



HAL
open science

Dynamique temporelle de la persistance d'un souvenir spatial : étude de l'implication des noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus dans différents systèmes de mémoire – mémoire de travail et mémoire à long terme

Laurine Boch

► To cite this version:

Laurine Boch. Dynamique temporelle de la persistance d'un souvenir spatial : étude de l'implication des noyaux reuniens et rhomboïde du thalamus dans différents systèmes de mémoire – mémoire de travail et mémoire à long terme. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2023. Français. NNT : 2023STRAJ115 . tel-04500760

HAL Id: tel-04500760

<https://theses.hal.science/tel-04500760v1>

Submitted on 12 Mar 2024

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

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

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

Laboratoire Des Neurosciences Cognitives Et Adaptatives

THÈSE présentée par

Laurine BOCH

Soutenue le : **8 décembre 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : **Neurosciences**

**Dynamique temporelle de la persistance d'un
souvenir spatial**

Étude de l'implication des noyaux Reuniens et Rhomboïde du thalamus dans différents systèmes de mémoire : mémoire de travail et mémoire à long terme.

Thèse dirigée par :

Mr CASSEL Jean-Christophe

Professeur, Université de Strasbourg

Mme PEREIRA DE VASCONCELOS Anne

Chargée de recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme RAVEL Nadine

Directrice de recherches, Université de Lyon 1

Mr WOLFF Mathieu

Directeur de recherches, Université de Bordeaux

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme BONNEFOND Anne

Professeur, Université de Strasbourg

Mr PARNAUDEAU Sébastien

Chargé de recherches, Université de Paris 6

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, Dr Nadine Ravel et Dr. Mathieu Wolff, Pr. Anne Bonnefond et Dr. Sébastien Parnaudeau d'avoir accepté, et pris le temps d'examiner ce travail de thèse.

Même s'il s'agit de mon nom qui figure sur la couverture de ce manuscrit, l'ensemble des personnes citées ci-après auront contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, au moins par leur soutien. Je n'aurai pu imaginer grandir dans un environnement si agréable et formateur, le LNCA est une petite famille qu'il va être dur de quitter.

Merci à mes trois encadrants, Jean-Christophe Cassel, Anne Pereira de Vasconcelos, et Aline Stephan, qui m'ont fait confiance et formé à la recherche, toujours avec bienveillance. Merci de m'avoir préparé au concours de l'école doctorale, non sans relâche (et c'est peu dire). Si j'ai été aussi sereine et épanouie pendant ces années, c'est grâce à vous trois.

Merci Jean-Christophe, pour votre dévotion à la recherche et à l'enseignement, qui il y a plus de 7 ans, m'ont permis de découvrir les Neurosciences. C'est votre passion pour la mémoire qui m'ont poussé à réaliser une thèse. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours poussé dans mes retranchements. Merci aussi pour les cours de mécanique, c'est fou ce qu'on peut apprendre à bricoler en réalisant une thèse !

Merci Anne, pour tout. Notre rencontre il y a près de 7 ans n'aurait pu prédire tout le chemin parcouru depuis. C'est aussi grâce à votre bienveillance, votre positivité à toute épreuve et votre sérénité que j'ai pu me lancer et réaliser cette thèse. Merci pour vos conseils et votre aide, vous avez toujours trouvé les mots pour me rassurer et m'encourager. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme encadrante et mentor.

Merci Aline, pour ton encadrement et ta bienveillance. Merci pour toutes ces discussions passionnantes (de sciences ou non...). Merci d'avoir toujours été patiente, je ne pensais pas pouvoir un jour réaliser des chir' comme c'est le cas aujourd'hui, car ce n'était pas gagné ! J'espère que tu penseras toujours un peu à moi lorsque tu seras face à un « Toto », pour que ça ne t'empêche plus jamais d'avancer. Et n'oublies pas, si tu vois tout gris autour de toi, déplace l'éléphant !

Merci à Catherine Krieger, sans qui le labo ne pourrait fonctionner. Merci d'avoir toujours parfaitement géré toutes les galères administratives et les délais de livraison de commandes en tout genre, toujours avec le sourire ! Tu ne figures pas dans les auteurs des papiers publiés, mais je pense que ça devrait être une chose à reconsidérer !

Merci à Brigitte Cosquer, notre petite fée du laboratoire. Merci de m'avoir formé à toutes les techniques de laboratoire, de la salle de chirurgie, en passant par l'immuno, jusqu'au cryostat, et la manipulation (chouchoutage) des petits rats. Merci pour l'aide incommensurable, d'un point de vue technique mais surtout psychologique. Ton soutien et tes petits mots m'ont été plus que précieux, je n'en serais clairement pas là aujourd'hui sans toi !

Merci à Karin Herbeaux, pour ton sourire, ta bonne humeur à revendre et tes petits conseils. Merci de toujours me suivre dans mes bêtises (le babyfoot, ou les déguisements d'Halloween...). Merci de nous avoir fédéré autour de ton sport, pour nous motiver à courir, ça n'était pas gagné, et pourtant ! Tu es un cœur !

Merci à Aminé pour ta gentillesse, tu es une personne adorable, merci de m'avoir fait découvrir les délicieux plats de ta maman.

Merci au travail de l'ensemble des animaliers Olivier, Daniel, George et Brice pour les soins apportés aux animaux, et surtout merci à tous les petits rats sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Merci à Olivier Durieux pour son aide et son soutien pour les derniers bugs informatiques de la fin de thèse.

Merci à tous les membres de l'équipe 1, pour vos conseils précieux lors des groupes-meetings, et les moments de partage et de célébration ensemble. Merci aussi à ceux déjà partis, Isabel, Rafael, pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

Merci Laura Tzeplaëff, pour les conseils sur Anymaze, l'analyse de données, et l'organisation. Merci de m'avoir intégré si chaleureusement dans ton bureau. Vivement qu'on puisse venir te voir à Munich !

Merci à Katia Befort et Vincent Lelièvre pour leur conseils lors des comités suivis de thèse. Merci Katia pour nos discussions sur l'après-thèse, et tes mots d'encouragement.

Merci à Monique et Alexandra, pour m'avoir initié au monitorat, et pour tous leurs conseils en comportement. Merci aussi à Céline, pour ta patience et ton partage de conseils concernant l'enseignement, mais surtout pour savoir quoi répondre aux étudiants qui posent des questions improbables (à quoi il sert ce TP ?).

Merci à Romain Bourdy pour tes conseils divers et variés, que ce soit en matière de virus ou d'analyse d'image, mais aussi pour les conversations passionnantes sur l'IA ou les nouvelles technologies.

Merci à Romain Goutagny pour nos discussions enrichissantes et ton aide précieuse dans la préparation de la soutenance.

Merci à Etienne Quet et Marie Muguet-Klein pour votre temps et vos conseils sur l'après-thèse.

Merci à tous les stagiaires qui sont passés par là ; Nina, Elena, Charleen, Marie-Sarah, Solène, Arthur et Julia, et qui ont permis au projet d'avancer plus vite.

Merci à mes compagnons de thèse, tous les doctorants du labo, à ceux déjà partis ou tout juste arrivés, pour les moments passés ensemble, les soirées jeux, marioKart, ou encore celles au Wawa à manger des Nachos, merci pour votre soutien et pour les fous rires.

Merci à Florian, pour la compagnie dans l'écriture de la thèse, merci de m'avoir appris les pires blagues d'humour noir, merci pour les cookies d'anniversaire, merci d'avoir ruiné le choix de prénoms pour mes enfants plus tard, mais surtout pour tous les moments partagés ensemble. J'espère que tu n'oublieras pas d'envoyer de tes nouvelles des States !

Merci à Matthieu, pour le soutien indéfectible de la dernière minute, je sais que je pouvais toujours compter sur toi pour ne pas être la dernière à rendre abstract et poster. Merci pour tous les partages de recettes et de recommandations de resto. Merci pour les blagues politiquement incorrectes, vous faites la paire avec Florian !

Merci à Marido, pour toutes tes histoires à dormir debout, tes anecdotes impossibles et ton rire communicatif, qui nous manquent déjà !

Merci à Coline et Baptiste pour leur don de bébé plantes trop mimi, j'espère en prendre soin encore très longtemps ! Et merci à Coline pour nos discussions électrophysiology et oscillations (qui m'ont réconcilié avec le sujet), tu es une prof très pédagogue et adorable !

Merci à Noémie d'avoir lancé les tests gustatifs pendant l'été, qui nous auront bien fait rire et réaliser que les Chococahuètes, c'est vraiment pas bon ! Merci aussi pour tes petites attentions !! Bon courage pour la suite, mais je suis sûre qu'avec Jil vous ferez un super duo de choc !

Un énorme merci aux filles, Anne-Sophie, Elodie, Cécile et Iris, pour tout. Toutes les soirées Ultimatum, Love is Blind, m'auront aidé à soulager le stress de la fin de thèse. Merci pour les sorties goûter, Aquacombat, course à pied ou juste café après-manger. Ma thèse n'aurait certainement pas été la même sans vous. J'ai eu la chance de nouer de vrais liens d'amitié, alors merci d'avoir été là tout du long.

Cécile, merci d'avoir été mon petit Buddha, toujours là pour me faire rire, et m'emmener faire des bêtises. Merci pour ton énergie, et tes petites attentions, tu es un soleil.

Iris, thank you so much for being the amazing human that you are. Thank you for all the long discussion, the laugh and the help for all situations, I don't know if it's correct but I hope you'll understand : volim te jako puno.

Anne-Sophie, je ne pourrais pas exprimer l'immense gratitude que j'ai de t'avoir rencontré et surtout de t'avoir eu dans mon bureau. Merci pour tous les moments passés ensemble, ma thèse n'aurait clairement pas été si chouette sans toi. Depuis le début du master, on s'est retrouvées recluses du labo, d'abord à la mezzanine (enfin même pas, le rebord de la mezzanine), avant de se retrouver là haut dans notre nid. Je n'aurais pu avoir de meilleure binôme d'écriture. Merci pour tout les fous rires, merci d'être toi, et d'avoir toujours été là.

Merci à Elodie, je sais que tu attends de lire ce passage avec impatience alors j'espère ne pas te décevoir. Merci est un mot trop petit pour exprimer toute la reconnaissance que j'ai envers toi, pour ces dernières années passées ensemble. Je n'aurai pu imaginer meilleure partenaire pour travailler à mes côtés. Partenaire mais aussi amie, puisque l'on a tout fait ensemble, toujours soudées. Merci pour

ta rigueur dans l'organisation et la planification des manips, Merci de m'avoir aidé à rester dans ma bulle quand c'était nécessaire, merci pour le soutien lors des moments de galères (liste non exhaustive : help le classifier, les trous, et les chirurgies sans compresseurs), et pour tous bons moments et fous rires partagés (oui, on peut rire et travailler en même temps). Je te souhaite tout le meilleur, future Docteure, et j'espère qu'on pourra être amenées à retravailler ensemble, puisque le destin nous a fait nous rencontrer il y a plus de 7 ans, on verra ce que l'avenir en diras, mais dans tous les cas, je ne te laisserai pas tranquille de si-tôt !!

Merci à tous mes amis en dehors du labo, qui n'ont pas toujours (jamais) compris ce que je faisais, mais qui ont toujours été présents.

Merci Julie et Céline, pour vos mots d'encouragement, et votre présence depuis plus de 15 ans maintenant (āie). Love you !

Merci à Maëlle d'être toujours là, et de me soutenir dans tous mes choix, depuis si longtemps.

Merci Marion et Céline pour les week-end réconfortants. Merci d'être toujours présentes depuis le Master, j'ai de la chance de vous avoir.

Merci à Coco, Sib, Nico, Val, Clara, pour les sorties à promener Toupie, les soirées jeux, et tous les bons repas qui m'ont permis de décompresser un peu, vivement les prochaines vacances ensemble !!

Enfin, merci à ma famille, particulièrement à mes parents, de m'avoir offert la possibilité de faire des études, et de me soutenir avec tant de dévouement, depuis tout ce temps. Il est vrai qu'on ne choisit pas sa famille, mais si j'avais dû le faire, il n'existe nul doute que je vous aurais choisi, milles fois.

Merci à mes grands-parents, et particulièrement à ma grand-mère, Monique, pour tes doux mots et conseils, qui m'ont réchauffé l'esprit et le cœur, et permis de rester sereine.

Merci à Karine, Didier et Anaëlle, pour votre aide et votre soutien, merci pour tous les moments partagés, et tout particulièrement les voyages, vivement les prochains.

Merci à Quentin, pour tout, tu sais déjà tout.

Table des matières

INTRODUCTION

I. LA MEMOIRE	1
A. DEFINITION ET GENERALITES SUR LA MEMOIRE	1
B. CLASSIFICATIONS DES DIFFERENTS SYSTEMES DE MEMOIRE.....	2
1. <i>La mémoire non déclarative</i>	3
2. <i>La mémoire déclarative</i>	3
C. LA MEMOIRE SPATIALE	5
1. <i>Généralités</i>	5
2. <i>Notion de carte cognitive et substrat biologique</i>	5
3. <i>Différentes stratégies de navigation : allocentrique et égocentrique</i>	8
4. <i>Notion de flexibilités cognitive et comportementale</i>	10
D. ÉVALUER LA MEMOIRE SPATIALE.....	10
1. <i>Mémoire spatiale de travail et mémoire spatiale de référence</i>	10
a) Labyrinthe radial.....	11
b) La piscine de Morris.....	13
c) Le labyrinthe de Barnes	14
d) Le T-Maze / Y-Maze	15
e) Le Double-H	16
E. NEUROANATOMIE DE LA MEMOIRE SPATIALE	17
1. <i>Implication du CPFm</i>	17
2. <i>Implication de l'HIP</i>	18
3. <i>Implication des interactions CPFm et HIP</i>	18
II. LA PERSISTANCE D'UN SOUVENIR	19
A. LE SUPPORT DU SOUVENIR	19
B. CONSOLIDATION A L'ECHELLE DE LA SYNAPSE	22
C. CONSOLIDATION A L'ECHELLE DES SYSTEMES.....	23
1. <i>Théorie standard de la consolidation</i>	24
2. <i>Théorie des traces multiples</i>	24
3. <i>Théorie de la transformation</i>	25
D. ROLE CLE DU SOMMEIL DANS LA MEMOIRE	26
E. ET L'OUBLI ?	28
III. LES NOYAUX REUNIENS ET RHOMBOÏDE AU SEIN DU CIRCUIT CORTICO-THALAMO-HIPPOCAMPIQUE .	31
A. ANATOMIE	31
B. NEUROCHIMIE.....	32
1. <i>D'où vient l'inhibition ?</i>	33
C. CONNECTIVITE.....	34
1. <i>Principales afférences et efférences</i>	34
2. <i>Focus sur l'hippocampe</i>	35
a) Description rapide de l'HIP	35
b) Connectivité HIP ↔ ReRh	36
3. <i>Focus sur le cortex préfrontal médian</i>	38
a) Description rapide du CPFm	38
b) Connectivité CPFm↔ReRh	39
4. <i>Connectivité HIP-CPFm-ReRh</i>	40
D. FONCTIONS.....	40
1. <i>Principales implications fonctionnelles</i>	41
a) Fonctions exécutives	41
b) Fonctions mnésiques	43
c) Pathologies associées	46

PARTIE I : IMPLICATION DES RERH EN MEMOIRE DE TRAVAIL SPATIALE

I.	INTRODUCTION SUR LE CONCEPT DE LA MEMOIRE DE TRAVAIL	51
II.	PUBLICATION 1 : VENTRAL MIDLINE THALAMUS ACTIVATION IS CORRELATED WITH MEMORY PERFORMANCE IN A DELAYED SPATIAL MATCHING-TO-SAMPLE TASK : A C-FOS IMAGING APPROACH IN THE RAT. 55	
A.	CONCLUSION PUBLICATION 1.....	67
B.	PREFACE PUBLICATION 2	67
III.	PUBLICATION 2 : INHIBITION OF THE VENTRAL MIDLINE THALAMUS DOES NOT ALTER ENCODING, SHORT-TERM HOLDING OR RETRIEVAL OF SPATIAL INFORMATION IN RATS PERFORMING A WATER-ESCAPE WORKING MEMORY TASK	69
IV.	DISCUSSION GENERALE	86
A.	CHOIX DE LA METHODOLOGIE : LE MUSCIMOL	88
1.	<i>Dose utilisée et spécificité neuroanatomique</i>	88
2.	<i>Avantages et inconvénients, quelles alternatives ?</i>	88
B.	MEMOIRE DE TRAVAIL, MEMOIRE A COURT TERME ? QU'AVONS-NOUS REELLEMENT TESTE DANS NOTRE PROTOCOLE ?....	89
1.	<i>Délai inter-essai</i>	89
2.	<i>Interférences proactives</i>	89
3.	<i>Quelle mémoire engagée chez nos animaux ?</i>	90
4.	<i>Interactions HIP-CPFm</i>	91
C.	LA NOTION DE CHARGE SPATIALE : QU'EST-CE QU'ON ENTEND PAR MEMOIRE DE TRAVAIL SPATIALE ?.....	92
1.	<i>Accès aux indices allothétiques</i>	92
2.	<i>Difficulté de la tâche</i>	93
V.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	94

PARTIE II : IMPLICATION DES RERH DANS LA CONSOLIDATION D'UN SOUVENIR SPATIAL

MATERIELS ET METHODES

I.	ANIMAUX ET CONSIDERATIONS ETHIQUES	98
II.	LESION CONDITIONNELLE DE LA VOIE CORTICO-THALAMIQUE PAR CHIRURGIE STEREOTAXIQUE	99
A.	CHIRURGIE STEREOTAXIQUE	99
B.	LESION CONDITIONNELLE	100
1.	<i>Le Système de Recombinaison Cre-LoxP</i>	100
C.	PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE LA CHIRURGIE	102
D.	GROUPES EXPERIMENTAUX	104
III.	ÉTUDES COMPORTEMENTALES	105
A.	ACTIMETRIE	105
1.	<i>Principe</i>	105
2.	<i>Dispositif</i>	106
B.	LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE	107
1.	<i>Principe</i>	107
2.	<i>Dispositif</i>	107
C.	PISCINE DE MORRIS.....	108
1.	<i>Principe</i>	108
2.	<i>Dispositif</i>	108
3.	<i>Protocole</i>	109
IV.	HISTOLOGIE	111
A.	MISE A MORT.....	111
B.	IMMUNOHISTOFLUORESCENCE.....	111

1.	Protocole	112
C.	MICROSCOPIE	113
D.	QUANTIFICATION	113
1.	Quantification de l'aire d'infection virale avec le logiciel QuPath.....	113
2.	Nombre de neurones/noyaux marqués avec le logiciel QuPath.....	114
V.	STATISTIQUES	114

RESULTATS

I.	MISE AU POINT DE LA DECONNEXION SPECIFIQUE	117
A.	VOIE CORTICO-THALAMIQUE	117
B.	VOIE THALAMO-CORTICALE	121
II.	DECONNEXION BILATERALE DE LA VOIE CORTICO-THALAMIQUE.....	127
A.	LOCALISATION ET ETENDUE DES INJECTIONS VIRALES.....	128
B.	MESURE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE AVANT ET APRES LA CHIRURGIE	129
C.	MESURE DE L'ANXIETE	131
D.	TACHE DE MEMOIRE SPATIALE EN PISCINE DE MORRIS	133

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I.	LE ROLE DES RERH DANS LA CONSOLIDATION D'UN SOUVENIR.....	139
II.	LIMITATION DANS LES CHOIX DE L'APPROCHE METHODOLOGIQUE : LA CONSOLIDATION SYSTEMIQUE, UN PROCESSUS GRADUEL DIFFICILE A ETUDIER	141
A.	AVANTAGES ET LIMITES DE L'APPROCHE DE DECONNEXION	141
B.	L'AAV-CRE RETROGRADE, TOXIQUE POUR LES NEURONES ?	143
C.	PAS D'IMPLICATION DE LA VOIE CORTICO-THALAMIQUE DANS LA PERSISTANCE D'UN SOUVENIR ?	144
D.	EFFICACITE DE LA DECONNEXION.	145
E.	PLASTICITE ET REORGANISATION CEREBRALE	146
III.	LA VOIE CORTICO-THALAMIQUE, UN ROLE DANS LES PROCESSUS MNESIQUES ?.....	147
A.	COMMENT EXPLIQUER CETTE DICHOTOMIE ENTRE PROCESSUS ONLINE ET OFFLINE?	149
IV.	PERSPECTIVES.....	152
V.	CONCLUSION	154

ANNEXES

I.	MISE AU POINT DU PROTOCOLE DE MEMOIRE A LONG TERME EN PISCINE DE MORRIS	157
II.	PUBLICATION SOUMISE : "DISCONNECTING PREFRONTAL CORTICAL NEURONS FROM THE VENTRAL MIDLINE THALAMUS : LOSS OF SPECIFICITY DUE TO PROGRESSIVE NEURAL TOXICITY OF AN AAV-CRE IN THE RAT THALAMUS"	165
III.	LE NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE	207

Table des figures

FIGURE 1. LES SYSTEMES DE MEMOIRE	2
FIGURE 2. SYSTEME DE FONCTIONNEMENT DE LA NAVIGATION SPATIALE CHEZ LE RONGEUR.....	7
FIGURE 3. STRATEGIES DE NAVIGATION DANS L'ESPACE.....	9
FIGURE 4. LE LABYRINTHE RADIAL	12
FIGURE 5. LA PISCINE DE MORRIS.....	13
FIGURE 6. LE LABYRINTHE DE BARNES	14
FIGURE 7. LE LABYRINTHE EN T.	15
FIGURE 8. LE DOUBLE-H, DIFFERENTS PROTOCOLES	16
FIGURE 9. UN ENGRAMME "BRAIN-WIDE", YIP ET GRAFF 2023	20
FIGURE 10. ÉVENEMENTS ET VOIES DE SIGNALISATION PARTICIPANT A LA PLASTICITE SYNAPTIQUE	22
FIGURE 11. MODELE STANDARD DE LA CONSOLIDATION.....	24
FIGURE 12. MODELE DES TRACES MULTIPLES	25
FIGURE 13. MECANISMES SOUS-TENDANT LA CONSOLIDATION PENDANT LE SOMMEIL	27
FIGURE 14. ORGANISATION NEUROANATOMIQUE DES NOYAUX REUNIENS ET RHOMBOÏDE DU THALAMUS	31
FIGURE 15. LE TRN ET L'INHIBITION DU RE, ZIMMERMAN	33
FIGURE 16. AFFERENCES ReRH.....	34
FIGURE 17. EFFERENCES ReRH	35
FIGURE 18. L'HIPPOCAMPE	36
FIGURE 19. CONNECTIVITE ENTRE L'HIP ET LES ReRH	37
FIGURE 20. LE CORTEX PREFRONTAL MEDIAN.....	38
FIGURE 21. CONNECTIVITE CPFm-RE.....	39
FIGURE 22. MODELE DE LA MEMOIRE DE TRAVAIL CHEZ L'HUMAIN PAR BADDELEY	51
FIGURE 23 : FREQUENCE DE LA 1 ^{ERE} VISITE DU BRAS CONTENANT LA PLATEFORME A J-1 LORS DU 1 ^{ER} ESSAI DU LENDEMAIN	91
FIGURE 24. PHOTOGRAPHIE DE RATS MALES DE SOUCHE LONG EVANS AGES DE 7 SEMAINES	98
FIGURE 25. CADRES STEREOTAXIQUES.....	99
FIGURE 26. FONCTIONNEMENT DU SYSTEME D'INVERSION CRE-LoXP.....	100
FIGURE 27. REPERES ANATOMIQUES LORS DE LA CHIRURGIE STEREOTAXIQUE.	102
FIGURE 28. GROUPES EXPERIMENTAUX.	104
FIGURE 29. MESURE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE.....	106
FIGURE 30. LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE.	107
FIGURE 31. PHOTOGRAPHIE DE LA SALLE DE TEST EN PISCINE DE MORRIS.	108
FIGURE 32. PROTOCOLE EN PISCINE DE MORRIS.....	109
FIGURE 33. MISE AU POINT DE L'APPROCHE VIRALE - VOIE CORTICO-THALAMIQUE.....	117
FIGURE 34. COMPTAGE DU NOMBRE DE NEURONES RETROMARQUES DANS LE CPFm	119
FIGURE 35. POURCENTAGE DE PERTE DE NEURONES SELON LE NIVEAU D'ANTERO-POSTERIORITE PAR RAPPORT AU BREGMA	120
FIGURE 36. MISE AU POINT DE L'APPROCHE VIRALE – VOIE THALAMO-CORTICALE.....	121
FIGURE 37. COMPTAGE DU NOMBRE DE NEURONES RETROMARQUES DANS LES PERIRE – AAV-CRE-mCherry.....	122
FIGURE 38. NOMBRE DE NEURONES COMPTES SUR L'ENSEMBLE DES NIVEAUX ANTERO-POSTERIEURS DES PERIRE – AAV-CRE- mCherry.....	123
FIGURE 39. COMPTAGE DU NOMBRE DE NEURONES RETROMARQUES DANS LES PERIRE – AAV-CRE-GFP.....	124
FIGURE 40. NOMBRE DE NEURONES COMPTES SUR L'ENSEMBLE DES NIVEAUX ANTERO-POSTERIEURS DES PERIRE -- AAV-CRE-GFP.....	125
FIGURE 41. COMPARAISON DU NOMBRE TOTAL DE NEURONES ENTRE LES PERIRE ET LES SUB.....	125
FIGURE 42. DESIGN EXPERIMENTAL	127
FIGURE 43. SITES D'INJECTION DE L'AAV-CRE-GFP DANS LES ReRH	128
FIGURE 44. MESURE DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE.....	129
FIGURE 45. RESULTATS DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE	132
FIGURE 46. PERFORMANCES DES ANIMAUX LORS DES PHASES D'HABITUATION ET D'ACQUISITION EN PISCINE DE MORRIS	133
FIGURE 47. TEMPS PASSE DANS LES DIFFERENTS QUADRANTS LORS DU PROBE TEST	134
FIGURE 48. INDICES DE PRECISION DE LA MEMOIRE LORS DU PROBE TEST.....	136
FIGURE 49. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CONNEXIONS AU SEIN DU RESEAU HIP-CPFm-RERH.....	140
FIGURE 50. EXPRESSION DE DIFFERENTS AAVs SELON LEUR SEROTYPE.	142

FIGURE 51. SCHEMA HYPOTHETIQUE DU FONCTIONNEMENT DES ReRH AU SEIN DU CIRCUIT HIPPOCAMPO-CORTICO-THALAMIQUE, MODIFIE DE CASSEL ET PEREIRA DE VASCONCELOS, 2015	149
FIGURE 52. RESULTATS DE L'HABITUATION ET ACQUISITION LORS DE LA MISE AU POINT	158
FIGURE 53. TEMPS PASSE DANS LES DIFFERENTS BRAS LORS DES PROBES TESTS, ET HEAT MAP	160
FIGURE 54. INDICES DE PRECISION DE LA MEMOIRE LORS DES PROBES TEST	161
FIGURE 55. COMPARAISON DE L'EFFET DU POINT DE LACHER AVEC LES RESULTATS DE LA COHORTE 'DECONNEXION BILATERALE', OU 2 POINTS DE LACHER ONT ETE UTILISES, A SAVOIR NE ET SO.....	162
FIGURE 56. PHOTOGRAPHIE DE LA PIECE DE TEST LORS DE LA MISE AU POINT, ET APRES L'AJOUT DE L'INDICE.....	163

Abréviations

A

AAV : virus adénoassociés
AC : cortex cingulaire antérieur
AMY : amygdale
AGm : cortex agrulaire médian
AP : antéro-postérieur

B

BLA : amygdale basolatérale

C

CA : Corne d'Ammon
Ca²⁺ : Calcium
CB : calbindine
Cfos
CM : noyau central médian
CPFm : cortex préfrontal médian
CR : calrétinine
Cre : recombinaison Cre

D

DH : double-H

E

EF1a: facteur d'élongation 1 alpha
eGFP: enhanced green protein
ETI entrées inhibitrices extra-thalamiques

G

GD : gyrus denté
GFP : green fluorescent protein

H

HC : home cage
HIP : hippocampe
hSyn : promoteur synapsine humaine

I

iEG : gènes d'expression précoce
IAM :noyau interoantéromédian
IL : partie infralimbique du cortex préfrontal médian
IMD ;, noyau interomédiadorsal
ITI : délai inter-essai (intertrial interval)

L

loxP : locus of X over P1
LTP: potentialisation à long terme

M

MD : noyau médiadorsal
MLT : mémoire à long terme
MRS : mémoire de référence spatiale
MTS : mémoire de travail spatiale
MT : mémoire de travail

N

N : nord
NE : nord est
NO : nord ouest

P

pb : paires de base
PF : plateforme
PL : prélimbique
pRe : péri-reuniens
PROC : groupe procédural
PT : noyau paraténial
PV : parvalbumine
PVA : noyau paraventriculaire antérieur
PVP : noyau paraventriculaire postérieur

R

Re : reuniens
REM : sommeil paradoxal
ReRh : reuniens et rhomboïde
Rh : rhomboïde

S

SPAT : groupe spatial
Sub : noyaux submédiadors
S: sud
SE : sud est
SO : sud ouest
SWS : sommeil à ondes lentes

T

TEVP : protéase du virus de la gravure du tabac
TRN : noyau réticulaire du thalamus

V

3V : 3^{ème} ventricule

X

Xi : xiphoïde

-Avant Propos-

Les animaux, comme les humains, ont la capacité de restituer ou d'utiliser une information apprise il y a longtemps. La persistance des souvenirs nécessite que la représentation mentale de l'information initialement perçue et encodée dans un état labile soit progressivement consolidée, ce qui la rend résistante aux interférences, durable. Ce processus de consolidation peut se réaliser grâce à des modifications des synapses, mais également à l'échelle des systèmes cérébraux, entre lesquels intervient une réorganisation progressive des réseaux qui assure la persistance de la trace mnésique. Les informations d'ordre spatial, par exemple, sont tout d'abord organisées et maintenues dans les circuits de l'hippocampe (Hip). Plus tard, elles sont prises en charge, au moins en partie, par des réseaux corticaux de la zone préfrontale. Ainsi la réactivation de circuits hippocampo-corticaux permet le maintien à long terme de l'information. Néanmoins, bien que l'Hip et le cortex préfrontal médian (CPFm) jouent un rôle indispensable dans la consolidation à l'échelle des systèmes, au laboratoire, un relai essentiel à l'échange d'informations entre l'Hip et le CPFm a été découvert : les noyaux Reuniens et Rhomboïde (Re/Rh) de la ligne médiane du thalamus ventral. Ces noyaux possèdent des relations anatomiques privilégiées, car réciproques avec l'Hip et avec le CPFm. De plus, nos données récentes ont montré que ces noyaux Re/Rh sont indispensables à la persistance d'un souvenir, tant contextuel ([Quet et al, 2020](#)) que spatial ([Loureiro et al, 2012](#)). Nous avons ainsi mis en évidence la nécessité d'un circuit hippocampo-cortico-thalamique dans la consolidation à long terme d'un souvenir, confortant l'idée que des noyaux thalamiques puissent jouer un rôle crucial dans la persistance d'un souvenir. Au-delà de la consolidation, les ReRh sont impliqués dans une variété de fonctions cognitives, qui reposent sur l'interaction entre l'Hip et le CPFm. Ces fonctions englobant l'encodage de l'information, la mémoire de travail spatial, la généralisation du conditionnement de la peur, la reconsolidation de la peur, et d'autres encore (par exemple, [Cassel et al, 2021](#)). Les Re/Rh semblent également contribuer à la rétention d'informations pendant quelques minutes (e.g. [rev Griffin, 2015](#)), donc dans un registre mnésique très limité au plan temporel.

Ce projet de thèse cherche à étudier chez le Rat, l'implication des noyaux ReRh dans deux systèmes de mémoire différents, puisqu'ils reposent dans les deux cas sur l'interaction entre l'Hip et le CPFm : la mémoire de travail spatial et la consolidation d'un souvenir spatial en mémoire à long terme.

-Structure de la thèse-

La première section de cette thèse introduit les concepts fondamentaux qui ont servi de base à mes travaux. Dans le premier chapitre, je présente les principaux concepts liés à la mémoire, en mettant particulièrement l'accent sur la mémoire spatiale, ainsi que les principaux tests comportementaux utilisés pour l'explorer et la tester chez les rongeurs. Le deuxième chapitre se penche sur la formation et la persistance des souvenirs, en examinant les différents modèles théoriques qui les sous-tendent. Enfin, le dernier chapitre de cette introduction offre une description neuroanatomique du circuit impliquant les noyaux reuniens et rhomboïde, l'hippocampe et le cortex préfrontal, tout en mettant en lumière les diverses fonctions qui leur sont associées.

Après avoir présenté les objectifs de ma thèse, la première partie se concentre sur la mémoire de travail spatiale. Elle commence par une brève introduction, suivie de deux articles publiés sur ce sujet, et se termine par une discussion, une conclusion et des perspectives pour ce travail. Dans la seconde partie, je détaille l'ensemble des matériaux et méthodes utilisés, ainsi que les résultats obtenus, visant à étudier le rôle de la voie entre le cortex préfrontal médian et les noyaux reuniens et rhomboïde dans la consolidation de la mémoire. Enfin, ma thèse finit sur une synthèse générale et des pistes de recherches futures ouvertes par mes travaux.

-Introduction-

I. La mémoire

A. Définition et généralités sur la mémoire

La mémoire est essentielle puisqu'elle nous définit ; notre caractère, nos traits ou encore notre personnalité, et ce grâce à l'ensemble de nos souvenirs : « *Que sommes-nous d'autre que la somme de nos souvenirs ?* » (Watson and Aslanides, 2011). Sans mémoire, nous serions condamnés à vivre dans un présent éternel.

La mémoire se définit comme l'ensemble des activités mentales qui nous permettent d'enregistrer, conserver et restituer des informations du passé. Cette définition met en lumière les trois processus associés à sa fonction. L'encodage permet à un événement d'être enregistré sous la forme d'une représentation mentale. Celle-ci pourra persister dans le temps grâce au processus de consolidation. Enfin, la récupération permettra le rappel total ou partiel de la trace mnésique enregistrée.

La notion d'engramme, support biologique de nos souvenirs, fut introduite en 1904 par Richard Semon (Schacter et al., 1978). L'engramme est constitué d'une assemblée cellulaire activée par une expérience d'apprentissage. Cette activation va induire des modifications physiques et chimiques durables, qui vont permettre, lors de la réactivation ultérieure de tout ou partie de ces cellules, le rappel du souvenir (Josselyn and Tonegawa, 2020). Grâce au développement d'outils de manipulation génétique, l'engramme a pu être physiquement matérialisé et visualisé, puisqu'il est même possible de créer artificiellement un souvenir chez le rongeur, et cela même en l'absence d'une expérience vécue (Vetere et al., 2019).

La mémoire est une fonction constamment à l'œuvre, nous permettant d'apprendre et de nous souvenir, et ce dans le but d'adapter nos comportements. Or, si l'on définit la mémoire comme une entité unique, il s'agit en réalité d'un système complexe, composé de diverses sous-unités.

Depuis plusieurs millénaires, les humains ont tenté de percer le mystère de la pensée en cherchant à la localiser dans le corps. D'abord dans le cœur, puis dans les humeurs, philosophes, psychologues et biologistes se sont penchés sur la question (Finger, 2001). Mais c'est particulièrement grâce aux apports de la neuropsychologie, et spécifiquement grâce au patient HM (Scoville and Milner, 1957), que la recherche sur la mémoire fit un grand pas en avant. Brenda Milner, la neuropsychologue qui a suivi HM tout au long de sa vie (il est décédé en 2008), a décrit les effets sur la mémoire de la résection bilatérale du lobe temporal médian,

réalisée dans le but de guérir HM de crises d'épilepsie pharmaco-résistantes et très invalidantes. L'étude de l'amnésie d'HM, et d'autres patients après lui, nous a permis de savoir que la mémoire se compose de différents systèmes, chacun d'entre eux reposant sur des réseaux neuronaux distincts et interconnectés, capable d'interagir et de coopérer parfaitement entre eux pour créer un ensemble mnésique fonctionnellement cohérent et pertinent (Tulving, 1985).

