding and M. C. Ko (2016). "Central N/OFQ-NOP Receptor System in Pain Modulation." *Adv Pharmacol* **75**: 217-243.
- Kim, J. J., M. S. Fanselow, J. P. DeCola and J. Landeira-Fernandez (1992). "Selective impairment of long-term but not short-term conditional fear by the N-methyl-D-aspartate antagonist APV." *Behav Neurosci* **106**(4): 591-596.
- Kjelstrup, K. G., F. A. Tuvnes, H. A. Steffenach, R. Murison, E. I. Moser and M. B. Moser (2002). "Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10825-10830.
- Knapska, E. and L. Kaczmarek (2004). "A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK?" *Prog Neurobiol* **74**(4): 183-211.
- Knoflach, F., R. K. Reinscheid, O. Civelli and J. A. Kemp (1996). "Modulation of voltage-gated calcium channels by orphanin FQ in freshly dissociated hippocampal neurons." *J Neurosci* **16**(21): 6657-6664.
- Koch, W., S. Teipel, S. Mueller, K. Buerger, A. L. W. Bokde, H. Hampel, U. Coates, M. Reiser and T. Meindl (2010). "Effects of aging on default mode network activity in resting state fMRI: Does the method of analysis matter?" *Neuroimage* **51**(1): 280-287.
- Koob, G. F. and N. D. Volkow (2010). "Neurocircuitry of addiction." *Neuropsychopharmacology* **35**(1): 217-238.
- Kovacs, K. J. (1998). "c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map." *Neurochemistry International* **33**(4): 287-297.
- Kovacs, K. J. (2008). "Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond." *J Neuroendocrinol* **20**(6): 665-672.
- Kroes, M. C. W., I. Tendolkar, G. A. van Wingen, J. A. van Waarde, B. A. Strange and G. Fernandez (2014). "An electroconvulsive therapy procedure impairs reconsolidation of episodic memories in humans." *Nature Neuroscience* **17**(2): 204-206.
- Kroon, J. A. and A. P. Carobrez (2009). "Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine." *Neurobiol Learn Mem* **91**(1): 32-40.

Kukolja, J., C. M. Thiel and G. R. Fink (2009). "Cholinergic Stimulation Enhances Neural Activity Associated with Encoding but Reduces Neural Activity Associated with Retrieval in Humans." *Journal of Neuroscience* **29**(25): 8119-8128.

Kuzmin, A., N. Madjid, B. Johansson, L. Terenius and S. O. Ogren (2009). "The nociceptin system and hippocampal cognition in mice: a pharmacological and genetic analysis." *Brain Res* **1305 Suppl**: S7-19.

Kuzmin, A., J. Sandin, L. Terenius and S. O. Ogren (2004). "Evidence in locomotion test for the functional heterogeneity of ORL-1 receptors." *British Journal of Pharmacology* **141**(1): 132-140.

Kwapis, J. L., T. J. Jarome and F. J. Helmstetter (2014). "The role of the medial prefrontal cortex in trace fear extinction." *Learn Mem* **22**(1): 39-46.

Kyuhou, S. and H. Gemba (1999). "Injection of orphanin FQ/nociceptin into the periaqueductal gray suppresses the forebrain-elicited vocalization in the guinea pig." *Neurosci Lett* **260**(2): 113-116.

-L-

LaLumiere, R. T., J. L. McGaugh and C. K. McIntyre (2017). "Emotional Modulation of Learning and Memory: Pharmacological Implications." *Pharmacol Rev* **69**(3): 236-255.

Lang, P. J. and M. Davis (2006). "Emotion, motivation, and the brain: reflex foundations in animal and human research." *Prog Brain Res* **156**: 3-29.

Laurent, V., A. R. Marchand and R. F. Westbrook (2008). "The basolateral amygdala is necessary for learning but not relearning extinction of context conditioned fear." *Learning & Memory* **15**(5): 304-314.

Leal, S. L., S. K. Tighe and M. A. Yassa (2014). "Asymmetric effects of emotion on mnemonic interference." *Neurobiol Learn Mem* **111**: 41-48.

Lebel, M. (2001). "Werner syndrome: genetic and molecular basis of a premature aging disorder." *Cell Mol Life Sci* **58**(7): 857-867.

Lebel, M. and P. Leder (1998). "A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13097-13102.

- LeDoux, J. E. (1995). "Emotion: clues from the brain." *Annu Rev Psychol* **46**: 209-235.
- LeDoux, J. E. (2000). "Emotion circuits in the brain." *Annu Rev Neurosci* **23**: 155-184.
- Lee, H. and J. J. Kim (1998). "Amygdalar NMDA receptors are critical for new fear learning in previously fear-conditioned rats." *Journal of Neuroscience* **18**(20): 8444-8454.
- Lee, J. L., A. L. Milton and B. J. Everitt (2006). "Cue-induced cocaine seeking and relapse are reduced by disruption of drug memory reconsolidation." *J Neurosci* **26**(22): 5881-5887.
- Lee, J. L. C., P. Di Ciano, K. L. Thomas and B. J. Everitt (2005). "Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior." *Neuron* **47**(6): 795-801.
- Lee, J. L. C., B. J. Everitt and K. L. Thomas (2004). "Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation." *Science* **304**(5672): 839-843.
- Lee, J. L. C., K. Nader and D. Schiller (2017). "An Update on Memory Reconsolidation Updating." *Trends Cogn Sci* **21**(7): 531-545.
- Lemaire, P., C. Vesque, J. Schmitt, H. Stunnenberg, R. Frank and P. Charnay (1990). "The serum-inducible mouse gene *Krox-24* encodes a sequence-specific transcriptional activator." *Mol Cell Biol* **10**(7): 3456-3467.
- Lenard, L., T. Ollmann, K. Laszlo, A. Kovacs, R. Galosi, V. Kallai, T. Attila, E. Kertes, O. Zagoracz, Z. Karadi and L. Peczely (2017). "Role of D2 dopamine receptors of the ventral pallidum in inhibitory avoidance learning." *Behav Brain Res* **321**: 99-105.
- Lessmann, V., K. Gottmann and M. Malcangio (2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects." *Prog Neurobiol* **69**(5): 341-374.
- Leverenz, J. B., C. E. Yu and G. D. Schellenberg (1998). "Aging-associated neuropathology in Werner syndrome." *Acta Neuropathol* **96**(4): 421-424.
- Li, X. W., F. Pu, Y. B. Fan, H. J. Niu, S. Y. Li and D. Y. Li (2013). "Age-related changes in brain structural covariance networks." *Frontiers in Human Neuroscience* **7**.

Likhtik, E., D. Popa, J. Apergis-Schoute, G. A. Fidacaro and D. Pare (2008). "Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction." *Nature* **454**(7204): 642-645.

Lissek, S., B. Glaubitz, O. Gunturkun and M. Tegenthoff (2015). "Noradrenergic stimulation modulates activation of extinction-related brain regions and enhances contextual extinction learning without affecting renewal." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **9**.

Lonergan, M. H., L. A. Olivera-Figueroa, R. K. Pitman and A. Brunet (2013). "Propranolol's effects on the consolidation and reconsolidation of long-term emotional memory in healthy participants: a meta-analysis." *Journal of Psychiatry & Neuroscience* **38**(4): 222-231.

Lopez-Salon, M., M. Alonso, M. R. M. Vianna, H. Viola, T. M. E. Souza, I. Izquierdo, J. M. Pasquini and J. H. Medina (2001). "The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation." *European Journal of Neuroscience* **14**(11): 1820-1826.

Lopez de Armentia, M. and P. Sah (2004). "Firing properties and connectivity of neurons in the rat lateral central nucleus of the amygdala." *J Neurophysiol* **92**(3): 1285-1294.

Lorente de No R (1934). "Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system". *Journal of psychology of the Neurobiology*, 46, 113-117.

Lu, N., M. Han, Z. L. Yang, Y. Q. Wang, G. C. Wu and Y. Q. Zhang (2010). "Nociceptin/Orphanin FQ in PAG modulates the release of amino acids, serotonin and norepinephrine in the rostral ventromedial medulla and spinal cord in rats." *Pain* **148**(3): 414-425.

Lupica, C. R. (1995). "Delta and mu enkephalins inhibit spontaneous GABA-mediated IPSCs via a cyclic AMP-independent mechanism in the rat hippocampus." *J Neurosci* **15**(1 Pt 2): 737-749.

Lynch, M. A. (2004). "Long-term potentiation and memory." *Physiol Rev* **84**(1): 87-136.

-M-

Madeddu, P., M. B. Salis, A. F. Milia, C. Emanuelli, R. Guerrini, D. Regoli and G. Calo (1999). "Cardiovascular effects of nociceptin in unanesthetized mice." *Hypertension* **33**(3): 914-919.

Malaplate-Armand, C., C. Desbene, T. Pillot and J. L. Olivier (2009). "[Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease: current update and future directions]." *Rev Neurol (Paris)* **165**(6-7): 511-520.

Maletic, V., A. Eramo, K. Gwin, S. J. Offord and R. A. Duffy (2017). "The Role of Norepinephrine and Its alpha-Adrenergic Receptors in the Pathophysiology and Treatment of Major Depressive Disorder and Schizophrenia: A Systematic Review." *Front Psychiatry* **8**: 42.

Mallimo, E. M. and A. W. Kusnecov (2013). "The role of orphanin FQ/nociceptin in neuroplasticity: relationship to stress, anxiety and neuroinflammation." *Front Cell Neurosci* **7**: 173.

Mamiya, N., H. Fukushima, A. Suzuki, Z. Matsuyama, S. Homma, P. W. Frankland and S. Kida (2009). "Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory." *J Neurosci* **29**(2): 402-413.

Mamiya, T., Y. Noda, M. Nishi, H. Takeshima and T. Nabeshima (1998). "Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice." *Brain Res* **783**(2): 236-240.

Mamiya, T., Y. Noda, M. Nishi, H. Takeshima and T. Nabeshima (1999). "Nociceptin system plays a role in the memory retention: involvement of naloxone benzoylhydrazone binding sites." *Neuroreport* **10**(6): 1171-1175.

Mamiya, T., K. Yamada, Y. Miyamoto, N. Konig, Y. Watanabe, Y. Noda and T. Nabeshima (2003). "Neuronal mechanism of nociceptin-induced modulation of learning and memory: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors." *Mol Psychiatry* **8**(8): 752-765.

Manabe, T., Y. Noda, T. Mamiya, H. Katagiri, T. Houtani, M. Nishi, T. Noda, T. Takahashi, T. Sugimoto, T. Nabeshima and H. Takeshima (1998). "Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors." *Nature* **394**(6693): 577-581.

Marchand, S., A. Betourne, V. Marty, S. Daumas, H. Halley, J. M. Lassalle, J. M. Zajac and B. Frances (2006). "A neuropeptide FF agonist blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine in C57Bl/6J mice." *Peptides* **27**(5): 964-972.

Maren, S. (2001). "Neurobiology of Pavlovian fear conditioning." *Annu Rev Neurosci* **24**: 897-931.

Maren, S. (2005). "Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala." *Neuron* **47**(6): 783-786.

Maren, S. (2017). "Synapse-Specific Encoding of Fear Memory in the Amygdala." *Neuron* **95**(5): 988-990.

Maren, S. and W. G. Holt (2004). "Hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats: Muscimol infusions into the ventral, but not dorsal, hippocampus impair the acquisition of conditional freezing to an auditory conditional stimulus." *Behavioral Neuroscience* **118**(1): 97-110.

Marowsky, A., Y. Yanagawa, K. Obata and K. E. Vogt (2005). "A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function." *Neuron* **48**(6): 1025-1037.

Marti, M., F. Mela, M. Fantin, S. Zucchini, J. M. Brown, J. Witta, M. Di Benedetto, B. Buzas, R. K. Reinscheid, S. Salvadori, R. Guerrini, P. Romualdi, S. Candeletti, M. Simonato, B. M. Cox and M. Morari (2005). "Blockade of nociceptin/orphanin FQ transmission attenuates symptoms and neurodegeneration associated with Parkinson's disease." *Journal of Neuroscience* **25**(42): 9591-9601.

Marti, M., F. Mela, M. Fantin, S. Zucchini, J. M. Brown, J. Witta, M. Di Benedetto, B. Buzas, R. K. Reinscheid, S. Salvadori, R. Guerrini, P. Romualdi, S. Candeletti, M. Simonato, B. M. Cox and M. Morari (2005). "Blockade of nociceptin/orphanin FQ transmission attenuates symptoms and neurodegeneration associated with Parkinson's disease." *J Neurosci* **25**(42): 9591-9601.

Marti, M., R. Viaro, R. Guerrini, G. Franchi and M. Morari (2009). "Nociceptin/Orphanin FQ Modulates Motor Behavior and Primary Motor Cortex Output Through Receptors Located in Substantia Nigra Reticulata." *Neuropsychopharmacology* **34**(2): 341-355.

Mason, S. T. and S. D. Iversen (1975). "Learning in the absence of forebrain noradrenaline." *Nature* **258**(5534): 422-424.

Mason, S. T. and S. D. Iversen (1978). "Central and peripheral noradrenaline and resistance to extinction." *Physiol Behav* **20**(6): 681-686.

Massaly, N., L. Dahan, M. Baudonnat, C. Hovnanian, K. Rekik, M. Solinas, V. David, S. Pech, J. M. Zajac, P. Roulet, L. Mouldous and B. Frances (2013). "Involvement of protein degradation by the ubiquitin proteasome system in opiate addictive behaviors." *Neuropsychopharmacology* **38**(4): 596-604.

Massip, L., C. Garand, R. V. N. Turaga, F. Deschenes, E. Thorin and M. Lebel (2006). "Increased insulin, triglycerides, reactive oxygen species, and cardiac

fibrosis in mice with a mutation in the helicase domain of the Werner syndrome gene homologue." *Experimental Gerontology* **41**(2): 157-168.

McDonald, A. J. (1998). "Cortical pathways to the mammalian amygdala." *Prog Neurobiol* **55**(3): 257-332.