B. Classifications des différents systèmes de mémoire

Il est possible de distinguer différents systèmes de mémoire (**Figure 1**) selon divers critères, tels que l'âge de la trace mnésique, la nature de l'information mémorisée, ou encore le caractère conscient ou non de l'information en mémoire. D'un point de vue temporel, on peut distinguer tout d'abord la mémoire sensorielle, caractérisée par le traitement des

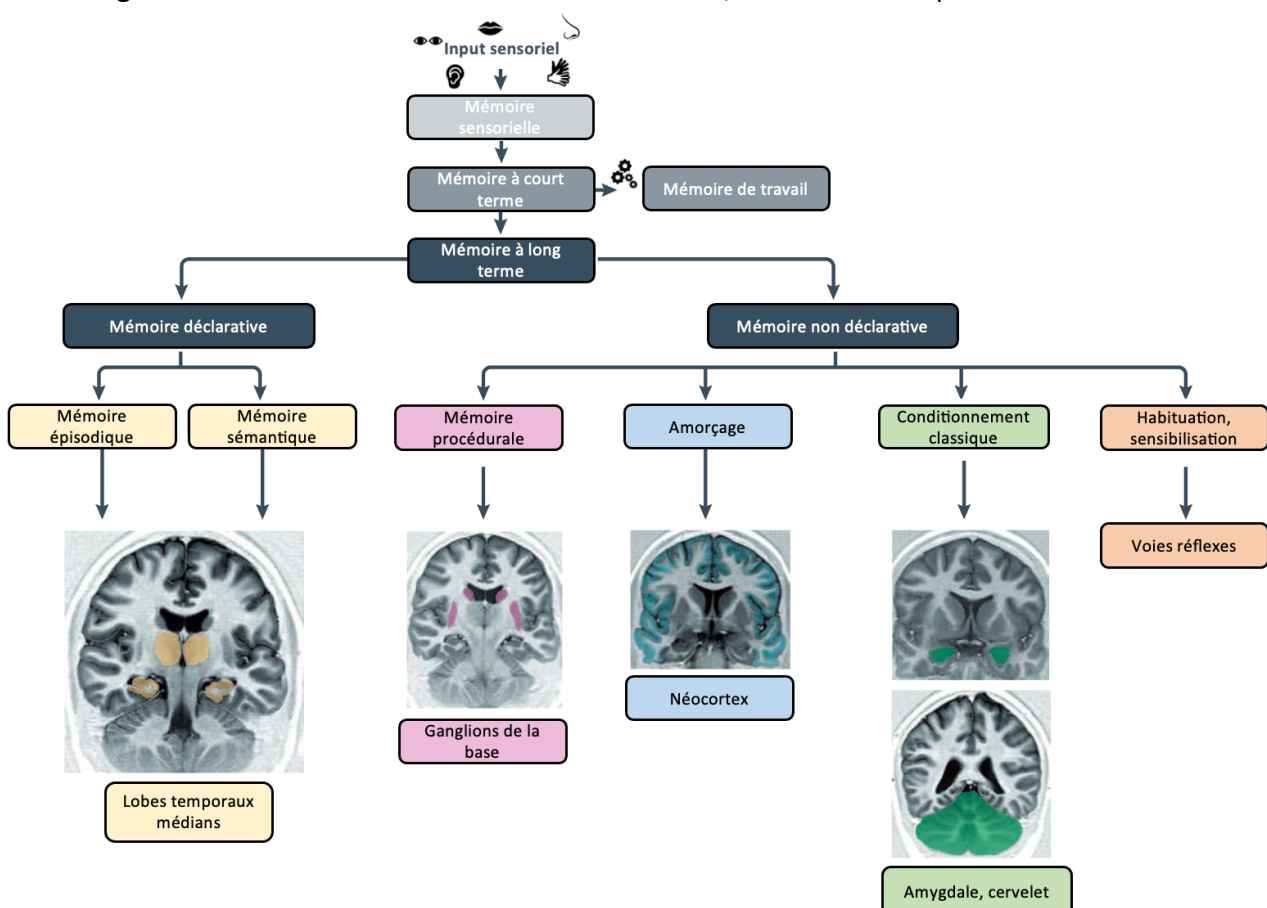


Figure 1. Les systèmes de mémoire

La mémoire sensorielle enregistre les stimuli reçus via nos différents sens. La mémoire à court terme permet de mémoriser des informations pendant plusieurs minutes, et si elles sont manipulées pour effectuer une tâche (calcul mental, réarrangement) on parle alors de mémoire de travail. L'information peut ensuite être potentiellement transférée dans le registre de la mémoire à long terme. Cette dernière est divisée en mémoire déclarative ou explicite, caractérisée par le fait que le souvenir convoqué est conscient, et mémoire non déclarative, qui est inconsciente ou implicite. La mémoire déclarative contient la mémoire épisodique (souvenirs autobiographiques, conscience dite auto-noétique) et la mémoire sémantique (connaissances générales, conscience noétique). La mémoire non-déclarative inclut l'apprentissage procédural (habiletés motrices et des savoir-faire), l'amorçage, le conditionnement classique, l'habituation et la sensibilisation (conscience anoétique). Modifié de [Henke \(2010\)](#), adapté de [Squire et Zola, \(1996\)](#).

informations reçues grâce à nos différents sens, et ce sur une très courte période, de l'ordre de quelques centaines de millisecondes. S'ensuit la mémoire à court terme, allant de quelques secondes à quelques minutes, dépendamment de la capacité du sujet à répéter l'information et/ou la présence de distraction. Si l'information est manipulée pour réaliser une tâche complexe (ex : retenir une séquence de chiffres et l'épeler dans le sens inverse), on parle alors de mémoire de travail. Enfin, en mémoire à long terme, on distingue classiquement la mémoire à long terme récente, quelques heures à quelques semaines chez l'humain (1 à 5 jours chez le rongeur), de la mémoire à long terme ancienne, qui peut persister pendant plusieurs décennies, voire toute la vie (de quelques semaines à plusieurs mois chez le rongeur ([Pickens et al., 2009](#))). La mémoire à long terme se divise en deux catégories, selon le caractère conscient ou non de l'information mémorisée : la **mémoire déclarative** et la **mémoire non-déclarative**.

1. La mémoire non déclarative

La mémoire **non déclarative** est implicite, elle repose sur une absence de conscience (conscience anoétique), et est difficilement verbalisable. Son acquisition est progressive et nécessite plusieurs répétition (à contrario de la mémoire épisodique où un évènement unique peut être ancré pour des années), et comporte la **mémoire procédurale**, mémoire de nos habiletés motrices et savoirs faire (exemple : apprendre à peindre, à faire du vélo ...), mais aussi l'amorçage, le conditionnement classique, et l'habituation.

2. La mémoire déclarative

La mémoire déclarative est explicite, ce qui signifie que l'on peut stocker et rappeler consciemment les souvenirs, et donc les verbaliser. Elle contient la **mémoire sémantique**, qui stocke nos connaissances générales sur le monde et sur nous-mêmes. Elle nous permet de restituer des connaissances sur le monde, sans avoir l'impression de revivre une situation (exemple : Je sais que le Sri Lanka est appelé la « Perle de l'Inde »). Cette mémoire est associée

à une conscience noétique, traduite par un sentiment familier lorsque l'on reconnaît savoir une information (Tulving, 1985).

La mémoire déclarative comporte également la **mémoire épisodique**, la mémoire de nos souvenirs autobiographiques, associés à un contexte spatio-temporel (exemple : Je me rappelle mon voyage au Sri Lanka). Les principaux critères de définition concernant la mémoire épisodique reposent sur

- la conscience auto-noétique : il s'agit de la capacité à vivre une expérience consciente de soi au passé, présent et futur
- le voyage mental dans le temps : c'est la capacité à se projeter mentalement dans le passé pour y revivre un événement
- la restitution consciente : il s'agit de la capacité à exprimer et expliquer un souvenir à travers le langage. (Tulving and Markowitsch, 1998).

Ce dernier critère peut difficilement être étudié chez l'animal, ce qui complique la résolution du débat concernant l'existence ou non d'une mémoire épisodique chez les animaux. C'est pourquoi on utilise le terme de mémoire « épisodique-like », que l'on définit comme une réponse comportementale résultant d'une expérience passée, intégrant le quoi, le où, et le quand (Clayton and Dickinson, 1998).

Quelques études ont très élégamment réussi à traduire comportementalement la mémoire épisodique-like chez l'animal. Clayton et Dickinson se sont basés sur l'aptitude innée des geais à enfouir leur nourriture. Les auteurs ont testé l'enfouissement de larves (très appréciées par ces oiseaux, mais périssables), et de cacahuètes (moins appréciées, mais non périssables). Selon le temps passé avant la récupération de la nourriture, les geais étaient capables d'ajuster leur recherche : les larves, si peu de temps s'était écoulé, et les cacahuètes, dans le cas contraire, puisque les larves étaient alors avariées. Les auteurs ont réussi à créer un paradigme expérimental chez le geai, permettant de tester les 3 prérequis de la mémoire épisodique: le quoi (larve ou cacahuète), le où (localisation de l'aliment enfoui) et le quand (récent ou non) (Clayton and Dickinson, 1998; Clayton et al., 2003).

De nombreuses autres recherches ont également utilisé ce paradigme du quoi-où-quand, afin de tester la mémoire épisodique-like chez diverses espèces ; le rat, les singes, les seiches et même les dauphins (Babb and Crystal, 2006; Martin-Ordas et al., 2010; Jozet-Alves et al., 2013; Davies et al., 2022).

C. La mémoire spatiale

1. Généralités

La mémoire spatiale s'inscrit dans le cadre de la mémoire épisodique, car elle joue un rôle essentiel dans la création d'un contexte pour nos souvenirs personnels. Que ce soit chez les êtres humains ou les animaux, elle constitue un élément central de nos activités quotidiennes. Elle nous permet de différencier les divers itinéraires et lieux, ainsi que de reconnaître les objets qui nous entourent. Elle nous guide pour rentrer chez nous le soir, en trouvant le chemin le plus direct, surtout en présence de perturbations sur notre route habituelle, car nous élaborons une carte mentale que nous pouvons consulter mentalement. Chez les animaux, la mémoire spatiale revêt également une importance capitale, car elle est cruciale pour la survie des différentes espèces. Elle englobe la mémorisation de l'emplacement de leur terrier, de leur nid, de leur source de nourriture, ainsi que des chemins praticables tout en évitant les prédateurs. Toutes ces informations reposent sur la mémoire spatiale, sans laquelle la navigation et l'orientation dans la nature seraient impossibles. C'est pour toutes ces raisons que cette forme de mémoire est profondément enracinée dans le processus évolutif (Rodríguez et al., 2002).

L'étude de la mémoire spatiale chez le rongeur est couramment utilisée pour étudier les mécanismes sous-jacents à la mémoire épisodique, puisqu'ils possèdent de nombreux points en commun (Eichenbaum and Cohen, 2014). Que ce soit chez l'humain (Maguire et al., 2000) ou chez le rongeur (O'Keefe and Nadel, 1978), elle repose sur l'intégrité du fonctionnement de l'hippocampe (HIP).

Ces travaux sont essentiels puisqu'ils permettent de modéliser les dysfonctionnements associés à certaines pathologies psychiatriques ou neurodégénératives. Les études chez l'humain ou l'animal ont démontré que les mêmes structures anatomiques qui sous-tendent la mémoire déclarative chez l'humain sont également impliquées dans la mémoire spatiale (D'Hooge and De Deyn, 2001; Burgess et al., 2002; Stella et al., 2012).

2. Notion de carte cognitive et substrat biologique

L'HIP, structure clé impliquée dans la navigation, fonctionne à la manière d'un GPS interne, intégré. C'est Edward Tolman, qui en 1948, introduit le concept de carte cognitive, en référence à une représentation interne des indices allocentriques de l'environnement, nous permettant de s'y déplacer de manière efficace (Tolman, 1948). Cette idée a été confortée par

le fait que le codage de l'espace est sous-tendu par un ensemble cohérent de différents types de cellules dont l'activité est particulièrement nécessaire à l'orientation dans son environnement.

Pour réussir à naviguer entre deux points avec succès, il est d'abord nécessaire d'avoir une représentation de sa propre position, puisque le choix de la trajectoire dépendra de cette orientation actuelle. Cette représentation spatiale nécessite deux types d'informations essentielles : la localisation et la direction. Posséder une seule de ces informations, sans l'autre, limite grandement les chances de se déplacer efficacement.

Chez le rongeur des cellules spécialisées dans le traitement de ces informations ont été découvertes. Dans l'hippocampe, par exemple, certains neurones sont responsables du codage de la position dans l'espace et sont appelés "cellules de lieu" (O'Keefe, 1976). On retrouve ces cellules de lieu dans d'autres régions telles que le subiculum (Sharp and Green, 1994) et le cortex entorhinal (Quirk et al., 1992; Frank et al., 2000).

D'autres cellules codent chaque fois où l'on pointe sa tête vers le nord-est, quelle que soit notre position actuelle, elles sont connues sous le nom de "cellules de direction de la tête". (Taube et al., 1990; Taube, 1995, 2007). Découvertes dans le post-subiculum, elles ont été mises en évidence dans d'autres structures telles que le noyau antérodorsal du thalamus, l'hypothalamus ou encore le cortex entorhinal (Taube, 1995; Sargolini et al., 2006). Ainsi, les cellules de direction de la tête fonctionnent de manière similaire à une boussole, avec une activation toujours orientée dans une direction spécifique, peu importe notre emplacement actuel, mais, à la différence d'une boussole, elles ne dépendent pas du champ magnétique terrestre. Certaines cellules partagent des caractéristiques de codage à la fois de la localisation et de la direction de la tête, et peuvent être retrouvée dans les cortex pré et parasubiculaires (Cacucci et al., 2004).

On trouve également les cellules de la grille, qui codent l'environnement de manière géométrique. Ces cellules ont été identifiées dans le cortex entorhinal médian dorso-caudal (Hafting et al., 2005; Sargolini et al., 2006; Moser et al., 2014). Les cellules de la grille présentent une activation qui couvre l'ensemble d'un même environnement, formant ainsi un motif régulier et répétitif, à l'image d'une grille. Ces neurones pourraient s'avérer utile pour estimer des distances et suivre un itinéraire donné. Enfin, les cellules de la bordure ont été

décrites dans le cortex entorhinal, et, comme leur nom l'indique, codent les bordures de l'environnement, définissant les limites de ce dernier (Solstad et al., 2008).

Chez l'humain, les cellules de lieu, de la grille et quelques cellules pouvant s'apparenter à des cellules de direction de la tête ont également été mises en évidence (Ekstrom et al., 2003; Doeller et al., 2010; Jacobs et al., 2013; Shine et al., 2016), semblant confirmer que les processus de codage spatial de l'environnement sont très similaires entre primates et rongeurs. L'ensemble de ces données encourage l'idée que l'HIP et ses connexions / son réseau sont idéalement composés et positionnés pour sous-tendre la mémoire spatiale et les processus de navigation. Ce circuit est représenté en figure 2.

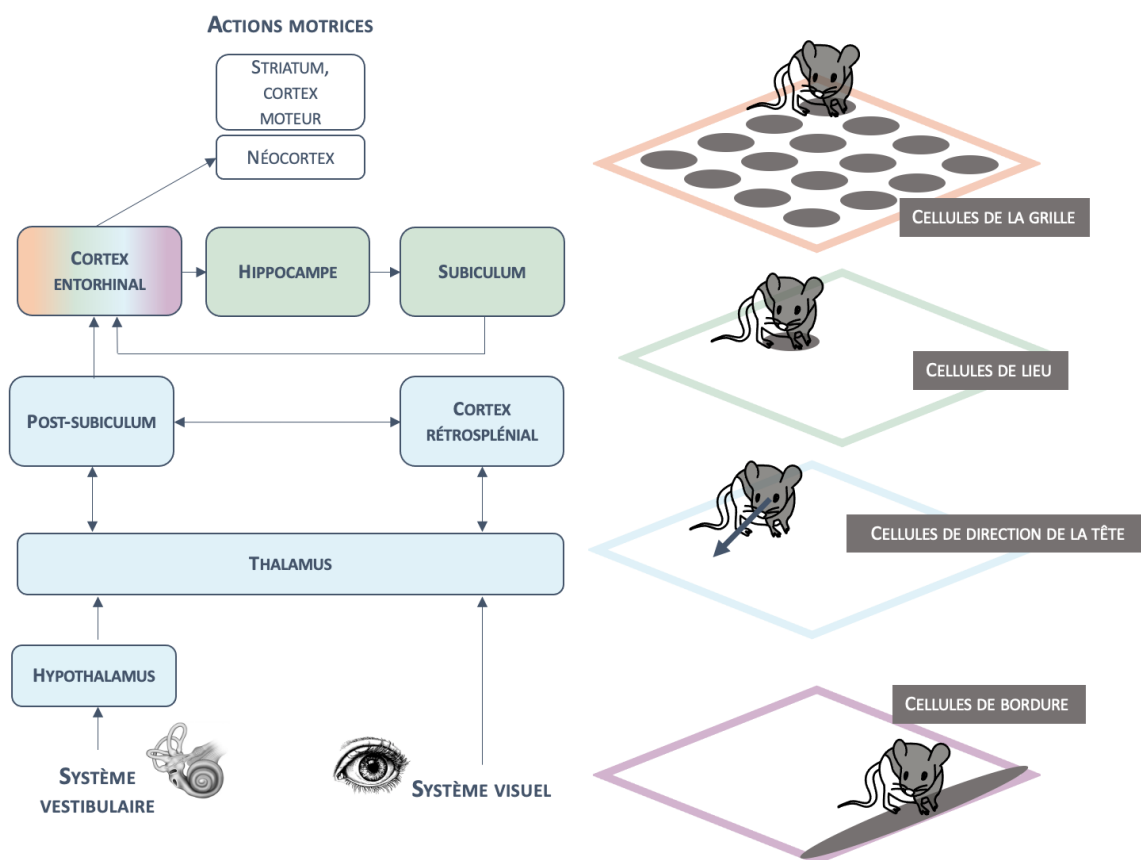


Figure 2. Système de fonctionnement de la navigation spatiale chez le rongeur

Les régions possédant des cellules de lieu, de direction de la tête et de la grille et des cellules de bordure sont représentées en vert, bleu, orange et violet respectivement. Le cortex entorhinal possède le réseau qui traite les différentes modalités relatives à la position du corps dans l'espace est représenté de manière simplifiée. L'hippocampe possède des cellules de lieux capable de coder une position spécifique dans l'environnement. Les autres structures avec lequel l'HIP interagit possède des cellules de la grille, de la bordure ou encore de direction de la tête, par exemple dans les cortex entorhinal, pré et post-subiculum. D'autres structures telles que le thalamus ou l'hypothalamus présentent également des cellules de direction de la tête. Le cortex entorhinal reçoit les informations relatives aux différentes directions, lui permettant probablement de les croiser avec les informations provenant des cellules de la grille et de bordure, avant de les transmettre à l'HIP. Ces informations lui sont transmises en retour, principalement via le subiculum. Ainsi, le cortex entorhinal est idéalement situé pour intégrer les différentes informations spatiales avant la réalisation d'un déplacement dans l'espace. Modifié de Burger et al 2010

stratégies de navigation. Dans le règne animal, la nécessité de parcourir parfois jusqu'à des milliers de km, cela dans le but de trouver de nouvelles ressources de nourritures ou encore de rechercher ses partenaires pour assurer la survie de l'espèce, a dispensé aux animaux diverses stratégies de navigation. Les chauves-souris utilisent par exemple l'écholocation, et donc l'utilisation d'ultrasons pour identifier leur environnement, même dans l'obscurité totale. Les oiseaux et animaux migrateurs peuvent se servir du soleil et des astres pour garder un cap, notamment au cours des migrations, et certains peuvent encore utiliser une sensibilité particulière au champ magnétique terrestre (magnétoréception), ou à la lumière polarisée. Concernant les humains, les primates et les rongeurs, deux stratégies principales, reposant sur deux systèmes neuroanatomiques distincts, existent.

Différents processus sont à l'œuvre quand il s'agit de s'orienter et naviguer dans l'espace qui nous entoure. Plusieurs stratégies sont envisageables et coopèrent afin de générer une représentation spatiale de notre environnement, selon la disponibilité des indices, mais aussi la familiarité du chemin emprunté.

3. Différentes stratégies de navigation : allocentrique et égocentrique

Le recours à une stratégie allocentrique repose sur la formation et l'utilisation de cartes cognitives qui codent les différents éléments qui constituent notre environnement, et les relations entre ces éléments. Cette stratégie permet une navigation flexible, autorisant une planification et adaptation rapide de nouvelles trajectoires (Tolman, 1948)

Chez l'animal, comme chez l'humain, la navigation allocentrique nécessite l'intégrité de l'hippocampe et des régions adjacentes (Morris et al., 1982; Maguire et al., 2000; Burgess et al., 2002). Les cellules de lieu de l'HIP pourraient représenter le substrat neuronal de la carte spatiale (O'Keefe and Dostrovsky, 1971).

La stratégie égocentrique se réfère aux informations relatives au corps de l'individu, telles que les informations proprioceptives (position du corps dans l'espace), et permet une navigation facile, quasi automatique, lors de l'emprunt d'un trajet connu. A l'inverse de la stratégie allocentrique, cette navigation égocentrique est très peu coûteuse cognitivement, mais est aussi beaucoup moins flexible. En conséquence, la navigation spatiale combine l'utilisation de ces

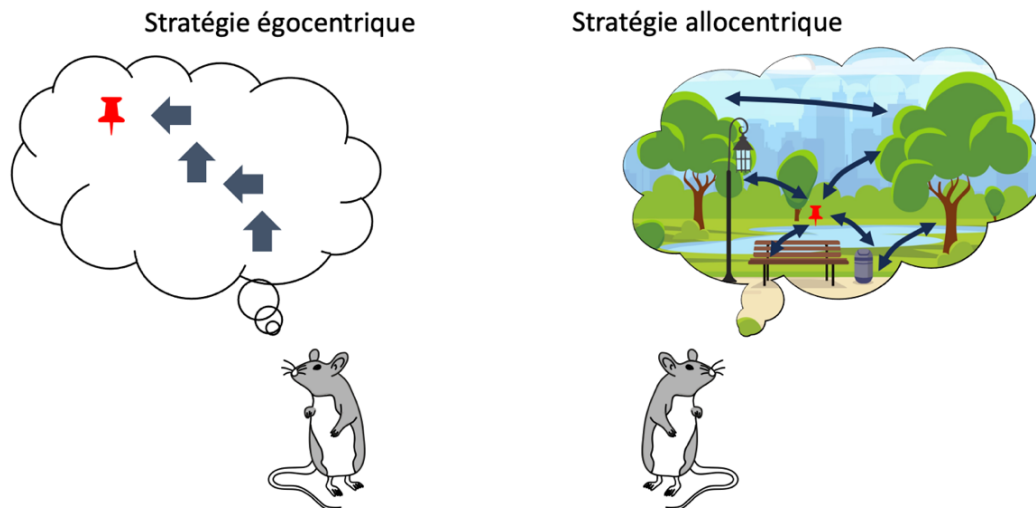


Figure 3. Stratégies de navigation dans l'espace.

Représentation simplifiée des différentes stratégies de navigation dans l'espace. La stratégie égocentrique fait référence à l'utilisation de sa propre position dans l'espace et permet de naviguer grâce à la mémorisation d'une séquence de mouvements. A l'inverse, la stratégie allocentrique fait référence à l'utilisation des indices présents dans l'environnement et à la capacité de mémoriser leur position les uns par rapport aux autres, pour créer une représentation, une carte cognitive, de son ensemble.

deux stratégies. (Packard and McGaugh, 1992, 1996). D'un point de vue neuroanatomique, le striatum est fortement engagé dans ces 2 types de stratégie de navigation. En effet, il possède des neurones dont l'activité est associée à une position, à la manière des cellules de lieu de l'HIP, mais qui peuvent être influencés par des éléments contextuels (Yeshenko et al., 2004; Gill and Mizumori, 2006). Il a été montré que l'activité de ces mêmes neurones est influencée par les mouvements passés ou à venir au sein d'une séquence apprise (Schmitzer-Torbert and Redish, 2004). Même en l'absence de projection directe du striatum dorsal vers l'HIP, l'inactivation du striatum dorsal perturbe l'activité hippocampique chez le rat, suggérant l'influence possible des neurones striataux sur l'activité hippocampique (Gengler et al., 2005). Cette notion renforce l'idée d'un système de navigation spatial complexe et intégré.

Chez le rongeur, il est possible de modifier la configuration des différents tests comportementaux, pour tester l'utilisation de l'une ou l'autre de ces stratégies (place pour allocentrée, ou réponse pour égocentrée). Aussi, dans certaines pathologies, seul un des deux systèmes neuroanatomiques peut être altéré, ce qui est le cas dans la maladie de Huntington par exemple, ou une atteinte du striatum entraîne des altérations précoces de la stratégie égocentrique. Au laboratoire, le développement du labyrinthe en Double-H permet de vérifier l'intégrité de ce système (Pol-Bodetto et al., 2011; Gasser et al., 2020; Alcalá-Vida et al., 2022).

4. Notion de flexibilités cognitive et comportementale

Lorsque nous naviguons dans un environnement inconnu, il est préférable d'adopter une stratégie allocentrique pour apprendre à nous repérer et à nous déplacer. L'apprentissage de la disposition de notre environnement demande des ressources cognitives considérables. C'est pourquoi, après un certain temps et la répétition du même trajet au quotidien, cette stratégie tend à être remplacée par une stratégie égocentrique, presque automatique, qui est beaucoup moins exigeante sur le plan cognitif. Si la stratégie égocentrique s'avère inefficace, par exemple lorsque la route habituelle est bloquée par un chantier, notre système est flexible et nous permet de basculer d'une stratégie à l'autre, ce qui démontre notre capacité à faire preuve de flexibilité cognitive. Cette flexibilité se traduit par notre aptitude à adapter nos réponses aux changements dans notre environnement externe ou interne. Cela signifie que nous pouvons interrompre notre comportement ou notre tâche actuelle pour les ajuster en fonction des modifications survenues. L'expression "flexibilité comportementale" désigne un comportement qui reflète un changement cognitif, par exemple, lorsque nous avons l'intention de prendre notre vélo pour aller au travail, mais que nous décidons de prendre le tramway en voyant qu'il pleut (Brown and Tait, 2010).

D. Évaluer la mémoire spatiale

Afin d'étudier la mémoire spatiale, il est nécessaire d'évaluer les aptitudes de l'animal à s'orienter dans l'espace. Divers tâches et paradigmes ont été développés pour permettre d'évaluer les capacités mnésiques de navigation des animaux. Seuls les tests utilisés chez le rongeur seront évoqués dans ce manuscrit. Dans la plupart des paradigmes, c'est la règle qui va déterminer le type de mémoire évalué : mémoire de travail, ou mémoire de référence.

1. Mémoire spatiale de travail et mémoire spatiale de référence

Chez l'animal on distingue usuellement la mémoire spatiale de référence, de la mémoire spatiale de travail (Olton and Paras, 1979). La mémoire spatiale de référence appartient au registre de la mémoire à long terme, et concerne les tâches durant lesquelles l'information reste valable/pertinente pour chaque session d'apprentissage/test. A l'inverse, dans une tâche de mémoire de travail spatiale, l'information à maintenir en mémoire n'est valable que pour la durée d'une session, et se voit modifiée lors de la session suivante.

Dans un labyrinthe radial à huit branches, il est possible de modéliser ces deux types de traitement de l'information, en ne renforçant que 4 des 8 branches. La configuration des branches appâtées reste la même durant plusieurs jours. L'animal doit ainsi se rappeler quelles branches sont appâtées (mémoire de référence), mais aussi lesquelles il a déjà visité au cours de l'essai en cours (mémoire de travail) (Jarrard, 1983). Ces deux systèmes sont indépendants, et reposent sur différents mécanismes neuronaux dans l'HIP ; mais ils peuvent également coopérer (Schmitt et al., 2003; Guitar and Roberts, 2015).

Dans cette thèse, ces deux sous-types de mémoire spatiale ont été étudiées, la mémoire de travail (MT) est au centre de la première partie de mon travail de recherche, et la mémoire de référence y sera abordée dans une seconde partie.

a) Labyrinthe radial

Le labyrinthe radial est constitué de huit bras, au milieu desquels se trouve une plateforme centrale (Olton and Samuelson, 1976). La motivation des animaux à réaliser la tâche repose sur la consommation de nourriture ou d'eau au bout de chaque bras. Pour susciter suffisamment de motivation lors des tests, les animaux sont soumis à une restriction alimentaire ou hydrique, de sorte à atteindre un poids de 15% inférieur au poids initial. Plusieurs protocoles existent, le plus classiquement utilisé pour tester la mémoire de référence spatiale (MRS) est le suivant ; l'animal doit apprendre, pendant plusieurs jours, à visiter les différents bras du dispositif, où certains (toujours les mêmes) sont récompensés. L'avantage de ce test est qu'il permet d'évaluer à la fois la mémoire de référence spatiale (MRS) et la mémoire de travail spatiale (MTS). Le type d'erreur (entrer à nouveau dans un bras déjà visité) indique quel type de mémoire est impacté. La visite d'un bras non récompensé lors de l'entraînement indique une erreur de MRS (la règle n'est pas respectée), tandis que la visite d'un bras déjà visité au cours de l'essai en cours indique une erreur de MTS (nécessité de maintenir en mémoire les bras visités au cours de l'essai).

Un autre protocole, spécifiquement utilisé pour tester la MTS, est celui du win-shift, utilisé notamment par Hembrook et Mair en 2011 (Hembrook and Mair, 2011). Il repose sur le principe des tâches catégorisées comme « Delayed non-matching to sample ». Lors du premier essai, le rat est autorisé à visiter 4 bras, les 4 autres sont fermés. Une fois les 4 récompenses alimentaires récupérées, le rat est replacé dans sa cage pendant quelques

secondes. Lors du test, l'ensemble des bras sont ouverts, mais seuls les quatre bras fermés lors de l'échantillonnage sont récompensés. L'entrée dans un bras ouvert lors de l'essai précédent, ou la visite répétée d'un bras sont considérées comme des erreurs.

Pour résoudre la tâche, l'animal va devoir recourir à l'utilisation des indices présents dans la pièce, et donc à une stratégie allocentrique.

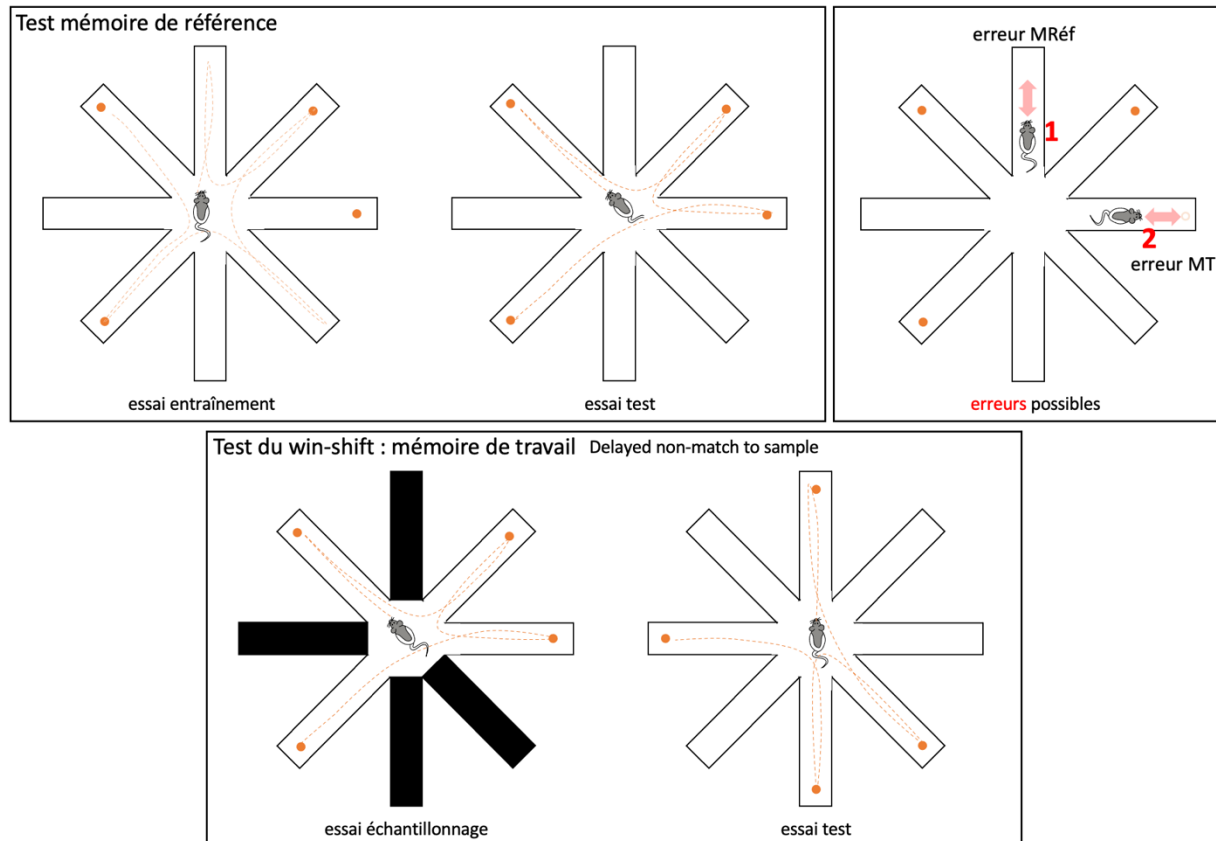


Figure 4. Le labyrinthe radial

Différents protocoles utilisés pour tester la mémoire spatiale de référence ou de travail chez le rongeur. Les points orange représentent les récompenses alimentaires. **Mémoire de référence** : Lors de l'entraînement, le rat est placé au centre du labyrinthe et apprend à ne visiter que les bras appâtés. Une fois les 4 récompenses récupérées il est replacé dans sa cage avant le test. Lors du test, on peut quantifier des erreurs de référence : une réentrée dans un bras non appâté lors de l'entraînement, ou une erreur de mémoire de travail : en réentrée dans un bras déjà visité pendant l'essai en cours. **Test du win-shift** : Ce test, issu du protocole de [Hembrook et Mair en 2011](#), permet de tester la mémoire de travail spatiale. Pour cela, lors de l'essai d'échantillonnage, seuls 4 des 8 bras sont accessibles et appâtés, les autres sont fermés (en noir). Durant le test, les 8 bras sont ouverts, mais seuls les 4 bras fermés lors de l'échantillonnage sont appâtés.

b) La piscine de Morris

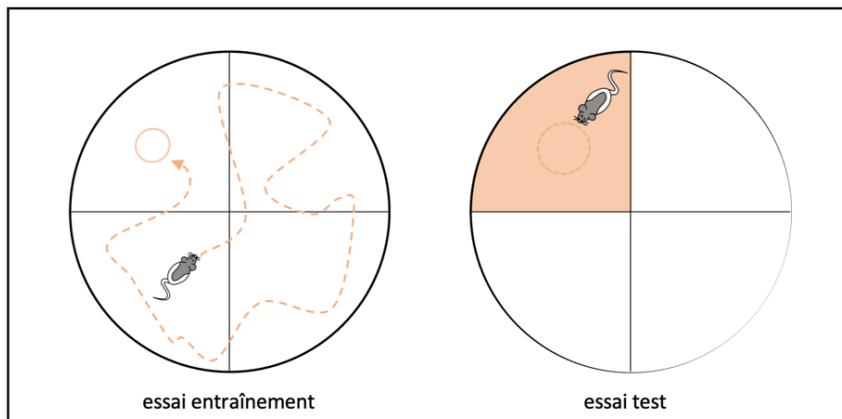


Figure 5. La piscine de Morris

La piscine de Morris est un dispositif utilisé pour tester la mémoire spatiale de référence chez le rongeur. Lors des sessions d'entraînement, l'animal est déposé dans l'eau de manière par différents points de lâcher. Une fois dans l'eau fraîche, le seul moyen d'en sortir est de trouver la plateforme immergée, dont la position reste fixe. Au fur et à mesure des essais, l'animal acquiert une représentation spatiale grâce aux indices allothétiques de la pièce et se rendent directement à la PF quelque soit le point de lâcher. Lors de l'essai test, ou probe test, on mesure le temps passé dans le quadrant cible, là où se trouvait la PF lors de l'acquisition pour traduire la persistance du souvenir.

L'un des tests les plus utilisés pour tester la mémoire spatiale est celui de la piscine de Morris. C'est ce test que nous avons choisi d'utiliser au laboratoire dans le cadre des expériences portant sur la MRS et la consolidation des souvenirs. Il sera donc davantage détaillé dans la partie Matériels et Méthodes. Rapidement, ce test a été

inventé en 1981 par Richard Morris, et repose sur l'aversion de l'eau fraîche par les rongeurs, ce qui va les motiver à résoudre la tâche (Morris et al., 1986). Cependant, comme l'eau fait partie de l'environnement naturel des rats, ce test est écologique, et ne nécessite donc pas de restriction alimentaire ou hydrique, pouvant induire un stress ou une altération des rythmes, et *in fine* agir sur les processus mnésiques. Le principe de la tâche repose sur l'intégration par l'animal des différents indices allothétiques de la pièce pour apprendre la position d'une plateforme (PF) immergée. Si l'on s'intéresse à la MRS, la position de la plate-forme reste constante pendant l'intégralité de l'entraînement (au minimum 3 jours pour un souvenir durable). Lors du rappel (essai test), la plateforme est retirée et sur une minute, on mesure différents paramètres, tel que le temps passé dans le quadrant où se trouvait la plateforme lors de l'acquisition, la latence avant de croiser la position virtuelle de la plateforme, ou encore le nombre de croisement de l'annulus, zone élargie de 10 cm par rapport à la plateforme, indice de précision de la mémoire. Si l'on s'intéresse à la MTS, la position de la PF est modifiée chaque jour, de sorte que l'information de sa position ne soit valable qu'au cours d'une session de deux essais généralement séparés par un délai court. Le premier essai consiste en

l'échantillonnage pour trouver la position de la PF, et après quelques secondes / minutes, lors du second essai, on mesure la latence d'accès pour retrouver la PF.

c) *Le labyrinthe de Barnes*

Le labyrinthe de Barnes est formé par une plateforme circulaire, percée par 18 trous circulaires espacés régulièrement le long autour de la circonférence (Barnes, 1979).