McDonald, A. J. (2003). "Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective." *Amygdala in Brain Function: Basic and Clinical Approaches* **985**: 1-21.

McEwen, B. S. and R. M. Sapolsky (1995). "Stress and cognitive function." *Curr Opin Neurobiol* **5**(2): 205-216.

McGaugh, J. L. (1966). "Time-dependent processes in memory storage." *Science* **153**(3742): 1351-1358.

McGaugh, J. L. (2000). "Memory--a century of consolidation." *Science* **287**(5451): 248-251.

Meis, S., T. Endres and V. Lessmann (2012). "Postsynaptic BDNF signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents." *Journal of Physiology-London* **590**(1): 193-208.

Meis, S. and H. C. Pape (2001). "Control of glutamate and GABA release by nociceptin/orphanin FQ in the rat lateral amygdala." *J Physiol* **532**(Pt 3): 701-712.

Merlo, E., R. Freudenthal, C. Maldonado and A. Romano (2005). "Activation of the transcription factor NF-kappa B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation." *Learning & Memory* **12**(1): 23-29.

Merlo, E., P. Ratano, E. C. Ilioi, M. A. Robbins, B. J. Everitt and A. L. Milton (2015). "Amygdala Dopamine Receptors Are Required for the Destabilization of a Reconsolidating Appetitive Memory(1,2)." *eNeuro* **2**(1).

Meunier, J. C., C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, J. L. Butour, J. C. Guillemot, P. Ferrara, B. Monsarrat and et al. (1995). "Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor." *Nature* **377**(6549): 532-535.

Meyer, L. C., C. E. Paisley, E. Mohamed, J. W. Bigbee, T. Kordula, H. Richard, K. Lufy and C. Sato-Bigbee (2017). "Novel role of the nociceptin system as a regulator of glutamate transporter expression in developing astrocytes." *Glia* **65**(12): 2003-2023.

Micheli, L., L. Di Cesare Mannelli, R. Guerrini, C. Trapella, M. Zanardelli, R. Ciccocioppo, A. Rizzi, C. Ghelardini and G. Calo (2015). "Acute and subchronic antinociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ receptor agonists infused by intrathecal route in rats." *Eur J Pharmacol* **754**: 73-81.

Miller, B. R. and R. Hen (2015). "The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety." *Curr Opin Neurobiol* **30**: 51-58.

Miller, C. A. and J. F. Marshall (2005). "Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory." *Neuron* **47**(6): 873-884.

Milton, A. L., J. L. C. Lee and B. J. Everitt (2008). "Reconsolidation of appetitive memories for both natural and drug reinforcement is dependent on beta-adrenergic receptors." *Learning & Memory* **15**(2): 88-92.

Minatohara, K., M. Akiyoshi and H. Okuno (2015). "Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace." *Front Mol Neurosci* **8**: 78.

Miwa, M., S. Uchida, F. Horiba, H. Takeshima, T. Nabeshima and M. Hiramatsu (2010). "Nociceptin and its metabolite attenuate U0126-induced memory impairment through a nociceptin opioid peptide (NOP) receptor-independent mechanism." *Neurobiology of Learning and Memory* **93**(3): 396-405.

Moga, D. E., M. E. Calhoun, A. Chowdhury, P. Worley, J. H. Morrison and M. L. Shapiro (2004). "Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses." *Neuroscience* **125**(1): 7-11.

Mogil, J. S. and G. W. Pasternak (2001). "The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family." *Pharmacol Rev* **53**(3): 381-415.

Mohammad, D., P. Chan, J. Bradley, K. Lanctot and N. Herrmann (2017). "Acetylcholinesterase inhibitors for treating dementia symptoms - a safety evaluation." *Expert Opin Drug Saf* **16**(9): 1009-1019.

Mohammed, A. K., B. Winblad, T. Ebendal and L. Larkfors (1990). "Environmental influence on behaviour and nerve growth factor in the brain." *Brain Res* **528**(1): 62-72.

Mohandas, E., V. Rajmohan and B. Raghunath (2009). "Neurobiology of Alzheimer's disease." *Indian J Psychiatry* **51**(1): 55-61.

Mollereau, C. and L. Mouldous (2000). "Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor." *Peptides* **21**(7): 907-917.

Mollereau, C., M. Parmentier, P. Mailleux, J. L. Butour, C. Moisand, P. Chalon, D. Caput, G. Vassart and J. C. Meunier (1994). "ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization." *FEBS Lett* **341**(1): 33-38.

Mollereau, C., M. J. Simons, P. Soularue, F. Liners, G. Vassart, J. C. Meunier and M. Parmentier (1996). "Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(16): 8666-8670.

Monti, B., C. Berteotti and A. Contestabile (2005). "Dysregulation of memory-related proteins in the hippocampus of aged rats and their relation with cognitive impairment." *Hippocampus* **15**(8): 1041-1049.

Mori, H., T. Tomiyama, N. Maeda, K. Ozawa and K. Wakasa (2003). "Lack of amyloid plaque formation in the central nervous system of a patient with Werner syndrome." *Neuropathology* **23**(1): 51-56.

Moser, E., M. B. Moser and P. Andersen (1993). "Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions." *J Neurosci* **13**(9): 3916-3925.

Moser, M. B. and E. I. Moser (1998). "Functional differentiation in the hippocampus." *Hippocampus* **8**(6): 608-619.

Moser, M. B., E. I. Moser, E. Forrest, P. Andersen and R. G. Morris (1995). "Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9697-9701.

Mouledous, L., B. Frances and J. M. Zajac (2010). "Modulation of basal and morphine-induced neuronal activity by a NPFF(2) selective agonist measured by c-Fos mapping of the mouse brain." *Synapse* **64**(9): 672-681.

Murali, S. S., I. A. Napier, B. K. Rycroft and M. J. Christie (2012). "Opioid-related (ORL1) receptors are enriched in a subpopulation of sensory neurons and prolonged activation produces no functional loss of surface N-type calcium channels." *Journal of Physiology-London* **590**(7): 1655-1667.

Muravieva, E. V. and C. M. Alberini (2010). "Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories." *Learn Mem* **17**(6): 306-313.

Murphy, N. P., H. T. Ly and N. T. Maidment (1996). "Intracerebroventricular orphanin FQ nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats." *Neuroscience* **75**(1): 1-4.

Murphy, N. P. and N. T. Maidment (1999). "Orphanin FQ nociceptin modulation of mesolimbic dopamine transmission determined by microdialysis." *Journal of Neurochemistry* **73**(1): 179-186.

Myers, C. E., B. R. Ermita, K. Harris, M. Hasselmo, P. Solomon and M. A. Gluck (1996). "A computational model of cholinergic disruption of septohippocampal activity in classical eyeblink conditioning." *Neurobiol Learn Mem* **66**(1): 51-66.

Myskiw, J. C., N. G. Fiorenza, L. A. Izquierdo and I. Izquierdo (2010). "Molecular mechanisms in hippocampus and basolateral amygdala but not in parietal or cingulate cortex are involved in extinction of one-trial avoidance learning." *Neurobiology of Learning and Memory* **94**(2): 285-291.

Myskiw, J. D., C. R. G. Furini, F. Benetti and I. Izquierdo (2014). "Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(12): 4572-4577.

-N-

Nader, K. (2003). "Memory traces unbound." *Trends Neurosci* **26**(2): 65-72.

Nader, K. and O. Hardt (2009). "A single standard for memory: the case for reconsolidation." *Nat Rev Neurosci* **10**(3): 224-234.

Nader, K., O. Hardt and R. Lanius (2013). "Memory as a new therapeutic target." *Dialogues Clin Neurosci* **15**(4): 475-486.

Nader, K., G. E. Schafe and J. E. Le Doux (2000). "Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval." *Nature* **406**(6797): 722-726.

Nakayama, D., H. Iwata, C. Teshirogi, Y. Ikegaya, N. Matsuki and H. Nomura (2015). "Long-delayed expression of the immediate early gene *Arc/Arg3.1* refines neuronal circuits to perpetuate fear memory." *J Neurosci* **35**(2): 819-830.

Nazzaro, C., M. Barbieri, K. Varani, L. Beani, R. J. Valentino and A. Siniscalchi (2010). "Swim stress enhances nociceptin/orphanin FQ-induced inhibition of rat dorsal raphe nucleus activity in vivo and in vitro: Role of corticotropin releasing factor." *Neuropharmacology* **58**(2): 457-464.

Ndountse, L. T. and H. M. Chan (2009). "Role of N-methyl-D-aspartate receptors in polychlorinated biphenyl mediated neurotoxicity." *Toxicology Letters* **184**(1): 50-55.

Newman, E. L., K. Gupta, J. R. Climer, C. K. Monaghan and M. E. Hasselmo (2012). "Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **6**.

Newman, L. A. and P. E. Gold (2016). "Attenuation in rats of impairments of memory by scopolamine, a muscarinic receptor antagonist, by mecamylamine, a nicotinic receptor antagonist." *Psychopharmacology (Berl)* **233**(5): 925-932.

Nicol, B., D. J. Rowbotham and D. G. Lambert (2002). "Nociceptin/orphanin FQ inhibits glutamate release from rat cerebellar and brain stem slices." *Neuroscience Letters* **326**(2): 85-88.

North, C. S., S. J. Nixon, S. Shariat, S. Mallonee, J. C. McMillen, E. L. Spitznagel and E. M. Smith (1999). "Psychiatric disorders among survivors of the Oklahoma City bombing." *Jama-Journal of the American Medical Association* **282**(8): 755-762.
Nyberg, L. (2017). "Neuroimaging in aging: brain maintenance." *F1000Res* **6**: 1215.

-O-

O'Dell, T. J., S. A. Connor, R. Guglietta and P. V. Nguyen (2015). "beta-Adrenergic receptor signaling and modulation of long-term potentiation in the mammalian hippocampus." *Learn Mem* **22**(9): 461-471.

O'Sullivan, M., D. K. Jones, P. E. Summers, R. G. Morris, S. C. R. Williams and H. S. Markus (2001). "Evidence for cortical "disconnection" as a mechanism of age-related cognitive decline." *Neurology* **57**(4): 632-638.

Olszewski, P. K. and A. S. Levine (2004). "Minireview: Characterization of influence of central nociceptin/orphanin FQ on consummatory behavior." *Endocrinology* **145**(6): 2627-2632.

Otis, J. M., C. T. Werner and D. Mueller (2015). "Noradrenergic regulation of fear and drug-associated memory reconsolidation." *Neuropsychopharmacology* **40**(4): 793-803.

Ouagazzal, A. M. (2015). "Nociceptin/orphanin-FQ modulation of learning and memory." *Vitam Horm* **97**: 323-345.

Ozaki, S., H. Kawamoto, Y. Itoh, M. Miyaji, T. Azuma, D. Ichikawa, H. Nambu, T. Iguchi, Y. Iwasawa and H. Ohta (2000). "In vitro and in vivo pharmacological characterization of J-113397, a potent and selective non-peptidyl ORL1 receptor antagonist." *European Journal of Pharmacology* **402**(1-2): 45-53.

-P-

- Pape, H. C. and D. Pare (2010). "Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear." *Physiol Rev* **90**(2): 419-463.
- Pare, D. (2003). "Role of the basolateral amygdala in memory consolidation." *Prog Neurobiol* **70**(5): 409-420.
- Pare, D., G. J. Quirk and J. E. Ledoux (2004). "New vistas on amygdala networks in conditioned fear." *J Neurophysiol* **92**(1): 1-9.
- Park, H. and M. M. Poo (2013). "Neurotrophin regulation of neural circuit development and function." *Nat Rev Neurosci* **14**(1): 7-23.
- Pavlidis, C., A. Kimura, A. M. Magarinos and B. S. Mcewen (1994). "Type-I Adrenal-Steroid Receptors Prolong Hippocampal Long-Term Potentiation." *Neuroreport* **5**(18): 2673-2677.
- Pavlidis, C., Y. Watanabe and B. S. Mcewen (1993). "Effects of Glucocorticoids on Hippocampal Long-Term Potentiation." *Hippocampus* **3**(2): 183-192.
- Paxinos, G., C. R. Watson and P. C. Emson (1980). "AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates." *J Neurosci Methods* **3**(2): 129-149.
- Paz Gavilan, M., J. Vela, A. Castano, B. Ramos, J. C. del Rio, J. Vitorica and D. Ruano (2006). "Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus." *Neurobiol Aging* **27**(7): 973-982.
- Peczely, L., T. Ollmann, K. Laszlo, A. Kovacs, R. Galosi, A. Szabo, Z. Karadi and L. Lenard (2014). "Effects of ventral pallidal D1 dopamine receptor activation on memory consolidation in morris water maze test." *Behav Brain Res* **274**: 211-218.
- Peebles, C. L., J. Yoo, M. T. Thwin, J. J. Palop, J. L. Noebels and S. Finkbeiner (2010). "Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(42): 18173-18178.
- Picciotto, M. R., M. J. Higley and Y. S. Mineur (2012). "Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior." *Neuron* **76**(1): 116-129.

Pitkanen, A., M. Pikkarainen, N. Nurminen and A. Ylinen (2000). "Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat - A review." *Parahippocampal Region* **911**: 369-391.

Pitkanen, A., V. Savander and J. E. LeDoux (1997). "Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala." *Trends Neurosci* **20**(11): 517-523.

Pitman, R. K., M. R. Milad, S. A. Igoe, M. G. Vangel, S. P. Orr, A. Tsareva, K. Gamache and K. Nader (2011). "Systemic Mifepristone Blocks Reconsolidation of Cue-Conditioned Fear; Propranolol Prevents This Effect." *Behavioral Neuroscience* **125**(4): 632-638.

Pitman, R. K., K. M. Sanders, R. M. Zusman, A. R. Healy, F. Cheema, N. B. Lasko, L. Cahill and S. P. Orr (2002). "Pilot study of secondary prevention of posttraumatic stress disorder with propranolol." *Biological Psychiatry* **51**(2): 189-192.

Platenik, J., N. Kuramoto and Y. Yoneda (2000). "Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals." *Life Sci* **67**(4): 335-364.

Plath, N., O. Ohana, B. Dammermann, M. L. Errington, D. Schmitz, C. Gross, X. Mao, A. Engelsberg, C. Mahlke, H. Welzl, U. Kobalz, A. Stawrakakis, E. Fernandez, R. Waltereit, A. Bick-Sander, E. Therstappen, S. F. Cooke, V. Blanquet, W. Wurst, B. Salmen, M. R. Bosl, H. P. Lipp, S. G. Grant, T. V. Bliss, D. P. Wolfner and D. Kuhl (2006). "Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories." *Neuron* **52**(3): 437-444.

Ploski, J. E., V. J. Pierre, J. Smucny, K. Park, M. S. Monsey, K. A. Overeem and G. E. Schafe (2008). "The Activity-Regulated Cytoskeletal-Associated Protein (Arc/Arg3.1) Is Required for Memory Consolidation of Pavlovian Fear Conditioning in the Lateral Amygdala." *Journal of Neuroscience* **28**(47): 12383-12395.

Popoli, M., Z. Yan, B. S. McEwen and G. Sanacora (2011). "The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission." *Nat Rev Neurosci* **13**(1): 22-37.

Porte, Y., M. C. Buhot and N. Mons (2008). "Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice." *Neurobiology of Aging* **29**(10): 1533-1546.

Post, A., T. S. Smart, J. Krikke-Workel, G. R. Dawson, C. J. Harmer, M. Browning, K. Jackson, R. Kakar, R. Mohs, M. Statnick, K. Wafford, A. McCarthy, V. Barth and J. M. Witkin (2016). "A Selective Nociceptin Receptor Antagonist to Treat Depression: Evidence from Preclinical and Clinical Studies." *Neuropsychopharmacology* **41**(7): 1803-1812.

Postiglione, A., A. Soricelli, E. M. Covelli, N. Iazzetta, A. Ruocco, G. Milan, L. Santoro, B. Alfano and A. Brunetti (1996). "Premature aging in Werner's syndrome spares the central nervous system." *Neurobiol Aging* **17**(3): 325-330.

Power, A. E., D. J. Berlau, J. L. McGaugh and O. Steward (2006). "Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: The role of re-exposure duration." *Learning & Memory* **13**(1): 27-34.

Przybylski, J., P. Roulet and S. J. Sara (1999). "Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: Role of beta adrenergic receptors." *Journal of Neuroscience* **19**(15): 6623-6628.

Pu, L., G. B. Bao, N. J. Xu, L. Ma and G. Pei (2002). "Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates." *Journal of Neuroscience* **22**(5): 1914-1921.

-Q-

Qi, S., Y. Mu, K. Liu, J. Zhang, Y. Huan, Q. Tan, M. Shi, Q. Wang, Y. Chen, H. Wang, H. Wang, N. Zhang, X. Zhang, L. Xiong and H. Yin (2013). "Cortical inhibition deficits in recent onset PTSD after a single prolonged trauma exposure." *Neuroimage Clin* **3**: 226-233.

Quirk, G. J. and D. Mueller (2008). "Neural mechanisms of extinction learning and retrieval." *Neuropsychopharmacology* **33**(1): 56-72.

-R-

Raz, N., U. Lindenberger, K. M. Rodrigue, K. M. Kennedy, D. Head, A. Williamson, C. Dahle, D. Gerstorf and J. D. Acker (2005). "Regional brain changes in aging healthy adults: General trends, individual differences and modifiers." *Cerebral Cortex* **15**(11): 1676-1689.

Redrobe, J. P., G. Calo, R. Guerrini, D. Regoli and R. Quirion (2000). "[Nphe(1)]-Nociceptin (1-13)-NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats." *Br J Pharmacol* **131**(7): 1379-1384.

Redrobe, J. P., G. Calo, D. Regoli and R. Quirion (2002). "Nociceptin receptor antagonists display antidepressant-like properties in the mouse forced swimming test." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **365**(2): 164-167.

Reinscheid, R. K., H. P. Nothacker, A. Bourson, A. Ardati, R. A. Henningsen, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, H. Langen, F. J. Monsma and O. Civelli (1995). "Orphanin-Fq - a Neuropeptide That Activates an Opioid-Like G-Protein-Coupled Receptor." *Science* **270**(5237): 792-794.

Reis, D. S., T. J. Jarome and F. J. Helmstetter (2013). "Memory formation for trace fear conditioning requires ubiquitin-proteasome mediated protein degradation in the prefrontal cortex." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **7**.

Reiss, D., E. P. Prinssen, J. Wichmann, B. L. Kieffer and A. M. Ouagazzal (2012). "The nociceptin orphanin FQ peptide receptor agonist, Ro64-6198, impairs recognition memory formation through interaction with glutamatergic but not cholinergic receptor antagonists." *Neurobiology of Learning and Memory* **98**(3): 254-260.

Reul, J. M. and E. R. de Kloet (1985). "Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation." *Endocrinology* **117**(6): 2505-2511.

Rich, M. T. and M. M. Torregrossa (2017). "Molecular and synaptic mechanisms regulating drug-associated memories: Towards a bidirectional treatment strategy." *Brain Res Bull.*

Rizzi, A., B. Spaynolo, R. D. Wainford, C. Fischetti, R. Guerrini, G. Marzola, A. Baldisserotto, S. Salvadori, D. Regoli, D. R. Kapusta and G. Calo (2007). "In vitro and in vivo studies on UFP-112, a novel potent and long lasting agonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor." *Peptides* **28**(6): 1240-1251.

Rodrigues, S. M., J. E. LeDoux and R. M. Sapolsky (2009). "The influence of stress hormones on fear circuitry." *Annu Rev Neurosci* **32**: 289-313.

Rodrigues, S. M., G. E. Schafe and J. E. LeDoux (2004). "Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala." *Neuron* **44**(1): 75-91.

Rogers, J. L. and R. P. Kesner (2003). "Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval." *Neurobiol Learn Mem* **80**(3): 332-342.

Romanski, L. M., M. C. Clugnet, F. Bordi and J. E. LeDoux (1993). "Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala." *Behav Neurosci* **107**(3): 444-450.

Roosendaal, B., R. Lengvilas, J. L. McGaugh, O. Civelli and R. K. Reinscheid (2007). "Orphanin FQ/nociceptin interacts with the basolateral amygdala noradrenergic system in memory consolidation." *Learn Mem* **14**(1-2): 29-35.

Roozendaal, B. and J. L. McGaugh (1997). "Glucocorticoid receptor agonist and antagonist administration into the basolateral but not central amygdala modulates memory storage." *Neurobiology of Learning and Memory* **67**(2): 176-179.

Rosenberg, T., S. Gal-Ben-Ari, D. C. Dieterich, M. R. Kreutz, N. E. Ziv, E. D. Gundelfinger and K. Rosenblum (2014). "The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation." *Front Mol Neurosci* **7**: 86.

Rutten, K., J. De Vry, W. Bruckmann and T. M. Tzschentke (2010). "Effects of the NOP receptor agonist Ro65-6570 on the acquisition of opiate- and psychostimulant-induced conditioned place preference in rats." *European Journal of Pharmacology* **645**(1-3): 119-126.

-S-

Sahay, A. and R. Hen (2007). "Adult hippocampal neurogenesis in depression." *Nat Neurosci* **10**(9): 1110-1115.

Salinska, E., R. C. Bourne and S. P. Rose (2004). "Reminder effects: the molecular cascade following a reminder in young chicks does not recapitulate that following training on a passive avoidance task." *Eur J Neurosci* **19**(11): 3042-3047.

Sanabria-Castro, A., I. Alvarado-Echeverria and C. Monge-Bonilla (2017). "Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update." *Annals of Neurosciences* **24**(1): 46-54.

Sandin, J., J. Georgieva, P. A. Schott, S. O. Ogren and L. Terenius (1997). "Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats." *European Journal of Neuroscience* **9**(1): 194-197.

Sandin, J., S. O. Ogren and L. Terenius (2004). "Nociceptin/orphanin FQ modulates spatial learning via ORL-1 receptors in the dorsal hippocampus of the rat." *Brain Res* **997**(2): 222-233.

Schaeffer, E. L. and W. F. Gattaz (2008). "Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A(2) enzyme." *Psychopharmacology* **198**(1): 1-27.

Schlicker, E. and M. Morari (2000). "Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system." *Peptides* **21**(7): 1023-1029.

Schwabe, L. and O. T. Wolf (2010). "Stress impairs the reconsolidation of autobiographical memories." *Neurobiology of Learning and Memory* **94**(2): 153-157.

- Segal, M., G. Richter-Levin and N. Maggio (2010). "Stress-Induced Dynamic Routing of Hippocampal Connectivity: A Hypothesis." *Hippocampus* **20**(12): 1332-1338.
- Serences, J. T. (2016). "Neural mechanisms of information storage in visual short-term memory." *Vision Res* **128**: 53-67.
- Shimamoto, A., K. Yokote and H. Tahara (2015). "Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming." *Front Genet* **6**: 10.
- Shin, L. M. and I. Liberzon (2010). "The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders." *Neuropsychopharmacology* **35**(1): 169-191.
- Shoblock, J. R. (2007). "The pharmacology of Ro 64-6198, a systemically active, nonpeptide NOP receptor (opiate receptor-like 1, ORL-1) agonist with diverse preclinical therapeutic activity." *CNS Drug Rev* **13**(1): 107-136.
- Sierra-Mercado, D., D. Dieguez and E. J. Barea-Rodriguez (2008). "Brief novelty exposure facilitates dentate gyrus LTP in aged rats." *Hippocampus* **18**(8): 835-843.
- Siniscalchi, A., D. Rodi, L. Beani and C. Bianchi (1999). "Inhibitory effect of nociceptin on [H-3]-5-HT release from rat cerebral cortex slices." *British Journal of Pharmacology* **128**(1): 119-123.
- Skeberdis, V. A., V. Chevalyere, C. G. Lau, J. H. Goldberg, D. L. Pettit, S. O. Suadicani, Y. Lin, M. V. Bennett, R. Yuste, P. E. Castillo and R. S. Zukin (2006). "Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors." *Nat Neurosci* **9**(4): 501-510.
- Skoog, I., L. Nilsson, B. Palmertz, L. A. Andreasson and A. Svanborg (1993). "A population-based study of dementia in 85-year-olds." *N Engl J Med* **328**(3): 153-158.
- Sol Fustinana, M., V. de la Fuente, N. Federman, R. Freudenthal and A. Romano (2014). "Protein degradation by ubiquitin-proteasome system in formation and labilization of contextual conditioning memory." *Learn Mem* **21**(9): 478-487.
- Sonntag, W. E., C. D. Lynch, S. A. Bennett, A. S. Khan, P. L. Thornton, P. T. Cooney, R. L. Ingram, T. McShane and J. K. Brunso-Bechtold (1999). "Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats." *Neuroscience* **88**(1): 269-279.

Sorensen, L., C. Igel, N. L. Hansen, M. Osler, M. Lauritzen, E. Rostrup, M. Nielsen, A. s. D. N. Initi and A. I. B. and (2016). "Early detection of Alzheimer's disease using MRI hippocampal texture." *Human Brain Mapping* **37**(3): 1148-1161.

Spagnolo, B., G. Carra, M. Fantin, C. Fischetti, C. Hebbes, J. McDonald, T. A. Barnes, A. Rizzi, C. Trapella, G. Fanton, M. Morari, D. G. Lambert, D. Regoli and G. Calo (2007). "Pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist SB-612111 [(-)-cis-1-methyl-7-[[4-(2,6-dichlorophenyl)piperidin-1-yl]methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ol]: In vitro studies." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **321**(3): 961-967.

Spampanato, J., J. Polepalli and P. Sah (2011). "Interneurons in the basolateral amygdala." *Neuropharmacology* **60**(5): 765-773.

Squier, T. C. (2001). "Oxidative stress and protein aggregation during biological aging." *Exp Gerontol* **36**(9): 1539-1550.

Squire, L. R. (1992). "Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory." *J Cogn Neurosci* **4**(3): 232-243.

Squire, L. R. (2004). "Memory systems of the brain: a brief history and current perspective." *Neurobiol Learn Mem* **82**(3): 171-177.

Squire, L. R. and A. J. Dede (2015). "Conscious and unconscious memory systems." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**(3): a021667.

Stepan, J., J. Dine and M. Eder (2015). "Functional optical probing of the hippocampal trisynaptic circuit in vitro: network dynamics, filter properties, and polysynaptic induction of CA1 LTP." *Front Neurosci* **9**: 160.

Stern, C. A. J., C. R. de Carvalho, L. J. Bertoglio and R. N. Takahashi (2017). "Effects of cannabinoid drugs on aversive or rewarding drug-associated memory extinction and reconsolidation." *Neuroscience*.

Stern, C. A. J., L. Gazarini, R. N. Takahashi, F. S. Guimaraes and L. J. Bertoglio (2012). "On Disruption of Fear Memory by Reconsolidation Blockade: Evidence from Cannabidiol Treatment." *Neuropsychopharmacology* **37**(9): 2132-2142.

Stern, S. A. and C. M. Alberini (2013). "Mechanisms of memory enhancement." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **5**(1): 37-53.

Steward, O., C. S. Wallace, G. L. Lyford and P. F. Worley (1998). "Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localise selectively near activated postsynaptic sites on dendrites." *Neuron* **21**(4): 741-751.

Strekalova, T., B. Zorner, C. Zacher, G. Sadvoska, T. Herdegen and P. Gass (2003). "Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus." *Genes Brain and Behavior* **2**(1): 3-10.

Sturchler-Pierrat, C., D. Abramowski, M. Duke, K. H. Wiederhold, C. Mistl, S. Rothacher, B. Ledermann, K. Burki, P. Frey, P. A. Paganetti, C. Waridel, M. E. Calhoun, M. Jucker, A. Probst, M. Staufenbiel and B. Sommer (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13287-13292.

Suzuki, A., S. A. Josselyn, P. W. Frankland, S. Masushige, A. J. Silva and S. Kida (2004). "Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures." *Journal of Neuroscience* **24**(20): 4787-4795.