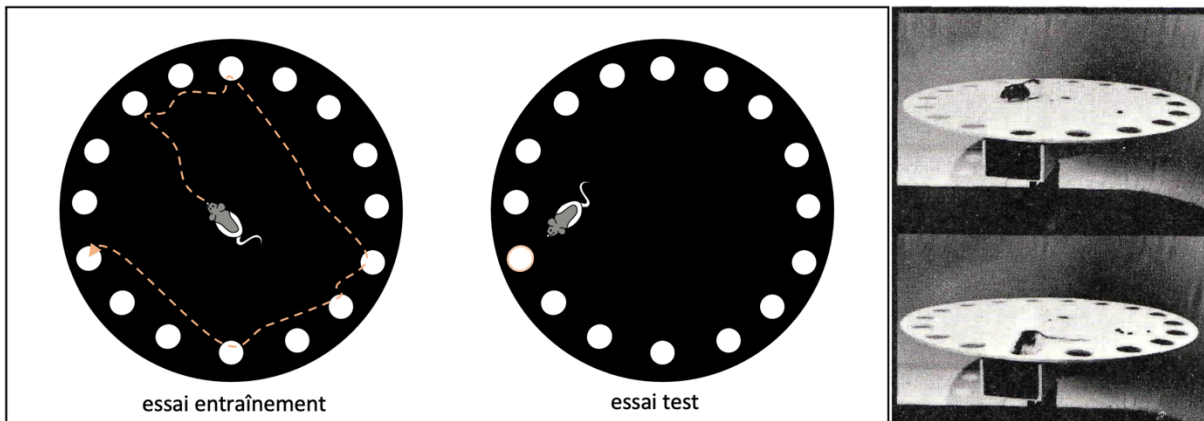


Figure 6. Le labyrinthe de Barnes

Placé au centre du dispositif, l'animal doit retrouver l'unique trou refuge lui permettant de retourner dans sa cage. Photographies d'un rat sur le dispositif, issues de Barnes, 1979.

Une forte luminosité, situation désagréable pour les rongeurs qui préfèrent les espaces sombres et couverts, va motiver l'animal à trouver l'unique trou menant à sa cage. Ce test repose sur l'utilisation d'une stratégie allocentrique, puisque l'animal va devoir utiliser les différents indices visuels de la pièce pour se repérer et retrouver le trou refuge. Lors du test sont mesurés les temps de latence avant de trouver le trou refuge ainsi que le nombre de trous visités. Ce test est écologique puisqu'il repose sur la nature innée des rongeurs à préférer les espaces sombres et couverts (pour échapper aux prédateurs).

d) Le T-Maze / Y-Maze

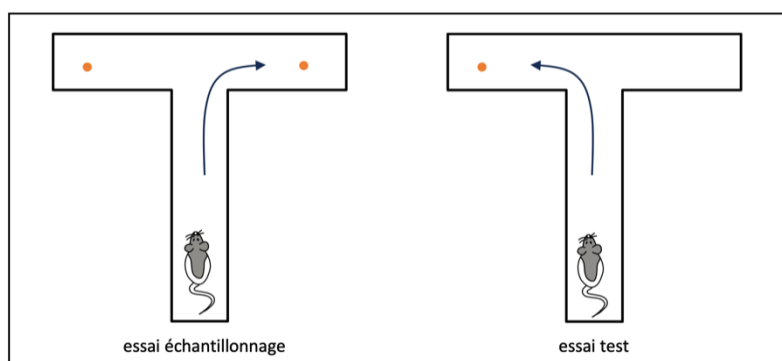


Figure 7. Le labyrinthe en T.

Lors de l'entraînement, les animaux sont lâchés de la base du T, avant de parcourir l'allée centrale et choisir l'un ou l'autre bras pour y récupérer la récompense. Lors de l'essai test, il doit se rendre dans le bras non visité lors de l'essai d'échantillonnage. On peut également parler d'alternance forcée lorsque le choix lors de l'essai d'échantillonnage est forcé par la fermeture d'un bras.

Le labyrinthe en T est probablement le paradigme le plus couramment choisi pour évaluer la mémoire de travail spatiale. Tolman a été l'un des premiers expérimentateurs à utiliser un labyrinthe en T et a décrit la tendance « très prononcée » des rats à alterner leurs entrées dans les bras lors d'essais successifs (Tolman, 1925). Le rat est d'abord placé à la base du T, il remonte l'allée centrale et entre dans l'un des bras du T, au bout duquel il va pouvoir y trouver une récompense. Le rat est récupéré par l'expérimentateur et replacé à la base du T. Généralement, le rat remonte l'allée centrale et entre dans le bras du T dans lequel il n'était pas entré lors du premier essai : c'est-ce qu'on appelle l'alternance. L'ajout d'un court délai entre l'essai d'échantillonnage et l'essai test nécessite une MTS fonctionnelle, et est impossible chez des rats dont l'HIP est inhibé ou lésé, et ce dès 15 sec de délai entre les 2 essais (Dudchenko et al., 2000). Si l'entrée dans un bras est bloquée lors de l'essai d'échantillonnage, la tâche est appelée « alternance à choix forcé ».

e) Le Double-H

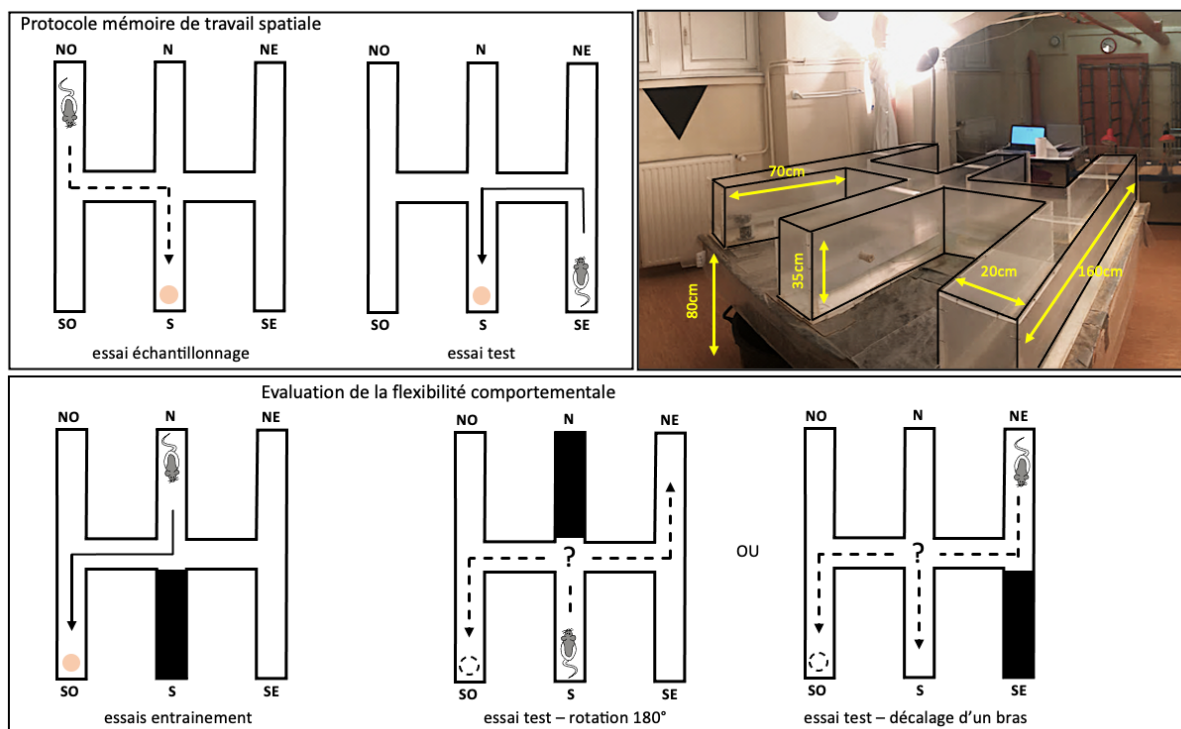


Figure 8. Le Double-H, différents protocoles

Dans un protocole classique de MTS, la session consiste en 2 essais, le premier va permettre de localiser la PF, et le second évalue la capacité de l'animal à la retrouver le plus efficacement possible. D'une session à l'autre la position de la PF est modifiée, et les bras de départ le sont à chaque essai. Dans un protocole d'évaluation de la flexibilité comportementale, on entraine l'animal à effectuer la même séquence motrice sur plusieurs jours, pour retrouver la PF (ici N à SO, soit un virage à droite, puis un virage à gauche). Lors du test, une modification radicale de la perspective environnementale (rotation de 180°), ou à l'inverse une très légère et difficilement perceptible (décalage d'un bras), permet d'évaluer la stratégie de l'animal. Il peut soit répéter la séquence apprise lors de l'entraînement droite, puis gauche, soit utiliser les indices spatiaux de la pièce pour effectivement retrouver la PF. (Pol-Bodetto 2011)

Afin de contrôler la stratégie que l'animal va pouvoir développer lors de l'apprentissage, le Double-H a été inventé par JC Cassel au laboratoire, en 2008 (Kirch et al., 2015). Le labyrinthe est constitué de 6 bras formant deux H imbriqués, d'où son appellation. Il est rempli d'eau opaque fraîche, son principe est le même que celui de la piscine de Morris, retrouver une plateforme immergée. Il permet ainsi d'éviter une restriction alimentaire des animaux. Grâce à sa configuration, le double-H permet à l'expérimentateur de manipuler et analyser précisément la stratégie allo-ou égocentrique empruntée par le rat, ainsi que le changement de stratégie pour passer de l'une à l'autre.

E. Neuroanatomie de la mémoire spatiale

Bien que de nombreuses tentatives aient été faites pour découvrir les circuits neuronaux sous-tendant la formation de la mémoire spatiale et la navigation, de nombreuses questions restent sans réponse sur la manière dont le cerveau accomplit ce phénomène. Même s'il est largement admis que l'HIP a un rôle majeur dans le traitement d'informations spatiales, il n'est pas le seul impliqué.

La mémorisation d'un emplacement peut découler de deux processus de mémoire distincts, correspondant approximativement à deux étapes différentes de la navigation spatiale. D'abord, les informations concernant l'emplacement à rejoindre doivent être extraites de la MLT. Cependant, pour être effectivement utilisées, elles doivent également être maintenues dans une mémoire de travail afin de garantir la planification et l'exécution d'une trajectoire adéquate. Le cortex préfrontal semble être impliqué dans ces deux aspects. (Poucet and Benhamou, 1997; Poucet and Hok, 2017).

1. Implication du CPFm

Le cortex préfrontal médian (CPFm) est connu pour son implication cruciale dans les fonctions exécutives, telles que la prise de décision, les comportements orientés vers un but, et la mémoire de travail (Kolb, 1990; Goldman-Rakic, 1995; Miller et al., 2002; Kesner and Churchwell, 2011). Des lésions ou inactivations du CPFm empêchent la réalisation de tâches en MTS (Kolb, 1990; Delatour and Gisquet-Verrier, 1999; Kesner, 2000; Gisquet-Verrier and Delatour, 2006).

En enregistrant l'activité électrique des neurones dans le CPFm, certains auteurs ont pu mettre en évidence des corrélats comportementaux de cette activité lors de tâches de mémoire de travail. Par exemple, certains neurones voient leur activité augmenter de manière soutenue, uniquement lors du délai, dans une tâche d'alternance spatiale, nécessitant que les informations soient conservées pendant un intervalle temporel court. Au-delà de l'activité neuronale, la connectivité fonctionnelle qui les lie est également associée à de meilleures performances en MT. Baeg et collaborateurs ont observé une baisse de l'activité neuronale du CPFm au fil des jours d'apprentissage, mais une constance de l'activité accrue observée pendant le délai. Ceci renforce l'idée que les informations traitées en mémoire de travail sont représentées par des modifications de la force synaptique entre les neurones du CPFm (Baeg et al., 2007). Cette activité persistante des neurones préfrontaux est décrite comme la

signature neuronale des processus en lien avec la mémoire de travail ([Goldman-Rakic, 1995](#); [Miller et al., 2002](#)).

2. Implication de l'HIP

Dans la tâche classique d'alternance spatiale en labyrinthe en T (décrite plus haut), l'ajout d'un délai entre l'essai d'échantillonnage et l'essai test (delayed alternation) rend la tâche dépendante de l'HIP, contrairement à la version continue de la tâche (continuous alternation) ([Rawlins and Olton 1982](#) ; [Ainge et al 2007](#)). Dans cette même tâche, [Hallock et Griffin en 2013](#) ont montré que des neurones de l'HIP dorsal présentaient une activité particulière lors du délai, dépendamment de la trajectoire future ([Hallock et al., 2013](#)), semblant anticiper le comportement à venir (tourner à gauche vs tourner à droite). D'une manière intéressante, une idée récente suggère que les processus de mémoire et de planification pourraient, d'un point de vue évolutif, découler de mécanismes originellement dédiés à la navigation. L'HIP serait donc à la fois impliqué dans la navigation spatiale, mais aussi dans la navigation mentale à travers l'espace et le temps ([Buzsáki and Moser, 2013](#))

Si le CPFm semble être suffisant à la réalisation de tâches en MTS, lors de l'ajout d'un délai qui nécessite de maintenir les informations d'ordre spatial en mémoire, le rôle de l'HIP devient indispensable. En 2003, [Lee et Kesner](#) ont étudié la dynamique des interactions entre l'HIP et le CPFm dans une tâche de MTS en labyrinthe radial, en combinant lésions et inactivations au muscimol (un agoniste des récepteurs GABA_A). Si le CPFm suffit à réaliser la tâche à un délai court (10sec), l'ajout d'un délai intermédiaire (5min) nécessitait l'intégrité de l'HIP ([Lee and Kesner, 2003](#)).

3. Implication des interactions CPFm et HIP

Finalement, plusieurs auteurs ont décrit l'importance de l'interaction entre l'HIP et le CPFm en MTS mais aussi en MRS. Une augmentation de la cohérence/synchronicité entre l'HIP et le CPFm a été associée à de meilleures performances, que ce soit en MTS ou en MRS ([Negrón-Oyarzo et al., 2018](#); [Hauer et al., 2019](#)). Ces interactions sont d'autant plus essentielles que le délai est long ([Churchwell and Kesner, 2011](#)). Plusieurs hypothèses ont été faites concernant l'interprétation d'une telle synchronisation sur le plan comportemental. Certains supposent que l'activité synchrone des neurones hippocampiques et préfrontaux facilite le transfert d'informations essentielles à l'exécution d'une tâche. Par exemple, des informations sur la localisation spatiale et la contingence des récompenses pourraient être transférées à partir de l'HIP pour être utilisées par les mécanismes de prise de décision du CPFm ([Gordon, 2011](#)).

Aussi, la synchronisation de l'activité neuronale est supposée assurer le transfert d'informations entre différentes régions, en coordonnant l'ouverture de fenêtres temporelles idéales pour favoriser la communication (Fries, 2005).

Lorsque l'on fait référence à la MRS, la coopération de l'HIP et du CPFm est plus établie, et théorisée, et sera développée dans la partie consacrée à la persistance du souvenir.

II. La persistance d'un souvenir

Parmi le flux constant d'informations que nous recevons au cours des expériences que nous vivons, il est essentiel de comprendre que tous ces éléments ne sont pas immédiatement enregistrés en mémoire. Pour qu'un souvenir soit stocké de manière durable, il doit passer par un processus de consolidation. Ce processus repose sur une modification des connexions entre les neurones activés à la suite d'une expérience, ce qui est communément appelé la consolidation synaptique. Ce processus de consolidation synaptique se déroule sur une échelle de temps relativement courte, allant de quelques minutes à quelques heures après l'encodage de l'information. Un autre type de consolidation de la mémoire existe, qui s'étend sur une période beaucoup plus longue. Il s'agit de la consolidation systémique. Celle-ci implique une réorganisation des circuits cérébraux après l'encodage initial de l'information. Ce processus de consolidation systémique s'étale sur plusieurs semaines/mois pour assurer que les souvenirs deviennent solidement ancrés dans notre mémoire à long terme.

A. Le support du souvenir

L'engramme est défini comme le substrat physique de la trace mnésique dans le cerveau (Dudai, 2004; Josselyn and Tonegawa, 2020). Le terme « engramme » a été introduit pour la première fois par le biologiste allemand Richard Semon, qui a postulé que l'encodage en mémoire active une population de neurones qui subissent des modifications chimiques et/ou physiques persistantes pour former et stocker les informations acquises sous forme d'un engramme (Schacter et al., 1978). La réactivation de l'engramme induirait alors le rappel (Tonegawa et al., 2015). Au cours des dernières décennies, les techniques modernes d'étiquetage des engrammes ont permis la visualisation, la manipulation et l'isolement d'ensembles neuronaux à une résolution cellulaire, transformant ainsi la proposition théorique de Semon en une réalité validée expérimentalement (Yip and Gräff, 2023).

Les connexions synaptiques entre les cellules de l'engramme représentent le substrat de la mémoire (Yang et al., 2009). Vetere et ses collègues ont fait le pari qu'il devait être possible d'implanter artificiellement un souvenir lié à un événement n'ayant jamais été vécu. Les glomérules olfactifs constituent le bulbe olfactif et, chez le rongeur, ils sont complètement caractérisés, de telle sorte que l'on connaît la cartographie des glomérules : chaque type d'odeur est spécifiquement associée à un glomérule. Stimuler grâce à l'optogénétique l'un de ces glomérules permet de déclencher la sensation artificielle d'une odeur chez une souris. Les auteurs ont ainsi stimulé un glomérule, associé à l'odeur d'orange, et l'ont couplée avec une seconde stimulation, de nature aversive ou appétitive. Une fois les stimulations répétées, l'odeur naturelle d'orange a été présentée aux souris pour la première fois, et les chercheurs ont quantifié le comportement des rongeurs. Lorsque l'odeur artificielle a été associée à la stimulation appétitive, cette présentation déclenchait une approche vers la source de l'odeur, et à l'inverse un évitement lorsqu'elle avait été associée à la stimulation aversive. Les auteurs ont manifestement réussi à créer un souvenir artificiel, en l'absence de toute expérience réelle impliquant une véritable odeur (Lewis, 2019; Vetere et al., 2019)

Les avancées les plus récentes, telles que la clarification/transparisation des tissus, avec des techniques comme CLARITY et iDISCO, permettent une visualisation globale et inédite d'images 3D sur l'ensemble d'un tissu, ce qui peut potentiellement dévoiler des détails structurels inconnus et apporter une nouvelle vision de l'architecture neuronale des différents circuits cérébraux.(Chung et al., 2013; Renier et al., 2014). Ces progrès inédits ont permis la cartographie des engrammes à l'échelle du cerveau (Renier et al., 2016; Schneeberger et al., 2019; Roy et al., 2022). La visualisation de l'engramme repose sur l'expression immédiate de

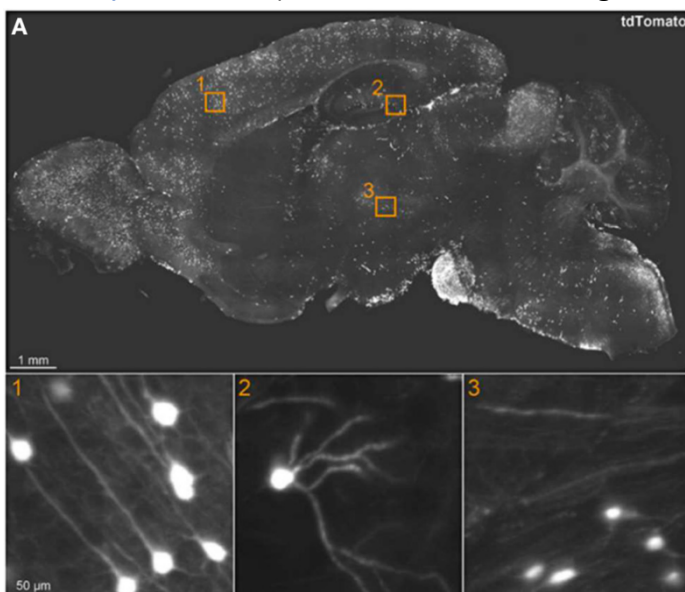


Figure 9. Un engramme "brain-wide", Yip et Graff 2023

Visualisation d'un engramme à l'échelle du cerveau grâce à la combinaison de technique de transparisation et de tagging neuronal. (A) Vue sagittale d'un cerveau de souris à partir d'une image 3D du cerveau transparisé à la suite d'un protocole permettant de « tagger » les neurones alloués à l'engramme lors d'un conditionnement de peur au contexte, dans le 1) cortex, 2) gyrus denté et 3) thalamus. Issu de Yip et Gräff 2023.

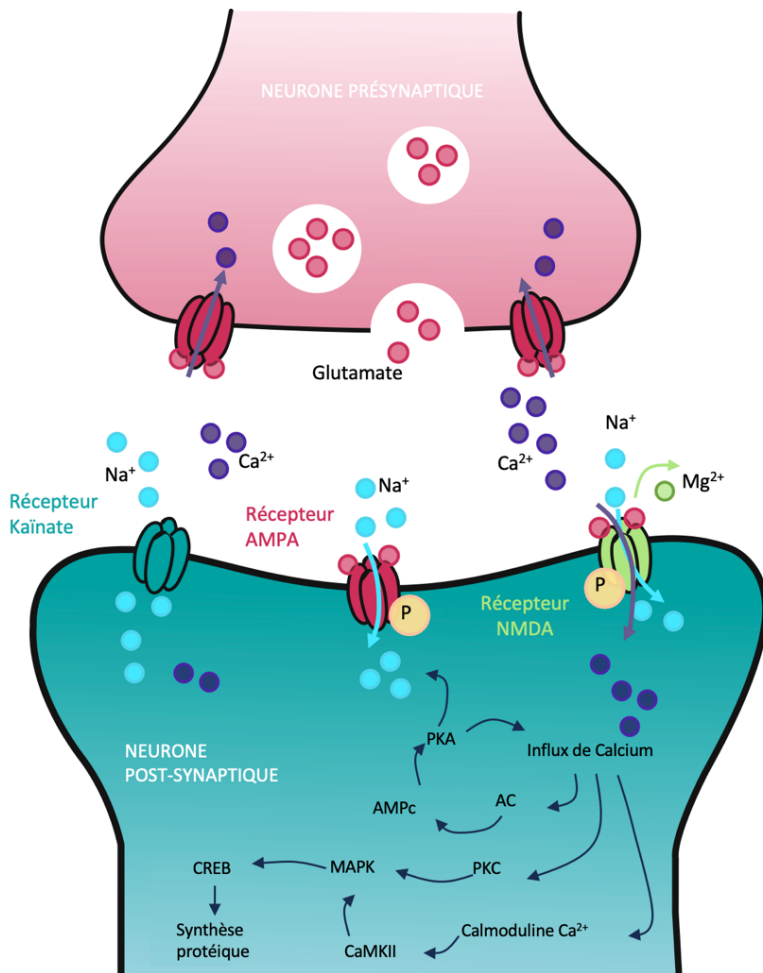
gènes précoces (tel que cFos, Arc ou Zif268), qui marquent les neurones dont l'activité neuronale est augmentée. En utilisant des protéines rapportrices fluorescentes sous l'influence de promoteurs de ces gènes précoces immédiats, les cellules activées par l'encodage peuvent ainsi être marquées durablement. Ajouter à cela une fenêtre temporelle qui définit l'expression de la protéine rapportrice permet de cibler les cellules précisément activées lors de la tâche de mémoire. Les cellules engagées lors du rappel du souvenir peuvent à leur tour devenir visualisables par un marquage immunohistochimique ultérieur de cette même protéine c-fos. La réactivation de l'engramme peut alors être mesurée comme la colocalisation des deux marquages, critère fondamental pour qu'une cellule soit qualifiée de cellule de l'engramme (Yip and Gräff, 2023).

Même si une assemblée neuronale constitue le substrat physique de la trace mnésique, celle-ci n'est pas immuable dans le temps. En réalité, les structures cérébrales sous-jacentes à un souvenir peuvent évoluer grâce aux processus de consolidation et/ou de reconsolidation de la mémoire (Dudai, 2004; Frankland and Bontempi, 2005). Ces processus permettent aux souvenirs de s'adapter, de se renforcer ou même de se modifier en réponse à de nouvelles expériences, contribuant à la plasticité de la mémoire.

B. Consolidation à l'échelle de la synapse

La consolidation synaptique est universelle et permet le stockage d'un souvenir en mémoire à long terme. Dès les premières minutes qui suivent un apprentissage, un mécanisme de

Figure 10. Événements et voies de signalisation participant à la plasticité synaptique



Différents événements participent au renforcement de la synapse et à la potentialisation à long terme : les potentiels d'action arrivant à la terminaison pré-synaptique créent un influx de calcium Ca^{2+} à travers les canaux calciques sensibles au voltage, entraînant la libération de Glutamate dans la synapse. Une fois fixé à ses récepteurs post-synaptiques AMPA et kainate le Glutamate les active, induisant une entrée de sodium Na^+ dans le neurone post-synaptique. La membrane post synaptique est alors dépolarisée. Lors de la dépolarisation, les ions magnésium Mg^{2+} sont éliminés des récepteurs canaux NMDA, permettant ainsi l'entrée de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique, ce qui induit l'activation d'enzymes Ca^{2+} dépendantes, telles que l'adénylate cyclase AC, les protéines kinases, la calmoduline-dépendante CaMKII, la protéine kinase C PKC, et la voie des protéines kinases MAPK (mitogen-activated en anglais). Ces voies de transduction activées vont aboutir à la transcription de gènes précoces. L'activation rapide et transitoire de ces gènes se traduit par une modification des gènes tardifs par la suite. Ces gènes cibles commandent la synthèse de protéines effectrices qui vont stabiliser les changements synaptiques et conduire à la formation de nouvelles synapses. Modifié de Korte et Schmitz 2016.

plasticité se mettra en oeuvre au niveau des synapses, permettant *in fine* de faciliter la transmission de l'information ; on parle de potentialisation à long terme ou LTP (pour *long term potentiation*). L'arrivée d'informations à la synapse va déclencher une cascade de réactions intracellulaires, conduisant à l'activation de facteurs de transcription qui vont moduler l'expression de gènes précoces d'abord, puis de gènes tardifs, induisant des modifications de la plasticité fonctionnelle et structurelle de la synapse (e.g., augmentation du nombre de récepteurs sur la membrane). L'un des facteurs de transcription les plus documentés est CREB (*protéine de liaison aux éléments de réponse AMPc*). Il interagit directement avec l'ADN par sa fixation aux éléments de réponse, induisant la transcription de certains gènes. CREB régule l'activité neuronale dans diverses régions cérébrales, et peut ainsi

réguler quels neurones seront alloués à l'engramme. Plus précisément, les neurones exprimant CREB en grande quantité sont préférentiellement recrutés dans l'engramme, tandis que les neurones déficients en CREB sont activement inhibés (Guskjolen and Cembrowski, 2023). Les mécanismes sous-tendant la consolidation synaptique sont très nombreux et ont été détaillés dans plusieurs revues (Dudai, 2004; Korte and Schmitz, 2016). Un schéma simplifié de ces processus moléculaires est illustré dans la **Figure 10**. L'application de cette plasticité synaptique à l'échelle des réseaux neuronaux sous-tend la mémoire à long terme.

C. Consolidation à l'échelle des systèmes

L'étude des patients atteints d'amnésie rétrograde (les souvenirs acquis de manière antérieure au traumatisme sont perdus) ont permis d'amener les principales preuves d'une réorganisation de la trace mnésique. En effet, ces patients présentaient une perte de mémoire plus importante pour les souvenirs récents, tandis que les souvenirs les plus anciens semblaient être conservés. Cette gradation dans la force de la trace mnésique repose sur la célèbre loi de la régression énoncée par Théodule Ribot en 1882. Cette loi posait que plus les souvenirs vieillissent, plus ils deviennent résistants. L'étude la plus célèbre (déjà citée plus haut), est celle du patient HM (Henri Molaison, son vrai nom fut divulgué après sa mort, en 2008), dont la résection bilatérale du lobe temporal médian, le plongea dans un présent continu/infini. L'étude de ce cas permit de mettre le doigt sur l'importance capitale du lobe temporal médian, particulièrement sur celle de l'hippocampe dans la formation de la mémoire déclarative. Cependant, HM possédait encore des souvenirs de son enfance, suggérant un désengagement de l'HIP pour les souvenirs les plus anciens. Plusieurs théories ont ainsi vu le jour pour tenter d'expliquer les réorganisations spatio-temporelles de la trace mnésique à travers différentes structures cérébrales, pour en permettre la pérennité. Toutes s'accordent sur un aspect, celui d'un échange d'informations entre l'HIP, dont l'implication est indispensable à l'encodage et la restitution des informations après une courte période de temps, et les aires corticales.

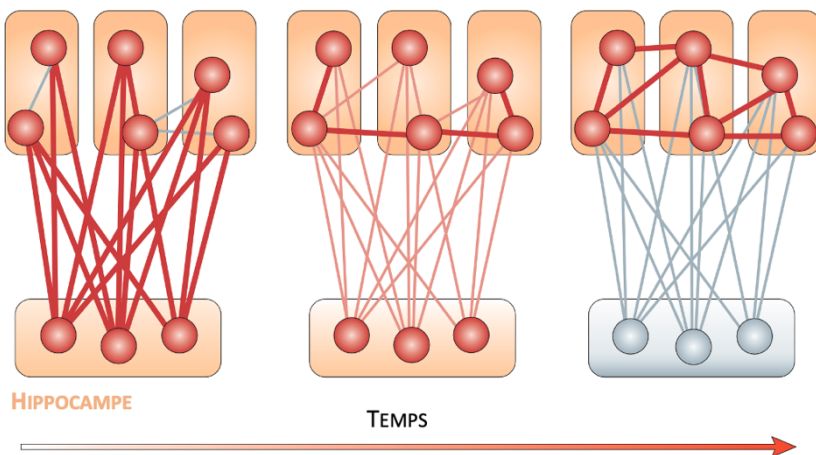
1. Théorie standard de la consolidation

Marr fut le premier, en 1971, à formuler le modèle standard de consolidation systémique. Il suggéra que l'HIP pouvait stocker rapidement les informations, les maintenir en mémoire temporairement, avant qu'elles soit transférées au néocortex pour une réorganisation, une reclassification ultérieure et un stockage à long terme. Le transfert de ces informations de l'HIP vers le néocortex aurait lieu notamment au cours du sommeil, par un processus de « replays » (réactivations). Ces réactivations des circuits hippocampo-corticaux se produiraient de manière répétée pendant le sommeil (processus de type « off line ») pour permettre l'intégration progressive de l'essentiel des nouvelles représentations dans des réseaux de mémoire à long terme préexistants, sans effacer les souvenirs plus anciens

Figure 11. Modèle standard de la consolidation

MODÈLE STANDARD DE LA CONSOLIDATION

MODULES CORTICAUX



Lors de l'encodage, les différents modules corticaux traitent les informations en provenance des différents sens (odorat, ouïe, vision, mais aussi proprioception ...), que l'HIP va intégrer en une représentation cohérente, ou trace mnésique. Les réactivations successives du réseau hippocampo-cortical, particulièrement pendant le sommeil, vont favoriser le renforcement des connexions cortico-corticales, jusqu'à devenir indépendantes de l'HIP. D'après Frankland et Bontempi, 2005.

(Diekelmann and Born, 2010).

Ce modèle est qualifié de standard, puisqu'il énonce les bases du fonctionnement de la consolidation, apportant les principaux fondements rediscutés et revus dans plusieurs modèles par la suite ((Squire and Alvarez, 1995; Frankland and Bontempi, 2005).

2. Théorie des traces multiples

Nadel et Moscovitch ont voulu compléter la théorie proposée par Marr, puisqu'elle présentait quelques incohérences avec certains cas cliniques. Certains patients possédaient une amnésie temporellement graduée de la mémoire sémantique, et une amnésie rétrograde intégrale de la mémoire épisodique (Manns et al., 2003), laissant suggérer qu'un traitement différent avait lieu entre les souvenirs sémantiques et épisodiques. Les auteurs proposent alors que chaque

réactivation d'un souvenir impliquerait une sensation de « revivre le souvenir original » ; et créerait ainsi des traces supplémentaires dans l'HIP. Plus les traces d'un souvenir particulier se seraient ajoutées dans l'HIP, plus grande serait la probabilité qu'une trace de ce souvenir survive à une perturbation partielle de l'HIP. Ce dernier resterait toujours engagé et nécessaire au rappel d'un souvenir épisodique, riche en détails, et à forte charge contextuelle. A l'inverse, les souvenirs sémantiques, dont les informations seraient abstraites et non associées à un contexte particulier seraient stockées à part, pouvant être rappelées indépendamment de l'HIP (Nadel and Moscovitch, 1997).

MODÈLE DES TRACES MULTIPLES

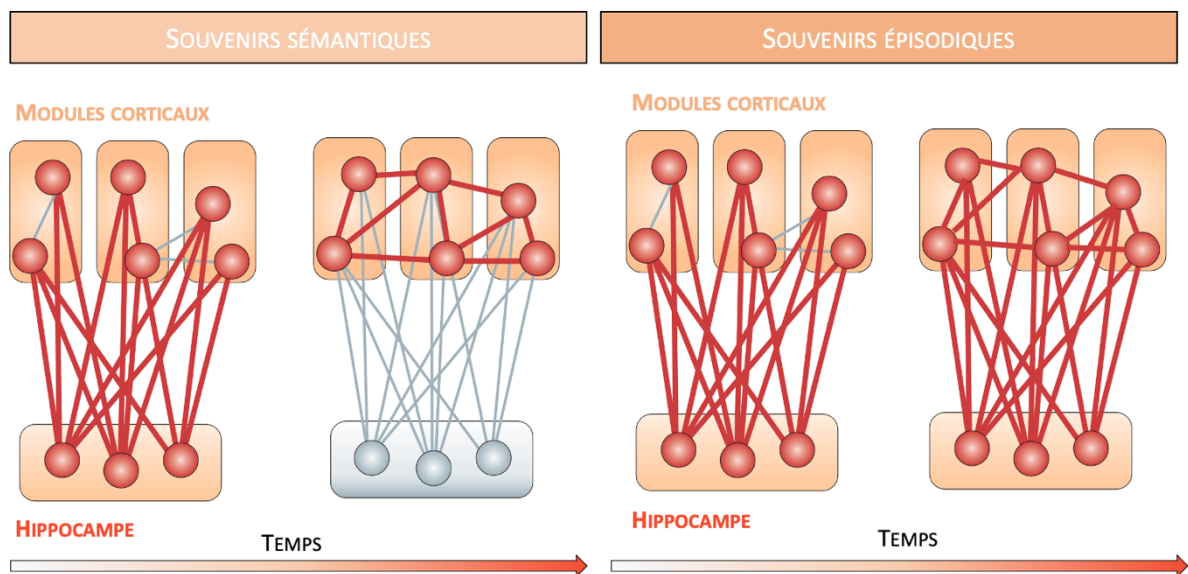


Figure 12. Modèle des traces multiples

La théorie des traces multiples propose que les souvenirs sémantiques, pauvres en éléments contextuels, deviennent indépendants de l'HIP avec le temps. A l'inverse, l'HIP resterait toujours nécessaire dans la récupération des souvenirs épisodiques, riches en éléments contextuels. Modifié de Frankland et Bontempi, 2005.

3. Théorie de la transformation

La théorie de la transformation a été proposée par Winocur, Moscovitch et Bontempi en 2010. Il s'agit d'une adaptation de la théorie des traces multiples. Pour les trois auteurs, l'implication ou non de l'HIP serait dépendante du contexte de réactivation du souvenir. Ils font l'hypothèse qu'avec le temps et l'expérience, un souvenir abstrait se créerait dans le néocortex, comme un schéma contenant uniquement les éléments essentiels du souvenir hippocampique. Ce dernier resterait également toujours présent dans l'HIP, mais là, il contiendrait l'ensemble des détails précis associés au souvenir. Une dynamique entre ces deux « types » de souvenirs se jouerait ensuite, de telle sorte que l'un ou l'autre pourrait être dominant selon les

circonstances (qui les suscitent) au moment de leur récupération. En conséquence, la rétention et la récupération seraient en constante évolution, et lors de chaque récupération les souvenirs hippocampiques et corticaux pourraient interagir et s'influencer mutuellement (Winocur et al., 2010)

D. Rôle clé du sommeil dans la mémoire

Marr évoquait déjà l'importance du sommeil dans le premier modèle de la consolidation. Les premières évidences des effets bénéfiques du sommeil sur la mémorisation et le rappel chez l'humain, en 1924, a déclenché une série d'études confirmant ses bienfaits sur la mémoire déclarative, mais aussi procédurale (pour revue, Smith, 2001)

Le sommeil est classiquement divisé en deux grands stades, le sommeil à ondes lentes (SWS *slow wave sleep* en anglais), et le sommeil paradoxal (*REM sleep* en anglais pour *rapid eye movement sleep*). Chez l'humain, le SWS est prédominant en début de nuit, et diminue en intensité et en durée tout au long de la période de sommeil, à l'inverse du REM qui devient plus intense et étendu vers la fin de la nuit. Le SWS se caractérise par des oscillations électroencéphalographiques lentes et de grandes amplitudes, tandis que le sommeil paradoxal est caractérisé par une activité cérébrale oscillatoire rapide et de faible amplitude. Le sommeil paradoxal est caractérisé par des mouvements oculaires phasiques (d'où son appellation *REM*) et par une atonie musculaire.