Swanson, L. W. (1992). *Brain maps : structure of the rat brain*. Amsterdam ; New York, Elsevier.

Szabadi, E. (2013). "Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system." *J Psychopharmacol* **27**(8): 659-693.

Szapiro, G., M. R. Vianna, J. L. McGaugh, J. H. Medina and I. Izquierdo (2003). "The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear." *Hippocampus* **13**(1): 53-58.

-T-

Taubenfeld, S. M., J. S. Riceberg, A. S. New and C. M. Alberini (2009). "Preclinical Assessment for Selectively Disrupting a Traumatic Memory via Postretrieval Inhibition of Glucocorticoid Receptors." *Biological Psychiatry* **65**(3): 249-257.

Taverna, F. A., J. Georgiou, R. J. McDonald, N. S. Hong, A. Kraev, M. W. Salter, H. Takeshima, R. U. Muller and J. C. Roder (2005). "Defective place cell activity in nociceptin receptor knockout mice with elevated NMDA receptor-dependent long-term potentiation." *J Physiol* **565**(Pt 2): 579-591.

Terry, A. V. and J. J. Buccafusco (2003). "The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **306**(3): 821-827.

Toll, L., M. R. Bruchas, G. Calo, B. M. Cox and N. T. Zaveri (2016). "Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems." *Pharmacol Rev* **68**(2): 419-457.

Torkaman-Boutorabi, A., F. Danyali, S. Oryan, M. Ebrahimi-Ghiri and M. R. Zarrindast (2014). "Hippocampal alpha-adrenoceptors involve in the effect of histamine on spatial learning." *Physiol Behav* **129**: 17-24.

Torregrossa, M. M. and J. R. Taylor (2016). "Neuroscience of learning and memory for addiction medicine: from habit formation to memory reconsolidation." *Prog Brain Res* **223**: 91-113.

Tronel, S. and C. M. Alberini (2007). "Persistent disruption of a traumatic memory by postretrieval inactivation of glucocorticoid receptors in the amygdala." *Biological Psychiatry* **62**(1): 33-39.

Tronel, S. and S. J. Sara (2002). "Mapping of olfactory memory circuits: Region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval." *Learning & Memory* **9**(3): 105-111.

Tronson, N. C., C. Schrick, A. Fischer, F. Sananbenesi, G. Pages, J. Pouyssegur and J. Radulovic (2008). "Regulatory mechanisms of fear extinction and depression-like behavior." *Neuropsychopharmacology* **33**(7): 1570-1583.

Tronson, N. C. and J. R. Taylor (2007). "Molecular mechanisms of memory reconsolidation." *Nat Rev Neurosci* **8**(4): 262-275.

Tronson, N. C., S. L. Wiseman, P. Olausson and J. R. Taylor (2006). "Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A." *Nature Neuroscience* **9**(2): 167-169.

Tulving, E. (1983). *Elements of episodic memory*. Oxford Oxfordshire New York, Clarendon Press ; Oxford University Press.

Tulving, E. (2001). "Episodic memory and common sense: how far apart?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1413): 1505-1515.

Tulving, E. (2002). "Episodic memory: from mind to brain." *Annu Rev Psychol* **53**: 1-25.

Tyler, W. J., M. Alonso, C. R. Bramham and L. D. Pozzo-Miller (2002). "From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning." *Learn Mem* **9**(5): 224-237.

-U-

Uezu, K., A. Sano, H. Sei, K. Toida, T. Houtani, T. Sugimoto, T. Suzuki-Yamamoto, H. Takeshima, K. Ishimura and Y. Morita (2005). "Enhanced hippocampal

acetylcholine release in nociceptin-receptor knockout mice." *Brain Research* **1050**(1-2): 118-123.

-V-

Vaiva, G., F. Ducrocq, K. Jezequel, B. Averland, P. Lestavel, A. Brunet and C. R. Marmar (2003). "Immediate treatment with propranolol decreases posttraumatic stress disorder two months after trauma." *Biological Psychiatry* **54**(9): 947-949.

Valjent, E., A. G. Corbille, J. Bertran-Gonzalez, D. Herve and J. A. Girault (2006). "Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(8): 2932-2937.

VanGuilder, H. D., G. V. Bixler, R. M. Brucklacher, J. A. Farley, H. Yan, J. P. Warrington, W. E. Sonntag and W. M. Freeman (2011). "Concurrent hippocampal induction of MHC II pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment." *Journal of Neuroinflammation* **8**.

VanGuilder, H. D. and W. M. Freeman (2011). "The hippocampal neuroproteome with aging and cognitive decline: past progress and future directions." *Frontiers in Aging Neuroscience* **3**.

VanGuilder, H. D., H. Yan, J. A. Farley, W. E. Sonntag and W. M. Freeman (2010). "Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome." *J Neurochem* **113**(6): 1577-1588.

Varty, G. B., L. A. Hyde, R. A. Hodgson, S. X. Lu, M. F. McCool, T. M. Kazdoba, R. A. Del Vecchio, D. H. Guthrie, A. J. Pond, M. E. Grzelak, X. Xu, W. A. Korfmacher, D. Tulshian, E. M. Parker and G. A. Higgins (2005). "Characterization of the nociceptin receptor (ORL-1) agonist, Ro64-6198, in tests of anxiety across multiple species." *Psychopharmacology (Berl)* **182**(1): 132-143.

Vaughan, C. W. and M. J. Christie (1996). "Increase by the ORL1 receptor (opioid receptor-like1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones." *Br J Pharmacol* **117**(8): 1609-1611.

Vazquez-DeRose, J., G. Stauber, T. V. Khroyan, X. M. S. Xie, N. T. Zaveri and L. Toll (2013). "Retrodialysis of N/OFQ into the nucleus accumbens shell blocks cocaine-induced increases in extracellular dopamine and locomotor activity." *European Journal of Pharmacology* **699**(1-3): 200-206.

Verde, E. M. R., J. Lee-Osbourne, P. F. Worley, R. Malinow and H. T. Cline (2006). "Increased expression of the immediate-early gene Arc/Arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission." *Neuron* **52**(3): 461-474.

Verret, L., A. Krezymon, H. Halley, S. Trouche, M. Zerwas, M. Lazouret, J. M. Lassalle and C. Rampon (2013). "Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice." *Neurobiology of Aging* **34**(1): 211-225.

Viaro, R., R. Sanchez-Pemate, M. Marti, C. Trapella, O. Isacson and M. Morari (2008). "Nociceptin/orphanin FQ receptor blockade attenuates MPTP-induced parkinsonism." *Neurobiology of Disease* **30**(3): 430-438.

Villain, H., A. Benkahoul, A. Drougard, M. Lafragette, E. Muzotte, S. Pech, E. Bui, A. Brunet, P. Birmes and P. Rouillet (2016). "Effects of Propranolol, a beta-noradrenergic Antagonist, on Memory Consolidation and Reconsolidation in Mice." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **10**.

von Bohlen und Halbach, O. (2009). "Structure and function of dendritic spines within the hippocampus." *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* **191**(6): 518-531.

von Herten, L. S. and K. P. Giese (2005). "Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation." *J Neurosci* **25**(8): 1935-1942.

von Linstow Roloff, E., D. Harbaran, J. Micheau, B. Platt and G. Riedel (2007). "Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats." *Neuroscience* **146**(3): 875-889.

-W-

Wagner, J. J., L. R. Etemad and A. M. Thompson (2001). "Opioid-mediated facilitation of long-term depression in rat hippocampus." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **296**(3): 776-781.

Wallace, C. S., G. L. Lyford, P. F. Worley and O. Steward (1998). "Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence." *Journal of Neuroscience* **18**(1): 26-35.

Walton, H. S. and P. R. Dodd (2007). "Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease." *Neurochemistry International* **50**(7-8): 1052-1066.

Wang, H. and R. Y. Peng (2016). "Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity." *Mil Med Res* **3**(1): 26.

Wassum, K. M. and A. Izquierdo (2015). "The basolateral amygdala in reward learning and addiction." *Neurosci Biobehav Rev* **57**: 271-283.

Wei, W. Z. and C. W. Xie (1999). "Orphanin FQ suppresses NMDA receptor-dependent long-term depression and depotentiation in hippocampal dentate gyrus." *Learn Mem* **6**(5): 467-477.

Weiner, M. W., D. P. Veitch, P. S. Aisen, L. A. Beckett, N. J. Cairns, R. C. Green, D. Harvey, C. R. Jack, Jr., W. Jagust, J. C. Morris, R. C. Petersen, A. J. Saykin, L. M. Shaw, A. W. Toga, J. Q. Trojanowski and I. Alzheimer's Disease Neuroimaging (2017). "Recent publications from the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: Reviewing progress toward improved AD clinical trials." *Alzheimers Dement* **13**(4): e1-e85.

Werthwein, S., U. Bauer, M. Nakazi, M. Kathmann and E. Schlicker (1999). "Further characterization of the ORL1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain in vitro." *British Journal of Pharmacology* **127**(1): 300-308.

Wichmann, J., G. Adam, S. Rover, A. M. Cesura, F. M. Dautzenberg and F. Jenck (1999). "8-acenaphthen-1-yl-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one derivatives as orphanin FQ receptor agonists." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**(16): 2343-2348.

Wichmann, J., G. Adam, S. Rover, M. Hennig, M. Scalone, A. M. Cesura, F. M. Dautzenberg and F. Jenck (2000). "Synthesis of (1*S*,3*aS*)-8-(2,3,3*a*,4,5,6-hexahydro-1*H*-phenalen-1-yl)-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one, a potent and selective orphanin FQ (OFQ) receptor agonist with anxiolytic-like properties." *Eur J Med Chem* **35**(9): 839-851.

Wilson, M. A. and J. R. Fadel (2017). "Cholinergic regulation of fear learning and extinction." *Journal of Neuroscience Research* **95**(3): 836-852.

Wilson, R. S., Y. Li, J. L. Bienias and D. A. Bennett (2006). "Cognitive decline in old age: separating retest effects from the effects of growing older." *Psychol Aging* **21**(4): 774-789.

Wimmer, M. E., P. J. Hernandez, J. Blackwell and T. Abel (2012). "Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice." *Neurobiology of Aging* **33**(9): 2220-2224.

Wisden, W., M. L. Errington, S. Williams, S. B. Dunnett, C. Waters, D. Hitchcock, G. Evan, T. V. Bliss and S. P. Hunt (1990). "Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord." *Neuron* **4**(4): 603-614.

Wolf, O. T. (2009). "Stress and memory in humans: twelve years of progress?" *Brain Res* **1293**: 142-154.

Wood, N. E., M. L. Rosasco, A. M. Suris, J. D. Spring, M. F. Marin, N. B. Lasko, J. M. Goetz, A. M. Fischer, S. P. Orr and R. K. Pitman (2015). "Pharmacological blockade of memory reconsolidation in posttraumatic stress disorder: Three negative psychophysiological studies." *Psychiatry Research* **225**(1-2): 31-39.

Wouda, J. A., L. Diergaarde, D. Riga, Y. van Mourik, A. N. M. Schoffelmeer and T. J. De Vries (2010). "Disruption of long-term alcohol-related memory reconsolidation: role of beta-adrenoceptors and NMDA receptors." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **4**.

Wu, J., M. Ishikawa, J. Zhang and K. Hashimoto (2010). "Brain imaging of nicotinic receptors in Alzheimer's disease." *Int J Alzheimers Dis* **2010**: 548913.

Wu, J. T., H. Z. Wu, C. G. Yan, W. X. Chen, H. Y. Zhang, Y. He and H. S. Yang (2011). "Aging-related changes in the default mode network and its anti-correlated networks: A resting-state fMRI study." *Neuroscience Letters* **504**(1): 62-67.

-Y-

Yamada, S., T. Kusaka, A. Urayama, R. Kimura and Y. Watanabe (2003). "In vitro and ex vivo effects of a selective nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) peptide receptor antagonist, CompB, on specific binding of [3H]N/OFQ and [35S]GTPgammaS in rat brain and spinal cord." *Br J Pharmacol* **139**(8): 1462-1468.

Yan, Y., Y. Miyamoto, A. Nitta, S. Muramatsu, K. Ozawa, K. Yamada and T. Nabeshima (2013). "Intrastriatal gene delivery of GDNF persistently attenuates methamphetamine self-administration and relapse in mice." *Int J Neuropsychopharmacol* **16**(7): 1559-1567.

Yang, Y., K. Takeuchi, A. Rodenas-Ruano, Y. Takayasu, M. V. Bennett and R. S. Zukin (2009). "Developmental switch in requirement for PKA RIIbeta in NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses." *Neuropharmacology* **56**(1): 56-65.

Yasuda, H., A. L. Barth, D. Stellwagen and R. C. Malenka (2003). "A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction." *Nat Neurosci* **6**(1): 15-16.

Yin, Y., G. M. Edelman and P. W. Vanderklish (2002). "The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2368-2373.

Yoshii, A. and M. Constantine-Paton (2010). "Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease." *Dev Neurobiol* **70**(5): 304-322.

Yu, T. P. and C. W. Xie (1998). "Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms." *Journal of Neurophysiology* **80**(3): 1277-1284.

-Z-

Zhu, W. L., W. Wen, Y. He, A. H. Xia, K. J. Anstey and P. Sachdev (2012). "Changing topological patterns in normal aging using large-scale structural networks." *Neurobiology of Aging* **33**(5): 899-913.

Annexe

Involvement of Protein Degradation by the Ubiquitin Proteasome System in Opiate Addictive Behaviors

Nicolas Massaly^{1,2,3}, Lionel Dahan^{*1,2}, Mathieu Baudonnat⁴, Caroline Hovnanian^{1,2}, Khaoula Reikik^{1,2}, Marcello Solinas⁵, Vincent David⁴, Stéphane Pech^{1,2}, Jean-Marie Zajac^{1,3}, Pascal Roulet^{1,2}, Lionel Mouledous^{1,3,6} and Bernard Frances^{1,2,6}

¹Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse Cedex 9, France; ²Centre de Recherches sur la Cognition Animale, CNRS UMR 5169, Toulouse Cedex 9, France; ³Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS UMR 5089, Toulouse Cedex 4, France;

⁴Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS UMR 5287, Université de Bordeaux, Talence Cedex, France;

⁵Institut de Biologie et Physiologie Cellulaires, CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, Poitiers, France

Plastic changes in the nucleus accumbens (NAcc), a structure occupying a key position in the neural circuitry related to motivation, are among the critical cellular processes responsible for drug addiction. During the last decade, it has been shown that memory formation and related neuronal plasticity may rely not only on protein synthesis but also on protein degradation by the ubiquitin proteasome system (UPS). In this study, we assess the role of protein degradation in the NAcc in opiate-related behaviors. For this purpose, we coupled behavioral experiments to intra-accumbens injections of lactacystin, an inhibitor of the UPS. We show that protein degradation in the NAcc is mandatory for a full range of animal models of opiate addiction including morphine locomotor sensitization, morphine conditioned place preference, intra-ventral tegmental area morphine self-administration and intra-venous heroin self-administration but not for discrimination learning rewarded by highly palatable food. This study provides the first evidence of a specific role of protein degradation by the UPS in addiction.

Neuropsychopharmacology (2013) **38**, 596–604; doi:10.1038/npp.2012.217; published online 21 November 2012

Keywords: nucleus accumbens; proteasome; protein degradation; opiate; behavior; reinforcement

INTRODUCTION

Addiction is defined as a compulsive use of a substance despite negative consequences. The high reinforcing properties of drug of abuse lead to pathological usurpation of neural processes that normally serve reward-related learning (Conrad *et al*, 2008). In recent years, it was shown that the transition to addiction depends on plastic changes in the reward system (Conrad *et al*, 2008; Kasanetz *et al*, 2010; McClung and Nestler, 2008). These neuro-adaptations, such as synaptic plasticity and changes in neuronal morphology, share many similarities with mechanisms involved in long-term memory (Hyman *et al*, 2006; Kauer and Malenka, 2007; Kelley, 2004; Robbins *et al*, 2008).

In rodents, contextual memory involves a reorganization of hippocampal neuronal networks that requires protein synthesis (Alberini, 2005). Although it has attracted less attention than gene transcription and protein synthesis,

protein degradation by the ubiquitin proteasome system (UPS) is now believed to have a crucial role in synaptic plasticity and memory (Fioravante and Byrne, 2011). The UPS function is based on the enzymatic linkage of a chain of ubiquitins (poly-ubiquitination), which directs the protein to degradation in a large proteolytic complex called the proteasome (Hegde, 2010). UPS-dependent protein degradation in the hippocampus of rodents is necessary for synaptic plasticity (Dong *et al*, 2008; Fonseca *et al*, 2006; Karpova *et al*, 2006) and long-term memory consolidation and reconsolidation in spatial and contextual learning (Artinian *et al*, 2008; Kaang and Choi, 2011; Lee *et al*, 2008; Lopez-Salon *et al*, 2001).

UPS activity is also involved in cellular adaptations induced by long-term morphine treatments. We reported that cellular sensitization produced by morphine involves the degradation of G proteins by the UPS in neuroblastoma cells (Mouledous *et al*, 2005). The UPS has also been implicated in morphine-induced downregulation of the glutamate transporter EAAC1 (Yang *et al*, 2008a, 2008b). An important question is, therefore, whether the UPS is necessary for the reinforcing properties of drugs of abuse.

The nucleus accumbens (NAcc) is an important point of convergence in the reward circuitry (Robbins and Everitt, 1996) and has a major role in the reinforcing properties of

*Correspondence: Dr L Dahan, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université Paul Sabatier, UMR 5169, 118 route de Narbonne, Bat. 4R3, 31062 Toulouse Cedex 9, France, Tel: +33 05 61 55 62 76, Fax: +33 561 55 61 54, E-mail: lionel.dahan@univ-tlse3.fr

⁶These authors contributed equally to this work.

Received 4 July 2012; revised 24 September 2012; accepted 4 October 2012

drugs of abuse (Cardinal and Everitt, 2004). Pathological plasticity in the NAcc is thought to participate in the transition from recreational to compulsive drug use (Belin *et al*, 2009). The purpose of the present study was to evaluate the necessity of UPS in the NAcc for the development of opiate-induced behaviors in rodents. First, we investigated whether injection of morphine *in vivo* could induce poly-ubiquitination in the NAcc. Then, our strategy was to determine the effects of protein degradation blockade by using lactacystin, a proteasome inhibitor, on a wide range of behavioral paradigms commonly used to test morphine reinforcement: morphine conditioned place preference (morphine CPP), morphine-induced behavioral sensitization, and two operant paradigms, intra-ventral tegmental area (VTA) morphine self-administration in the Y-maze and free access intra-venous heroin self-administration. This strategy allowed us to provide compelling evidence for a role of protein degradation in the NAcc in opiate-related behaviors.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Three-month-old C57BL/6J male mice obtained from Charles River (l'Arbresle, France) were used in all experiments except for intra-venous self-administration of heroin, which was conducted on 10- to 12-week-old male Sprague-Dawley rats obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). They were subjected to a 12-h light-dark cycle, with lights on at 0800 h with food and water *ad libitum*. Animal surgery and experimentation are authorized by the French Direction of Veterinary Service to BF, J-MZ, LM, MS, PR, and VD and were approved by the French Animal Care and Use Committee (MP 02/02/02/06). Experiments were performed in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (NRC, 2003) and the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

Surgery

NAcc guide cannulae implantations were performed as described in Marchand *et al* (2006). Briefly, mice and rats were anesthetized with a mixture of Ketamine and Xylazine (respectively 100 and 15 mg/kg for mice and 60 and 10 mg/kg for rats) and placed in a stereotaxic apparatus. For mice, the guide cannulae (9 mm long, 0.3 mm in diameter) were lowered vertically at the following coordinates measured from bregma: A, +1.6, L, ± 1 , and V, -3 mm from skull. VTA guide cannulae implantation was performed during the intra-NAcc implantation procedure and was positioned 1.5 mm above the VTA under the following coordinates: 0.40 mm anterior to the interaural line, 0.30 mm lateral to the sagittal line, and 3.30 mm vertically below the surface of the skull as described in Baudonnat *et al* (2011). Rats were implanted with catheters in the right jugular vein (Chauvet *et al*, 2009) and bilateral guide cannulae (24GA; Plastic One, Roanoke, VA) aimed at the NAcc shell following coordinates measured from bregma: A, +1.8; L, ± 3.2 ; V, -6.6 mm from the skull, angle: 16°.

Drugs

Saline solution refers to 0.9% NaCl dissolved in sterile water. Lactacystin (Sigma) was dissolved in 2% DMSO, MG132 (ZLeu-Leu-Leu-al, Sigma) was dissolved in saline solution, both at a final concentration of 200 μ M. Morphine hydrochloride (10 mg/kg, i.p.) was obtained from Francopia (Gentilly, France). Heroin hydrochloride was obtained from Research Triangle Institute (Research Triangle Park, North Carolina) and dissolved in sterile water.

Intracerebral Infusion

At least 1 week after surgery, the injector tip was inserted into the guide cannula and protruded 1 mm for mice and 2 mm for rats. Proteasome inhibitor solutions were delivered in a volume of 0.5 μ l per side at a speed of 0.125 μ l/min (animals were single housed and freely moving during the injection).

Test of Proteasome Activity

Mice ($n = 8$) received an injection of lactacystin in one side of the NAcc and 2% DMSO in the other. NAcc was dissected out under binocular microscope from slices of 1 mm thickness obtained as described (Artinian *et al*, 2008) and homogenized in Tris 100 mM, pH 8. Protein concentrations were equilibrated and proteasome activity was measured as described in Artinian *et al* (2008).

Place Conditioning

Apparatus and pre-conditioning session were described in Marchand *et al* (2006). During conditioning, drug treatment (intra-peritoneal saline or morphine) and side presentation (black or white) were randomly assigned. Morphine and saline were given alternatively in the morning and in the afternoon during 3 days, half of the mice receiving morphine in the morning and the other half receiving morphine in the afternoon. One hour before receiving i.p. morphine, animals were pre-injected with either intra-NAcc proteasome inhibitors (lactacystin or MG132) or its vehicle (DMSO or saline, respectively). One hour before i.p. saline, mice received intra-NAcc vehicle. Ten minutes after the i.p. injection of morphine or saline, mice were confined to the associated compartment during 20 min. Twenty-four hours after the last conditioning session, post-conditioning test was performed in the same conditions as in the pre-conditioning test without habituation session (both test sessions lasted 20 min).

Behavioral Sensitization

Locomotor activity was measured in an apparatus composed of six Plexiglas boxes (25 \times 21.5 \times 9.5 cm) equipped with infrared beams to measure mice horizontal activity (Apelex, Evry, France). Mice were first exposed 10 min to the apparatus for habituation. Then, animals were injected i.p. with morphine solution (10 mg/kg) 10 min before being placed again in the box. On the following 4 days, the same procedure was repeated and bilateral injection in the NAcc with lactacystin or 2% DMSO took place 1 h before i.p.

treatment. On days 6 and 7, mice were left in their home cages without any treatment. On the eighth day, animals were challenged with an injection of morphine (10 mg/kg) and were placed in the box 10 min later. Two control groups with no injection in the NAcc were added: the first group (Saline Control) received saline injections during the induction protocol (days 1–5) and on day 8. The second one (Saline/Mor Control) received saline injections during the induction protocol and morphine on day 8. Locomotion was measured during 1 h. Comparison between morphine-induced locomotion on days 1 and day 8 was used to evidence behavioral sensitization.

Egocentric Y-maze Procedure

Egocentric Y-maze procedure rewarded by intra-VTA morphine injections was described in Baudonnat *et al* (2011). Mice were placed in a fixed starting box of the Y-Maze apparatus. By interrupting the photocell beam in one of the two target arms, mice could obtain a 5-mm² crisp (Vico) placed in a 10-mm diameter plastic cup or trigger an intra-VTA microinjection of morphine sulfate (50 ng) dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF 50 nl). The other arm was neutral. Mice were maintained for 30 s in the chosen arm. Intracranial injections were performed using an automatic computer-controlled apparatus and lasted 8 s. One hour before each daily session mice received intra-NAcc lactacystin or DMSO injections.

Heroin Self-Administration Procedure under Fixed-Ratio 1 Schedule in Rats

Behavioral testing was performed in Imetronic experimental chambers equipped with nose-pokes as operanda and controlled by Imetronic interfaces and software (Imetronic, Pessac, France). Fifteen 3 h self-administration sessions were conducted using a Fixed-Ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement after 10 days of recovery from surgery and were preceded by injections of lactacystin or 2% DMSO 1 h before each session. A single response in the active nose-poke hole immediately delivered an i.v. injection of heroin (or saline for control animals) and caused the house light to pulse for 5 s followed by a 5-s timeout. Duration of the injection varied between 1, 2, or 4 s to determine the dose of heroin injected (12.5, 25, and 50 µg, respectively). Responses in the inactive nose-poke hole were recorded but had no programmed consequences.

Histology

At the end of behavioral experiments, mice were killed by cervical dislocation and their brains removed for the histological verification of cannula placement as described in Artinian *et al* (2008). Rats were euthanized with an overdose of chloral hydrate. Brains were removed and placed in 4% formaldehyde for a day and stored in 18% sucrose PBS for 1–5 days until sectioning. Coronal sections (30 µm) were cut with a cryostat, mounted on gelatin-treated slides and examined with a light microscope. Animals with incorrect cannula placements were excluded from the analysis.

Western Blot Analysis

Mice were treated with morphine or saline and confined 20 min in a compartment of the CPP apparatus. Directly or 40 min after the end of the confinement, animals were euthanized and NAcc were dissected as described for proteasome activity test. All samples were flash frozen in liquid nitrogen and later homogenized in Tris 50 mM, EDTA 5 mM, Sucrose 320 mM, and a protease inhibitor cocktail (Roche, Neuilly-Sur-Seine, France). Bilateral NAcc structures from four mice were pooled in a single sample and crude synaptosomal fractions were prepared as described by Dunah and Standaert (2001). Western blot procedure was performed as described in Mouledous *et al* (2008) using ubiquitin monoclonal antibody (1/1000) (P4D1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) and actin antibody (1/5000) (Sigma). Ubiquitination levels above 55 kDa were quantified and normalized with actin using Quantity One Software (Bio-Rad, UK).

Immunohistochemistry of Activated Caspase 3

Mice were injected intra-NAcc twice daily with lactacystin or 2% DMSO as described for place preference conditioning. One hour after the last injection of proteasome inhibitor, animals were deeply anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital. Perfusion and immunohistochemistry were performed as described in Mouledous *et al* (2010) using anti-activated caspase-3 rabbit IgG (Ozyme, Saint-Quentin, France) at a concentration of 1/400 overnight and biotinylated secondary antibody (1/250; AB Cam, Paris, France). For each mouse, the lesion area inside the NAcc (lesion + immunopositive areas) was calculated from three slices adjacent to the injection site and expressed as a percentage of the total area of the NAcc.

Statistics

All results are presented as group means ± SEM. Differences between groups were assessed using appropriate *t*-test or ANOVA followed, when necessary, by a Bonferonni *post hoc* test. Tests were performed using GraphPad Prism or Statview software.