A l'origine, on supposait que le sommeil améliorerait la mémoire de manière passive, en la protégeant contre les interférences pouvant être générées par de nouveaux apprentissages (Ellenbogen et al., 2006). Les théories actuelles proposent davantage qu'une consolidation active des souvenirs soit spécifiquement établie pendant le sommeil ; elle proviendrait de la réactivation des représentations nouvellement encodées en mémoire et du renforcement des représentations réactivées, d'un point de vue moléculaire et synaptique (Giuditta et al., 1995). Le processus actif de consolidation pendant le SWS conduit à une transformation et à une réorganisation qualitative de la représentation de la mémoire, par laquelle l'essentiel en est extrait, et intégré dans les réseaux de connaissances à long terme préexistants.

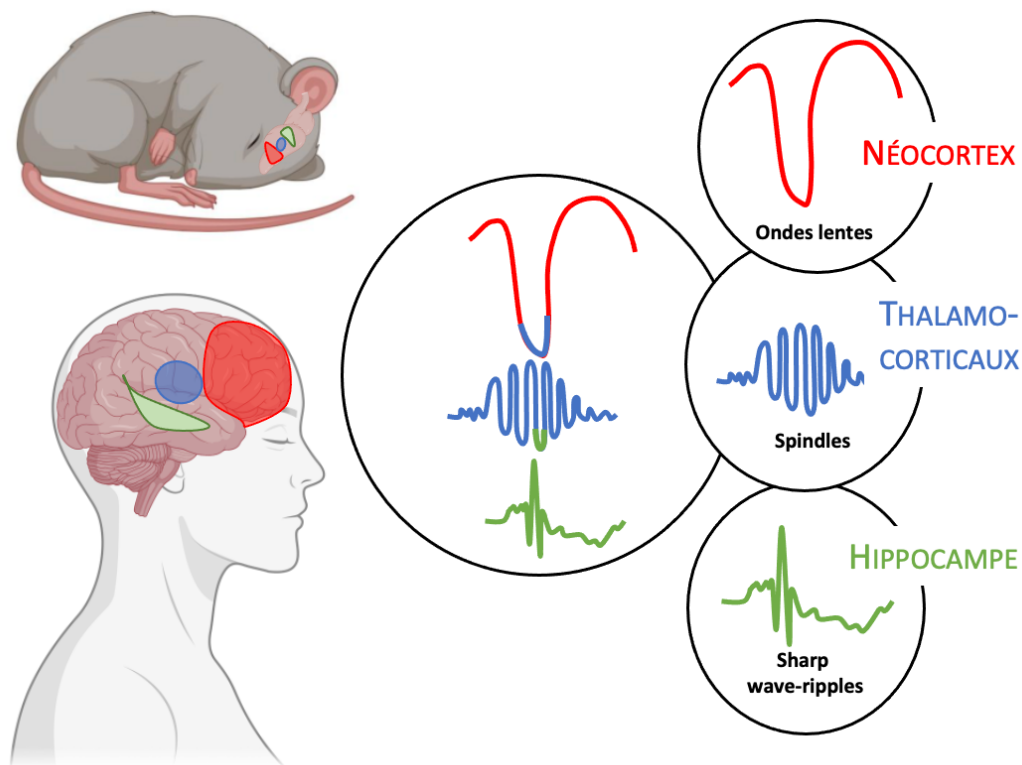


Figure 13. Mécanismes sous-tendant la consolidation pendant le sommeil

La consolidation systémique pendant le SWS repose sur un dialogue entre le néocortex et l'HIP, contrôlé par les ondes lentes néocorticales (rouge). Les réactivations de la trace mnésique pendant les Sharp-waves Ripples (vert) surviennent de façon synchronisée avec les spindles thalamo-corticaux (bleu) de façon répétée, permettant potentiellement un transfert d'informations de l'HP vers le néocortex. Adapté de Rasch et Born, 2013

Les mécanismes sous-jacents à ces réactivations impliquent la coordination de différentes oscillations cérébrales. Ces oscillations sont représentatives de l'activité électrique rythmique générée spontanément, ou en réponse à des stimuli par les différents réseaux neuronaux (Ferraris et al., 2021) et sont supposées sous-tendre le transfert efficace d'informations entre différentes structures cérébrales (Buzsáki, 2019).

Les oscillations lentes pendant le SWS orchestrent la réactivation répétée des représentations au sein de l'HIP, les « *sharp-wave ripples* », avec les « *spindles* » thalamo-corticaux (Rasch and Born, 2013; Maingret et al., 2016). La perturbation de l'une ou l'autre de ces oscillations empêche la mise en place d'une consolidation pérenne. Chez le rat, l'interruption des *sharp-wave ripples* pendant le sommeil suivant un apprentissage spatial a impacté la performance lors du rappel (Girardeau et al., 2009). Chez l'humain, chez les adultes comme chez les enfants,

le sommeil favorise, par exemple, l'intégration de nouveaux mots, cet effet ayant été associé à une activité accrue des *spindles*. (Tamminen et al., 2010)

L'idée qui prime aujourd'hui souligne l'importance de la succession cyclique du SWS et du sommeil paradoxal dans la consolidation, suggérant un rôle complémentaire de ces deux phases de sommeil. La première partie de la nuit, composée majoritairement de SWS, mènerait au tri des souvenirs non pertinents et au renforcement des autres. Les souvenirs bénéficiant le plus du sommeil sont ceux survenus juste avant le sommeil (Gais et al., 2006; Talamini et al., 2008), explicitement encodés (Walker et al., 2003; Korman et al., 2007), riches en émotions (Hu et al., 2006; Wagner et al., 2006; Payne et al., 2012), ou pertinents/congruents avec les comportements et actions futurs de l'individu (Wilhelm et al., 2011). Ce processus de tri serait favorisé par la dépotentialisation globale des connexions synaptiques en raison de la lente fréquence des ondes caractéristiques du SWS, ainsi que de l'absence de facteurs transcriptionnels importants (Giuditta et al., 1995).

La deuxième étape de traitement pendant le sommeil paradoxal permettrait d'intégrer les souvenirs tout juste triés dans des réseaux de connaissances préexistants. Ce sont les fréquences rapides et les *sharp-wave ripples* de l'HIP qui sous-tendraient les renforcements synaptiques. Par exemple, chez le rat, des corrélations élevées ont été décrites entre le nombre de périodes de SWS suivies d'un sommeil paradoxal et les performances de la mémoire lors d'une tâche d'évitement actif (Langella et al., 1992).

E. Et l'oubli ?

Bien que la formation des souvenirs ait été intensivement étudiée, la neurobiologie de l'oubli n'en est qu'à ses premiers pas. Si l'on encode une quantité astronomique d'information tout au long de notre vie, nous en oublions également une grande quantité. Souvent vu de manière négative, l'oubli survient lorsque la mémoire n'est plus disponible (trace mnésique dégradée, ou déficit de consolidation), ou lorsqu'elle n'est plus accessible (déficit dans le rappel du souvenir).

Pourquoi oublie-t-on ? Plusieurs hypothèses ont été faites pour répondre à cette question. L'une d'entre elle estime que la mémoire permettrait d'anticiper le futur, en stockant toutes les informations nécessaires à imaginer, simuler et prédire le futur, pour s'y adapter. Lorsqu'elles ne sont plus pertinentes, les informations en mémoire seraient alors oubliées (Schacter et al., 2007). D'un point de vue biologique, l'oubli consiste en un processus actif,

permettant de faire le tri entre les éléments importants ou non, régulant l'homéostasie du système de la mémoire.

Un mécanisme de l'oubli a été proposé par Wang et collaborateurs en 2020. Celui-ci fait intervenir les microglies, cellules immunitaires de notre cerveau, comme acteur principal du processus. Les auteurs ont utilisé un protocole de peur conditionnée au contexte, car il induit un oubli « classique » qui peut être facilement mesuré en observant le pourcentage de *freezing* (immobilité) des souris. Grâce à un antagoniste CSF1R (Colony-stimulating factor 1 receptor), les chercheurs ont éliminé l'ensemble des microglies au sein du gyrus denté du cerveau des souris. Ce traitement a entraîné une hausse du comportement de *freezing* lors d'un test 35 jours après l'acquisition de la peur, indiquant un souvenir « préservé », en comparaison aux contrôles, chez qui le souvenir du contexte avait disparu, et avec lui la réaction de peur. Ce comportement était positivement corrélé avec le taux de réactivation de l'engramme ; c'est-à-dire le nombre de neurones actifs à la fois lors de l'encodage et du rappel du contexte. Plus les souris avaient tendance à rappeler le souvenir (fort taux de *freezing*), plus elles présentaient un nombre de neurones actifs à la fois lors de l'encodage et du rappel. Enfin les chercheurs ont démontré que les lysosomes présents dans les microglies phagocytent les synapses les moins sollicitées, en utilisant le système du complément, habituellement activé lors d'élimination de pathogène, et associé à l'immunité innée (Janeway, 2001; Wang et al., 2020). Notre système immunitaire serait donc à l'origine du tri de nos souvenirs, menant à l'effacement de certains d'entre eux, particulièrement les moins sollicités. Finalement, bien que l'oubli puisse être associé à une connotation négative, notamment dans le contexte des maladies neurodégénératives ou des troubles de la mémoire, l'oubli est aussi un phénomène adaptatif essentiel. Il favorise l'intégration de nouveaux apprentissages, facilite la prise de décision, contribue à la régulation des émotions et joue un rôle important dans la préservation de la santé mentale (Kraemer and Golding, 1997; Nørby, 2015; Davis and Zhong, 2017). Comme souligné par T. Ribot, "*l'oubli, sauf dans certains cas, n'est donc pas une maladie de la mémoire, mais une condition de sa santé, de sa vie*". (Ribot, 1882)

Il est important de noter qu'il existe d'autres processus, qui ne seront pas développés ici, mais pouvant induire à des conséquences très variées pour le devenir de la mémoire. Par exemple, le rappel va induire une réactivation de la mémoire, pouvant mener à une déstabilisation,

extinction ou encore reconsolidation (Nader et al., 2000; Sara, 2000; Dudai, 2002; Suzuki et al., 2004).

Différents mécanismes du devenir d'un souvenir ont été abordés ici, particulièrement le phénomène de consolidation systémique. Toutes les théories décrites s'accordent sur l'importance d'un dialogue, crucial, entre l'HIP et le CPFm pour pérenniser le souvenir. Or, si on sait que l'HIP projette de manière monosynaptique, et donc directe, sur le CPFm (Jay and Witter, 1991), la voie de projection en retour n'est pas directe. L'absence de réciprocity directe (monosynaptique) entre ces deux structures conduit à concevoir la présence d'un relai des informations. Les noyaux reuniens et rhomboïde ReRh du thalamus ont une connectivité toute particulière, à même de les positionner, non seulement comme un relai, mais aussi comme un véritable acteur orchestrant les interactions hippocampo-corticales. La partie suivante de cette introduction décrira donc la place des ReRh au sein d'un réseau hippocampo-cortico-thalamique.

III. Les noyaux *Reuniens* et *Rhomboïde* au sein du circuit cortico-thalamo-hippocampique

A. Anatomie

Le thalamus est la plus grande structure du diencephale. On y dénombre près de 60 noyaux. Initialement perçu comme une structure relai entre les différentes régions du cortex et les noyaux sous-corticaux, il est désormais admis que le thalamus participe largement aux fonctions supérieures et à la cognition (Albe-Fessard and Besson, 1973; Macchi and Bentivoglio, 1999; Pereira de Vasconcelos and Cassel, 2015). Les études de patients ayant subi des accidents vasculaires cérébraux, des traumatismes crâniens, atteints du syndrome de Korsakoff, ou d'autres pathologies portant atteintes à l'intégrité du thalamus ont permis de montrer que ce dernier est impliqué dans tout un panel de fonctions cognitives, et que son dysfonctionnement pouvait entraîner des amnésies, aphasies, troubles des fonctions exécutives, de l'attention, ainsi que des comportements persévératifs (De Witte et al., 2011). Les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) appartiennent aux noyaux de la ligne médiane du thalamus, qui couvre toute l'étendue dorso-ventrale (Swanson, 2004).

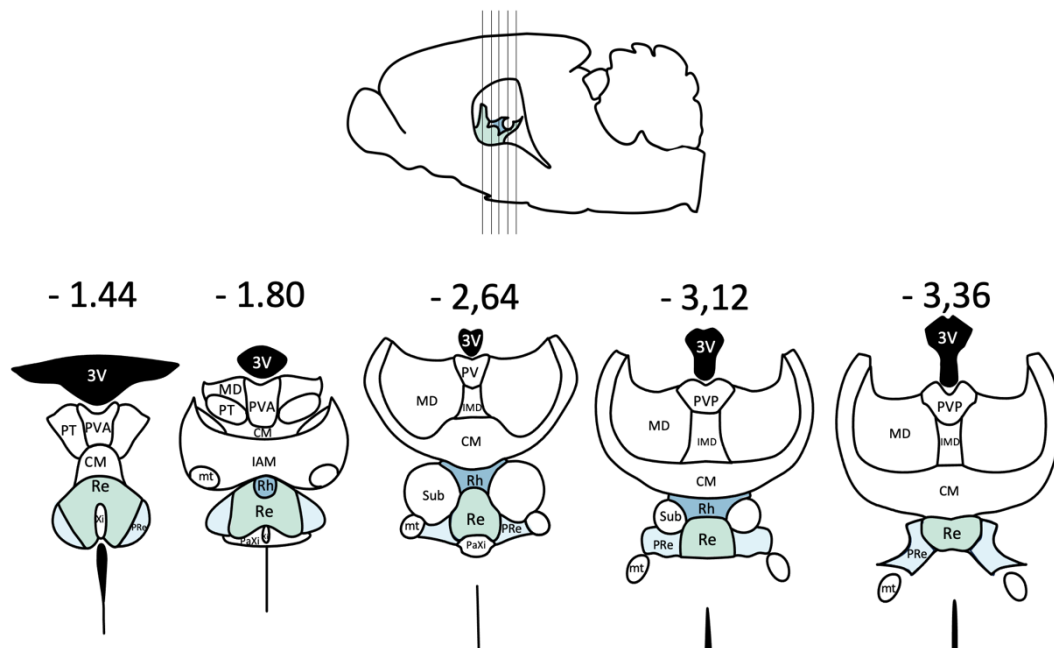


Figure 14. Organisation neuroanatomique des noyaux *reuniens* et *rhomboïde* du thalamus

Ils sont situés dans la partie la plus ventrale de la ligne médiane du thalamus, immédiatement au dessus du 3e ventricule. Les valeurs chiffrées correspondent aux coordonnées en mm de la distance par rapport au Bregma selon Paxinos et Watson, 2007. Abréviations : CM, noyau central médian ; IAM, noyau interoantéromédian ; IMD, noyau interomédiodorsal ; MD, noyau médiodorsal ; PaXi, noyau paraxiphoïde pRe, périreuniens ; PT, noyau paraténial ; PVA, noyau paraventriculaire antérieur ; PVP, noyau paraventriculaire postérieur ; Re, noyau reuniens ; Rh, noyau rhomboïde ; Sub, noyau submedians ; mt, tract mamillothalamique, Xi, xiphoïde, modifié de Cassel et al. 2013.

De la partie la plus rostrale à la plus caudale on retrouve dans l'ordre : les noyaux paraventriculaire et paraténial, le Re d'abord seul, juste au-dessus du 3^e ventricule, puis surmonté du Rh, après quoi apparaissent les noyaux inter-antéromédian, (qui devient progressivement le noyau inter-médiodorsal), et enfin le noyau central médian. Le Re est généralement subdivisé en une partie centrale (ou médiane) et des segments latéraux qui ont été désignés comme les ailes latérales appelées péri-reuniens (periRe).

B. Neurochimie

Il n'existe que peu de données concernant la distribution et l'organisation neurochimique des neurones au sein des noyaux ReRh. Le principal neurotransmetteur du Re est un acide aminé exciteur, supposé être le glutamate ou l'aspartate (Bokor et al., 2002). L'existence de neurones dopaminergiques a également été décrite (Ogundele et al., 2017). Récemment, Viena et coll. (Viena et al., 2021) ont caractérisé la répartition des protéines liant le calcium (Ca²⁺), la calrétinine (CR), la calbindine (CB) et la parvalbumine (PV) dans les noyaux de la ligne médiane du thalamus. Rapidement, les auteurs ont confirmé l'absence de neurones PV+ dans la ligne médiane du thalamus. En revanche, ils ont décrit la présence de cellules CR+ tout au long du troisième ventricule (3V). Les cellules CB+ étaient systématiquement plus latérales et proches du centre de l'étendue dorso-ventrale du thalamus médian. Les neurones projetant à la fois au CPFm et à l'HIP n'exprimaient aucune des protéines de liaison au calcium examinées, mais étaient contenus dans des « niches » de cellules CR+ et CB+. La description de ces différentes sous-populations de neurones dans le Re s'ajoute à un précédent rapport d'Arai et al. (Arai et al., 1994) et appelle à davantage d'investigations sur les contributions fonctionnelles de chaque sous-population neuronale. Les cellules du thalamus qui contiennent des canaux Ca²⁺ de type T sont caractérisées par leur capacité à passer rapidement d'un mode de décharge tonique vers une décharge à haute fréquence grâce à l'entrée excitatrice et/ou inhibitrice qu'elles reçoivent d'autres cellules (Sherman and Guillery, 2002; Walsh et al., 2017). Ces populations pourraient ainsi appartenir à des microcircuits spécifiques, associés à une rythmicité et des synchronisations distinctes (Cassel et al., 2021). Cependant, aussi surprenant que cela puisse paraître, on ne retrouve pas de neurones GABAergiques dans le Re, qui sont donc dépourvus d'interneurones inhibiteurs. (Ottersen and Storm-Mathisen, 1984; Rinvik et al., 1987). Du moins, chez le rongeur, puisque récemment,

Joyce et collaborateurs ont montré, chez le singe rhésus, la présence de neurones GABAergiques, et aussi de quelques neurones PV (Joyce et al., 2022).

1. D'où vient l'inhibition ?

Mais d'où provient alors l'inhibition des ReRh chez le rongeur ? Les circuits thalamiques sont ciblés par deux systèmes inhibiteurs majeurs : le noyau réticulaire thalamique (TRN) et les entrées inhibitrices extra-thalamiques (ETI, par exemple la *zona incerta*). Les ETI fournissent une inhibition focale et temporellement précise, impactant la fréquence de décharge du thalamus. La voie incerto-thalamique par exemple, a déjà été décrite comme impliquée dans la modulation de la peur (Venkataraman et al., 2021). A l'inverse, le TRN, fournit une inhibition locale, plus lente ; il est souvent actif lors des phases de sommeil. Ensemble, ces systèmes

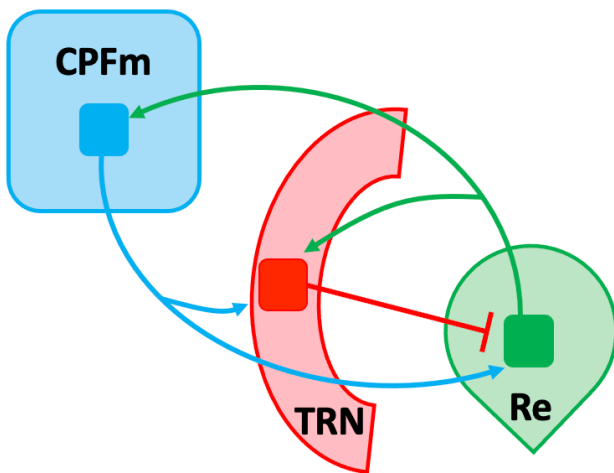


Figure 15. Le TRN et l'inhibition du Re, Zimmerman

Les projections corticothalamiques vers le Re suivent les principes d'organisation de base décrits pour les autres noyaux thalamiques : les neurones des couches 5 et 6 du CPFm envoient des connexions monosynaptiques vers le Re (McKenna & Vertes, 2004 ; Varela et al., 2014), et les neurones du CPFm de la couche 6 envoient des collatérales vers le TRN antérieur (Cornwall et al., 1990), la même sous-région du TRN qui projette vers le Re (Kolmac et Mitrofanis, 1997). Modifié de Zimmerman et Grace 2018.

inhibiteurs permettent un contrôle progressif de la fréquence de décharge thalamique, allouant aux opérations thalamo-corticales la capacité de répondre de manière dynamique lors de demandes comportementales. (Halassa and Acsády, 2016). Çavdar et ses collègues ont montré que le Re et l'HIP projetaient tous deux sur la partie rostrale du TRN (Çavdar et al., 2008). Zimmerman et al, en 2018, se sont attelés à décortiquer le fonctionnement du circuit reliant la partie infralimbique (IL) du CPFm, le TRN et le Re. Il est important de décrire que les projections du CPFm vers le Re suivent les mêmes principes d'organisation que celles qui se font vers les autres noyaux thalamiques : les neurones des couches V et VI du CPFm envoient des projections directes sur le Re (McKenna and Vertes, 2004; Varela et al., 2014), et les neurones de la couche VI du CPFm envoient des collatérales au TRN antérieur (Cornwall et al., 1990), la même sous-région du TRN qui projette au Re. (Kolmac and Mitrofanis, 1997). Les auteurs ont montré que l'inhibition du CPFm réduisait le phénomène de décharge en « burst » des neurones du Re, tandis que sa stimulation entraînait une hausse des bursts et réduisait le

taux de décharge « tonique ». De plus, l'inhibition du TRN avait une action similaire que celle du CPFm, puisqu'elle entraînait une réduction du nombre de neurones spontanément actifs dans le Re. Ensemble, ces résultats démontrent que le CPFm, à la fois via des projections directes, mais aussi via le TRN, peut moduler l'activité des neurones du Re de manière nuancée et complexe (Zimmerman and Grace, 2018).

C. Connectivité

1. Principales afférences et efférences

Les noyaux ReRh constituent une zone de convergences de fibres en provenance de nombreuses structures cérébrales différentes, du télencéphale, diencéphale, comme du tronc cérébral. Ils projettent également vers de nombreuses régions cérébrales. Les afférences et efférences étant déjà largement décrites, deux schémas récapitulatifs présentent simplement les principales *input* et *output* des ReRh. Seules les connexions avec l'HIP et le CPFm seront détaillées ci-après. Pour une description précise et détaillée, se référer à Cassel et al., 2013 et 2021. (Cassel et al., 2013, 2021)

De manière générale, la connectivité du noyau Re est mieux décrite que celle du Rh. Etant donné leur taille et leur proximité, il est très compliqué d'en cibler un sans impacter le second. Les Figures 16 et 17 reprennent respectivement les afférences et efférences communes aux deux noyaux thalamiques.

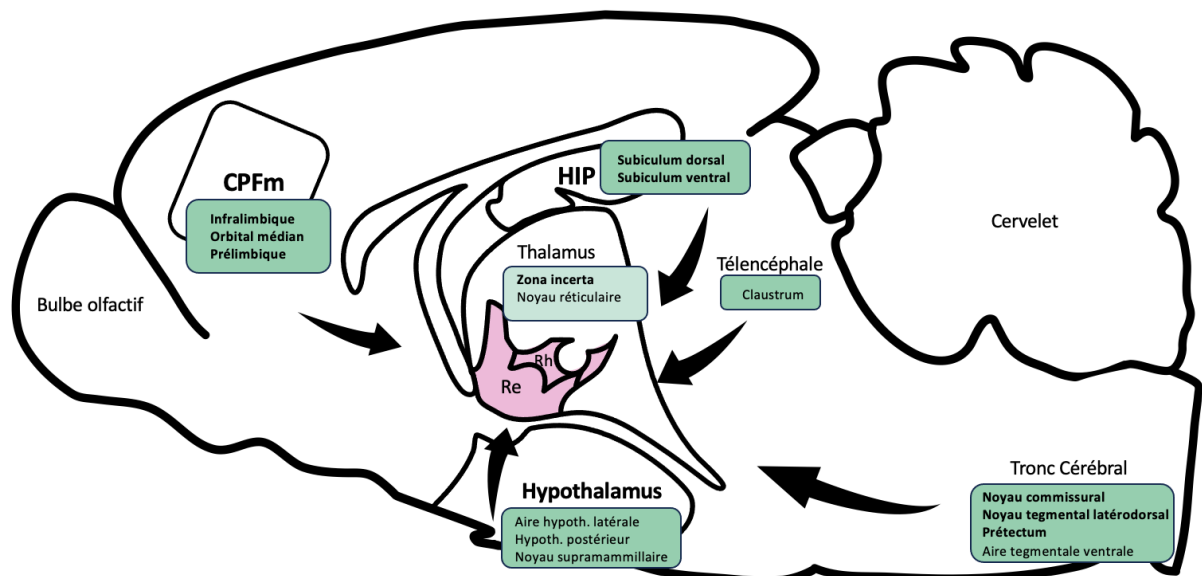


Figure 16. Afférences ReRh

Les afférences les plus denses sont représentées en vert foncé, et les moins denses en vert clair. D'après Vertes, 2002, Van der Werf 2002, McKenna et Vertes 2004, Vertes et al 2010, Varela et al 2014.

Concernant les efférences du noyau Rh sont moins bien décrites mais semblent globalement identiques à celles du noyau Re. Une différence majeure est que le noyau Rh ne projette que sur l'HIP dorsal alors que le noyau Re, lui, projette sur l'ensemble de l'axe dorso-ventral de l'HP (Vertes, 2006).

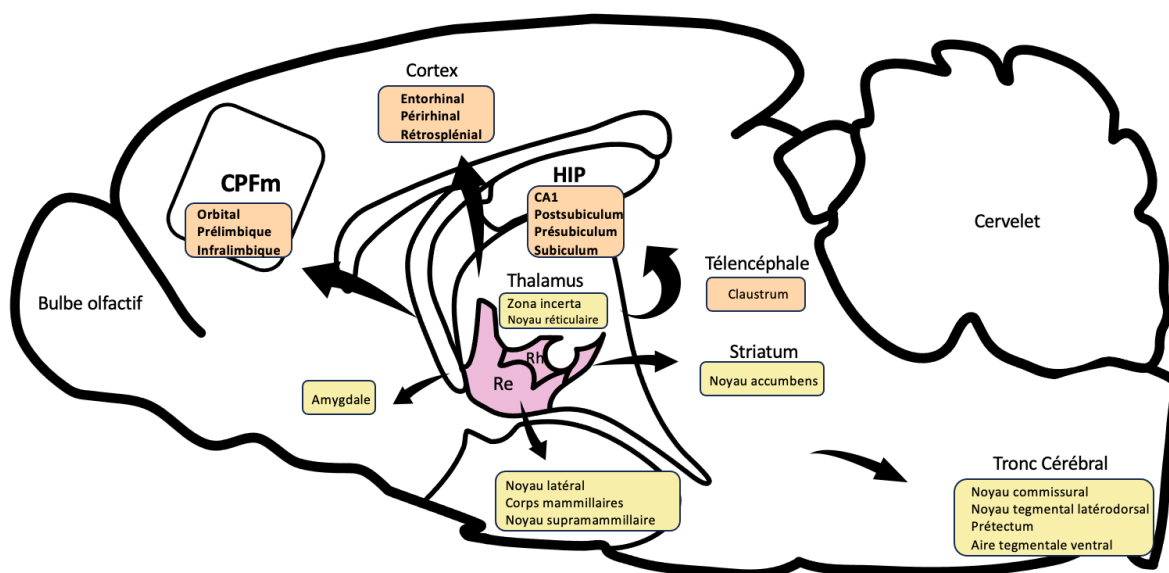


Figure 17. Efférences ReRh

Les efférences les plus denses sont représentées en orange, et les moins denses en jaune. D'après Vertes, 2002, McKenna et Vertes 2004, Varela et al 2014

2. Focus sur l'hippocampe

a) Description rapide de l'HIP

L'hippocampe (HIP) est une structure bilatérale appartenant au lobe temporal (chez le primate). Elle contient trois régions : le gyrus denté GD, la corne d'Ammon CA, et le subiculum (Amaral and Witter, 1989)

Le GD est composé de la couche moléculaire, la couche granulaire, et le hile. La couche granulaire contient les cellules granulaires, qui projettent à l'arbre dendritique de la couche moléculaire. L'HIP est également divisé en plusieurs sous régions : la couche moléculaire contient la *stratum radiatum* et la *stratum lacunosum-moleculare*. Au-dessus, on retrouve la *stratum pyramidale*, caractérisée par la présence de cellules pyramidales, densément compactées, et alignées. Leurs prolongements s'orientent d'un côté vers la *stratum oriens*, avec leurs dendrites basales, et vers la *stratum lacunosum-moleculare* avec leurs dendrites

apicales. L'HIP est également divisé en plusieurs parties communément appelées cornes d'Ammon. On dénombre 3 sous-régions: CA1, CA2 et CA3 (Lorente De Nó, 1934).

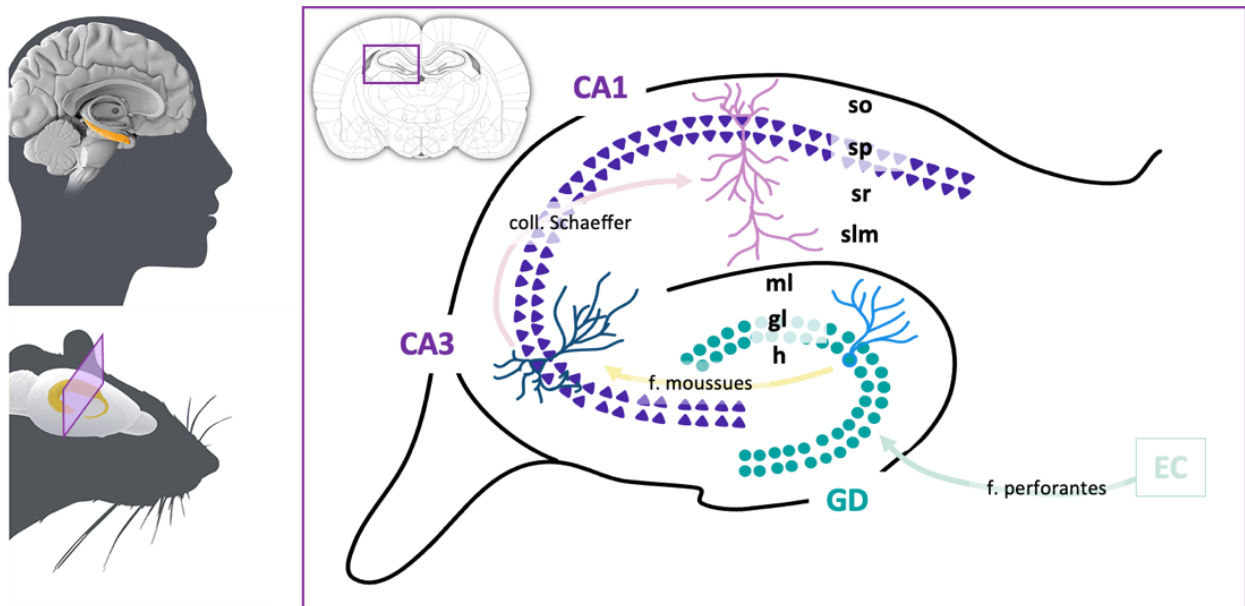


Figure 18. L'hippocampe

Représentation schématique en vue saggitale (à gauche) de l'HIP chez l'humain et le rat. Vue en coupe frontale (à droite) chez le rat. Le rectangle violet représente la position de la section frontale. EC : Cortex Entorhinal, GD : Gyrus Denté, f. moussues : fibres moussues, coll. Schaeffer : collatérales de Schaffer Pal : f. perforantes (venant du cortex entorhinal et projetant sur les dendrites des cellules du GD), so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare ; ml : couche moléculaire ; gl : couche granulaire ; h : hile. Panel de gauche modifié de Biderman and Shohamy, 2020

De manière très simplifiée, le transfert des informations au sein de l'HIP s'effectue de la façon suivante : l'arrivée majeure des informations a son origine dans le cortex entorhinal, qui innerve les différentes régions de l'HIP grâce à la voie perforante. Les cellules granulaires du GD font synapse dans CA3 à travers les fibres moussues. Les cellules pyramidales de CA3 envoient leurs axones dans CA1 à travers les collatérales de Schaffer, et font synapse sur les dendrites proximales et basales dans la *stratum radiatum* et *oriens*. Ces connexions sont souvent nommées boucle tri-synaptique. Enfin, le subiculum constitue la principale voie de sortie du circuit de l'HIP.

b) Connectivité HIP ↔ ReRh

Le subiculum, tout comme l'HIP ventral (CA1), projette densément au Re (McKenna and Vertes, 2004), et particulièrement sur sa partie caudale. En retour, la partie rostrale du Re

projette principalement sur la couche *stratum lacunosum-moleculare* de CA1, et la couche moléculaire du subiculum (Vertes 2006). Le Re forme des synapses asymétriques (excitatrices) sur les cellules pyramidales et les interneurons de CA1, du subiculum et du cortex entorhinal (Meredith and Wouterlood, 1990). Il a même été décrit comme étant l'*input* majeur provenant du thalamus vers l'HIP (Herkenham, 1978; Wouterlood et al., 1990; Bokor et al., 2002). S'il projette vers l'ensemble de l'HIP, les projections les plus importantes ciblent la partie ventrale de ce dernier, à un facteur proche de 10, suggérant une connexion privilégiée du Re avec l'HIP ventral (Vertes et al., 2007; Hoover and Vertes, 2012).

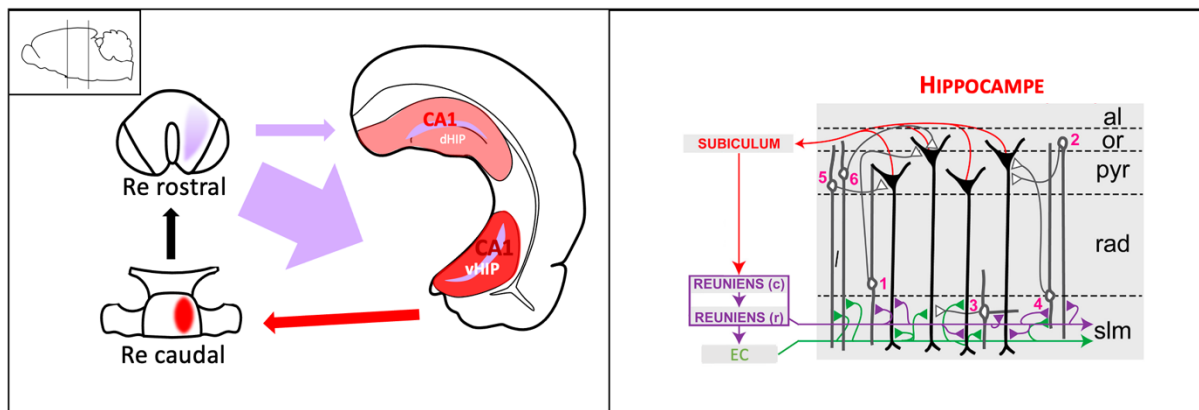


Figure 19. Connectivité entre l'HIP et les ReRh

Les efférences des ReRh sont représentées en violet et leurs afférences de l'HIP en rouge. La partie rostrale des ReRh projettent sélectivement sur CA1, en respectant un gradient dorso-ventral ; les projections les plus importantes ciblent la partie ventrale de l'HIP (vHIP), à un facteur proche de 10, en comparaison avec la partie dorsale de l'HIP (dHIP). Ses terminaisons arrivent dans la *stratum lacunosum moleculare* (slm), à la fois sur les cellules pyramidales (noires) et les interneurons (gris). Les terminaisons du cortex entorhinal (EC) arrivent également dans la slm. En retour, l'HIP ventral ainsi que le subiculum projettent densément sur la partie caudale des ReRh. Des connexions directes du Re caudale au Re rostrales sont également décrites. Le pannel de droite est modifié de Dolleman van der Weel et al 2019

D'un point de vue fonctionnel, la stimulation du Re mène à une forte déflexion négative dans la *stratum lacunosum-moleculare*, et une positive dans la *stratum radiatum*, et ainsi une dépolarisation robuste des cellules pyramidales, mais non une décharge. En revanche, des décharges ont en effet lieu dans les couches *oriens et alveus*, mettant en évidence l'activation d'interneurones locaux (Dolleman-Van der Weel et al., 1997). Dolleman van der Weel et al. ont également décrit que le Re rostral projetait directement à CA1, tandis que le Re caudal projetait uniquement sur le Re rostral, formant donc une connexion disynaptique.

Cependant, Bertram et Zhang ont montré, en 1999, que le Re avait une forte action excitatrice sur CA1, à même d'y entraîner des décharges, comparables à celles induites par une stimulation de CA3. Ils décrivent même cette action comme pouvant être plus forte encore

que celle induite par CA3, puisqu'elle pourrait entraîner une potentialisation à long terme (Bertram and Zhang, 1999).