RESULTS

Morphine Exposure Increases Protein Poly-Ubiquitination in NAcc Synaptosomal Fractions

We first investigated whether the UPS was activated in the NAcc of mice treated with morphine. Mice were injected with morphine (10 mg/kg, i.p.) or saline and placed, 10 min after injection, into a compartment of the place preference apparatus for 20 min. Immediately after this session, or 40 min after replacing the mice in their home cages, NAcc was dissected. Considering growing evidence of a crucial role of proteasome activity in this cellular compartment, NAcc was processed to obtain crude synaptosomal fractions. The rate of poly-ubiquitination, reflecting the amount of proteins addressed to the proteasome for degradation, was measured by western blotting (Figure 1). Protein poly-ubiquitination in the synaptosomal fractions of the NAcc in

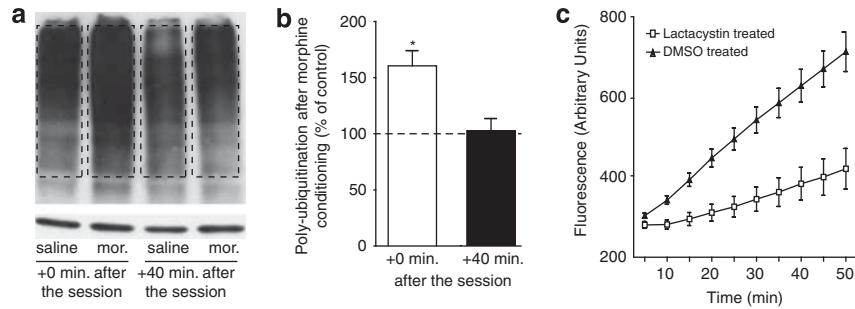


Figure 1 A single morphine conditioning increases synaptosomal poly-ubiquitination rate in the NAcc. (a, b) Mice were injected i.p. with 10 mg/kg morphine or saline and placed in the CPP apparatus, as in a conditioning session. Protein poly-ubiquitination was evaluated in NAcc synaptosomes isolated immediately or 40 min after the session. (a) Representative western blot. Upper panel: ubiquitin bands over 55 kDa (dotted lines) were compared; lower panel: actin. (b) Data quantification. Morphine-treated mice showed an increase in synaptic proteins poly-ubiquitination ($n = 4$) immediately, but not 40 min after the session ($n = 4$). Data are expressed as the mean \pm SEM of percent change in poly-ubiquitination compared with saline-treated mice. (c) Mice were injected in the NAcc with lactacystin (100 pmol) in one side and 2% DMSO in the other side. One hour later, NAcc proteasome activity was measured by the rate of degradation of the fluorogenic substrate Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4 methylcoumarin. A comparison between slopes of the linear part of the two curves reveals a significant inhibition of proteasome catalytic activity in lactacystin-injected NAcc ($n = 6$, Mann Whitney test, $p < 0.041$) of $59.28 \pm 17.01\%$. Data are expressed in counts of fluorescence (arbitrary unit) over time. * $p < 0.05$.

morphine-treated mice was increased immediately after the session ($160.6 \pm 13.54\%$ of control; $p < 0.021$) and returned to control level after 40 min ($102.6 \pm 11.07\%$ of control; $p > 0.832$), suggesting that ubiquitin-tagged proteins were degraded shortly after the session (Figure 1). Morphine exposure in a novel environment thus appears to induce a transient protein ubiquitination.

Injections of Lactacystin in Mice NAcc Are Effective Without Noticeable Toxicity

To test the role of UPS in the NAcc, we used local injections of the proteasome inhibitor lactacystin (Kisselev and Goldberg, 2001). To verify the efficacy of this treatment, we quantified the inhibition of UPS 1 h after intra-NAcc injections using a fluorogenic proteasome substrate. Injection of 100 pmol lactacystin reduced proteasome activity in *ex vivo* NAcc homogenates by $59.3 \pm 17.01\%$ ($p < 0.035$; Figure 1c). In addition, to test for toxicity induced by intra-NAcc injections, we measured activated caspase-3 activity in eight mice. Caspase 3 immunoreactivity was restricted to the vicinity of the injection site. Lactacystin and DMSO produced similar damage in the NAcc (lesion + caspase immunoreactivity = 14.7 ± 8.3 and $7.4 \pm 5.0\%$ of total NAcc area, respectively, for DMSO and lactacystin; $p > 0.48$; Supplementary Figure S1). This dose of lactacystin was thus considered as both effective and non-toxic, and was used to study the role of the UPS in behavioral procedures.

Development of Morphine CPP Is Prevented by UPS Inhibition in the NAcc

The rewarding effects of morphine were measured by morphine CPP (Tzschentke, 1998). During the pre-conditioning test, mice displayed no natural preference for a particular compartment. They were then conditioned for 3 consecutive days in a counterbalanced manner. Each day, mice were submitted to a morphine (10 mg/kg, i.p.) and a saline conditioning session preceded by intra-NAcc infusion of lactacystin or DMSO. To rule out any non-specific effect of lactacystin, we also used MG132 (or NaCl for control group), an UPS inhibitor with a different

mechanism of inhibition and a shorter duration of action (Kisselev *et al*, 2001). One day after conditioning, mice were allowed to explore the entire apparatus and time spent in the morphine-paired compartment was recorded. A two-way ANOVA revealed an effect of conditioning ($F_{1,51} = 36.9$, $p < 0.0001$) and an interaction between conditioning and intra-NAcc treatments ($F_{3,51} = 4.22$, $p < 0.01$). *Post hoc* analysis confirmed that mice treated intra-NAcc with DMSO or NaCl spent more time in the drug-associated compartment after conditioning than before (Figure 2d, DMSO: $p < 0.001$; NaCl: $p < 0.001$). In sharp contrast, mice treated with lactacystin or MG132 did not show any preference for the morphine-associated compartment (Figure 2d, lactacystin: $p > 0.05$; MG132: $p > 0.05$). DMSO and lactacystin injections alone did not produce any appetitive or aversive effect (pre-conditioning: DMSO-saline ($n = 7$), $49.98 \pm 1.19\%$ and lactacystin-saline ($n = 9$), $48.35 \pm 1.77\%$; post-conditioning: DMSO-saline, $54.00 \pm 4.27\%$ ($p > 0.05$) and lactacystin-saline, $47.62 \pm 3.73\%$ ($p > 0.05$)).

Because of its long lasting effects, lactacystin could have interfered with the expression of morphine CPP 24 h after the last intra-NAcc injection. We treated mice with a single intra-NAcc injection of lactacystin 1 h before the post-conditioning test (Figure 2f). Lactacystin-injected mice exhibited a preference for the drug-associated compartment ($p < 0.01$) demonstrating that protein degradation by the UPS is not necessary for CPP expression. Finally, we were also able to exclude a possible irreversible toxic effect of lactacystin by showing that intra-NAcc lactacystin injections performed once daily during 3 days before submitting mice to a conditioning process did not disrupt drug-induced place preference ($p < 0.01$; Figure 2h).

Taken together, these results demonstrate the involvement of protein degradation via the UPS in the NAcc in the establishment of morphine CPP but not in its expression.

Behavioral Sensitization Depends on UPS Activity in the NAcc

In mice, morphine induces an increase in locomotion, and repeated injections followed by a withdrawal period enhance this response (Contet *et al*, 2008). This effect,

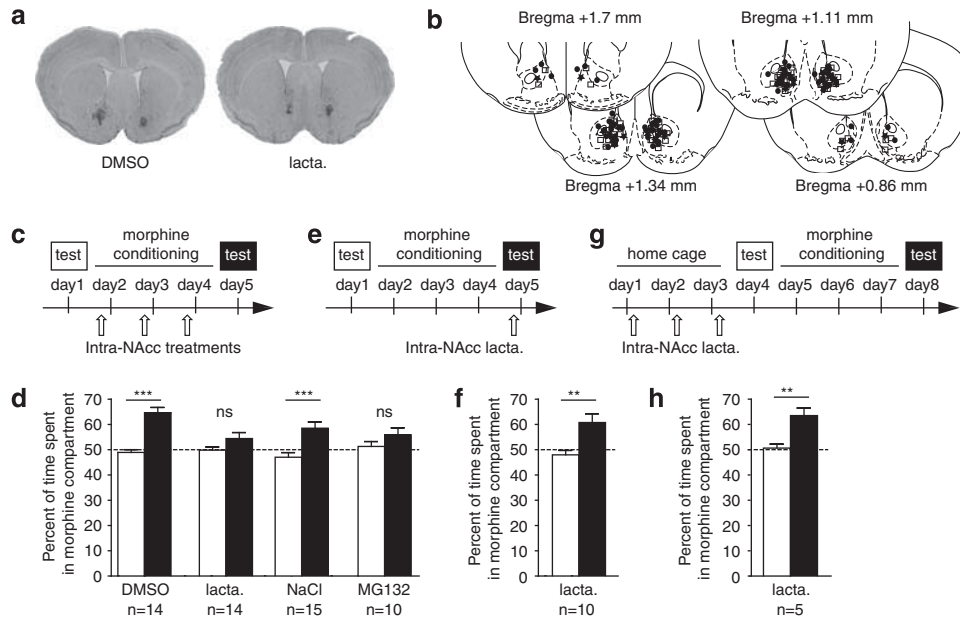


Figure 2 Development, but not expression, of morphine CPP is prevented by intra-NAcc injections of proteasome inhibitors. (a) Representative microphotographic view of injection sites in animals treated with DMSO (left) and lactacystin (right). (b) Schematic localization of injection sites of DMSO (squares), lactacystin (circles), and MG132 (stars) in coronal sections ranging from +1.7 to +0.86 mm from Bregma. (c, e, g) Schematic representations of procedures. (d, f, h) Pre-conditioning (empty bars) and post-conditioning (filled bars) test results. (c) Mice were injected with vehicle or proteasome inhibitors 1 h before each conditioning session. (d) Lactacystin- and MG132-injected mice ($n = 14$ and $n = 10$, respectively) did not develop any morphine place preference, whereas control animals (DMSO: $n = 14$ and NaCl: $n = 15$) showed a preference for the drug-paired side. (e) Lactacystin was injected 1 h before the post-conditioning test. (f) Proteasome inhibition did not affect the expression of morphine place preference on test day ($n = 10$). (g) Mice were injected during 3 days with lactacystin before a classical conditioning procedure. (h) Repeated intra-NAcc lactacystin injections did not alter the acquisition of a preference for the drug compartment ($n = 5$). All results are expressed as percentage of time spent in the drug-associated compartment \pm SEM during pre-conditioning tests (empty bars) and post-conditioning tests (filled bars). NS, $p > 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

called behavioral sensitization, depends on neuro-adaptations in the NAcc triggered by the exposure to the drug and developing during cessation of drug administration (Vanderschuren and Kalivas, 2000). To test the effects of intra-NAcc injections of lactacystin on locomotion induced by morphine exposure and on context-dependent behavioral sensitization paradigm, we used a sensitization protocol that consists of two phases: an induction phase, consisting of five daily injection of morphine (10 mg/kg, i.p.), and an expression test, consisting of the injection of the same dose of morphine after 3 days of withdrawal (Figure 3). During the induction protocol, morphine-treated mice exhibited a higher locomotion than saline-treated ones. A two-way ANOVA for repeated measures (days 1–5) shows an effect of i.p. treatment ($F_{1,148} = 35.43$, $p < 0.001$), a main effect of time ($F_{4,148} = 3.35$, $p = 0.0117$) and no interaction effect ($F_{4,148} = 0.36$, $p > 0.83$). *Post hoc* test did not show any difference between any pair of days ($p > 0.05$). Thus, mice did not exhibit sensitization during the induction phase. There was no difference between the two groups that received daily morphine injection (DMSO and lacta). A two-way ANOVA for repeated values reported no effect of intra-NAcc treatment ($F_{1,68} = 0.69$, $p = 0.4$), no effect of the test day ($F_{4,68} = 0.70$, $p > 0.59$), and no time \times intra-NAcc interaction ($F_{4,68} = 1.10$, $p > 0.37$). Thus, intra-NAcc injection of lactacystin did not impair the acute locomotor effect of morphine.

Comparing locomotion observed on day 1 and day 8 allows evaluating sensitization. A two-way ANOVA for

repeated measures reveals an effect of treatment ($F_{3,35} = 10.60$, $p < 0.0001$), an effect of day ($F_{1,35} = 14.40$, $p < 0.0006$), and a treatment \times day interaction ($F_{3,35} = 5.82$, $p < 0.0025$). *Post hoc* tests show a clear difference between day 1 and day 8 for the DMSO group ($p < 0.001$) and for the Saline/Mor control group injected with morphine for the first time on day 8 ($p < 0.01$), but not for the two other groups ($p > 0.44$ for the saline control and $p > 0.77$ for the lacta. group). At day 8, the locomotion of the lacta. group was significantly lower than the locomotion of the DMSO group ($p < 0.05$) but not different from the locomotion of mice that received their first morphine injection on day 8 ($p > 0.05$). Thus, protein degradation by the UPS in the NAcc is necessary for the development of behavioral sensitization.