3. Focus sur le cortex préfrontal médian

a) Description rapide du CPFm

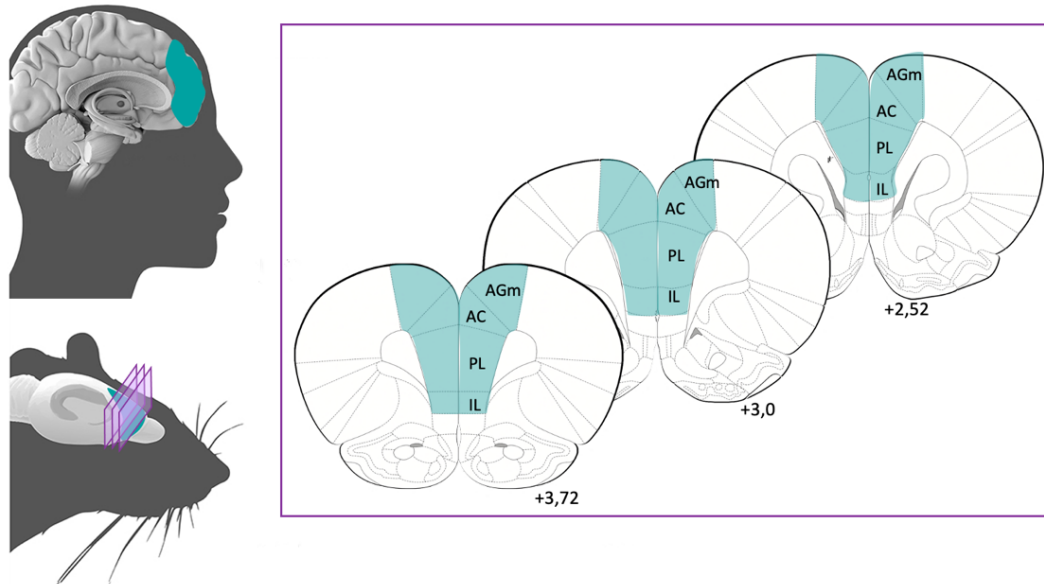


Figure 20. Le cortex préfrontal médian

Représentation schématique en vue sagittale (à gauche) du CPFm chez l'humain et le rat. Vue en coupe frontale (à droite) chez le rat. Les valeurs chiffrées correspondent aux distances en mm par rapport au Bregma. Les rectangles violets représentent la position des 3 sections frontales. AGm cortex agranulaire médian, AC : cortex cingulaire antérieur, PL : cortex prélimbique, IL : cortex Infralimbique. Panel de gauche modifié de [Biderman and Shohamy, 2020](#)

Chez le rongeur, le CPFm est habituellement divisé en quatre principales sous-régions : le cortex agranulaire médian (AGm), le cortex cingulaire antérieur (AC), le cortex prélimbique (PL), et le cortex infralimbique (IL). Cette nomenclature est spécifique au rongeur, et diffère de celle utilisée chez l'humain, rendant compliqué la comparaison des différentes études et résultats obtenus dans les différentes espèces. C'est pourquoi, récemment, Vogt et Paxinos ont proposé une nouvelle nomenclature pour caractériser le CPFm chez le rongeur, basé sur celle utilisée chez l'humain (Vogt and Paxinos 2014). Dans cette thèse, l'ancienne nomenclature sera tout de même conservée, puisque l'ensemble des résultats et description anatomique publiées jusqu'alors se sont basés sur celles-ci. Pour une comparaison entre les deux nomenclatures, voir (Laubach et al., 2018).

b) Connectivité CPFm ↔ ReRh

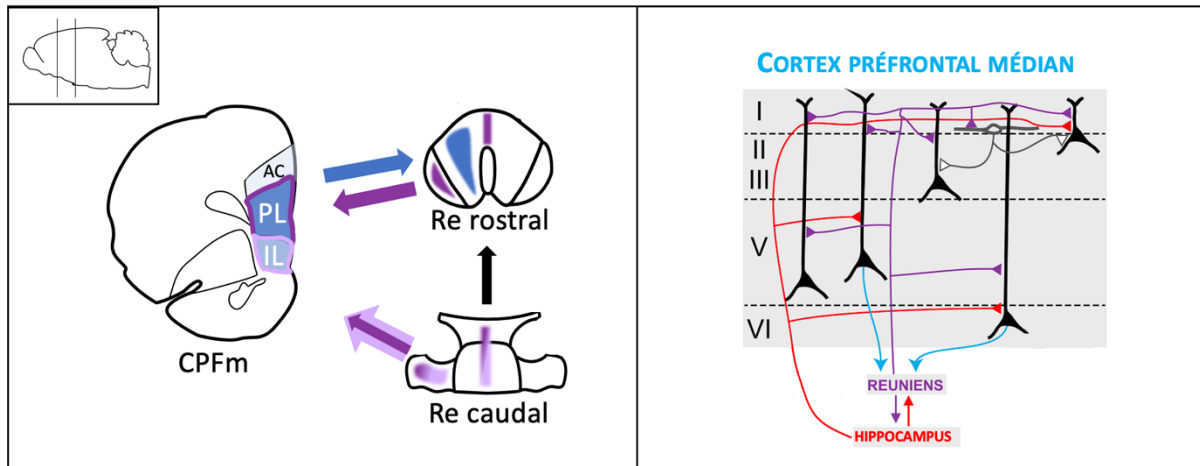


Figure 21. Connectivité CPFm-RE

Les efférences des ReRh sont représentées en violet ; celles ciblant le cortex prélimbique sont en foncé et celles ciblant le cortex infralimbique en clair. Leurs afférences en provenance du CPFm sont en bleu. La partie caudale des ReRh contient la majorité des neurones qui projettent au CPFm. Ces projections se terminent dans les couches I, V et VI. Cependant, c'est la partie rostrale du Re qui projette plus densément au prélimbique PL, et la partie caudale qui projette plus densément à l'IL. L'ensemble de ces neurones se trouvent dans les periRe, ainsi que dans la partie médiane du Re. En retour, toutes les régions du CPFm projettent aux ReRh, principalement sur le Re rostral. Ces terminaisons se finissent principalement sur les neurones du Re qui projettent vers l'HIP. Le pannel de droite est modifié de [Dolleman van der Weel et al 2019](#)

Au niveau du CPFm, les fibres en provenance des ReRh finissent majoritairement dans les couches 1, V et VI des cortex infralimbique et prélimbique, régions qui reçoivent également les terminaisons provenant de l'HIP ([Jay and Witter, 1991](#); [Gabbott et al., 2002](#)). Les noyaux ReRh projettent également au cortex cingulaire antérieur et agrulaire, mais de manière moins dense ([Vertes, 2006](#)). Les régions du Re qui projettent vers le mPFC proviennent principalement des périRe, tout comme de la ligne médiane du Re ([Hoover and Vertes, 2012](#); [Varela et al., 2014](#)).

D'un point de vue fonctionnel, Di Prisco et Vertes ont décrit que la stimulation du Re entraînait une large réponse monosynaptique dans les quatre subdivisions du CPFm, mais dont l'amplitude était majeure dans l'IL et le PL, de manière congruente avec l'anatomie décrite ci-dessus. Une stimulation répétée de cette voie pouvait entraîner un phénomène de facilitation similaire à celui observé lors d'une stimulation de l'HIP ([Vertes, 2002](#); [McKenna and Vertes, 2004](#); [Di Prisco and Vertes, 2006](#)). Ces résultats positionnent les noyaux ReRh comme une source directe d'afférences excitatrices pouvant moduler de manière non négligeable le CPFm.

En retour, le CPFm est une source majeure de projections pour le Re, se répartissant dans tout le Re, indiquant de fortes connexions réciproques entre Re/periRe et le CPFm (Dolleman-van der Weel et al., 2019). Les terminaisons des neurones du CPFm qui projettent aux ReRh ont également été décrites comme directement connectées aux neurones du Re projetant vers l'HIP (Vertes et al., 2007). Comme décrit plus haut, le CPFm projette également de manière indirecte au Re, en passant par le TRN, qui, à son tour, exerce des actions inhibitrices rétroactives sur le Re (McKenna and Vertes, 2004; Zimmerman and Grace, 2018).

4. Connectivité HIP-CPFm-ReRh

Une petite partie des neurones des ReRh (de 3 à 8% selon les études), envoient des collatérales à l'HIP et au CPFm (Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014), occupant donc une place idéale pour influencer les processus nécessitant une coopération des deux structures. De surcroît, les terminaisons des neurones du CPFm qui projettent au Re, se trouvent sur les neurones du Re qui projettent à l'HIP, facilitant le transfert d'informations au sein du circuit hippocampo-cortico-thalamique. Récemment, Viena et collaborateurs ont décrit que ces cellules particulières n'étaient ni seulement CR+ ni seulement CB+, mais étaient entourées de cellules CR+/CB+. Ce type d'organisation anatomique particulier pourrait créer une sorte de microcircuit servant à intégrer l'activité de plusieurs entrées, puis à les synchroniser afin de les transmettre de manière coordonnée vers l'HIP et le CPFm (Viena et al., 2021).

Nos collaborateurs de Marseille ont récemment mis en évidence, chez le rat, qu'une inactivation du Re menait à l'abolition de la synchronisation gamma entre l'HIP et le CPFm, mécanisme essentiel dans le transfert d'information pendant le sommeil à ondes lentes (Ferraris et al., 2018).

De ce fait, les ReRh ont une position-clé pour relayer et orchestrer les informations entre l'HIP et le CPFm, d'où en découlent les diverses fonctions leur étant associées, décrites dans le paragraphe ci-après.

D. Fonctions

A l'origine, il était d'usage de penser que le rôle des noyaux de la ligne médiane du thalamus était uniquement de réguler l'activité d'autres structures (Van Der Werf et al., 2002). Cependant, depuis quelques années, l'importance de leur implication dans diverses fonctions cognitives ou non s'est développée puis a été validée.

1. Principales implications fonctionnelles

Aux vues des vastes projections qu'ils relayent, les noyaux ReRh ont longtemps été attribués au thalamus dit non-spécifique. Classiquement, on ne distinguait que deux types de projections thalamo-corticales. D'une part, on distinguait les projections spécifiques, ayant pour cible une aire corticale restreinte, majoritairement dans la couche IV, et d'autre part, on retrouvait les projections dont les terminaisons étaient beaucoup plus éparées, et ciblaient plusieurs territoires corticaux, plutôt dans la couche I (Lorente de No, 1938). Les noyaux ReRh appartenait à cette dernière catégorie, dont l'activité sur le cortex était dispersée dans le traitement de la modalité sensorielle associée (Dempsey and Morison, 1941; Groenewegen and Berendse, 1994; Pereira de Vasconcelos and Cassel, 2015).

De cette classification initiale découlent plusieurs études qui ont suggéré un rôle des noyaux ReRh dans des fonctions non-cognitives, telles que la régulation circadienne (Giardino et al., 1989), la reproduction (Iwasaki et al., 2010), la nociception (Bullitt, 1990), ou encore la prise alimentaire (Wilmot et al., 1988). Pour une revue détaillée de l'ensemble de ces implications, voir revue (Cassel et al., 2013).

La qualification de ces noyaux comme « non-spécifique » a été remise en cause lorsque leurs connexions vers des régions corticales, majoritairement préfrontales ont été décrites (Van Der Werf et al., 2002; Vertes, 2004). Les recherches sur les fonctions associées à ces noyaux ont ainsi changé de cap, s'orientant vers un rôle dans des fonctions cognitives, et notamment de haut niveau, telles que l'attention, les fonctions exécutives, et la mémoire. Aux vues des connexions décrites plus haut entre les ReRh, l'HIP et le CPFm, ces petits noyaux thalamiques possèdent une position idéale pour organiser et orienter les fonctions dépendante de l'interaction entre l'HIP et le CPFm (Vertes, 2006; Hoover and Vertes, 2007; Cassel et al., 2013). Quelques-unes de ces études seront décrites ci-après (pour revues détaillées voir (Dolleman-van der Weel et al., 2019; Cassel et al., 2021; Ferraris et al., 2021).

a) *Fonctions exécutives*

Les patients présentant des lésions thalamiques manifestent des déficits d'attention, en particulier du contrôle inhibiteur, constat semblant résulter d'une déconnexion avec la zone préfrontale. Il s'agit d'un des exemples de l'influence du thalamus sur les fonctions exécutives et l'attention (Bogousslavsky et al., 1988; Van Der Werf et al., 2000).

Pour tester l'attention chez le Rat, il est possible d'utiliser le test du *5-choice serial reaction time (5-CRST)*, qui mesure l'attention visuelle soutenue et sélective. Dans une étude de 2013, Prasad et collaborateurs ont montré que des rats chez qui le Re était lésé présentaient moins de persévérance, plus de réponses prématurées, mais aussi moins d'omissions que des rats du groupe contrôle. La lésion du Re entraînait un comportement de type impulsif, laissant supposer une implication dans les processus de contrôle de l'inhibition, plutôt que dans l'attention à proprement parler (Prasad et al., 2013).

Une autre étude menée par Dolleman-van der Weel et al. (2009) a également montré que les rats présentant une lésion du Re voyaient leurs performances impactées, lors d'un test à 24h en piscine de Morris. Les auteurs ont analysé la stratégie empruntée par les animaux lors de cet essai de 60 sec. Ils ont révélé que les rats lésés ont nagé aussi directement que les contrôles vers la position virtuelle de la plate-forme, mais qu'ils ont ensuite abandonné beaucoup plus rapidement leur recherche, diminuant ainsi le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible. Les auteurs ont proposé une interprétation à ce comportement, comme une flexibilité accrue, les amenant à changer leur stratégie de recherche très rapidement (Dolleman-van der Weel et al., 2009).

Plus récemment, Linley et al ont montré que des rats présentant une lésion des ReRh montraient des déficits dans l'apprentissage d'un changement de règle, dans une tâche de discrimination odeur/texture. Les rats montraient également des déficits dans la capacité à transférer ou à généraliser les règles de la tâche (Linley et al., 2016).

Enfin, Ito et al en 2015, ont impliqué le Re dans les comportements orientés vers un but. En enregistrant l'activité de l'HIP, le CPFm et du Re dans une tâche d'alternance continu dans un labyrinthe en T, ils ont montré que certains neurones déchargeaient de manière sélective à la trajectoire empruntée dans le labyrinthe, anticipant ainsi le comportement à venir. Ces neurones ont été observés dans le CPFm, le Re et CA1. Les lésions ou l'inactivation optogénétique du Re ont considérablement réduit la décharge des neurones « prédicteurs de la trajectoire » à venir dans CA1. Ces résultats suggèrent que le Re est nécessaire à la représentation du futur lors d'un comportement dirigé vers un but (Ito et al., 2015).

b) Fonctions mnésiques

Mémoire spatiale

Aux vues de leur connexions idéales avec l'HIP et le CPFm, notre laboratoire s'est intéressé, il y a un peu plus de 10 ans, au rôle des ReRh dans la consolidation d'un souvenir spatial. Loureiro et al. ont utilisé le test de la piscine de Morris pour étudier la persistance du souvenir. En combinant des approches de lésions pharmacologiques, inactivations réversibles, et marquages de gènes précoces, ils ont pu mettre en évidence que des rats lésés étaient capables d'apprendre la position de la PF, de rappeler cette information 5 jours après l'apprentissage, mais qu'à 25 jours, le souvenir de la PF avait disparu. Lors du rappel à 25 jours uniquement, les rats contrôles présentaient une augmentation significative du nombre de neurones c-fos positifs dans les ReRh, suggérant une implication de ces noyaux dans le rappel de l'information ancienne. Toutefois, une inactivation de ces noyaux juste avant le rappel n'a pas altéré le rappel de la position de la PF, suggérant que, même s'ils sont impliqués, les ReRh ne sont pas nécessaires au rappel de l'information. De ce fait, l'intégrité de ces noyaux est ainsi nécessaire à la consolidation systémique, puisqu'une lésion pré-acquisition empêche le souvenir d'être maintenu en mémoire à long terme ancienne (Loureiro et al., 2012). Cette étude a été complétée par l'équipe plus tard, puisque Klein et al. en 2019 ont décrit que la lésion des ReRh en pré-acquisition, en plus d'empêcher la mise en place du souvenir, endiguait le maintien du nombre d'épines dendritiques formées dans l'HIP à la suite de l'apprentissage. De surcroît, la formation de nouvelles épines en mémoire à long terme ancienne au sein du CPFm était également réprimée chez les rats lésés, par rapport aux rats contrôles. Ensemble, ces résultats convergent vers l'idée que les ReRh sont nécessaires à la formation d'un souvenir ancien, et que leur intégrité est indispensable aux modifications morphologiques sous tendant la consolidation synaptique au sein du réseau entre l'HIP et le CPFm (Klein et al., 2019).

Cependant, une étude récente de Mei et collaborateurs suggère une implication du Re dans la récupération de la mémoire à long terme ancienne, plutôt que dans la consolidation. Pour parvenir à ces conclusions, les auteurs ont entraîné pendant 5 jours des rats à retrouver une récompense dans un labyrinthe surélevé. Après chaque session d'acquisition, les auteurs ont inactivé de manière réversible le Re en administrant du muscimol, un agoniste des récepteurs GABA-A. L'inactivation répétée du Re n'a pas entraîné de déficit en mémoire à long terme ancienne testée 20 jours plus tard, mais des déficits lors du rappel en mémoire à long terme récente ont été décrits, après 2 jours d'entraînement (Mei et al., 2018). Cette étude est la seule

à contester les évidences apportées par notre laboratoire, et ces différences peuvent s'expliquer par la technique utilisée par les auteurs. La consolidation, comme décrite plus haut, est un processus graduel, s'établissant sur plusieurs jours. Or, une inactivation répétée uniquement lors des quelques heures suivant l'apprentissage quotidien n'a probablement pas suffi à perturber les processus de consolidation du souvenir, rendant, à mes yeux, la conclusion des auteurs un peu hâtive.

L'ensemble des données relative à l'implication des ReRh dans la mémoire de travail spatiale sera abordée plus tard, dans la Partie 1 de cette thèse.

Chez l'humain, le rôle des ReRh en lien avec la pérennité des souvenirs a également été décrit, renforçant les conclusions faites chez le rongeur. Pour étudier le rôle des ReRh chez l'humain, des techniques d'imagerie cérébrales sont combinées à des tâches de reconnaissances visuelles où plusieurs items sont associés afin d'être mémorisés. Thielen et al. ont décrit une augmentation de la connectivité fonctionnelle entre les noyaux de la ligne médiane du thalamus et les régions hippocampiques et corticales lors des phases précoces de la consolidation (Thielen et al., 2015). Wagner et al. ont confirmé cette idée selon laquelle le thalamus pourrait constituer un hub soutenant la formation et la pérennité des souvenirs (Wagner et al., 2019). Ils ont rapporté qu'une augmentation de la connectivité fonctionnelle entre le noyau médio ventral du thalamus (le Re chez l'humain) et les aires corticales lors de la période post-encodage, était associé à la formation de souvenirs plus durables.

Mémoire de peur

La consolidation des souvenirs de type aversifs, se rapproche, d'un point de vue conceptuel, de celle des souvenirs spatiaux, puisque dans les deux cas, l'information mémorisée est associée à un contexte (réussite au test = récompense alimentaire, s'extraire de la situation grâce à la plateforme refuge, ou à l'inverse, contexte = choc électrique). Ces deux types de mémoire reposent également sur l'implication de l'HIP et du CPFm. Dans cette optique, Quet et al. en 2020, ont testé l'impact d'une lésion des ReRh dans un paradigme classiquement utilisé pour tester la mémoire contextuelle : celui du conditionnement de peur, où l'animal va mémoriser l'association entre le contexte dans lequel il se trouve, et un choc électrique désagréable. Lors du rappel, pour mesurer le degré de rappel de l'information, on mesure le taux d'immobilisation comportementale (freezing) de l'animal. En réalisant les lésions avant

l'acquisition, les auteurs ont observé un déficit, exprimé par un taux de freezing plus faible que les contrôles, uniquement lors du test à 25 jours. La quantification de l'expression de c-fos n'a pas indiqué de modifications significatives dans les ReRh, quel que soit le délai du test, indiquant qu'ils ne seraient pas engagés lors de la récupération du souvenir. Pour le confirmer, les auteurs ont inactivé les ReRh juste avant le rappel à 1 ou 25 jours, grâce à une approche DREADD, et n'ont pas mis en évidence de déficit (Quet et al., 2020b). Les auteurs ont également testé l'impact de la lésion sur une tâche de conditionnement de peur au son, tâche indépendante de l'HIP, et n'ont pas mis en évidence de déficit mnésique. Ensemble, ces résultats confirment le rôle des ReRh dans la consolidation systémique d'une mémoire de peur au contexte, de manière identique à celle d'une mémoire spatiale, toutes deux étant des mémoires fortement hippocampo-dépendantes. Cette dernière composante, semble être particulièrement importante, puisque les ReRh ne sont pas non plus impliqués dans consolidation d'une mémoire associative olfactive (Quet et al., 2020a).

Les premiers auteurs à s'être intéressé à l'implication du Re dans un paradigme de peur conditionnée étaient Xu et Südhof en 2013. Grâce à une combinaison d'approche de traçage viral, d'optogénétique et d'inactivation/activation spécifique ils ont permis de mettre en évidence que le Re était impliqué dans le contrôle de la spécificité du souvenir. Ils ont mesuré ce paramètre en utilisant un paradigme classique de mémoire de peur au contexte, et ont mesuré le taux de freezing des animaux dans un contexte identique ou altéré à celui de la session d'acquisition où étaient administrés les chocs électriques. Les animaux ayant mémorisé un souvenir de manière peu spécifique les mènera à présenter un fort taux de freezing dans un contexte altéré : on parle de généralisation de la peur. Les auteurs ont montré que l'inhibition de la voie du CPFm aux ReRh lors de l'encodage induisait une généralisation de la peur 2 jours plus tard, indiquant l'importance de cette voie dans la gestion de la spécificité d'un souvenir. Cette généralisation de la peur était également présente après l'inhibition du Re uniquement, pendant l'acquisition de la tâche. A l'inverse, la stimulation du Re lors de l'acquisition réduisait ce phénomène, rendant le souvenir plus précis, plus spécifique au contexte de l'encodage. Ces résultats ont participé à ouvrir la voie des recherches sur le circuit impliquant l'HIP, le CPFm, et le Re en lien avec la persistance des souvenirs, confortant l'idée que ce petit noyau thalamique a un rôle important à jouer dans cette circuiterie (Xu and Südhof, 2013).

Plus récemment, Silva et al. ont également décrit l'implication du Re dans le processus d'extinction d'un souvenir d'une peur conditionnée chez la souris. L'extinction est un processus dont le but est « d'éteindre » le souvenir de peur, spécifiquement utilisé dans le contexte des stress-post traumatique chez l'humain, où la réexposition répétée à des stimuli associés à l'évènement traumatique, mais dans un environnement sûr (on parle de thérapie d'exposition) va permettre une atténuation de la peur pathologique associée au souvenir traumatique. Chez les rongeurs, l'exposition répétée au contexte d'encodage de la peur, en l'absence de chocs électriques va mener à une réduction progressive du freezing.

Après avoir établi une cartographie cérébrale des régions impliquées lors de l'extinction d'un souvenir de peur conditionnée chez la souris (Silva et al., 2019), ils ont se sont focalisés sur les structures candidates les plus à même d'intervenir dans le processus d'extinction ; la partie infralimbique IL du CPFm, l'amygdale basolatérale (BLA), et le Re. Les auteurs ont ainsi mis en évidence que les voies de l'IL au Re et de l'IL à la BLA étaient deux populations distinctes, et que la première était spécifiquement activée après les sessions d'extinction. Ils ont ensuite décrit que l'activité spécifique du Re était décisive ; son activation lors des sessions d'extinction facilite le processus, tandis que son inactivation empêche le souvenir d'être actualisé. Les auteurs ont montré que le Re était particulièrement actif juste après l'expression du comportement de peur, le freezing, confortant l'idée d'un rôle crucial du Re pour éteindre le comportement de freezing pendant l'extinction d'un souvenir à long terme (Silva et al., 2021)

c) Pathologies associées

Du fait de sa position-clé entre l'HIP et le CPFm, le dysfonctionnement des ReRh pourrait être impliqués dans diverses affections cliniques, tels que des troubles persistants de la mémoire de travail, ou d'autres troubles cognitifs partagés dans des pathologies neurologiques ou psychiatriques.

Alzheimer

En 1991, Braak et Braak ont décrit un grand nombre de dépôts amyloïdes extracellulaires dans presque tous les noyaux thalamiques. Il y avait également de nombreux enchevêtrements neurofibrillaires dans le noyau antérodorsal, qui était le plus touché de tous, mais aussi dans le noyau Re. Ces altérations ont certainement pu contribuer à la perturbation de l'information

circulant au sein des circuits limbiques et in fine aux symptômes cognitifs de la maladie (Braak and Braak, 1991).

C'est pourquoi, en utilisant deux modèles souris de la maladie d'Alzheimer, Kohli et collaborateur ont testé l'activation optogénétique des noyaux antéropostérieurs du thalamus, et du Re, dans le but de restaurer des fonctions cognitives perturbées chez des modèles murins de la maladie. L'activation optogénétique de l'ATN ou du Re n'a pas permis d'améliorer de manière significative les performances mnésiques dans des tâches de reconnaissance d'objet ou de mémoire spatiale évaluée dans un labyrinthe radial. Les auteurs concluent sur le fait qu'une compensation a pu être mise en place, ou au fait que les modifications pathologiques des modèles murins soient trop avancées pour permettre une récupération mnésique (Kohli et al., 2021).

Dépression / anxiété

Kafetzopoulos et coll. (2018) ont utilisé des lésions NMDA ou des inactivations réversibles du Re chez des rats soumis au test de nage forcée, test utilisé pour mesurer l'état « dépressif » des animaux, et leur « résignation acquise » (learned helplessness), un test pré-clinique pour tester l'efficacité de traitements antidépresseurs. Des animaux dont le Re est lésé présentent un niveau d'immobilité plus faible et un temps de nage plus élevé, suggérant des effets de type antidépresseur. L'ajout d'un protocole de stress pendant 3 semaines a augmenté la durée d'immobilité dans le test de nage forcé, ce qui a pu être contré par la lésion du Re, de même que par un traitement anti-dépresseur (Kafetzopoulos et al., 2018). Lee et al 2022 ont montré une augmentation du volume de matière grise thalamique, particulièrement au niveau du noyau Re chez des personnes réfugiées. Elle serait corrélée à des symptômes dépressifs moins nombreux chez une population de personnes réfugiées, qui traduirait une augmentation de la résilience dépendante de la taille de la structure. (Lee et al., 2022).

Enfin grâce à l'équipe de T. Allen, une nouvelle procédure d'identification neuroanatomique basée sur la connectivité anatomique pour la ligne médiane du thalamus a été décrite, offrant de nouvelles opportunités pour étudier cette région in vivo chez l'humain, dans des populations saines, et chez celles souffrant de troubles psychiatriques et neurologiques (Reeders et al., 2022).

Pour finir, d'autres études se sont également focalisées sur l'implication des ReRh dans d'autres pathologies, telles que l'épilepsie (Romeo et al., 2019), la schizophrénie (Lisman et al., 2010; Duan et al., 2015; Dolleman-van der Weel and Witter, 2020), ou encore le syndrome d'alcoolisation fœtale (Gursky and Klintsova, 2021). Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents au fonctionnement des ReRh, contribuera à établir des liens utiles entre la recherche préclinique et les futures applications thérapeutiques, et ce dans différents domaines.

Objectifs de la thèse

L'ensemble des études citées jusqu'à présent convergent vers l'idée d'un candidat sérieux, à même de moduler le transfert d'information au sein du réseau HIP-CPFm. **Ce projet de thèse cherche ainsi à étudier chez le rat, l'implication des noyaux ReRh dans deux systèmes de mémoire différents, puisqu'ils reposent dans les deux cas sur l'interaction entre l'Hip et le CPFm : la mémoire de travail spatiale (MTS) et la consolidation d'un souvenir spatial en mémoire à long terme (MLT).**

Ma thèse s'inscrit dans l'optique de mieux caractériser le réseau de la mémoire et ce dans deux sous-systèmes :

D'un point de vue temporel premièrement, en interrogeant donc le rôle des ReRh dans le maintien **à court terme d'une information spatiale**. Jusqu'à présent, les quelques études qui soutiennent une implication des ReRh en MTS reposent sur des protocoles utilisant une inactivation réversible (grâce au muscimol, un agoniste des récepteurs GABA A, ou encore grâce à des outils pharmacogénétiques) sur une fenêtre temporelle qui englobe des épisodes d'encodage et de réactivation de la mémoire. Ces approches ne distinguent donc pas une éventuelle participation à des processus d'encodage, de maintenance et/ou d'utilisation de l'information après de courts délais (sec à min). Le but de ce premier projet était alors de **savoir si les ReRh contribuent à tous ces processus ou à l'un d'entre eux en particulier**. Cette première partie de thèse consistera en une courte introduction sur cette thématique non-abordée jusqu'ici, avant la présentation des travaux réalisés sous la forme de deux publications, et sera suivie d'une discussion.

Le second projet portant sur la consolidation d'un souvenir spatial en MLT cherche à disséquer anatomiquement le **réseau entre l'Hip, le CPFm et les ReRh**, afin de comprendre **quelle(s) voie(s) y sont indispensable(s) à la persistance/consolidation d'un souvenir**. Mon projet de thèse s'est focalisée sur la voie du CPFm aux ReRh, car elle a déjà été décrite comme impliqué dans l'extinction d'une peur conditionnée ([Ramanathan et al., 2018](#); [Silva et al., 2021](#)), et dans le contrôle de la spécificité du souvenir dans un même paradigme ([Xu et Sudhof, 2013](#)). Cette seconde partie de thèse sera constituée des matériels et méthodes utilisés, des résultats obtenus, puis d'une discussion et les perspectives ouvertes par ces travaux.

**- PARTIE 1 : L'implication des ReRh en
mémoire de travail spatiale -**

I. Introduction sur le concept de la mémoire de travail

Chez l'humain, le concept de mémoire de travail (**MT**) a été proposé par Baddeley et Hitch en 1974. Il appartient au registre de la mémoire à court terme et assure la double fonction de traitement et de stockage temporaire de l'information (Baddeley and Hitch, 1974). La MT est utile pour des tâches telles que le raisonnement, la lecture ou le calcul mental. D'un point de vue fonctionnel, elle se compose d'un administrateur central et de deux sous-systèmes : un calepin visuo-spatial et une boucle phonologique. **L'administrateur central** constitue un mécanisme attentionnel qui contrôle et coordonne les deux autres sous-systèmes ; il en intègre les informations et les met en relation avec une quatrième composante (composante ajoutée dans une révision du concept initial en 2000 (Baddeley, 2000), le tampon épisodique.

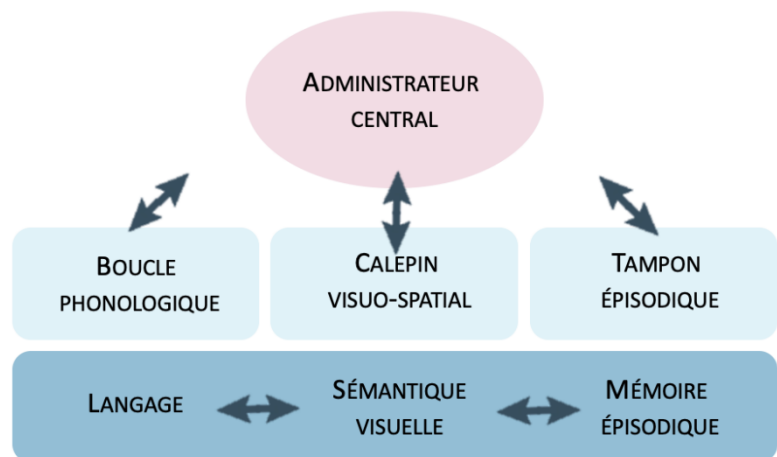


Figure 22. Modèle de la mémoire de travail chez l'humain par Baddeley

Le **calepin visuo-spatial** permet de maintenir en mémoire les informations visuelles, tandis que la **boucle phonologique** se charge du maintien des

informations verbales ou symboliques (telles que les chiffres ou symboles), notamment grâce à la répétition subvocale (Baddeley, 1992). Ces deux systèmes intègrent et stockent activement les différentes représentations en mémoire, de sorte qu'elles soient continuellement mises à jour et cohérentes avec la tâche en cours. Le **tampon épisodique** va, en parallèle, associer les données issues des différentes modalités sensorielles maintenues en MT avec celles issues de la mémoire à long terme épisodique, pour créer une représentation logique de l'information en MT.

Le concept de MT inclue un administrateur central, qui contrôle grâce à l'attention, deux sous-systèmes de mémoires temporaires basées sur les modalités visuelles et phonologiques. Le tampon épisodique comprend un lien vers la mémoire à long terme. Les composants interagissent entre eux et sont liés à la mémoire à long terme.

Cette vision modulaire du traitement des informations sensorielles a été confirmée expérimentalement chez des sujets sains, notamment grâce au développement des paradigmes en « double-tâche » (McDowell et al., 1997; Klingberg, 2000; Olive, 2004), mais des preuves neuropsychologiques étayent également cette dichotomie. Certains patients ont de grandes difficultés à imaginer et à se rappeler les caractéristiques visuelles telles que les caractéristiques physiques d'une race de chien, ou de la couleur d'un fruit, mais ne rencontrent aucune difficulté dans des tâches spatiales telles que la description d'itinéraires ou la localisation de villes sur un plan (Farah et al., 1988). De manière intéressante, il semblerait que chez le Rat, cette vision modulaire du traitement de l'information soit également présente, et que les informations sensorielles relatives à l'odorat et celles d'ordre spatial soient également traitées indépendamment (Bratch et al., 2016).

Bien que sa définition soit explicite chez l'humain, chez l'animal, il est difficile de différencier la MT de la mémoire à court terme. Dans les années 1970, David Olton et Werner Honig, furent les premiers auteurs à appliquer la notion de MT à la cognition chez l'animal. Au sein du labyrinthe radial, Olton et ses collègues ont observé que des rats apprenaient rapidement à ne pas ré-entrer dans les bras dont ils avaient déjà récupéré la récompense. Ce constat était la preuve d'une MT chez le rat, se définissant comme la capacité pour l'animal de se souvenir quel bras il avait visité au sein d'une session, information obsolète/caducque le lendemain, puisque tous les bras seront à nouveau récompensés (Olton and Samuelson, 1976; Olton et al., 1979). Honig, dont les études ont porté sur la mémoire chez le pigeon, caractérise la MT comme le maintien d'une représentation en mémoire, au cours de laquelle le signal initial n'est plus présent. Il la distingue de la mémoire à long terme par sa brièveté. La MT fonctionne sur un essai particulier, mais doit ensuite être oubliée ou ignorée lors des sessions ultérieures, pour lesquelles la consigne a été modifiée (Spetch and Honig, 1988).

Le CPFm, chez le primate humain et non humain comme chez le rongeur, est connu pour assurer un rôle crucial dans les fonctions exécutives, dont la prise de décision, les comportements orientés vers un but, ou encore la MT (Miller and Cohen, 2001; Churchwell and Kesner, 2011). En revanche, la MTS semble être le produit d'interactions dynamiques entre le CPFm et d'autres systèmes cérébraux, particulièrement l'HIP. Précisément, c'est la

qualité des interactions entre le CPFm et l'HIP qui déterminera les niveau de performances des animaux (pour revue (Griffin, 2015; Jin and Maren, 2015)).

Compte tenu de l'absence de projections directes du CPFm vers l'HIP, les noyaux de la ligne médiane du thalamus ventral, les ReRh, ont une position anatomique idéale pour transmettre les informations d'une structure à l'autre. En effet, ils reçoivent des afférences du CPFm et de l'HIP, structures vers lesquelles ils renvoient des efférences. Nombreuses sont les études qui se sont focalisées sur le rôle que pouvait avoir ces noyaux ReRh en lien la MTS, puisqu'ils se sont avérés impliqués dans différentes tâches où la coordination de l'HIP et du CPFm était nécessaire (pour revue Dolleman-van der Weel et al., 2019; Cassel et al., 2021).

En revanche, jusqu'à présent, les quelques études qui soutiennent une telle implication reposent sur des protocoles utilisant une inactivation fonctionnelle réversible des ReRh (grâce au muscimol, un agoniste des récepteurs GABA-A, ou encore grâce à des outils pharmacogénétiques, voir *tableau récapitulatif en discussion de cette partie*). Qui plus est, l'inactivation recouvrait une fenêtre temporelle englobant des épisodes d'encodage et de réactivation de la mémoire. Ces approches ne permettent pas de distinguer une éventuelle participation des noyaux ReRh spécifiquement à des processus d'encodage, de conservation et/ou d'utilisation de l'information après de courts délais (sec à min).

Le but de ce projet a consisté à essayer de comprendre dans quelle mesure les ReRh étaient nécessaires à tous ces processus ou à l'un d'entre eux en particulier. Pour répondre à cette question, un protocole de MTS a été pensé dans le labyrinthe en double-H (DH) (e.g., Gasser et al., 2020). Le DH est un labyrinthe aquatique mis au point au laboratoire (Pol-Bodetto et al., 2011; Cassel et al., 2012). Un long délai post échantillonnage, de 6h, a permis d'inactiver les ReRh avec du muscimol et de séparer temporellement les différents processus engagés (encodage / maintien / rappel).