Lactacystin Infusions into the NAcc Disrupt Intra-VTA Morphine Self-Administration

To test whether the UPS is involved in the dopamine-dependent reinforcing effects of morphine, we used intra-VTA morphine self-administration (David et al, 2002). Mice had to choose between two arms of the Y-maze, one only being rewarded. In a first group of mice, the reward consisted in intra-VTA morphine injection. In the control group, intra-VTA injection of morphine was replaced by aCSF. In a third group, the arm was rewarded by a small piece of crisps. For all groups, half of mice were infused with lactacystin and the other half was injected with DMSO

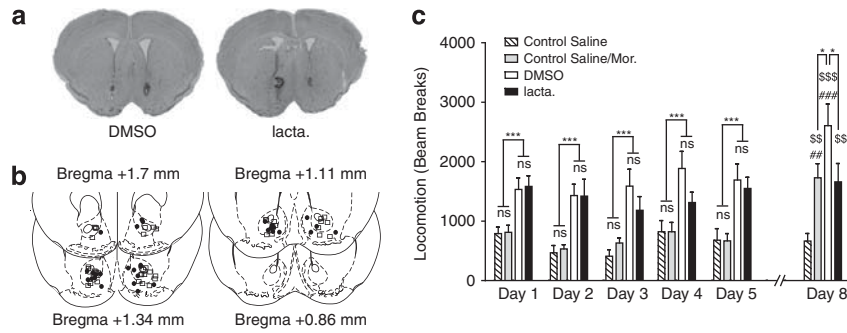


Figure 3 Behavioral sensitization depends on UPS functionality. Control Saline mice ($n = 11$) received daily i.p. saline injections during the induction protocol (days 1–5) and the sensitization test at day 8. Control Saline/Mor mice ($n = 9$) received daily i.p. saline injections during the induction protocol and one i.p. injection of morphine on day 8. Mice included in the lacta. and DMSO groups, respectively, received bilateral injections of lactacystin ($n = 8$) or DMSO ($n = 11$) in the NAcc 1 h before morphine exposure during the induction protocol and a morphine challenge on day 8. (a) Representative microphotographic view of injection sites in animals treated with DMSO (left) and lactacystin (right). (b) Schematic localization of injection sites of DMSO (squares) and lactacystin (circles) on coronal sections ranging from +1.7 to +0.86 mm from Bregma. (c) Morphine injection induces hyperlocomotion as compared with i.p. saline injection (two-way ANOVA: $p < 0.0001$ for treatment independently of the day). Lactacystin had no significant effect during the induction protocol ($p > 0.40$). DMSO-treated mice exhibited sensitization to morphine on day 8, whereas lactacystin-treated ones did not. Furthermore, lactacystin-treated animals show hyperlocomotion similar to the one observed after a first morphine exposure in the Control Saline/Mor group on day 8. Data are expressed as number of beam breaks \pm SEM measured during 1 h sessions following morphine injections (10 mg/kg). NS, $p > 0.05$, * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with day 1; \$\$ $p < 0.01$ and \$\$\$ $p < 0.001$ compared with the Saline Control group.

into the NAcc 1 h before each session. For each of the five daily sessions, performance was measured by the number of rewarded-arm choices over 10 trials. A three-way ANOVA with one repeated factor (session) revealed a main effect of reward ($F_{2,33} = 11.053$, $p < 0.002$), of session ($F_{4,132} = 11.278$, $p < 0.0001$), a reward \times session interaction ($F_{8,132} = 2.859$, $p < 0.006$), a treatment \times session interaction ($F_{4,132} = 2.89$, $p < 0.024$), and a reward \times treatment \times session interaction ($F_{8,132} = 2.034$, $p < 0.047$). *Post hoc* analyses showed that DMSO-treated animals receiving intra-VTA morphine injections increased their number of self-administrations ($p < 0.05$ in day 3, $p < 0.01$ in day 4, and $p < 0.001$ in day 5 as compared with the control aCSF group) (Figure 4c). Lactacystin-treated mice did not develop such a preference for the morphine-reinforced arm ($p > 0.61$). On the third, fourth, and fifth day, their number of self-injections was significantly different from DMSO-treated animals ($p < 0.05$, Figure 4c). Interestingly, lactacystin treatment did not impair the task acquisition when highly palatable food (crisps) was used as reward ($p > 0.57$, Figure 4d). Together, these results demonstrate the involvement of proteasome-dependent protein degradation in the NAcc in operant responding reinforced by intra-VTA morphine injections but not by highly palatable food.

Inhibition of Protein Degradation by the UPS in the NAcc Shell Impairs Heroin Self-Administration in Rats

Finally, we studied the impact of proteasome inhibition on opiate reinforcement in a self-administration procedure in which rats could freely obtain intra-venous heroin infusion during 3-h daily sessions. Rats were injected bilaterally in the NAcc shell with lactacystin 1 h before each self-administration session. Animals were allowed to self-administer three decreasing doses of heroin (50 μ g/inj, 25 μ g/inj, and 12.5 μ g/inj) to establish a dose–response curve, whereas control rats could self-administer only saline (Figure 5). At the dose of 50 μ g/inj, rates of self-administration did not differ from saline. When the dose was

decreased to 25 μ g/inj, both lactacystin and DMSO rats self-administered significantly more than saline control rats. One-way ANOVA revealed that intra-NAcc treatment induced modifications in self-administration response rate during the session ($F_{2,24} = 3.71$, $p < 0.05$). When the dose was finally lowered to 12.5 μ g/inj, DMSO-treated rats further increased the number of injections whereas lactacystin-treated rats did not. One-way ANOVA revealed that intra-NAcc treatment modified drug intake ($F_{2,23} = 8.08$, $p < 0.01$). Actually, the self-administration rate of lactacystin-treated rats did not differ from saline rats (Figure 5c). A dose–response curve was obtained by grouping data by heroin dose (Figure 5d). A two-way ANOVA for repeated values revealed an effect of dose ($F_{2,18} = 53.73$, $p < 0.0001$), treatment ($F_{1,18} = 9.486$, $p < 0.0001$), and an interaction between these two factors ($F_{2,18} = 12.49$, $p < 0.0001$). A Bonferroni *post hoc* test showed that, at the heroin dose of 12.5 μ g/inj, lactacystin-treated animals self-administered significant less opiate than controls ($p < 0.01$; Figure 5d). Therefore, administration of lactacystin produces a vertical downshift (Zernig et al, 2004) in the heroin dose–response curve, which is consistent with a role of protein degradation in the reinforcing effects of heroin.

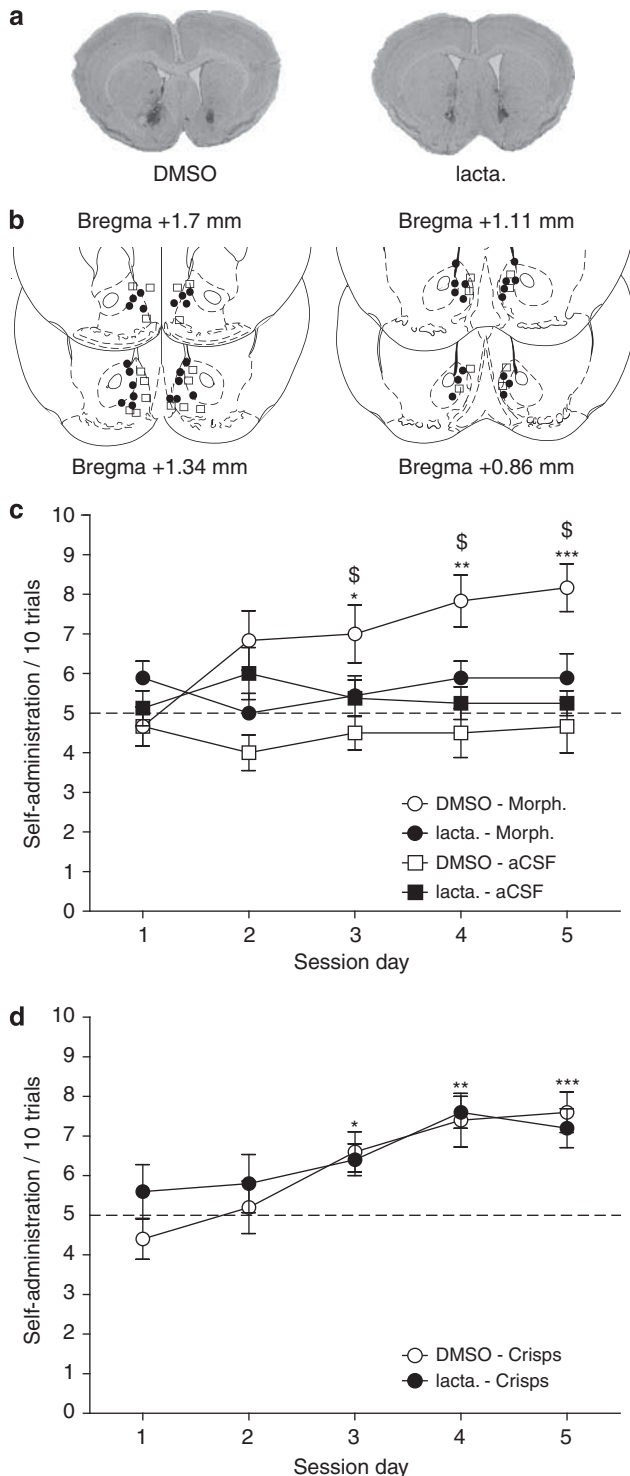
DISCUSSION

This study used several complementary models to evidence the role of protein degradation by the UPS in the reinforcing effects of opiates in rodents. We demonstrated that inhibition of protein degradation by UPS in the NAcc blocks the establishment of all behaviors tested in this study, involving either passive (place preference, behavioral sensitization) or active (self-administration) exposure to the drug.

Our lactacystin treatments did not appear to be toxic or to have an overall detrimental effect on mice behavior. Indeed, our data show that lactacystin injections do not affect choice latencies in the egocentric task of the Y-maze experiment and do not block CPP expression (*i.e.*, when

injected only before the test, Figure 2f) nor CPP acquisition when injected during 3 days before the beginning of the conditioning (Figure 2h). It also spares acute motor hyperactivity induced by morphine. Altogether, this suggests that the effects of lactacystin are unlikely to rely on a blockade of the acute, unconditioned, effects of morphine exposure.

An important aspect in the tests that we used to evaluate morphine-related behaviors is their context dependency.



In place preference and in the Y-maze experiments, mice have to associate drug exposure with a location using environmental cues. The behavioral sensitization paradigm we used is also known to depend on the context (Badiani and Robinson, 2004). It has been suggested that drugs of abuse lead to abnormally strong association between the context and the drug by potentiating glutamate-mediated inputs that provide contextual information to the NAcc (Girault *et al*, 2007; McClung *et al*, 2008). Here we show that, although UPS blockade does not impair acute effects of morphine, it blocks sensitization and place preference, which require long lasting plastic changes. Thus, our data strongly suggest a requirement for UPS-dependent protein degradation in drug-induced plasticity in the NAcc, which is necessary for the development of the conditioned effects of the drug.

Several lines of evidence support this conclusion. First, protein degradation has been shown to participate in synaptic plasticity in the hippocampus (Citri *et al*, 2009; Dong *et al*, 2008; Karpova *et al*, 2006; Sun and Wolf, 2009) and the processing of episodic-like memory requires, in that structure, the degradation of proteins associated with synaptic plasticity such as Shank, GKAP, and I κ B (Lee *et al*, 2008; Lopez-Salon *et al*, 2001). Second, UPS has previously been associated with synaptic plasticity in cultured NAcc neurons (Sun and Wolf, 2009). Furthermore, recent studies showed that behavioral sensitization (Pascoli *et al*, 2011) and drug craving rely on the potentiation of glutamate inputs to the NAcc (Conrad *et al*, 2008; Mameli *et al*, 2009) and that vulnerability to addiction is due to an impairment of NAcc long-term depression of these inputs (Kasanetz *et al*, 2010). In the light of these results and on the basis of our observations, we propose that exposure to drugs of abuse triggers, in the NAcc, the degradation of a specific set of proteins that is necessary for synaptic plasticity underlying the development of addiction. Several known direct or indirect targets of the UPS, such as synaptic anchoring proteins Shank and GKAP (Lee *et al*, 2008) or transcription factors CREB and deltaFosB (Carle *et al*, 2007; Dong *et al*, 2008), could be regulated by this process. Future work will help identifying the NAcc UPS targets whose degradation participates in the development of morphine-related behaviors described in this study.

Figure 4 Protein degradation by the UPS in the NAcc is involved in intra-VTA morphine self-administration. Mice received intra-NAcc injections of lactacystin or DMSO before each session of intra-VTA morphine or highly palatable food (crisps) self-administration in the Y-maze. (a) Representative microphotographic view of injection sites in animals treated with DMSO (left) and lactacystin (right). (b) Schematic localization of injection sites of DMSO (squares) and lactacystin (circles) in coronal sections ranging from +1.7 to +0.86 mm from Bregma. (c) Mice were exposed to intra-VTA morphine or aCSF self-administration. DMSO-treated animals (open circles, $n=6$) increased gradually their number of choice of the rewarded arm, whereas lactacystin animals did not (full circles, $n=9$). No preference was observed for the control group receiving aCSF into the VTA (squares, DMSO: $n=6$ and lactacystin: $n=8$). (d) Mice receiving either lactacystin ($n=6$) or DMSO ($n=6$) infusions into the NAcc developed a preference for the highly palatable food-rewarded arm. Data are presented as mean number of entries in the rewarded arm over 10 successive trials \pm SEM for each daily session. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for morphine vs aCSF or crisps vs chance (5 over 10 trials). § $p < 0.05$ for lactacystin vs vehicle (DMSO).

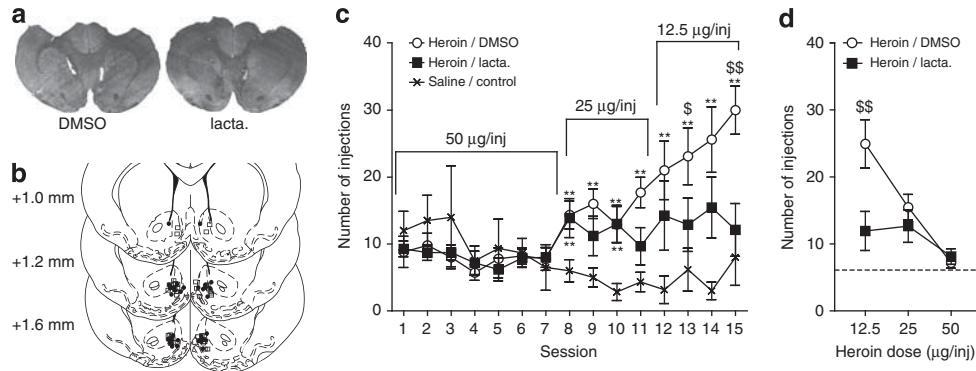


Figure 5 Protein degradation in the NAcc shell is necessary for the development of an adaptive addictive behavior to a decrease in reward delivery in self-administration paradigm. Rats were allowed to self-administer intra-venous heroin according to an FR1 schedule 1 h after intra-NAcc injections of lactacystin (heroin/lacta. group, $n = 9$) or vehicle (heroin/DMSO group, $n = 10$). Saline/control rats ($n = 6$) were allowed to self-administer saline under the same schedule. (a) Representative microphotographic view of injection sites in animals treated with DMSO (left) and lactacystin (right). (b) Schematic localization of injection sites of DMSO (squares) and lactacystin (circles) in coronal sections ranging from +1.6 to +1.0 mm from Bregma. (c) Number of injections during daily sessions indicates that heroin/DMSO rats developed adaptations to decreasing dose of heroin, whereas heroin/lacta.-treated animals did not. (d) Number of injections per session as a function of the dose of heroin. The dotted line indicates the average number of injection in the saline/control group. The heroin/DMSO group exhibits a strong increase in number of injections for the lower dose compared with the heroin/lacta. group. Data are presented as mean number of injections \pm SEM. $**p < 0.01$ different from saline control group, $^{\$}p < 0.05$ and $^{\$\$}p < 0.01$ compared with lactacystin-treated group.