Dans le DH, sur le même principe que la piscine de Morris, les rats devaient atteindre une plateforme refuge, immergée sous l'eau, et donc invisible. Comme dans l'ensemble des tâches en MTS, une session était constituée de 2 essais. Le premier essai d'échantillonnage, consistait à l'exploration du dispositif afin d'y localiser la plateforme. Après un délai de 6h, le second essai test vérifiait la capacité des rats à y revenir le plus directement possible. L'emplacement de la plateforme était modifié entre chaque session (mais restait le même pour deux essais

successifs), tout comme les points de lâcher qui changeaient entre chaque essai, afin de conférer à la tâche un caractère spatial. Le groupe expérimental (**SPAT**) a dû utiliser des indices allothétiques pour trouver l'emplacement de la plateforme, tandis qu'un groupe contrôle (**PROC**) suivait un protocole où la plateforme était maintenue en position constante d'un jour à l'autre. La tâche des contrôles reposait donc sur la mise en œuvre d'une stratégie égocentrique, engageant une mémoire de type procédural, et permettait d'avoir un groupe engageant également l'aspect moteur de la nage dans le dispositif, mais sans solliciter la MTS.

Dans notre premier article publié, [Morvan et al., 2022](#), les rats ont été mis à mort quatre-vingt-dix minutes après la dernière session, afin de permettre la quantification du marquage c-Fos lors du dernier essai test, à un délai de 6h post-encodage. C-fos est un gène précoce, dont l'expression est induite par l'activité neuronale. Il permet donc de visualiser et de comparer, grâce à un marquage par immunohistochimie, l'activité des différentes régions cérébrales. La comparaison entre les groupes SPAT et PROC a été complétée par l'ajout d'un groupe home-cage (**HC**), dont les rats sont restés dans leur cage de stabulation durant la totalité de l'expérience. Il s'agit d'un contrôle supplémentaire par rapport au comportement natatoire.

II. Publication 1 : Ventral midline thalamus activation is correlated with memory performance in a delayed spatial matching-to-sample task : a c-Fos imaging approach in the rat.

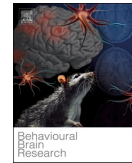
Behavioural Brain Research 418 (2022) 113670



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Behavioural Brain Research

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



Ventral midline thalamus activation is correlated with memory performance in a delayed spatial matching-to-sample task: A c-Fos imaging approach in the rat

Thomas Morvan^{a,b,1}, Laurine Boch^{a,b,1}, Elena Mikhina^{a,b}, Brigitte Cosquer^{a,b}, Aline Stéphane^{a,b}, Anne Pereira de Vasconcelos^{a,b}, Jean-Christophe Cassel^{a,b,*}

^a Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

^b LNCA, UMR 7364 - CNRS, F-67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Brain imaging
Rat
Reuniens nucleus
Rhomboid nucleus
Thalamus
Spatial working memory

ABSTRACT

The reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei of the ventral midline thalamus are bi-directionally connected with the hippocampus and the medial prefrontal cortex. They participate in a variety of cognitive functions, including information holding for seconds to minutes in working memory tasks. What about longer delays? To address this question, we used a spatial working memory task in which rats had to reach a platform submerged in water. The platform location was changed every 2-trial session and rats had to use allothetic cues to find it. Control rats received training in a typical response-memory task. We interposed a 6 h interval between instruction (locate platform) and evaluation (return to platform) trials in both tasks. After the last session, rats were killed for c-Fos imaging. A home-cage group was used as additional control of baseline levels of c-Fos expression. C-Fos expression was increased to comparable levels in the Re (not Rh) of both spatial memory and response-memory rats as compared to their home cage counterparts. However, in spatial memory rats, not in their response-memory controls, task performance was correlated with c-Fos expression in the Re: the higher this expression, the better the performance. Furthermore, we noticed an activation of hippocampal region CA1 and of the anteroventral nucleus of the rostral thalamus. This activation was specific to spatial memory. The data point to a possible performance-determinant participation of the Re nucleus in the delayed engagement of spatial information encoded in a temporary memory.

1. Introduction

In a commercial area, we usually park our car in a large parking lot among a plethora of other cars. When coming back after shopping, most of us return to their car with minimal seeking effort. Our vehicle's location remained in our memory for the duration of shopping. Once back, driving the vehicle, this information has become useless and most often vanishes. The temporary storage of information is a major component of the working memory (WM) system in humans and animal models (e.g. [1]).

Several brain regions participate in WM, including the prefrontal, parietal, temporal cortices, and basal ganglia (e.g. [2,3]). In animal models, WM is defined as a transient memory for an item used in a given session of a task, and which is no longer valid for the next session of the

same task (e.g. [4]). Thus, in a typical WM test, an animal gets an instruction trial followed by an immediate or delayed evaluation trial. When WM is operating correctly, performance during the evaluation trial is better than during the instruction trial. From session to session, the instruction is different, so that information sampled at one time remains relevant only for this time.

When the WM task is spatial, as for a reinforced alternation task in a T-maze, both the hippocampus (Hip) and the medial prefrontal cortex (mPFC) strongly contribute to it (e.g. [5–8]). For instance, Churchwell and Kesner [5] elegantly showed that when a unilateral inactivation of the Hip, the WM deficit grows proportionally to the length of the interval separating the evaluation from the instruction trial (see also [9]).

The reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei, two components of the

* Correspondence to: Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France.

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

¹ Contributed equally to this work

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113670>

Received 1 September 2021; Received in revised form 8 November 2021; Accepted 10 November 2021

Available online 17 November 2021

ventral midline thalamus, participate in cognitive processes requiring a coordinated activation of the Hip and mPFC (e.g. [10–14]). This is most probably the reason why spatial WM (SWM) tasks appear sensitive to permanent or reversible alterations of these nuclei [13]. Using a T-maze, Layfield et al. [15] inactivated the ReRh nuclei and found an alternation deficit only when the delay between instruction and evaluation trials was of 5 or 30 s compared to no delay. Viena et al. [16] used a similar task and came to the same conclusion for delays of 30, 60, and 120 s. Duan et al. [17] induced a reinforced alternation (delay = 15 s) deficit in a T-maze with a delta frequency-like optogenetic stimulation of the Re delivered during both the instruction and the evaluation trials (no stimulation in between). In a Y-maze, Rahman et al. [18] obtained analogous alternation deficits by optogenetic, delta-like stimulation of Re projections to the dorsal hippocampus (delay = 15 s). Altogether, these data point to a possible role for the Re and/or Rh nuclei in the temporary maintenance of spatial information in the WM buffer. Because T-maze alternation devices are often made of opaque lateral walls (as in the studies by Layfield et al. [15] or Viena et al. [16]), the allocentric spatial load of the task may be overestimated (e.g. [19]). Therefore, depending on the conditions, egocentric or even other (e.g. [19]) processes might enter into play (e.g. [20]). Furthermore, in the T-maze, Viena et al. [16] reported marked deficits that were produced with relatively high amounts of muscimol (250 ng and 500 ng). In another study, smaller amounts of the drug also revealed highly efficient (e.g., 30 and 80 ng in [21]), though in a different task. Large drug amounts infused in target regions as small as the Re or Rh nucleus may question the anatomical specificity of the effects.

In the current study, we used a delayed matching-to-place (DMTP) task taxing spatial working memory (SWM). In a simple maze (the double-H maze; [25–28]), rats had to navigate to a platform according to allothetic cues in order to escape from cold water. We used an immediate early gene imaging approach that prioritized anatomical resolution. We compared rats performing the DMTP task to controls performing an egocentric task relying on response memory without precluding elaboration of a cognitive map. A variant of this egocentric task has been used in a previous study [22]. A home-cage group was used as additional baseline control. We placed a strong load on temporality by using a delay of 6 h between the instruction and evaluation trials, after which rats were killed for histological preparations. As instruction and evaluation trials were separated by an inter-trial interval (ITI) of 6 h, instruction-related c-Fos modifications had vanished at the time of the evaluation trial [23,24], meaning that the collected c-Fos expression patterns mainly reflected activity patterns corresponding to memory activation during the evaluation trial.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Male Long-Evans rats (Janvier Labs, Le Genest-St-Isle, France; $N = 26$) were used. Rats were two months old (body weight: 250 g in average) upon arrival at the laboratory. They were housed by groups of two with ad libitum food and water in a temperature (22 ± 1 C)-controlled room, under a 12–12 h light–dark cycle (lights on at 7.00 a. m.; humidity $55 \pm 5\%$). A wooden chew was placed in each cage. The study respected the rules and guidelines of the European Parliament 2010/63/UE of September 22, 2010, and of the French Department of Agriculture and Food (decree no. 2013–118, 1st of February 2013). The current project was run under official agreement (no. #11427).

2.2. The double-H maze: device

The homemade device has been described in detail in previous articles (e.g. [25–28]), along with precise characteristics of the room in which it is permanently hosted [21]. Briefly, the general layout of the apparatus corresponds to the shape of two contiguous capital Hs. The

device is made of three parallel run arms, 160 cm in length and 18.8 cm wide (internal measure), connected to each other at their center by a perpendicular arm. All side walls, 35 cm high, are made of transparent Plexiglas to favor perception of allothetic cues. The two opposite arms in the middle are labeled north (N) and south (S), respectively (see Fig. 1). The four other arms are labeled south-east (SE), south-west (SW), north-east (NE), and north-west (NW). For all behavioral training and testing (see below), the device was always kept at the same place (on a square table, 80 cm above the floor). All cues in the room (two black disks on one wall, and one large and well-contrasted triangle on another wall, two orange-painted heating ducts above the maze, one table, one chair, one computer desk, one boiler, etc) were left at their original location for the entire duration of the experiment. Most of these landmarks were located close to the maze, i.e., between 1.20 and 1.50 m from the closest maze wall and between 86 and 140 cm above the water surface. To secure the locations of potentially mobile objects, including the maze and its table, their position was marked on the floor. In the room, there was a small loudspeaker fixed on the wall, playing music at low volume during the 12-h light period. From a previous experiment, we know that rats do not use this audible signal to anchor their orientation/navigation, even when deprived of visual cues [25].

2.3. Habituation and pre-training protocols

The habituation protocol (Fig. 1) encompassed three stages. In stage 1, habituation permitted rats to learn that, once in the cold water (20°C), they could escape from it by climbing on a visible platform. Only SE and NE arms were accessible (a transparent guillotine door prevented access to the central alley, thus to other arms), the platform was located in the NE arm, and the rats were released for 4 successive trials from the SE arm (see Fig. 1). Height of the water (20°C) was 15 cm. Addition of powdered milk (1.2 g/L) made the water opaque. In stage 2 (pre-training stage), rats were further familiarized with the escape task, the allothetic cues surrounding the maze, and the fact that the platform was now hidden under the water surface (by 1 cm). Pre-training consisted in 6 successive 4-trial sessions, one per day. Daily trials were separated from each other by about 10 s. Rats were always released from the N arm (S arm closed). They had to reach the platform located in the SW arm. We chose a monotonous, egocentric-like, pre-training task to limit both the spatial load of the task and cognitive processing, although we know that such conditions enable slow-progressing integration of allothetic cues [25]. We recorded the latency, distance and speed to reach the platform. In stage 3 (probe test), all rats were given a single 60-s test trial (single trial; start from the S, N arm closed, no platform in the maze) in order to check that they had also integrated the configuration of the allothetic cues (cognitive map) and were able to use them appropriately. From previous work, we know [22] that when, after a comparable pre-training protocol, rats are released for the probe trial after a 180° shift of the usual start arm (e.g., from the N after having been pre-trained from the S), at least half the animals immediately swim to the former location of the platform with the aid of allothetic cues. Then, however, during the remaining time of the probe trial, they spend a longer average time in the former target arm than in the other accessible arms [25]. These two behaviors demonstrate that a spatial map has been constructed during repetitive pre-training, although the strategy with which most rats actually apprehended the task during the pre-training was overwhelmingly a response strategy, as also demonstrated previously [e.g., 25]. Indeed, in this former study, Gasser et al. [25] observed that after translating the start of a trial to the arm located on the left of the usual start arm, i.e., to the SW arm when the start was from the S one during pre-training (a shift resulting in a weak alteration of the perspective on environmental cues), the first choice of most rats (7 out of 8) was to repeat the right-left turns made during pre-training. Such behavior indicates that the rats' behavior is largely response memory-based. This is not the case after a 180° rotation of the start arm (N instead of S, resulting in a dramatic alteration of the

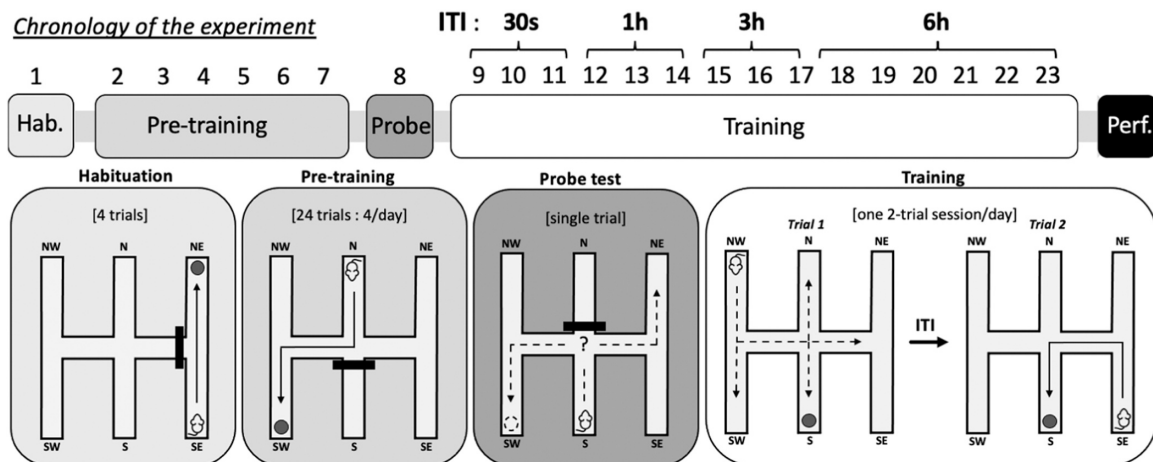


Fig. 1. Habituation, pre-training, and training protocols. For habituation, rats are given 4 successive trials in which they have to swim straight from the SE to the NE, where the escape platform is visible. For pre-training, the platform is hidden underneath the water surface in the SW and the rats are released at the extremity of the N arm. Pre-training lasted from day 2 to day 7 and consisted in 4 successive trials per day. The S arm is closed by a guillotine door. On day 8, the platform is removed from the maze and the rats are released from the S arm (180° rotation of the usual release place); the N arm is closed by a guillotine door. The trial is stopped after 60 s. This protocol is used for both SWM and CTRL rats. From days 9–23, the rats are trained with an interval interposed between trial 1 (instruction trial) and trial 2 (evaluation trial). The first ITI (days 9–11) is of 30 s, then of 1 h (days 12–14), subsequently of 3 h (days 15–17), and finally of 6 h (days 18–23). From days 9–23, the platform and start locations are changed every day. Notice that from day 9 onwards, all arms were accessible (guillotine door removed). On day 23, ninety min after the evaluation trial, the rats are perfused and their brain is prepared for later immunostaining.

perspective on environmental cues; see discussion of this point in [22]). It is noteworthy that in the latter study [22], 12 out of 13 rats, even after only 4 days of pre-training, showed a response memory-based swim pattern when released from the SW following pre-training from the S, against only 6 out of 12 when released from the N following pre-training from the S. These previous findings indicate that in case of a marked perspective modification at the start of the probe trial, a larger number of rats immediately engage a place memory-based strategy as compared to a situation with weaker perspective modifications. This is why we used a probe trial protocol with marked perspective modifications in the current study. Two differences with our former studies are that in Cassel et al. [22], rats were pre-trained for only 4 days (6 days in [22]), and that the start arm during pre-training was the S one for at least half the rats tested in the studies by Cassel et al. [22] or Gasser et al. [25]; for the others, it was the N.

We analyzed the first swim path of the rats (from start to first arm visited), as well as the time they spent in the SW arm (former location of the platform) and in the NE arm (to which successive right-left turns led the rats after the start). The times in SW and NE arms were compared to chance level. As each arm had a surface representing 13.7% of the accessible surface of the maze (i.e., 5 arms + central alley), and as the probe trial lasted for 60 s, computation of chance level was as follows: $60 \times 0.137 = 8.2$ s. The purpose of this repetitive training was to allow the rats to become highly familiar with the device, escape possibility, and allothetic environment.

2.4. Training protocol

We calibrated the DMTP protocol used for c-Fos imaging (see Fig. 1 for an illustration) in a preliminary experiment (not reported here). In this experiment, we established that a progressive increase of the interval between trial 1 and trial 2 to a duration of 6 h yielded optimal performance in comparison with the introduction of this long ITI immediately after pre-training. Thus, training used ITIs of 30 s (3 sessions), then 1 h (3 sessions), later 3 h (3 sessions), and finally 6 h (6 sessions). Two control groups were constituted. The first one (baseline control) consisted in home cage rats that were not tested (HC hereafter).

The second control group (CTRL hereafter) consisted in rats for which the behavioral protocol for training was the same as for pre-training (i.e., platform always in the same place, start arm always the same from session to session), except that no guillotine door was used, and ITIs identical to those used for the experimental group were interposed between trial 1 and trial 2. Thus, in this second control group rats had to solve the task by continuing to use their response memory.

2.5. c-Fos imaging

In the current report, names for cortical structures do not follow the recent nomenclature introduced by Vogt and Paxinos [29]. Instead, the names follow Paxinos and Watson [30]. The mPFC is subdivided in the anterior cingulate cortex (A32D in Vogt and Paxinos' nomenclature), prelimbic cortex (A32V), infralimbic cortex (A25), and for the more posterior cingulate cortex in areas CG1 (A24b) and CG2 (A24a).

All rats were perfused 90 min after the last evaluation trial (ITI = 6 h) using a lethal pentobarbital injection (200 mg/kg; i.p.). First they were perfused transcardially with 50 mL of 0.9% NaCl at 4 °C over 5 min, then with 150 mL of a 4% phosphate-buffered (0.1 M) paraformaldehyde solution (PFA, 4 °C). Their brain was removed, postfixed for 2 h in 4% PFA (4 °C), and placed into a 20% sucrose solution (in 0.1 M PBS) for 48 h at 4 °C. The brains were then quickly frozen in isopentane (−40 °C) and stored at −80 °C until their processing. Floating coronal sections (40 μm) were cut serially using a cryostat (MICROM HM 560). They were collected in 3 blocks between the mPFC (+3.72 according to Bregma; [30]) and the dorsal Hip (−4.08 mm from Bregma). All sections were collected in wells containing glycerol, ethylene glycol, sodium phosphate, and distilled water, in which they were kept frozen at −20 °C.

For immunostaining, the sections were first rinsed three times in PBS, during 10 min each, and then soaked for 1 h in 5% normal donkey serum in PBS containing 0.5% Triton X-100. They were subsequently transferred into the primary anti-Fos rabbit polyclonal antibody solution (1:4000, Rabbit anti-Fos polyclonal IgG; Synaptic Systems, 226003/13), where they were left overnight at room temperature. These sections were then rinsed and soaked in a buffer solution containing biotinylated

goat anti-rabbit secondary antibody (1:500, biotinylated Goat anti-rabbit IgG; Vector laboratories, PK 6100). Staining was revealed with the avidin–biotin peroxidase method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) coupled to diaminobenzidine.

The quantitative analyses of c-Fos-positive nuclei used a stereological approach. Sections were analyzed by investigators who were blind to the rats' identity. The overall number of c-Fos immunoreactive cells was estimated in the Re and Rh nuclei, the dorsal Hip (CA1, CA3, DG), the dorsolateral (DLS) and dorsomedial (DMS) striatum, mPFC (PL, IL, ACC), posterior cingulate cortex (CG1, CG2), and anterior thalamus (anterodorsal nucleus = AD; anteroventral nucleus, dorsomedial subdivision = AVDM; anteroventral nucleus, ventrolateral subdivision = AVVL). We used optical dissectors ($40 \times 40 \mu\text{m}$ for the Re; $30 \times 30 \mu\text{m}$ for the Rh; $40 \times 40 \mu\text{m}$ for the other structures) allowing unbiased counting [31,32]. The Hip, CG1, CG2, AD, AVDM and AVVL were chosen because of their implication in spatial memory processing. The mPFC was chosen because of its contribution to working memory processing. The DLS and DMS were chosen for their contribution to response memory, which was engaged in our CTRL rats. Height of the dissectors was 12–14 μm . For stereological counting, we used a Leica DM5500B light microscope coupled with a MicroFire CCD color camera (Optronics) equipped with a motorized x–y–z stage control. Stereological analyses were performed using the Mercator software (Explora Nova, La Rochelle, France) and all cell counts were processed online on the video image. The same light intensity in the microscope and the same parameters in the exposure time of the digital camera were used for all sections. Areas of interest in stained sections were first outlined using a 2.5x objective. C-Fos-positive cells were then counted using a 100x (1.40 NA) oil-immersion objective. Counting grids ($60 \times 60 \mu\text{m}$ [Re, Rh], $70 \times 70 \mu\text{m}$ [dorsal Hip]; $90 \times 90 \mu\text{m}$ [anterior thalamus], $120 \times 120 \mu\text{m}$ [mPFC, posterior cingulate cortex]), equidistant from each other, were randomly positioned within the area of interest using the Mercator software. The total number of c-Fos-positive nuclei in regions of interest was estimated from 4 to 9 sections per animal and region. The error coefficients (rev [33]) for each estimation and animal ranged from 0.07 to 0.39. For almost all regions, we collected data from 7 rats in the SWM and CTRL groups, and from 6 rats in the HC group. For the AD, AVDM, and AVVL regions of the thalamus, however, sample size was reduced to 6 rats in SWM and CTRL groups, and 4 rats in the HC group. Indeed, for stereological quantifications, we prepared 3 brain blocks, including one with the mPFC and striatum, and another one encompassing the dorsal Hip and ReRh. The AD, AVDM and AVVL being located in between these two blocks, we had occasionally too few sections encompassing these regions for reliable quantification.

2.6. Statistical analyses

Data were analyzed using one-way or two-way ANOVAs (latency during training phase), one-sample *t*-tests (comparison between a mean and chance), paired sample *t*-tests (comparison between trial 1 and trial 2), Chi^2 tests, and Spearman regression analyses. The correlations were performed for ensembles of nuclei or regions from a same structure, and correction of the type I error were made according to Bonferroni's simple but very conservative method (alpha level divided by number of comparisons for each structure). It is noteworthy that in doing so, one unavoidably increases the risk of a type II error [34]. C-Fos data were analyzed using a one-way ANOVA in each region/subregion of interest. Where relevant, two by two comparisons used the Newman-Keuls test. A *p* value lower than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Familiarization and pre-training

Two rats with inconsistent behavior (for one of them, obviously due to sickness) were discarded: 1 from the SWM group, the other from the

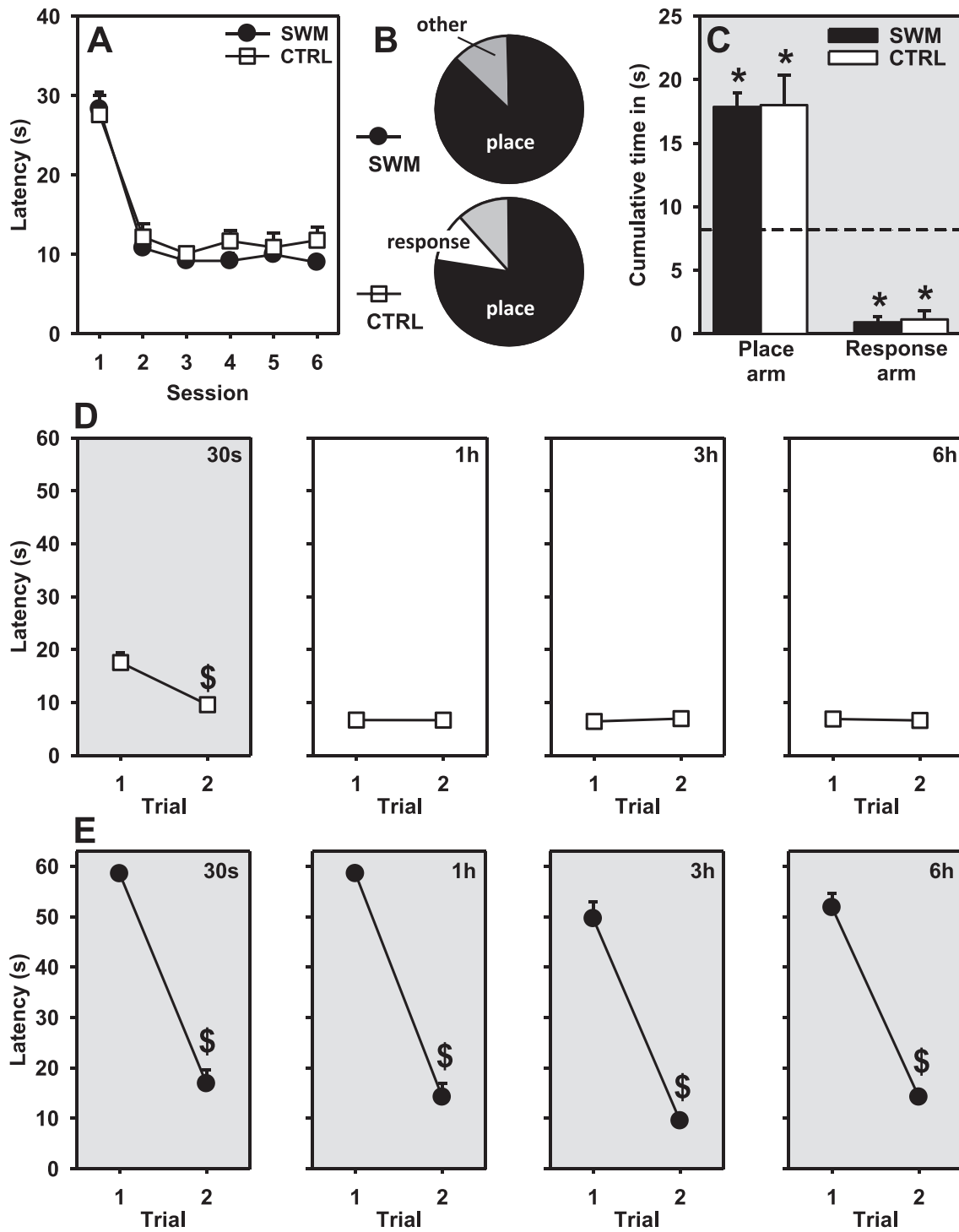
CTRL group. This reduced each sample to 9 subjects. Behavioural results are shown in Fig. 2A–C. For pre-training results, a Group (SWM, CTRL) X Session ANOVA showed no significant Group effect ($F_{(1,16)} = 1.1$, $p = 0.3$), a significant Session effect ($F_{(5,80)} = 51.9$, $p < 0.001$), and no significant interaction effect ($F_{(5,80)} < 1.0$, $p = 0.8$). In the probe trial (Fig. 2B), a majority of rats (i.e., at least 78%) swam directly to the former location of the platform, showing that most of them had elaborated an immediately efficient cognitive map. This proportion was significantly above chance in both SWM ($\text{Chi}^2 = 8.2$, $p < 0.01$) and CTRL ($\text{Chi}^2 = 5.7$, $p < 0.05$) rats, and the difference between SWM and CTRL rats was not significant ($\text{Chi}^2 = 0.3$, $p = 0.54$). Data shown in Fig. 2C confirmed the spatial bias in both groups. Indeed, during the probe trial, the average time spent in the place arm (i.e., where the platform was located during training) was significantly larger than chance (i.e., 8.2 s) in SWM ($t_{(8)} = 16.3$, $p < 0.001$) and in CTRL ($t_{(8)} = 4.3$, $p < 0.01$) rats. Conversely, in the response arm (to which successive R-L turns led), this time was significantly below chance (SWM: $t_{(8)} = 25.8$, $p < 0.001$; CTRL: $t_{(8)} = 14.0$, $p < 0.001$). Fig. 2D illustrates performance recorded in the CTRL group for the different ITIs. Quickly a floor level was reached. There was a small but significant improvement at the 30 s ITI ($t_{(8)} = 3.4$, $p < 0.01$), due to an increase of average times recorded on trial 1. This increase was related to some change in behavior after removal of the guillotine door closing the access to the arm located in front of the start arm. As expectable, the difference between trial 2 and 1 was not significant on subsequent sessions. In Fig. 2E, it is obvious that SWM rats improved their performance between both trials, and did so in comparable ways for each of the ITIs (30 s, $t_{(8)} = 14.8$; 1 h, $t_{(8)} = 15.4$; 3 h, $t_{(8)} = 12.1$; 6 h: $t_{(8)} = 12.7$, $p < 0.001$).

The analysis of distances to the platform confirmed these observations (see supplemental data for an illustration). During the evaluation trial, the average swim speed of SWM rats was 25.5 cm/s, (± 1.1), and that of CTRL rats was 30.0 cm/s (± 1.0). The difference was significant ($F_{(1,16)} = 8.8$, $p < 0.01$), though not surprisingly given that controls were running a procedural task.

3.2. C-Fos imaging

Rats were perfused 90 min after the last session with the 6 h ITI. Typical c-Fos expression patterns are shown for some of the structures of interest in Fig. 3, namely for CA1, the DMS, and the Re nucleus.

From SWM and CTRL groups, two rats had to be excluded from counting, the quality of their stained sections being of too variable reliability. This reduced each sample size from 9 to 7. Average numbers of c-Fos positive counts are illustrated for each region in Fig. 4. In the Re nucleus, there was a significant Group effect ($F_{(2,17)} = 5.6$, $p < 0.05$), due to counts that were higher in CTRL and SWM rats as compared to HC rats ($p < 0.05$ in both cases). In the Rh nucleus, the Group effect was also significant ($F_{(2,17)} = 5.1$, $p < 0.05$). This time, only the difference between CTRL and HC rats was significant ($p < 0.05$), while the difference between CTRL and SWM rats only tended towards significance ($p = 0.06$). In the anterior thalamus, we found no significant Group effect in the AD ($F_{(2,13)} = 0.37$, ns). In the AVDM and the AVVL, however, the Group effect was significant ($F_{(2,13)} = 4.6$ and 5.2, respectively, $p < 0.05$ in both cases). In the AVDM, the difference between SWM and CTRL rats tended towards significance ($p = 0.06$) while SWM rats had significantly higher c-Fos counts than HC rats ($p < 0.05$). In the AVVL, SWM rats had significantly higher c-Fos counts in comparison with either CTRL ($p < 0.05$) or HC ($p < 0.05$) rats. In the dorsal Hip, we found no significant Group effect in CA3 ($F_{(2,17)} < 1.0$, ns) and DG ($F_{(2,17)} < 1.0$, ns), but the Group effect was significant in CA1 ($F_{(2,17)} = 5.2$, $p < 0.05$). This was due to an increase of c-Fos-positive cells in SWM rats as compared to their HC ($p < 0.05$) and CTRL ($p < 0.05$) counterparts. Despite an increase in CTRL and SWM rats, in the mPFC, we found no significant Group effect, whether in the anterior cingulate cortex (ACC; $F_{(2,17)} = 1.8$, ns), the prelimbic (PL; $F_{(2,17)} = 2.2$, ns) or the infralimbic (IL; $F_{(2,17)} = 2.0$, ns) cortices. It is noteworthy, however, that



(caption on next page)

Fig. 2. Performance of rats ($n = 9$ in each group) during pre-training and training. A: shows the latency to the platform over 6 daily sessions, each encompassing 4 successive trials, in SWM and CTRL rats during pre-training. The value shown is the mean of the 4 trials of each session. The rats were released from the N and the platform was located in the SW for each trial. B: Pie charts illustrating the first swim path adopted by the rats in the probe trial (platform removed, rats released with a 180° rotation of the start arm) in SWM and CTRL rats. Illustrated is the percentage of rats swimming directly to the former location (SW) of the platform by using a place memory ('place'; in black), repeating the right-left turn leading them to the NE arm by using a response memory ('response'; in white), or swimming directly to a different arm ('other'; in grey). The number of rats swimming directly to the NE was significantly above chance (i.e., 20%; χ^2 , $p < 0.01$). The number of rats making a response memory choice did not differ significantly from chance. C: Average cumulated time in the place arm (i.e., SW, where the platform was located during training) and in the response arm (NE, where a right-left turn led the rat right after its release in the maze). The interrupted line indicates chance level (see methods for its computation). Statistics: * significantly different from chance level (stippled line), $p < 0.05$. D: Latency to reach the platform in the CTRL group (platform always at the same location, rats always released from the same arm) during the training phase. Between trials 1 and 2, there was a 30 s, 1 h, 3 h, and finally 6 h interval. E: Same variable and same delays as in D, but rats from the SWM group were released from different locations between trials 1 and 2, and the platform was placed at a new location from day to day. In A, C, and D the data illustrated are means + SEM. In D and E, each mean corresponds to an average of 3 sessions/ITI duration, except for the 6 h delay, for which 6 sessions were run. Statistics in D and E: \$ significant improvement of performance as compared to trial 1, $p < 0.05$.

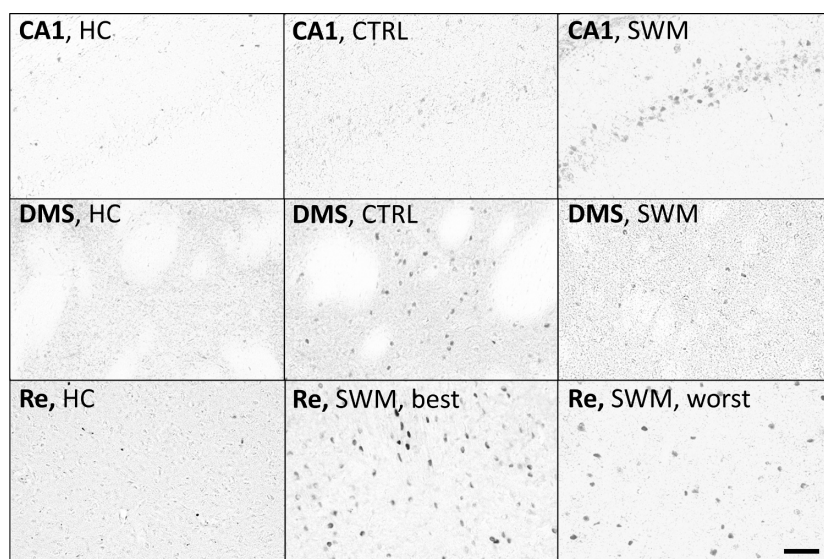


Fig. 3. Typical c-Fos immunostaining patterns in some of the regions of interest. Top: c-Fos expression in CA1 of home cage rats (CA1, HC), control rats performing the procedural task (CA1, CTRL), and rats tested for their spatial working memory capabilities (CA1, SWM). Notice the higher expression in SWM rats. Middle: the three same conditions (from left to right: HC, CTRL, SWM) in the dorsomedial striatum. Notice the higher expression level in the CTRL condition. Bottom: c-Fos expression level in the reuniens nucleus of a home cage rat (Re, HC), of the rat best performing in the spatial working memory task (Re, SWM, best), and of the rat showing the worst performance in the same task (Re, SWM, worst). Notice the higher c-Fos expression in the best-performing rat as compared to the worst performing one. Scale bar = 100 μ m.

more posteriorly, we found a significant Group effect in the cingulate cortex (CG2; $F_{(2,17)} = 4.0$, $p < 0.05$), and only a tendency towards significance in CG1 ($F_{(2,17)} = 2.7$, $p = 0.09$). In CG2, post-hoc comparisons showed significantly higher counts in CTRL and SWM rats as compared to their HC counterparts ($p < 0.05$ in both cases). Finally, in the striatum, we found a significant Group effect in the dorsomedial (DMS; $F_{(2,17)} = 4.4$, $p < 0.05$) and dorsolateral (DLS; $F_{(2,17)} = 4.9$, $p < 0.05$) regions. In both regions, CTRL rats had higher counts than HC or SWM rats ($p < 0.05$ in all cases).

3.3. Regression analyses

Regression analyses between c-Fos counts in the different brain sub-regions of either SWM or CTRL rats and their respective performance (latency on the 2nd trial; Fig. 5) only showed a significant correlation in the Re ($r = -0.89$, $p = 0.007$) and Rh ($r = -0.77$, $p = 0.041$) nuclei of SWM rats: the higher the number of c-Fos-positive neurons, the better performance. The same computations were done for distances (not illustrated) in place of latencies, and we also found a significant correlation in the Re ($r = -0.84$, $p = 0.017$), but only a strong tendency in the Rh ($r = -0.74$, $p = 0.058$). The only significant correlation that survived the Bonferroni correction (alpha level divided by number of correlations in each structure, i.e., thalamus, hippocampus, striatum) was in the Re nucleus. We also considered the average speed for our regression computations. There was no significant correlation, either in

the Re ($r = 0.24$) or in the Rh ($r = 0.25$). In CTRL rats, there was no significant correlation between these variables.

4. Discussion

During the evaluation trial after a 6-h ITI, we observed an increased c-Fos expression in several brain regions, including the ReRh. This increase appeared specific to DMTP task in region CA1 of the hippocampus and in one nucleus of the rostral thalamus (see Fig. 6, for an overview of major differences between SWM and CTRL rats). Quite logically, CTRL rats showed increased c-Fos expression in the DLS and DMS, two structures involved in response memory [22]. Because performance of SWM rats significantly correlated with the level of c-Fos immunohistochemistry in the Re nucleus, we suggest a possible relationship between the level of activation in these nuclei and the level of performance achieved in the memory task. This finding provides novel information with respect to previous findings showing an implication of the ventral midline thalamus in SWM assessed in a T-maze with ITIs of seconds to minutes (e.g. [15–17]).

4.1. c-Fos expression in CTRL rats performing the procedural control task

With progressive training, rats were able to keep spatial information for several hours, which confirms previous studies in other maze devices (e.g. [35,36]). Not all studies, however, substantiate this conclusion (e.

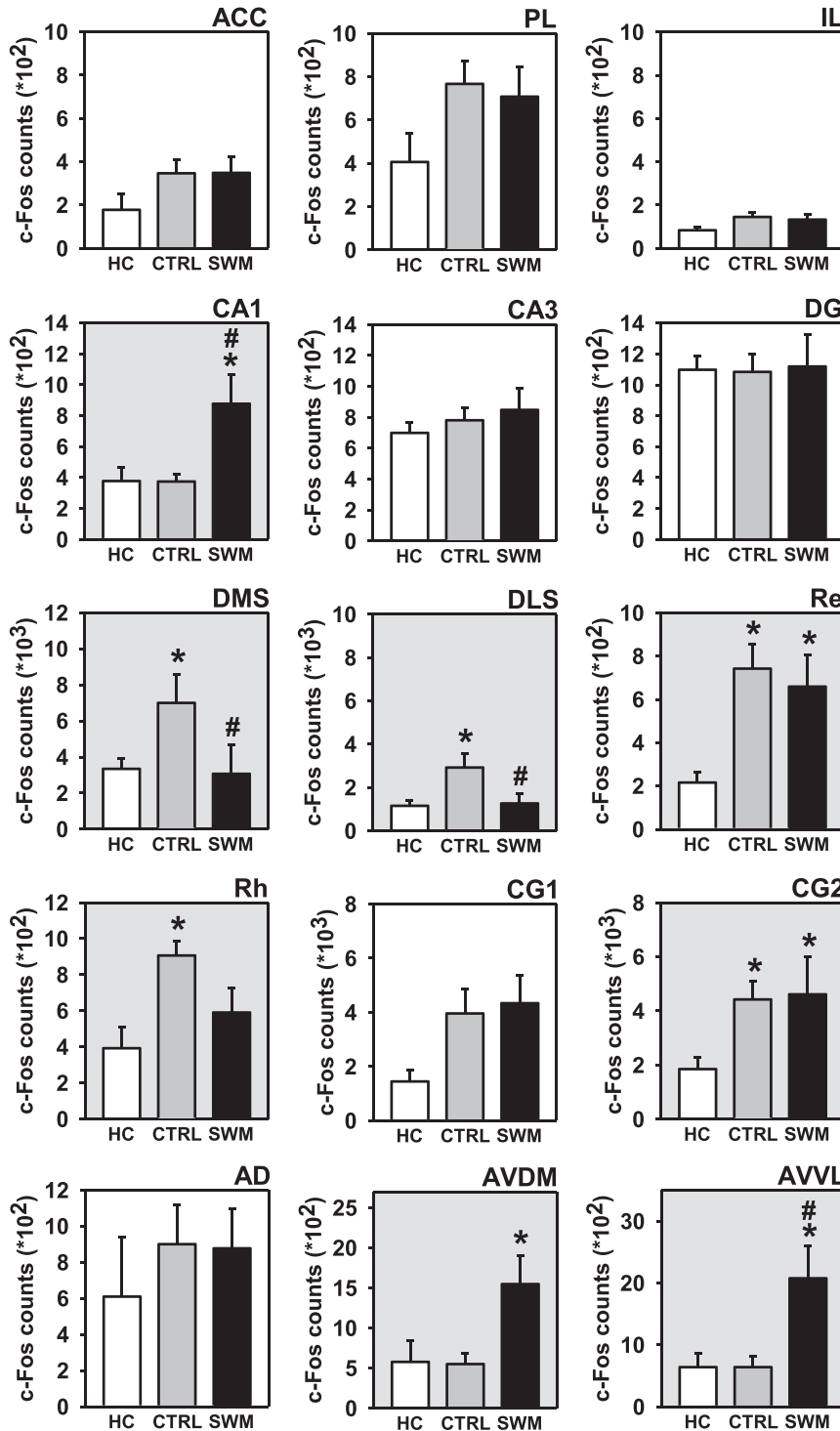


Fig. 4. C-Fos quantifications. The figure shows the average number of c-Fos positive cells stereologically counted in a variety of brain regions within the mPFC, the hippocampus, the striatum, and the thalamus. Statistics (Newman-Keuls after significant overall ANOVA effects): * $p < 0.05$, significantly different from HC; # $p < 0.05$, significantly different from CTRL. Figures showing a grey background correspond to a significant overall Group effect shown by the ANOVA. Notice that the Y axes sometimes corresponds to a 10^3 scale and sometimes to a 10^2 one. Abbreviations: CA1: region CA1 of the hippocampus; CA3: region CA3 of the hippocampus; DG: dentate gyrus; DMS: dorsomedial striatum; DLS: dorsolateral striatum; ACC: anterior cingulate cortex; PL: prelimbic cortex; IL: infralimbic cortex; CG1: region CG1 of the posterior cingulate cortex; CG2: region CG2 of the posterior cingulate cortex; Re: reuniens nucleus; Rh: rhomboid nucleus; AD: anterodorsal nucleus of the thalamus; AVDM: anteroventral nucleus of the thalamus, dorsomedial subdivision; AVVL: anteroventral nucleus of the thalamus, ventrolateral subdivision.

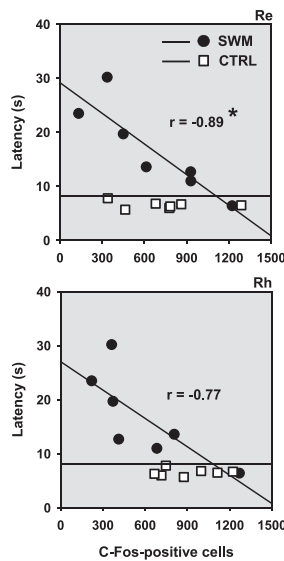


Fig. 5. Illustration of the regressions lines between latencies to the platform on the second trial of the last session with a 6-h ITI and number of c-Fos-positive cells in the Re and Rh nuclei of SWM and CTRL rats. CTRL rats performed a task based on their response memory. Statistics: * $p < 0.05$, significant correlation between both variables. Notice that reliable c-Fos-stained sections could be obtained in the Re and Rh for only 7 rats in each group, hence the slightly reduced sample size (from 9 to 7).

g. [37,38]). Discrepancies might be due to differences in training levels and task motivation (appetitive vs. aversive). Before being trained with ITI of increasing durations, all rats had been pre-trained using a repetitive egocentric navigation task, which does not prevent the formation of a cognitive map, as the room was illuminated and allothetic cues were visible [22]. Consequently, as found in a former study [25], after a 180° rotation of the start arm for the probe trial, a large majority of rats displayed an immediate place memory-based behavior. This was reflected in the first arm to which they swam after being released in the maze, namely that of the platform location during training. Existence of efficient place memory was confirmed by the time spent in the place arm relatively to the duration of the probe trial. From a previous study, we know that after such pre-training, a translation to the left of the start arm (instead of a 180° rotation) results in a repeat of right-left turns in most rats, reflecting an egocentric strategy [22,25]. C-Fos expression patterns of rats subsequently subjected to the DMTP training/task were compared to those of rats performing a procedural memory task (CTRL in the figures), as well as to home cage controls (HC in the figure).

With the ITI of 6 h between the instruction and the evaluation trials, we substantially reduced the possibility that a c-Fos expression pattern corresponding to the instruction trial could subsequently contaminate the pattern of brain activation corresponding to the evaluation trial. Indeed, even after massive brain activation such as during pentylentetrazol-induced seizures, c-Fos mRNA expression returns to close-to-baseline levels after 3 h post-administration, and protein levels do so after 6 h (e.g. [23]; see also [39–41] for other types of seizure with comparable c-Fos timings). In case of ongoing learning (water maze), c-Fos mRNA and protein levels have a relatively similar time course in e.g., the hippocampus [24]. Therefore, in the current study, c-Fos expression patterns are largely corresponding to brain activation accompanying the evaluation trial.

When CTRL rats were compared to their HC counterparts, the number of c-Fos-positive neurons was increased significantly in the Re and Rh nuclei, in region CG2 of the posterior cingular cortex, as well as

in the DMS and DLS. Among these modifications, the only ones not also observed in SWM rats were those found in the Rh nucleus, DMS and DLS. Regarding the DMS and DLS, we made relatively comparable observations in a former study in which rats were trained for 14 days in a repetitive egocentric task [22]. This task used the double-H maze, although with a difference relative to the current study: ITI did not exceed a few seconds and 4 consecutive trials were given each day [22]. In this study [22], we did not quantify c-Fos immunoreactivity in the ReRh nuclei. In the present study, as the number of c-Fos-positive neurons was not different between SWM and HC rats, the increased activation of the DMS and DLS of CTRL rats most probably reflected the expression of the response memory rather than a less specific behavior such as swimming to a goal or scanning the intra- and extra-maze environment. This interpretation is congruent with previous work in rats (e.g. [42,43]). The DMS controls action outcome and participates in goal-directed actions, while the DLS supports the storage of habits and stimulus-response learning (e.g. [44]). The CTRL protocol soliciting both functions, it is not surprising that an increased c-Fos signal appeared in both striatal regions.

Concerning the Rh, it is known that the nucleus projects terminals to the striatum, but the corresponding innervation density is not pronounced [45]. This is not a sufficient argument to disqualify a possible interrelated activation profile between the Rh, the DLS and DMS. However, our regression analysis did not show a significant correlation between c-Fos expression in the Rh and either of both other structures (r values were even close to 0). In CG2 and in the Re, we noticed a comparable increase of the c-Fos signal in CTRL and SWM rats, suggesting that in these two structures the changes found were not necessarily specific to the type of training or performance achieved. Furthermore, in CTRL rats, there was no correlation of response memory-based performance with the number of c-Fos-positive neurons in any of the quantified structures, especially not in the Re and Rh nuclei.

4.2. c-Fos expression in SWM rats and regression analysis

In rats tested for DMTP, we observed a task-specific increase of the number of c-Fos-positive neurons in region CA1 of the dorsal Hip and in one subdivisions of the anterior thalamus, namely the AVVM (Fig. 6; vs. CTRL; in the AVDM, the difference tended towards significance). The increase in CA1 is reminiscent to increases observed in spatial navigation tasks and therefore might be linked to a hippocampus-dependent processing of cues belonging to the allothetic spatial context of the DMTP task. This possibility is in line with a report by Teather et al. [46] who used cued vs. spatial tasks in the water maze and found an increased c-Fos immunoreactivity in CA1 of spatial rats. In comparison with c-Fos quantifications reported in some of our previous experiments on spatial memory, it is noteworthy that the relative increase found in the current study appeared of smaller amplitude. In the study by Klein et al. [47], for instance, the increase was about twice larger compared to baseline (home cage). We have to underline, however, that in the Klein et al. study [47], the spatial task was different and probably more demanding, as recent or remote memory retrieval was assessed in the Morris water maze after 5 and 25 post-acquisition days, respectively. Furthermore, in our Klein et al. study, rats had undergone less training than in the current one, and we recently reported that with sustained training in a simple spatial memory task, rats reach good performance despite relatively weak activation of hippocampal CA1 region [22]. We also must keep in mind that during the evaluation trial, CTRL rats swam a shorter time and were faster than SWM rats. Although the difference was not huge, it indicates that the respective sensorimotor experiences were not identical. Therefore, one cannot exclude that part of the aforementioned differences in c-Fos expression patterns also reflected, at least in part, differences in (duration of) sensorimotor experience.

Concerning the thalamus, it is noteworthy that its anterior region has both direct and indirect connections with the hippocampus (e.g. [48]).

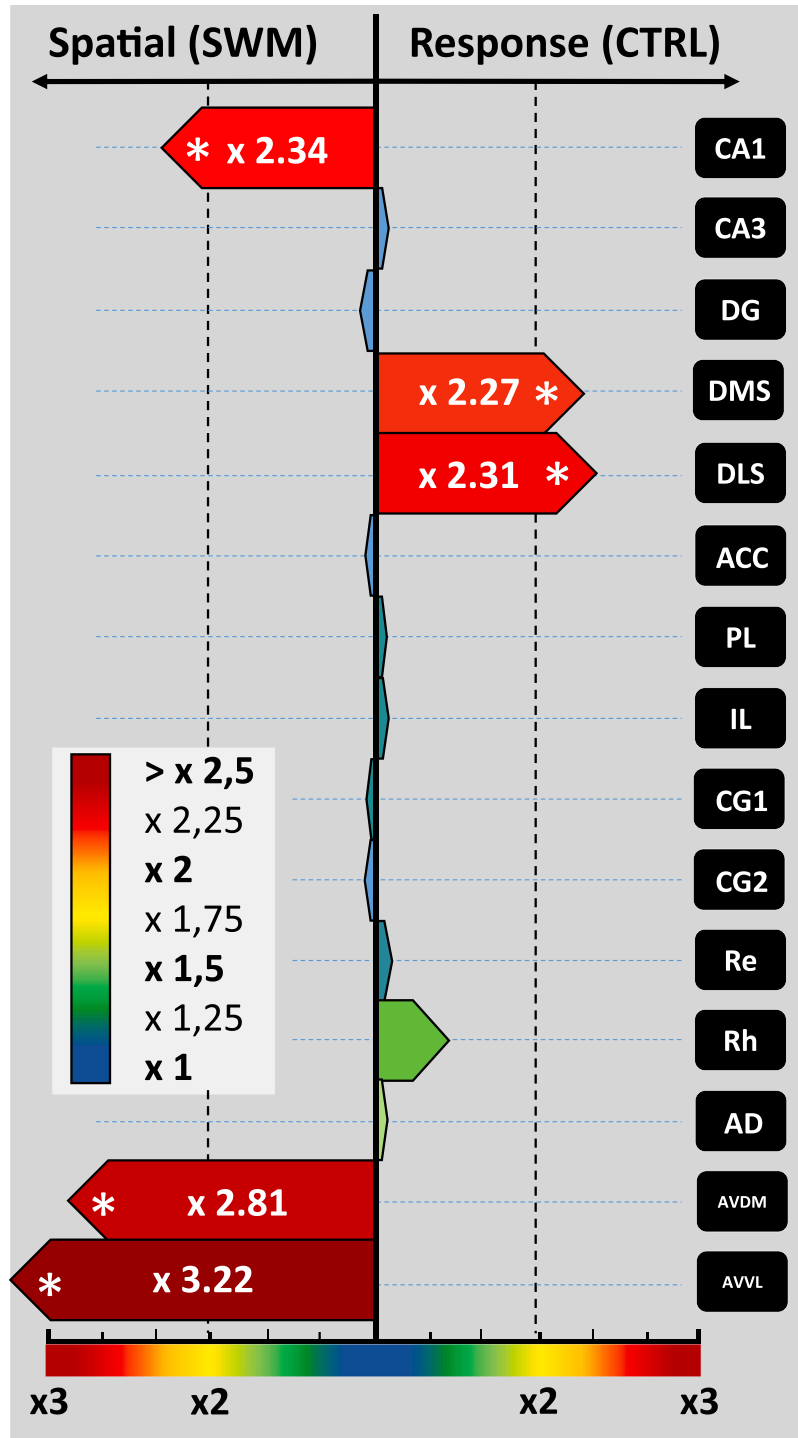


Fig. 6. Graphical summary of the major differences between c-Fos expression patterns in SWM and CTRL rats. Well-trained SWM rats were subjected to a SWM evaluation trial 6 h after they received an instruction trial, and perfused 90 min later. The same delay separated two trials in CTRL rats, which received training in a typical response-memory task. Represented in this figure is, for each region of interest, the ratio between the highest (numerator) and lowest (denominator) number of c-Fos-positive neurons according to the color scale shown on the left (x 1 indicates identical c-Fos counts in SWM and CTRL rats). When the highest count was in SWM rats, the bar is pointing to the left. When the highest count was in CTRL rats, it is pointing to the right. The differences between both groups are in line with an implication of the hippocampus and the anterior thalamus in spatial memory processes, and of the dorsal striatum in response-memory processes (e.g. [22]). Statistics: * indicated in bars beside the ratio points to a significant difference between SWM and CTRL rats, $p < 0.05$. Abbreviations: as in Fig. 4.

The DMTP-triggered increase of c-Fos expression therein is in line with previous reports about lesion effects having shown its implication in memory and spatial navigation tasks, including tasks taxing working memory (e.g. [49–55]). There are also other c-Fos expression data in line with such lesion effects (e.g. [56,57]). It is noteworthy, however, that in the AD, we found no difference between HC, CTRL and SWM rats. This observation is at variance with a previous report by Vann et al. [57], who used a different, appetitive spatial working memory task (8-arm radial maze). The AD contains head direction cells (e.g. [58]), which process direction-, navigation- and location-related information. Such information might be as useful in the home cage as in the two other testing situations; hence the absence of difference among the c-Fos expression levels in the three conditions. In the AVVL, however, we had a specific DMTP-related activation; in the AVDL, there was only a tendency. These two subdivisions of the anterior thalamus do contribute to spatial memory (e.g. [58]). With the AD, the hippocampus (CA1) and subiculum, they belong to a large system involved in spatial information processing [59].

Given the literature on the implication of the ventral midline thalamus in spatial working memory, the hypothesis in the current study was that the ReRh nuclei could contribute to the engagement of a spatial memory encoded 6 h earlier during a single instruction trial. This hypothesis was inspired by recent work indicating a contribution of at least one of these nuclei (the Re) to spatial working memory. Indeed, when a spatial working memory task includes a short interval between instruction and evaluation trials, disruption of Re function produces a deficit [15–17]. It is noteworthy that these three studies used a T-maze alternation task. In the current study, we did not disrupt ReRh functions but prioritized a brain imaging approach and used a different task. Had we considered only the average number of c-Fos-positive neurons reflecting regional activation during the evaluation trial, our conclusion would have been that neither the Re nor the Rh nucleus showed evidence for a specific functional contribution to the performance during the SWM evaluation trial after an ITI of 6 h. Indeed, in the Re, there was no difference with the activation pattern found in our response memory CTRL rats, and in the Rh, the activation was not significantly different from that found in the home cage controls. Clearly, such results would not support our hypothesis of an implication of the ReRh nuclei in spatial working memory. Alternatively, given the length of the ITI, it cannot be excluded that our memory task required more a contribution of long term memory than that of working memory, which is usually considered a short term memory. This possibility would be supported by the increased c-Fos activity in regions CA1 and anterior thalamus in the absence of evidence for significant activation in the mPFC, a region implicated in working memory. If the task had placed a strong load on working memory, one would expect c-Fos activity to increase in the mPFC. The fact that it did not could thus be regarded as evidence for weak or no engagement of working memory, and thus as evidence for contribution of another type of memory (i.e., long term memory). Furthermore, spatial tasks such as the one used in the current study, even with short delays, might predominantly involve the hippocampus, as substantiated by Steele and Morris [60], although the latter's experiments were performed in the water maze. Finally, and the point is complementary to the one of Steele and Morris, interactions between the mPFC and the hippocampus might be more crucial in tasks requiring an alternation behavior [61], in which interference is high (due to e.g., the short interval between trials/tests and the limited variety in the task), than in the task used herein (longer inter-trials/tests intervals and more variety). If so, one should perhaps better consider that the memory tested in the current study is a memory of which the duration outpaces the duration of information holding in working memory.

Given the complexity of the efferent and afferent connectivity of the ReRh nuclei, it cannot be excluded, however, that the increase of c-Fos immunoreactivity was linked to a particular behavior in CTRL rats, and to a different one in SWM rats, and which both required similar activation levels in the Re or/and Rh nucleus while supporting different

processes. This is the reason why we checked if performance in the evaluation trial of each group was related with the level of activation of the Re or Rh nucleus. It was not the case in CTRL rats. Given the extremely weak variability of latencies in this group, this finding is not surprising. This weak variability most probably reflected the lack of difficulty in the task and the highly automated 'swim-from-start-to-goal' behavior, which consisted in repeating the same track from session to session. Therefore, all CTRL rats performed at maximal efficacy and thus with latencies that fit into a very tight time window. In SWM rats, however, we found a significant correlation between both variables for the Re: the lower the c-Fos immunostaining, the longer the latency to the platform, suggesting that performance increased proportionally to the level of activation of the Re nucleus. These data point to a possible performance-determinant participation of the Re nucleus in the delayed engagement of spatial information previously encoded in working/temporary memory. In addition to the aforementioned articles [15–17], that the Re nucleus contributes to working memory is also compatible with a recent publication by Rahman et al. [18]. These authors transfected the Re nucleus of mice with a virus leading to the expression of ChR2 in its excitatory neurons. Terminals in CA1 of the dorsal hippocampus were stimulated with light at a delta frequency and at different moments of a Y-maze alternation task requiring intact working memory. The stimulations did not disrupt encoding of information, but clearly altered its retrieval after a 10 s delay.

5. Conclusion

From this study, we retain that in terms of c-Fos immunoreactivity, the only evidence we collected in favor of a regional activation possibly related to spatial working memory was neither in the Re nor in the Rh nucleus, but in region CA1 of the hippocampus and in one nucleus of the anterior thalamus. This is sound given the implication of these structures in spatial information processing. The story could have ended there. Our regression analyses, however, showed a striking correlation between the degree of activation of the Re and performance in the evaluation trial. Because a correlation does not demonstrate causality, the latter observation calls for further experiments exploring causality between the level of Re activation and the level of performance reached in a spatial (working) memory task like the one used herein.

CRedit authorship contribution statement

T. Morvan: Investigation, Data curation, Visualization, Formal analysis. **L. Boch:** Investigation, Data curation, Visualization, Formal analysis. **E. Mikhina:** Investigation. **B. Cosquer:** Methodology, Investigation. **A. Stéphane:** Writing – review & editing. **A. Pereira de Vasconcelos:** Supervision, Project administration, Writing – review & editing. **J.-C. Cassel:** Conceptualization, Data curation, Analysis, Writing – original draft, Review, Editing, 1st revision.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). We are grateful to O. Bildstein, D. Egesi, and G. Edomwonyi for their assistance in animal care, and to C. Jiang, C. Locatelli and J. Streicher for their help with

stereological c-Fos countings. LB is supported by a Unistra PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

References

- [1] Y. Watanabe, S. Funahashi, Thalamic mediodorsal nucleus and working memory, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36 (2012) 134–142, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.05.003>.
- [2] D.E. Linden, The working memory networks of the human brain, *Neuroscientist* 13 (2007) 257–267, <https://doi.org/10.1177/1073858406298480>.
- [3] C. Lustig, M.S. Matell, W.H. Meck, Not just a coincidence: frontal-striatal interactions in working memory and interval timing, *Memory* 13 (2005) 441–448, <https://doi.org/10.1080/09658210344000404>.
- [4] P.A. Dudchenko, An overview of the tasks used to test working memory in rodents, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28 (2004) 699–709, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.002>.
- [5] J. Churchwell, R.P. Kesner, Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: interactions and independent parallel processing, *Behav. Brain Res.* 225 (2011) 389–395, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.045>.
- [6] L.L. Colgin, Oscillations and hippocampal prefrontal synchrony, *Curr. Opin. Neurobiol.* 21 (2011) 467–474, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.04.006>.
- [7] S.B. Floresco, Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without delay, *J. Neurosci.* 17 (1997) 1880–1890, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-05-01880.1997>.
- [8] H.L. Hallock, A. Wang, A.L. Griffin, Ventral midline thalamus is critical for hippocampal-prefrontal synchrony and spatial working memory, *J. Neurosci.* 36 (2016) 8372–8389, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0991-16.2016>.
- [9] G.W. Wang, J.-X. Cai, Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats, *Behav. Brain Res.* 175 (2006) 329–336, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.09.002>.
- [10] J.C. Cassel, A. Pereira de Vasconcelos, M. Loureiro, T. Cholvin, J.C. Dalrymple-Alford, R.P. Vertes, The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications, *Prog. Neurobiol.* 111 (2013) 34–52, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.08.006>.
- [11] M.J. Dolleman-van der Weel, A.L. Griffin, H.T. Ito, M.L. Shapiro, M.P. Witter, R. P. Vertes, T.A. Allen, The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior, *Learm. Mem.* (2019) 191–205, <https://doi.org/10.1101/lm.048389.118>.
- [12] M. Ferraris, J.C. Cassel, A. Pereira de Vasconcelos, A. Stephan, P.P. Quilichini, The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 125 (2021) 339–354, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.02.025>.
- [13] A.L. Griffin, Role of the thalamic nucleus reuniens in mediating interactions between the hippocampus and medial prefrontal cortex during spatial working memory, *Front. Syst. Neurosci.* 9 (2015) 29, <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00029>.
- [14] R.P. Vertes, S.B. Linley, W.B. Hoover, Limbic circuitry of the midline thalamus, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54 (2015) 89–107, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.014>.
- [15] D.M. Layfield, M. Patel, H. Hallock, A.L. Griffin, Inactivation of the nucleus reuniens/rhomboid causes a delay-dependent impairment of spatial working memory, *Neurobiol. Learn. Mem.* 125 (2015) 163–167, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.09.007>.
- [16] T.D. Viena, S.B. Linley, R.P. Vertes, Inactivation of nucleus reuniens impairs spatial working memory and behavioral flexibility in the rat, *Hippocampus* 28 (2018) 297–311, <https://doi.org/10.1002/hipo.22831>.
- [17] A.R. Duan, C. Varela, Y. Zhang, Y. Shen, L. Xiong, M.A. Wilson, J. Lisman, Delta frequency optogenetic stimulation of the thalamic nucleus reuniens is sufficient to produce working memory deficits: relevance to schizophrenia, *Biol. Psychiatry* 77 (2015) 1098–1107, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.01.020>.
- [18] F. Rahman, R. Nanu, N.A. Schneider, D. Katz, J. Lisman, Optogenetic perturbation of projections from thalamic nucleus reuniens to hippocampus disrupts spatial working memory retrieval more than encoding, *Neurobiol. Learn. Mem.* 179 (2021), 107396, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107396> (in press).
- [19] J.E. Futter, J.P. Aggleton, How rats perform spatial working memory tasks: limitations in the use of egocentric and idiothetic working memory, *Q. J. Exp. Psychol.* 59 (2006) 77–99, <https://doi.org/10.1080/02724990544000068>.
- [20] C. Hölcher, W. Jacob, H.A. Mallot, Learned association of allocentric and egocentric information in the hippocampus, *Exp. Brain Res.* 158 (2004) 233–240, <https://doi.org/10.1007/s00221-004-1896-z>.
- [21] T. Cholvin, M. Loureiro, R. Cassel, B. Cosquer, K. Geiger, D. De Sa Nogueira, H. Raingard, L. Robelin, C. Kelche, A. Pereira de Vasconcelos, J.C. Cassel, The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions, *J. Neurosci.* 33 (2013) 8772–8783, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013>.
- [22] J. Gasser, A. Pereira de Vasconcelos, B. Cosquer, A.L. Boutillier, J.C. Cassel, Shifting between response and place strategies in maze navigation: effects of training, cue availability, and functional inactivation of striatum or hippocampus in rats, *Neurobiol. Learn. Mem.* 167 (2020) 107–131, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107131>.
- [23] V.N. Barros, M. Mundim, L.T. Galindo, S. Bittencourt, M. Porcionatto, L.E. Mello, The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys, *Front. Cell. Neurosci.* 9 (2015) 72, <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00072>.
- [24] S.D. Carter, K.R. Mifsud, J.M. Reul, Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training, *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) 156, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00156>.
- [25] R. Cassel, C. Kelche, L. Lecourtier, J.C. Cassel, The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats, *Behav. Brain Res.* 230 (2012) 333–342, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.021>.
- [26] R.D. Kirch, P.T. Meyer, S. Geisler, F. Braun, S. Gehrig, K.J. Langen, S. von Hörsten, G. Nikkha, J.C. Cassel, M.D. Döbrösy, Early deficits in declarative and procedural memory dependent behavioral function in a transgenic rat model of Huntington's disease, *Behav. Brain Res.* 239 (2013) 15–26, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.048>.
- [27] R.D. Kirch, R.C. Pinnell, U.G. Hofmann, J.C. Cassel, The double-H maze: a robust behavioral test for learning and memory in rodents, *JOVE* (2015), e52667, <https://doi.org/10.3791/52667>.
- [28] S. Pol-Bodetto, H. Jeltsch-David, L. Lecourtier, N. Rusnac, N. Mam-Lam-Fook C., B. Cosquer, K. Geiger, J.C. Cassel, The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training, *Behav. Brain Res.* 218 (2011) 138–151, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.043>.
- [29] B.A. Vogt, G. Paxinos, Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologues, *Brain Struct. Funct.* 219 (2014) 185–192, <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0493-3>.
- [30] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, sixth ed., Academic Press, San Diego, 2007.
- [31] M.J. West, L. Slomianka, H.J. Gundersen, Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator, *Anat. Rec.* 231 (1991) 482–497, <https://doi.org/10.1002/ar.1092310411>.
- [32] M.J. West, New stereological methods for counting neurons, *Neurobiol. Aging* 14 (1993) 275–285, [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90112-o](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90112-o).
- [33] H.J. Gundersen, T.F. Bendtsen, L. Korbo, N. Marcussen, A. Moller, K. Nielsen, J. R. Nyengaard, B. Pakkenberg, F.B. Sorensen, A. Vesterby, M.J. West, Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis, *APMS* 96 (1988) 379–394, <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb05320.x>.
- [34] F. Curtin, P. Schulz, Multiple correlations and Bonferroni's correction, *Biol. Psychiatry* 44 (1998) 775–777, [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(98\)00043-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00043-2).
- [35] J.J. Bolhuis, O. Buresova, J. Bures, Persistence of working memory of rats in an aversively motivated radial maze task, *Behav. Brain Res.* 15 (1985) 43–49, [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(85\)90016-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(85)90016-6).
- [36] R. Galani, O. Lehmann, T. Bolmont, E. Aloy, F. Bertrand, C. Lazarus, H. Jeltsch, J. C. Cassel, Selective immunolesions of CH4 cholinergic neurons do not disrupt spatial memory in rats, *Physiol. Behav.* 76 (2002) 75–90, [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00674-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00674-1).
- [37] J.J. Bolhuis, S. Bijlsma, P. Ansmink, Exponential decay of spatial memory of rats in a radial maze, *Behav. Neural Biol.* 46 (1986) 115–122, [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(86\)90584-4](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(86)90584-4).
- [38] P.A. Dudchenko, How do animals actually solve the T-maze? *Behav. Neurosci.* 115 (2001) 850–860, <https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.4.850> (doi.org/).
- [39] P. Gass, T. Herdegen, R. Bravo, M. Kiessling, Induction of immediate early gene encoded proteins in thera hippocampus after bicuculline-induced seizures: differential expression of KROX-24, FOS and JUN proteins, *Neuroscience* 48 (1992) 315–324, [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90493-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90493-1).
- [40] T.E. Helton, J.F. McGinty, Intrahippocampal NMDA administration affects Fos, Fos-related antigens, and opioid peptide immunoreactivity and mRNA in rats, *Mol. Cell. Neurosci.* 4 (1993) 319–334, <https://doi.org/10.1006/mcne.1993.1042>.
- [41] C.M. Spencer, T.A. Houpt, Dynamics of c-fos and ICER mRNA expression in rat forebrain following lithium chloride injection, *Mol. Brain Res.* 93 (2001) 113–126, [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(01\)00173-5](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(01)00173-5).
- [42] K.M. Gill, I.L. Bernstein, S.J. Mizumori, Immediate early gene activation in hippocampus and dorsal striatum: effects of explicit place and response training, *Neurobiol. Learn. Mem.* 87 (2007) 583–596, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.12.011>.
- [43] M.G. Packard, J.L. McGaugh, Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning, *Neurobiol. Learn. Mem.* 65 (1996) 65–72, <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.0007>.
- [44] B.D. Devan, N.M. White, Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function, *J. Neurosci.* 19 (1999) 2789–2798, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-07-02789.1999>.
- [45] J.C. Cassel, M. Ferraris, P.P. Quilichini, T. Cholvin, L. Boch, A. Stephan, A. Pereira de Vasconcelos, The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: a crossroads for cognition-relevant information processing? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 126 (2021) 338–360, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.023>.
- [46] L.A. Teather, M.G. Packard, D.E. Smith, R.G. Ellis-Behnke, N.G. Bazan, Differential induction of c-Jun and Fos-like proteins in rat hippocampus and dorsal striatum after training in two water maze tasks, *Neurobiol. Learn. Mem.* 84 (2005) 75–84, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.03.006>.
- [47] M.M. Klein, T. Cholvin, B. Cosquer, A. Salvadori, J. Le Mero, L. Kourouma, A. L. Boutillier, A. Pereira de Vasconcelos, J.C. Cassel, Ventral midline thalamus lesion prevents persistence of new (learning-triggered) hippocampal spines, delayed neocortical spinogenesis, and spatial memory durability, *Brain Struct. Funct.* 224 (2019) 1659–1676, <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01865-1>.

- [48] M.L. Mathiasen, S.M. O'Mara, J.P. Aggleton, The anterior thalamic nuclei and nucleus reuniens: so similar but so different, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 119 (2020) 268–280.
- [49] J.P. Aggleton, A.J.D. Nelson, Why do lesions in the rodent anterior thalamic nuclei cause such severe spatial deficits? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54 (2015) 131–144, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.013>.
- [50] B.J. Clark, R.E. Harvey, Do the anterior and lateral thalamic nuclei make distinct contributions to spatial representation and memory? *Neurobiol. Learn. Mem.* 133 (2016) 69–78, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.002>.
- [51] M.M. Jankowski, K.C. Ronnqvist, M. Tsanov, S.D. Vann, N.F. Wright, J.T. Erichsen, J.P. Aggleton, S.M. O'Mara, The anterior thalamus provides a subcortical circuit supporting memory and spatial navigation, *Front. Syst. Neurosci.* 7 (2013) 45, <https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00045>.
- [52] E.A. Loukavenko, M. Wolff, G.L. Poirier, J.C. Dalrymple-Alford, Impaired spatial working memory after anterior thalamic lesions: recovery with cerebrolysin and enrichment, *Brain Struct. Funct.* 221 (2016) 1955–1970, <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1015-x>.
- [53] A.J. Nelson, L. Kinnavane, E. Amin, S.M. O'Mara, J.P. Aggleton, Deconstructing the direct reciprocal hippocampal-anterior thalamic pathways for spatial learning, *J. Neurosci.* 40 (2020) 6978–6990, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0874-20.2020>.
- [54] T. Van Groen, I. Kadish, J.M. Wyss, Role of the anterodorsal and anteroventral nuclei of the thalamus in spatial memory in the rat, *Behav. Brain Res.* 132 (2002) 19–28, [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00390-4](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00390-4).
- [55] M. Wolff, S.J. Gibb, J.C. Cassel, J.C. Dalrymple-Alford, Anterior but not intralaminar nuclei support allocentric spatial memory, *Neurobiol. Learn. Mem.* 90 (2008) 71–80, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.01.007>.
- [56] J. Lopez, K. Gamache, C. Milo, K. Nader, Differential role of the anterior and intralaminar/lateral thalamic nuclei in systems consolidation and reconsolidation, *Brain Struct. Funct.* 223 (2018) 63–76, <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1475-2>.
- [57] S.D. Vann, M.W. Brown, J.P. Aggleton, Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests, *Neuroscience* 101 (2000) 983–991, [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00288-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00288-8).
- [58] J.S. Taube, Head direction cells recorded in the anterior thalamic nuclei of freely moving rats, *J. Neurosci.* 15 (1995) 70–86, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00070.1995>.
- [59] G. Byatt, J.C. Dalrymple-Alford, Both anteromedial and anteroventral thalamic lesions impair radial-maze learning in rats, *Behav. Neurosci.* 110 (1996) 1335–1348, <https://doi.org/10.1037//0735-7044.110.6.1335>.
- [60] R.J. Steele, R.G.M. Morris, Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA antagonist D-AP5, *Hippocampus* 9 (1999) 118–136, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:2<118::AID-HIPO4>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:2<118::AID-HIPO4>3.0.CO;2-8).
- [61] M. Sapiurka M, L.R. Squire LR, R.E. Clark, Distinct roles of hippocampus and medial prefrontal cortex in spatial and nonspatial memory, *Hippocampus* 26 (2016) 1515–1524, <https://doi.org/10.1002/hipo.22652>.

A. Conclusion publication 1

Les résultats indiquent que les rats entraînés en MTS sont capables de conserver et d'utiliser une information spatiale pendant au moins 6 heures. L'analyse du gène précoce c-fos après l'essai test nous a permis de montrer :

- chez le groupe SPAT : une augmentation de l'activité de l'HIP et du noyau thalamique antérieur
- chez le groupe PROC : une augmentation de l'activité dans le striatum

Nous n'avons pas relevé d'activation spécifique des noyaux ReRh dans le groupe SPAT. Néanmoins, nous avons remarqué une forte corrélation entre la latence pour atteindre la plateforme après le délai de 6 h et le nombre de neurones c-Fos-positifs dans le Re : plus la latence était faible, plus l'expression de c-Fos était élevée. Ce résultat conforte l'idée d'une implication du Re dans le rappel d'une MTS.