Finally, one of the interesting results of the present study is the differential effect of lactacystin on food and morphine reinforcement. Using the same experimental conditions, we have recently reported that food-reinforced mice use a spatial learning strategy involving the hippocampus, whereas drug-reinforced subjects will use instead an associative, stimulus-response process depending on the striatum to learn the same task (Baudonnat *et al*, 2011). Therefore, although interfering with UPS activity within the NAcc is likely to decrease both food and drug reinforcing properties, this would disrupt learning more efficiently in drug-reinforced animals than in food-reinforced mice which rely on a more distributed circuit to learn the task.

In conclusion, this study constitutes the first demonstration of a behavioral role of protein degradation in the NAcc. This knowledge is crucial for the understanding of the molecular adaptations required for drug addiction. However, targeting proteasome activity in the brain by peripheral drug injections would probably be accompanied by too many detrimental effects (Chen *et al*, 2011). E3 ubiquitin ligases that allow the fixation of the ubiquitin chain on specific proteins and present a very large diversity in humans (Ande *et al*, 2009) could represent more selective pharmacological targets. The identification of these E3 ubiquitin ligases as well as their target proteins is thus warranted to fully exploit the potency of the UPS for the control of addiction-related behaviors.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Julien Familiades, Fanny Botreau, Ingrid Waldschmidt, and Claudia Chauvet for help in behavioral procedures (place preference, behavioral sensitization, and intra-venous self-administration); Claire Rampon and Magaly Alonso for help with the immunohistochemistry; Helene Halley for technical assistance and animal care; Jean-Pierre Changeux, Peter Redgrave, Nasser Haddjeri,

Manuel Mameli, and Fred Ambroggi for their useful comments on the manuscript.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Alberini CM (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28: 51–56.
- Ande SR, Chen J, Maddika S (2009). The ubiquitin pathway: an emerging drug target in cancer therapy. *Eur J Pharmacol* 625: 199–205.
- Artinian J, McGauran AM, De Jaeger X, Mouldous L, Frances B, Roulet P (2008). Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. *Eur J Neurosci* 27: 3009–3019.
- Badiani A, Robinson TE (2004). Drug-induced neurobehavioral plasticity: the role of environmental context. *Behav Pharmacol* 15: 327–339.
- Baudonnat M, Guillou JL, Husson M, Vandesquille M, Corio M, Decorte L *et al* (2011). Disrupting effect of drug-induced reward on spatial but not cue-guided learning: implication of the striatal protein kinase A/cAMP response element-binding protein pathway. *J Neurosci* 31: 16517–16528.
- Belin D, Jonkman S, Dickinson A, Robbins TW, Everitt BJ (2009). Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. *Behav Brain Res* 199: 89–102.
- Cardinal RN, Everitt BJ (2004). Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol* 14: 156–162.
- Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A *et al* (2007). Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: identification of FosB degraon domains and implications for DeltaFosB stability. *Eur J Neurosci* 25: 3009–3019.

- Chauvet C, Lardeux V, Goldberg SR, Jaber M, Solinas M (2009). Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. *Neuropsychopharmacology* 34: 2767–2778.
- Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Ping DQ (2011). Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 11: 239–253.
- Citri A, Soler-Llavina G, Bhattacharyya S, Malenka RC (2009). N-methyl-D-aspartate receptor- and metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression are differentially regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Eur J Neurosci* 30: 1443–1450.
- Conrad KL, Tseng KY, Uejima JL, Reimers JM, Heng LJ, Shaham Y et al (2008). Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature* 454: 118–121.
- Conte C, Filliol D, Matifas A, Kieffer BL (2008). Morphine-induced analgesic tolerance, locomotor sensitization and physical dependence do not require modification of mu opioid receptor, cdk5 and adenylate cyclase activity. *Neuropharmacology* 54: 475–486.
- David V, Durkin TP, Cazala P (2002). Differential effects of the dopamine D2/D3 receptor antagonist sulpiride on self-administration of morphine into the ventral tegmental area or the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 160: 307–317.
- Dong C, Upadhyaya SC, Ding L, Smith TK, Hegde AN (2008). Proteasome inhibition enhances the induction and impairs the maintenance of late-phase long-term potentiation. *Learn Mem* 15: 335–347.
- Dunah AW, Standaert DG (2001). Dopamine D1 receptor-dependent trafficking of striatal NMDA glutamate receptors to the postsynaptic membrane. *J Neurosci* 21: 5546–5558.
- Fioravante D, Byrne JH (2011). Protein degradation and memory formation. *Brain Res Bull* 85: 14–20.
- Fonseca R, Vabulas RM, Hartl FU, Bonhoeffer T, Nagerl UV (2006). A balance of protein synthesis and proteasome-dependent degradation determines the maintenance of LTP. *Neuron* 52: 239–245.
- Girault JA, Valjent E, Caboche J, Herve D (2007). ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7: 77–85.
- Hegde AN (2010). The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learn Mem* 17: 314–327.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29: 565–598.
- Kaang BK, Choi JH (2011). Protein degradation during reconsolidation as a mechanism for memory reorganization. *Front Behav Neurosci* 5: 2.
- Karpova A, Mikhaylova M, Thomas U, Knopfel T, Behnisch T (2006). Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *J Neurosci* 26: 4949–4955.
- Kasanetz F, Deroche-Gamonet V, Berson N, Balado E, Lafourcade M, Manzoni O et al (2010). Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. *Science* 328: 1709–1712.
- Kauer JA, Malenka RC (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8: 844–858.
- Kelley AE (2004). Memory and addiction; shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron* 44: 161–179.
- Kisselev AF, Goldberg AL (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8: 739–758.
- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK et al (2008). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science* 319: 1253–1256.
- Lopez-Salon M, Alonso M, Vianna MR, Viola H, Mello e Souza T, Izquierdo I et al (2001). The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. *Eur J Neurosci* 14: 1820–1826.
- Mameli M, Halbout B, Creton C, Engblom D, Parkitna JR, Spanagel R et al (2009). Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nat Neurosci* 12: 1036–1041.
- Marchand S, Betourne A, Marty V, Daumas S, Halley H, Lassalle JM et al (2006). A neuropeptide FF agonist blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine in C57Bl/6j mice. *Peptides* 27: 964–972.
- McClung CA, Nestler EJ (2008). Neuroplasticity mediated by altered gene expression. *Neuropsychopharmacology* 33: 3–17.
- Mouldous L, Neasta J, Uttenweiler-Joseph S, Stella A, Matondo M, Corbani M et al (2005). Long-term morphine treatment enhances proteasome-dependent degradation of G beta in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: correlation with onset of adenylate cyclase sensitization. *Mol Pharmacol* 68: 467–476.
- Mouldous L, Frances B, Zajac JM (2010). Modulation of basal and morphine-induced neuronal activity by a NPPF(2) selective agonist measured by c-Fos mapping of the mouse brain. *Synapse* 64: 672–681.
- Mouldous L, Merker S, Neasta J, Roux B, Zajac JM, Mollereau C (2008). Neuropeptide FF-sensitive confinement of mu opioid receptor does not involve lipid rafts in SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 80–84.
- Pascoli V, Turiault M, Lüscher C (2011). Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481: 71–75.
- Robbins TW, Ersche KD, Everitt BJ (2008). Drug addiction and the memory systems of the brain. *Ann NY Acad Sci* 1141: 1–21.
- Robbins TW, Everitt BJ (1996). Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6: 228–236.
- Sun X, Wolf ME (2009). Nucleus accumbens neurons exhibit synaptic scaling that is occluded by repeated dopamine pre-exposure. *Eur J Neurosci* 30: 539–550.
- Tzschentke TM (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* 56: 613–672.
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology* 151: 99–120.
- Yang L, Wang S, Lim G, Sung B, Zeng Q, Mao J (2008a). Inhibition of the ubiquitin-proteasome activity prevents glutamate transporter degradation and morphine tolerance. *Pain* 140: 472–478.
- Yang L, Wang S, Sung B, Lim G, Mao J (2008b). Morphine induces ubiquitin-proteasome activity and glutamate transporter degradation. *J Biol Chem* 283: 21703–21713.
- Zernig G, Wakonigg G, Madlung E, Haring C, Saria A (2004). Do vertical shifts in dose-response rate-relationships in operant conditioning procedures indicate "sensitization" to "drug wanting"? *Psychopharmacology (Berl)* 171: 349–351 author reply 352–363.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

Titre : La mémoire hippocampo-dépendante: Altérations dans un modèle de vieillissement accéléré et régulation par le système nociceptinergique chez la souris.

La mémoire est définie comme une activité biologique et psychique qui permet d'emmagasiner, de conserver et restituer des informations. La formation de la mémoire à long terme a lieu en plusieurs étapes : acquisition, consolidation. Une fois consolidée, la mémoire peut être réactivée puis reconsolidée. C'est un processus dynamique qui au cours de la vie d'un individu peut subir des altérations physiologiques (vieillesse) ou pathologiques (maladies neurodégénératives, syndrome de stress post traumatique (PTSD)).

Dans un premier temps nous avons caractérisé du point de vue comportemental les souris Werner (WRN), un modèle de vieillissement accéléré. Nos résultats ont montré que les souris WRN de différents âges (3, 5 et 8 mois) ne présentaient aucun problème moteur ni d'anxiété, deux paramètres altérés chez des souris âgées de 21 mois. Ces souris ne montrent pas non plus de déficit de mémoire non hippocampo-dépendante mais par contre présentent des déficits de mémoire hippocampo-dépendante. En termes d'intégrité fonctionnelle de l'hippocampe, les souris Werner sont capables de stocker l'information après un apprentissage mais à partir de 8 mois, elles présentent un déficit de flexibilité comportementale dans les tests de mémoire spatiale et contextuelle, un défaut caractéristique des animaux âgés. Nos résultats montrent qu'au niveau comportemental, les souris WRN sont un bon modèle pour étudier le vieillissement car elles présentent dès 8 mois des déficits comparables à des souris normales âgées sans effets confondants liés à des troubles de la locomotion ou de l'anxiété.

Dans un second temps nous avons évalué l'effet d'un système neuropeptidergique, le système nociceptine (peptide N/OFQ, récepteur NOP), sur la mémoire à long terme. Nous avons tout d'abord montré que différents agonistes du récepteur NOP inhibaient spécifiquement la reconsolidation de la mémoire aversive de type contextuelle dans le test du conditionnement de peur. Cet effet inhibiteur a également été observé dans un test hippocampo-dépendant non aversif, le test de localisation d'objet. Puisque l'activation des récepteurs NOP produit un effet amnésiant on peut émettre l'hypothèse que leur inhibition par des antagonistes pourrait favoriser l'apprentissage et la mémoire. Nos premiers résultats montrent en effet que l'injection d'un antagoniste NOP améliore les performances dans le test de localisation d'objet chez des souris Tg2576, modèles d'une forme familiale de la maladie d'Alzheimer. L'ensemble de ces résultats valident l'intérêt du système nociceptinergique en tant que cible thérapeutique pour atténuer les formes pathologiques de mémoire aversive comme dans le cas du PTSD ou au contraire améliorer les performances mnésiques chez les patients Alzheimer.

MOTS CLES : vieillissement, souris Werner, mémoire hippocampo-dépendante, mémoire non hippocampo-dépendante, reconsolidation de la mémoire, nociceptine/orphanine FQ, trouble de stress post traumatique, maladie d'Alzheimer.

Title : Hippocampus-dependent memory : alteration in a model of accelerated aging and regulation by the nociceptinergic system in mice.

Memory can be defined as a biological and psychic activity that allows the acquisition, storage and retrieval of information. Long-term memory formation takes place in several stages: acquisition, consolidation. Once consolidated, the memory can be reactivated and then reconsolidated. Memory is a dynamic process that can undergo physiological (aging) or pathological alterations (neurodegenerative diseases, post-traumatic stress disorder (PTSD)) during the life of an individual.

In a first step, we characterized the behavior of Werner mice (WRN), a model of accelerated aging. Our results showed that WRN mice of different ages (3, 5 and 8 months) showed no motor problems or anxiety, two parameters altered in 21-month-old mice. These mice also showed no non hippocampus-dependent memory deficit but showed hippocampus-dependent memory deficits. In terms of functional integrity of the hippocampus, Werner mice are able to store information after learning, but from 8 months onwards, they lack behavioral flexibility in spatial and contextual memory tests, a feature also observed in physiological aging. Our results show that at the behavioral level, WRN mice are a good model for studying aging because they show from 8 months deficits comparable to normal elderly mice without confounding effects related to locomotion or anxiety.

Secondly, we evaluated the effect of a neuropeptidergic system, the nociceptin system (N/OFQ peptide, NOP receptor) on long-term memory. We first showed that different agonists of the NOP receptor inhibit the reconsolidation of aversive memory in the fear conditioning paradigm.. This inhibitory effect was also observed in a non-aversive hippocampus-dependent task, the object location test. Since activation of NOP receptors produces an amnesic effect, it can be hypothesized that their inhibition by antagonists could promote learning and memory. Indeed, our first results show that the injection of a NOP antagonist improves the performance in the object location test in Tg2576 mice, a model of familial Alzheimer's disease. All these results validate the interest of the nociceptinergic system as a therapeutic target to attenuate pathological forms of aversive memory as in the case of PTSD, or on the contrary improve memory performance in Alzheimer patients.

KEY WORDS: aging, Werner mice, hippocampus-dependent memory, non hippocampus-dependent memory, memory reconsolidation, nociceptin / orphanin FQ, post traumatic stress disorder, Alzheimer's disease.