B. Préface publication 2

Dans le second article, [Boch et al., 2022](#) , nous avons testé fonctionnellement le rôle des ReRh, grâce à l'inhibition des ReRh avec un agoniste des récepteurs de type A du GABA, le muscimol, et ce à 2 doses différentes : 0,26 nmol et 0,70 nmol, le but étant de tester l'implication des ReRh dans l'encodage, le maintien ou le rappel de l'information en MTS. Sur la base de nos précédents résultats, nous faisons donc l'hypothèse d'une implication des ReRh lors du rappel en MTS, ce qui serait cohérent avec l'étude récente de [Rahman et al., 2021](#), où les auteurs ont montré que l'inhibition de la voie de projection du Re vers l'HIP lors du rappel, mais pas de l'encodage, perturbait les performances de MTS dans un labyrinthe en Y.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec [Thomas Morvan](#) et [Thibault Neige](#), lors de leur Master 2, qui avaient testé l'implication des noyaux ReRh en MTS grâce à une inactivation :

- au muscimol-juste [après l'encodage pour tester le maintien de l'information](#)
- au muscimol juste avant le rappel pour tester l'utilisation de l'information

- par inhibition pharmacogénétique (DREADD) juste avant l'encodage pour tester le codage de l'information en ciblant les neurones excitateurs des ReRh.

J'ai complété ces travaux en testant l'inactivation au muscimol juste avant l'encodage, seule condition manquante sous muscimol pour compléter l'approche pharmacologique.

Le choix de compléter le protocole grâce à une seconde méthodologie, l'approche pharmacogénétique DREADD, se justifie par le fait que le muscimol agit indistinctement sur tous les types de neurones porteurs de récepteurs GABA-A. De ce fait, nous avons voulu gagner en spécificité, en limitant l'inhibition aux neurones excitateurs des ReRh grâce au promoteur $CamKII\alpha$ (chaîne alpha de la protéine kinase Calcium/calmoduline dépendante de type 2), permettant de cibler spécifiquement les neurones excitateurs, et donc notamment les neurones de projection vers l'HIP et le CPFm et ceux ayant des collatérales vers les deux (Bokor et al., 2002).

Enfin, le choix de spécifier la méthode d'inhibition lors de l'encodage uniquement, avait été réalisé car, au moment de la mise en place du protocole, une hypothèse issue de la littérature semblait privilégier l'idée d'une implication des ReRh dans l'encodage d'une information. Plusieurs articles avaient décrit un rôle de ces noyaux dans l'encodage d'une information contextuelle ou spatiale (Xu and Südhof, 2013; Maisson et al., 2018; Ramanathan et al., 2018).

III. Publication 2 : Inhibition of the ventral midline thalamus does not alter encoding, short-term holding or retrieval of spatial information in rats performing a water-escape working memory task

Behavioural Brain Research 432 (2022) 113979



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

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



Inhibition of the ventral midline thalamus does not alter encoding, short-term holding or retrieval of spatial information in rats performing a water-escape working memory task

Laurine Boch^{a,b,1}, Thomas Morvan^{a,b,1}, Thibaut Neige^{a,b,1}, Nino Kobakhidze^{a,b}, Elodie Panzer^{a,b}, Brigitte Cosquer^{a,b}, Anne Pereira de Vasconcelos^{a,b}, Aline Stephan^{a,b}, Jean-Christophe Cassel^{a,b,*}

^a Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

^b LNCA, UMR 7364 - CNRS, F-67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Cognition
Executive functions
Maze
Rat
Reuniens
Rhomboid
Spatial working memory
Thalamus

ABSTRACT

Working memory (WM) is a function operating in three successive phases: encoding (sample trial), holding (delay), and retrieval (test trial) of information. Studies point to a possible implication of the thalamic reuniens nucleus (Re) in spatial WM (SWM). In which of the aforementioned 3 phases the Re has a function is largely unknown. Recently, in a delayed SWM water-escape task, we found that performance during the retrieval trial correlated positively with c-Fos expression in the Re nucleus, suggesting participation in retrieval. Here, we used the same task and muscimol (MUSC) inhibition or DREADD(hM4Di)-mediated inhibition of the Re during information encoding, right thereafter (thereby affecting the holding phase), or during the retrieval trial. A 6-hour delay separated encoding from retrieval. Concerning SWM, MUSC in the Re nucleus did not alter performance, be it during or after encoding, or during evaluation. CNO administered before encoding in DREADD-expressing rats was also ineffective, although CNO-induced inhibition disrupted set shifting performance, as found previously (Quet et al., *Brain Struct Funct* 225, 2020), thereby validating DREADD efficiency. These findings are the first that do not support an implication of the Re nucleus in SWM. As most previous studies used T-maze alternation tasks, which carry high proactive interference risks, an important question to resolve now is whether the Re nucleus is required in (T-maze alternation) tasks using very short information-holding delays (seconds to minutes), and less so in other short-term spatial memory tasks with longer information holding intervals (hours) and therefore reduced interference risks.

1. Introduction

The concept of working memory (WM) is used in animal models, but it does not overlap the human WM model [1,2]. In humans, WM permits temporary storage of information for active mental manipulations to be processed on it (as e.g., for mental calculation or reading). In animals, WM is defined by e.g., Dudchenko [3] as "a short term memory for an object, stimulus, or location that is used within a testing session, but not typically between sessions." Hence, in animals, tasks taxing WM must respond to the following principle: between successive test sessions, the content of the WM must have lost its relevance, and can therefore either be forgotten or ignored. In a typical WM test, an animal gets a sample

(encoding) trial followed by a close or delayed test (retrieval) trial. Correct WM is deduced from better performance on the retrieval as compared to the encoding trial. From session to session, the instruction changes, which makes the task largely independent from training levels achieved over previous sessions.

When the WM task is spatial, as can be the case for a reinforced alternation task in a T-maze, performance depends on the hippocampus (Hip), the medial prefrontal cortex (mPFC), and even more on the interaction between these two structures (e.g., [4]). This, for example, is reflected in increased coherence between Hip and mPFC oscillatory activity when WM is ongoing (e.g., [5,6]). Because the hippocampal-prefrontal connection is ipsilateral (e.g., [7]), it is possible

* Correspondence to: Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France.
E-mail address: jcassel@unistra.fr (J.-C. Cassel).

¹ Share equal contribution to this work

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113979>

Received 11 February 2022; Received in revised form 8 June 2022; Accepted 22 June 2022

Available online 26 June 2022

0166-4328/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

to disconnect the two structures bilaterally by a unilateral inhibition of one structure and a contralateral inhibition of the other. Interestingly, such crossed inhibition disrupts performance in a spatial WM task (e.g., [8]), and the deficit is larger when the delay between the encoding and the retrieval trials increases (e.g., [9]).

The reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei, two components of the ventral midline thalamus, participate in cognitive processes requiring a coordinated engagement of the Hip and mPFC. Given their connectivity with each structure, the ReRh nuclei could serve as a relay between the Hip and mPFC (e.g., [10–14]). It is therefore not surprising that spatial WM (SWM) tasks are described as sensitive to a lesion or a functional inhibition of the Re and perhaps Rh nuclei [13]. Given the size of the Re and Rh nuclei, it is improbable that using tools like permanent lesions, pharmacological inhibitions, pharmacogenetics, and optogenetic approaches, either one nucleus can be manipulated without affecting functions in the other. This is why, hereafter, we will consider the ReRh nuclei as a set, even though several articles from the literature mention to have functionally manipulated only the Re nucleus.

If we go back to SWM, what is unknown so far, is which of the operations underlying SWM is affected by experimental manipulations of the ReRh. Indeed, a SWM ‘cycle’ is starting by information sampling, and thus by the encoding of an instruction, is going on by holding this information active for some time, and is ending by engaging it into the expression of a situation-adapted behavior.

Unfortunately, almost none of the articles showing a role for the ventral midline thalamus in SWM has made the distinction between these three operations. In the studies by Layfield et al. [15], Hallock et al. [6], Viena et al. [16], or Bobal and Savage [17], an alternation task was used and the authors inhibited the ReRh with muscimol (MUSC). The duration of ReRh inhibition, however, covered the encoding, holding and retrieval phases indistinctly. In the study by Duan et al. [18], the ReRh were inhibited optogenetically, but also continuously during the encoding, holding and retrieval phases.

Herein, using a matching-to-sample protocol defining a SWM task in rats (e.g., [19–21]), the effects on SWM performance of ReRh inhibition (using MUSC or DREADD) were compared according to whether inhibition was made specifically before the encoding, before the post-encoding information holding period, or before the retrieval phase. A recent study of ours suggests that at least activation of the Re nucleus during the evaluation phase might be necessary for achieving good performance [22]. Therefore, our hypothesis was that ReRh inhibition before the retrieval test should disrupt performance, as compared to pre-encoding or immediate post-encoding inhibition, which should not. If so, this finding would not be in line with the report by Maisson et al. [23], who pointed to possible implication of the Re nucleus in information encoding. Because MUSC acts indistinctly on all types of neurons bearing GABA_A receptors, and an inhibition approach could therefore gain in specificity by focusing on neuronal subpopulations, possible contribution of the ReRh to the information encoding phase was also assessed using a DREADD methodology to inhibit only excitatory neurons of the ReRh, including those projecting to the mPFC, the Hip, or both [24,25].

2. Materials and methods

2.1. Materials and methods common to all experiments

2.1.1. Experimental animals

Experiment 1 used a within-subject design, the two other ones a between-subject one. The three experiments used a total of 136 Long-Evans male rats (32 in experiment 1, 44 in experiment 2, and 60 in experiment 3). All rats were provided by Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). We used only male rats because our previous c-Fos imaging experiment had been carried out in males [22], and more generally, all our former experiments about ReRh functions did use males. The rats were aged of 2 months (body weight: 250 g in average) at their arrival at

the laboratory. At the time of testing, they were between 12 and 21 weeks old for the MUSC infusions experiments (1, 2), and between 14 and 24 weeks for the DREADD approach (experiment 3). Rats were housed in groups of two with ad libitum food and water in a temperature-controlled room (22 ± 1 °C), under a 12–12 hr light–dark cycle (lights on at 7.00 a.m.; humidity $55 \pm 5\%$). A wooden chew was placed in each cage. The study respected the rules and guidelines of the European Parliament 2010/63/UE of September 22, 2010, and of the French Department of Agriculture and Food (decree no. 2013–118, 1st of February 2013). The current project was run under official agreement number #11427.

2.1.2. The double-H maze: device

The homemade device and its hosting room have been described in previous articles (e.g., [19–21,26–28]). Briefly, seen from above, the shape of the device corresponds to two contiguous capital H. It is made of three parallel run arms, 160 cm in length and 18.8 cm wide (internal measure; external = 20 cm), connected to each other at their center by a perpendicular alley (160 cm in length). All side walls, 35 cm high, are made of transparent Plexiglas to permit easy perception of allothetic cues. The maze is not covered. The two opposite arms in the middle are labeled north (N) and south (S), respectively (see Fig. 1). The four remaining arms are labeled south-east (SE), south-west (SW), north-east (NE), and north-west (NW). For all behavioral training and testing (see below), the device remained at the same place (on a square table, 80 cm above the floor). The maze is filled with water to a height of 15 cm. All cues in the room (two black disks on one wall, and one large triangle on another wall, two orange-painted heating ducts above the maze, one table, one chair, one computer desk, one boiler, etc) were left at their original location for the entire duration of the experiments. Most of these landmarks were located close to the maze, i.e., between 1.20 and 1.50 m from the closest maze wall and between 86 and 140 cm above the water surface. To secure the locations of potentially mobile objects, including the maze on its table, their position was marked, for most on the floor. The room was equipped with a small loudspeaker fixed on the wall, playing music at low volume during the 12-h light period. From a previous experiment, we know that rats do not use this audio signal to anchor their orientation/navigation, even when navigating in darkness [21].

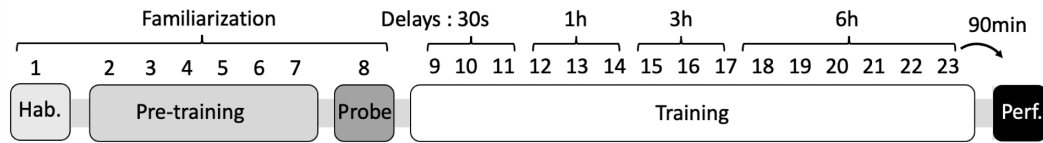
2.1.3. Behavioral protocol

2.1.3.1. Familiarization. The protocol was the same as the one used by Morvan et al. [22]. The task familiarization protocol (Fig. 1) covered three stages:

a) Habituation (day 1) permitted rats to learn that, once in the fresh water (20 °C), they could escape from it by climbing on a visible platform. Only two arms (SE and NE) were accessible (a transparent guillotine door prevented access to other arms). The platform was located in the NE arm. Rats were released on 4 successive trials from the SE arm (see Fig. 1). The platform emerged one centimeter above the surface of the water.

b) Pre-training (days 2–7) permitted rats to be further familiarized with the escape task, the room and allothetic cues surrounding the maze. The water was made opaque by addition of powdered milk (1.2 g/L) and the platform was hidden under the water surface (1 cm). Pre-training consisted in 6 successive 4-trial sessions, one per day. Trials were separated from each other by about 30 s. Rats were always released from the N arm (S arm closed). They had to reach the platform located in the SW arm. We chose a monotonous egocentric task in order to limit its spatial load, although we know that such conditions do not prevent a slowly progressing integration of allothetic cues and their configuration [21]. The latency (and distance) to reach the platform was recorded. Latency is defined as the time elapsed between the start of a trial and the exact moment the platform is reached by the rats, whether having swum

A Time line



B Protocols

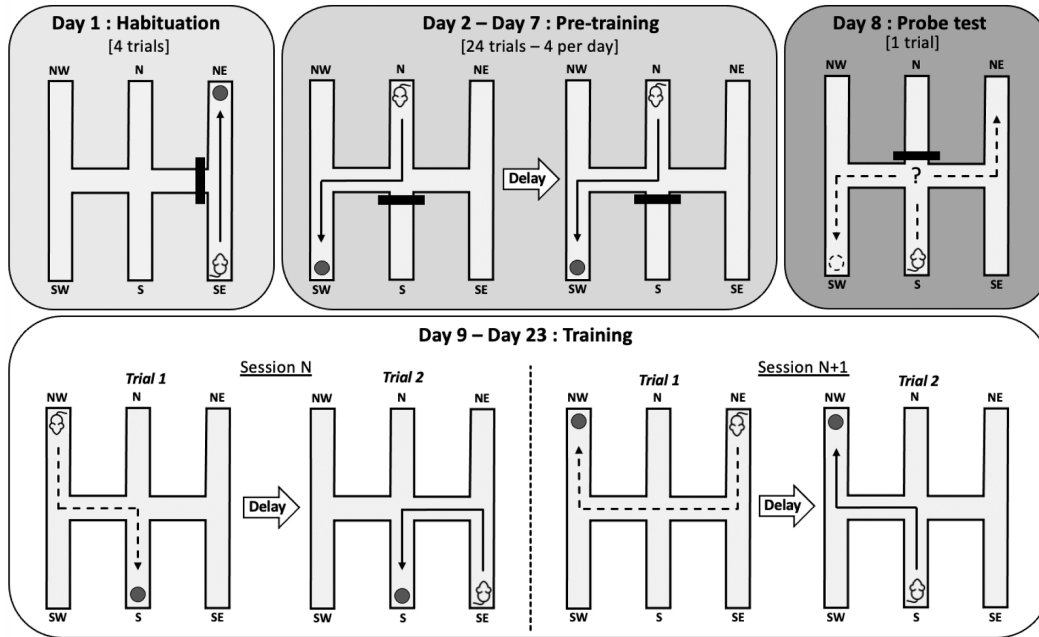


Fig. 1. A Timeline common to all experiments. B Overall habituation, pre-training, training, procedural control testing, and spatial working memory testing protocols. For habituation, rats are given 4 successive trials in which they have to swim straight from the SE to the NE; the platform is visible. There is no access to the rest of the maze. For pre-training, the platform is hidden underneath the water surface in the SW and the rats are released at the extremity of the N arm for each trial. Pre-training is lasting from day 2 to day 7 on the basis of 4 successive trials each day. The S arm is closed by a guillotine door. On day 8, the platform is removed from the maze and the rats are released from the S arm (180° rotation of the usual release place); the N arm being closed by a guillotine door. The trial is stopped after 60 s. From days 9–23, the rats are trained with a delay interposed between trial 1 (sample trial) and trial 2 (test trial). The first delay (days 9–11) was of 30 s, then (day 12–14) of 1 h, subsequently (days 15–17) of 3 h, and finally (days 18–23) of 6 h.

directly to it or not.

c) **The probe test** (day 8) aimed to check that rats had integrated the configuration of the allothetic cues (cognitive map) and were able to use it appropriately in a single 60-s trial with no platform. Rats were released from the S arm, meaning a 180° rotation of the usual start arm (N arm now closed). We know from previous work that after such pre-training, at least half the rats first swim to the former target arm (= place arm), where they subsequently spend more time than in the other arms (in average; see [19]). These two behaviors demonstrate that a spatial map has been constructed during repetitive training according to allothetic cues.

During the probe test, we observed the first arm visited and analyzed the time rats spent in the SW arm (place arm) and in the NE arm (response arm, reached after successive right and left turns, what corresponds to the pre-training path). These results were compared to chance level. As each arm had a surface representing 13.7% of the accessible surface of the maze (i.e., 5 arms + central corridor), and as the probe test lasted for 60 s, computation of chance was as follows: $60 \times 0.137 = 8.2$ s

The purpose of this familiarization was to allow the rats to become very accustomed to the device, the existence of an escape possibility, and the allothetic cues of their environment.

2.1.3.2. Training. After the probe test, a training phase was started (Fig. 1). It consisted in a protocol with two trials per session and one session per day (days 9–23). The inter-trial delay increased progressively (days 9–23). From session to session, the platform location was changed in order to place a load on SWM. For the two trials of a given session, the platform was kept on the same location but start locations were changed, although equidistant from the platform. Inter-trial delays were of 30 seconds (3 consecutive days), then 1 h (3 consecutive days), later on 3 h (3 consecutive days), and finally 6 h (6 consecutive days). This last delay of 6 h was used for testing MUSC or clozapine-N-oxide (CNO) effects.

2.1.4. Drugs

To induce inhibition in experiments 1 and 2, we used the GABA_A receptor agonist MUSC (Sigma, Saint Louis, MO, USA), as done in former studies (e.g., [20]). The drug was dissolved in aCSF. In contrast to

lidocaine or tetrodotoxin, muscimol reportedly induces a deep inhibition of neurons in its diffusion radius without changing the excitability of the fibers *en passage* (e.g., [29,30]). For experiment 3, we used clozapine-N-oxide (CNO, Enzo life sciences), administered i.p. (see below).

2.1.5. Statistical analyses

Initial group sizes have been determined according to previous experiments in which significant effects could be established, although with different protocols (e.g., [19–21]). We did not perform a priori power analysis. All data were analyzed using one-way, two-way or 3-way ANOVAs (where appropriate, analyses considered repeated measures), one-sample t-tests (comparison of a mean to chance), and Chi² tests. When relevant, two by two comparisons used the Newman-Keuls test, a good compromise between power and conservatism, given our experimental designs. A p value lower than 0.05 was considered significant.

2.2. Materials and methods specific to each experiment

2.2.1. Experiments 1 and 2: muscimol infusion

2.2.1.1. Surgery. Rats were anaesthetized with a ketamine (98 mg/kg)-xylazine (13 mg/kg) mixture, which was injected i.p. The scalp was anesthetized with lidocaine (21.33 mg/kg, Xylovet). All rats were also treated s.c. with Metacam (0.5 mg/rat, Boehringer Ingelheim). During surgery, rats were placed on a heating mat and their temperature was

monitored. Using a stereotaxic frame, a guide cannula was introduced into the brain and was secured to the skull by acrylic dental cement and stainless steel screws. Implantation coordinates were: AP -2.3 mm from Bregma, ML - 1.7 mm from midline (Bregma), and DV - 6.2 mm from skull with a 15° ML angle [31]. At the end of surgery, a sterile stainless steel mandrel (Ø 0.27 mm) was inserted into the guide cannula. After the operation, all rats were allowed to recover under a warm lamp for at least 30 min before being returned to their home cage.

2.2.1.2. Muscimol infusion procedure. As previously described [32,33], all rats were first habituated to be handled and maintained as they would be for drug infusions. Such handling was repeated over 5 consecutive days. For the infusions, rats were gently restrained by hand, the mandrel was removed, and an infusion needle (Ø 0.27 mm) was slowly inserted into the guide cannula with the tip of the needle protruding 1.0 mm beyond the tip of the guide cannula. The needle was connected to a 10 µL Hamilton syringe by polyethylene tubing. Using a micropump (CMA/100), MUSC (Sigma, Saint Louis, MO, USA); dissolved in aCSF, was infused over 3 min to induce inhibition of the ReRh. In the low dose group, rats received an amount of 0.26 nM in 0.3 µL, (corresponding to 0.03 µg). In the high dose group the amount was of 0.70 nM in 0.3 µL (i.e., 0.08 µg). Both amounts had been used previously in the ReRh by Cholvin et al. [20], who obtained clear-cut behavioral alterations in a set shifting task with at least the highest dose. Control infusions consisted in an infusion of an identical volume of aCSF. All infusions were performed in a room close to the testing room, to which rats were brought 15 min before being given the sample trial (Trial 1) or

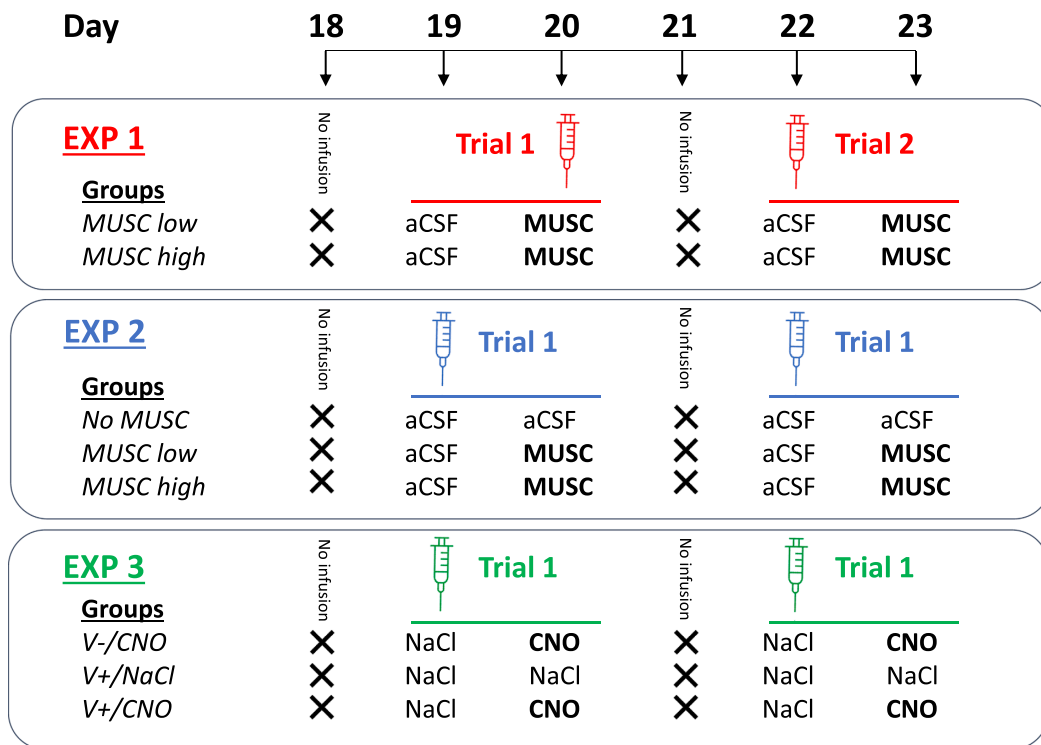


Fig. 2. Protocol of treatment administrations in each experiment. In experiment 1 (EXP1), effects of muscimol infusions (low and high dose) were assessed on days 20 and 23, muscimol being infused right after trial 1 on day 20 (EXP1), and 30 min before trial 2 on day 23 (EXP1). On days 18 and 21, no infusion was made (X). On days 19 and 22, all rats receive an aCSF infusion. In experiment 2 (EXP2), the effects of a low and a high dose of muscimol were assessed on days 20 and 23, but muscimol was infused 30 min before trial 1 on each of these two days. Rats received a high or a low dose, and in the control group aCSF was injected. On days 18 and 21, no infusion was made (X). On days 19 and 22, all rats received an aCSF infusion. In experiment 3 (EXP3), the same approach was performed using a DREADD-mediated inhibition of the ventral midline thalamus. On days 18 and 21, there was no ip injection (X). On days 19 and 22, all rats received an ip injection of saline (NaCl). On days 20 and 23, NaCl was injected to V+ rats (V+/NaCl), CNO was injected to V- rats (V-/CNO) as well as to V+ (V+/CNO) rats.

the test trial (Trial 2). After the infusion, the needle was left in place for an additional 30 s before being slowly retracted (over 1 min). After this time, rats were returned to their home cage until the start of the first or second trial of the SWM task, which occurred 30 min post-infusion when the infusion was made before trial 1 or trial 2 (experiments 1, 2 and 3), or after 6 h when it was made right after trial 1 (experiment 1).

2.2.1.3. Testing MUSC effects on SWM. The protocol of each experiment is illustrated in Fig. 2.

For the first session with a 6 h delay in experiment 1 (day 18), all rats were trained (trial 1) and tested (trial 2) without infusion. On the second session (day 19), all rats were infused with aCSF. On the third session (day 20), the low dose of MUSC (0.26 nM) was infused in rats from one group, and the high dose of Msci (0.7 nM) in those of a second group. The infusions were made right after trial 1. On sessions 4, 5 and 6 (days 21–23, respectively), we used the same overall training/testing schedule (session 4: no infusion; session 5: aCSF infusion to all; session 6: MUSC infusion), except that the aCSF or MUSC infusions were made before trial 2, the rats having been run through trial 1 drug-free. There were 14 rats per group (after 4 with misplaced infusion sites had been discarded).

For experiment 2 (inhibition before trial 1), the design was slightly modified as we shifted to a between-subject design. On sessions 1 and 4 (days 18 and 21 respectively), all rats were trained and tested infusion-free. On sessions 2 and 5 (days 19 and 22), all rats were infused with aCSF before the first trial. On sessions 3 and 6 (days 20 and 23), a first group of rats was again infused with aCSF. In the second group, rats were given the low dose of MUSC. In the third group, they received the high dose of MUSC. After discarding rats with misplaced infusion devices, we had 12 rats given aCSF, 12 receiving the low dose of MUSC, and 14 given the high dose.

2.2.1.4. Histological verifications. The rats were killed by injection of an overdose of pentobarbital (200 mg/kg, ip) and transcardially perfused with a 4% phosphate-buffered (0.1 M) paraformaldehyde solution (4 °C). Brains were removed, post-fixed for 2 h in the same fixative at 4 °C, and transferred to a 20% phosphate-buffered (0.1 M) sucrose solution for 48 h at +4 °C before being snap-frozen in isopentane (−40 °C) and stored at −80 °C. The brains were cut using a cryostat (Reichert Jung, Frigocut 2800) in serial sections that were collected on gelatin-coated slides and processed for cresyl violet staining to be viewed under a light microscope. Once the infusion site was identified, its precise location was drawn on a plate of the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson [31].

2.2.2. Experiment 3: DREADD inactivation

2.2.2.1. Surgery. Rats were anaesthetized with a ketamine (98 mg/kg)-xylazine (13 mg/kg) mixture injected i.p. The scalp was anesthetized with lidocaine (21.33 mg/kg, Xylovet). All rats were also treated s.c. with Metacam (Boehringer Ingelheim, 0.5 mg). During surgery, rats were placed on a heating mat and their temperature was monitored continuously. Using a stereotaxic frame, $2 \times 0.4 \mu\text{L}$ of 7.3×10^9 genomic copies/ μL of AAV8-Camk2 α -hM4Di-mCherry or, as a control,

$2 \times 0.4 \mu\text{L}$ of AAV8-Camk2 α -mCherry (Vigene, Biosciences) were injected into the ReRh region at a rate of 0.1 $\mu\text{L}/\text{min}$. The coordinates used were: AP − 1.6 mm and 2.6 mm from Bregma, DV − 7.1 mm (from skull), ML − 1.9 mm from the midline [31]. A ML angle of 15° was used. This AAV8 virus enables a CaMKII α promoter-driven expression of hM4Di receptors and of the mCherry reporter gene, whereby it permits preferential reversible CNO-induced neuronal silencing of excitatory neurons. Indeed, because this expression is driven by the CaMKII α promoter, it is restricted to excitatory neurons. At the end of the injection, the needle was left in place for 3 min before being slowly retracted. After surgery, the scalp was sutured and rats were placed individually in a warm environment until recovering from anesthesia. To reach an optimal expression of the AAV-mediated genes, they were given a 4-week rest before the start of behavioral training.

2.2.2.2. CNO administration. In the rats infected with the AAV8-Camk2 α -hM4Di-mCherry, the chemogenetic inhibition of the ReRh was achieved by i.p. administration of clozapine-N-oxide (CNO, 1 mg/kg, Enzo life sciences), 45 min before the start of the first trial. As controls, rats that had received the viral construct devoid of the hM4Di gene (V−) were injected with CNO, while the remaining rats, which received the viral construct encompassing the hM4Di gene (V+), were injected with a saline solution (0.9% NaCl). Thus, we had the following three groups V+/NaCl, V+/CNO, and V−/CNO (group size in Table 1).

2.2.2.3. DREADD validation in a cognitive flexibility task. To make sure that chemogenetic inhibition was sufficient to produce behavioral effects, we trained a separate set of rats in a double-H maze task taxing cognitive flexibility. Indeed, from previous work, we know that an inhibition of the ReRh, be it with muscimol or with a CNO-DREADD approach targeting the ReRh, disrupts the rats' ability to perform an adaptive strategy shift in response to a set point change [20,34]. This task is very sensitive to functional inhibition of the ReRh. Briefly, rats were trained over 2 sequences of 2 days as described by Quet et al. [34], each pair of days being followed by a probe trial given after a 24-h delay. On each training day, rats were released twice from the S and twice from the N (in random order), with the escape platform located at the extremity of the NE arm (and the arm facing the start arm closed by a guillotine door). When released from the N, rats could reach the platform after two successive left turns. When released from the S, they had to make a right turn immediately followed by a left turn to reach the platform most directly. For the probe trial, the platform was removed and each rat was released from the SW (now the NW arm was closed), meaning that a left turn was not possible at the exit of the start arm. If the rat repeated the right-left (R-L) turns, it ended in the N arm, but as the probe trial lasted for 60 s, rats could make a correction and swim from there to other arms, and in particular look for the platform in the NE arm if remembering the correct platform location. When a rat swam directly to the NE arm and/or when the time spent in the NE arm was above chance, we considered that a strategy shift from a response memory-based to a place memory-based navigation had occurred. Such behavior reflects the presence of a spatial map. The entire procedure with the corresponding results is described in Cholvin et al. [20] and

Table 1

Quantification of the extent of the viral infection in the Re and Rh nuclei. Values are means \pm s.e.m. infection levels expressed as a percentage of the area of the Re and the Rh on frontal sections, calculated from an average of at least 5 sections per rat between − 1.8 and − 3.24 mm from Bregma [31]. The ANOVA showed no difference between the two subpopulations of rats, those tested for working memory (WM) and those tested for DREADD validation. Sample size is indicated between brackets in each cell of the table.

	V+ /NaCl		V+ /CNO	
	Re	Rh	Re	Rh
Experiment 3, rats tested for WM	58.7 \pm 8.2 (n = 7)	56.4 \pm 8.3	60.1 \pm 5.6 (n = 10)	60.9 \pm 6.9
Experiment 3, rats tested for DREADD validation	71.8 \pm 9.1 (n = 4)	50.3 \pm 11.3	67.3 \pm 3.0 (n = 8)	58.8 \pm 6.7

Quet et al. [34].

2.2.2.4. Testing CNO effects on SWM. In experiment 3 (inhibition before trial 1), rats with DREADD expression in the ReRh nuclei (see below) received no injection on days 18 and 21, an injection of NaCl 0.9% on days 19 and 22, and an injection of CNO or NaCl 0.9% on days 20 and 23. After discarding rats with inappropriate infections (weak extent, bad location), we had 9 rats given CNO without DREADD, 7 rats with DREADD given saline, and 10 rats with DREADD given CNO. Due to a technical problem, intensity of the ambient light in the testing room was weaker than for experiments 1 and 2.

2.2.2.5. Histological verifications. Rats were killed and perfused as in the two first experiments. To check for the location and extent of viral infection of the ReRh, brain sections from DREADD-injected rats were rinsed in PBS (3 ×10 min). Observation of the infection was made

directly on histological material (there was no enhancement of mCherry fluorescence by additional immunostaining). Viral infections were considered acceptable when they covered at least 40% of the ReRh nuclei and in no case less than 20% of each nucleus. Seven rats used for testing CNO effects on SWM and 6 rats used for DREADD validation had inappropriate infections and were discarded. Another DREADD validation rat died.

3. Results

3.1. Experiment 1

3.1.1. Location of infusion sites

Fig. 3 illustrates the location of the injection tips in the rats that received the high or the low amount of MUSC. As we used a within-subject design, control infusions were made at exactly the same sites.

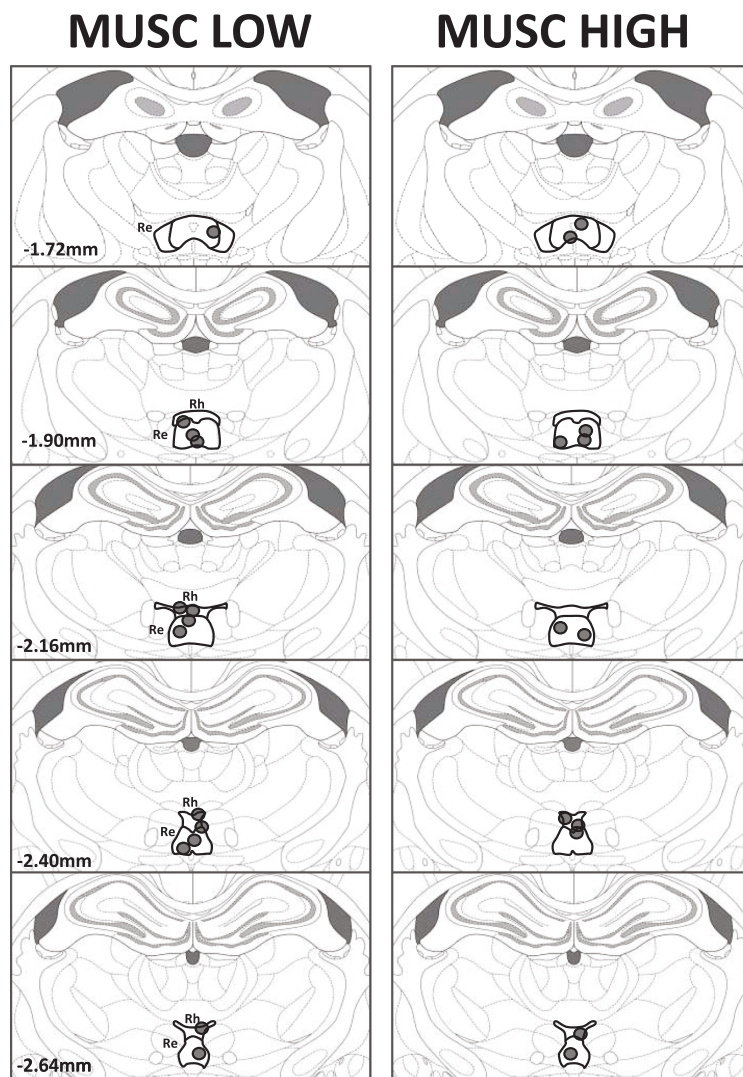


Fig. 3. Location of the infusion sites on coronal sections through the ReRh nuclei of the rats used in experiment 1. The sites indicated are those of rats infused with the low dose of muscimol (i.e., 0.26 nmol; left, MUSC LOW), and those from rats given the high dose of muscimol (i.e., 0.70 nmol; right, MUSC HIGH). Coordinates are given in mm from Bregma according to Paxinos and Watson [31]. Each infusion site corresponds to the location of the tip of the infusion needle.

Three rats were discarded due to inappropriate locations (not illustrated). In all other rats, infusion sites targeted the regions of interest between anteroposterior coordinates going from -1.72 to -2.64 mm from Bregma [31], as was the case in our previous experiments using intra-ReRh drug infusions [20,33].

3.1.2. Pre-training and training

All data are illustrated in Fig. 4. The population of rats was subdivided in two groups. In one group, rats were to be infused with the low amount of muscimol (0.26 nM, or 0.03 μ g). In the other one, it was with the high amount (0.7 nM, or 0.08 μ g). The day before MUSC infusions, all rats were tested after aCSF infusion. In panels A to C of Fig. 4, groups 'low' and 'high' are not distinguished. Indeed, as documented hereafter,

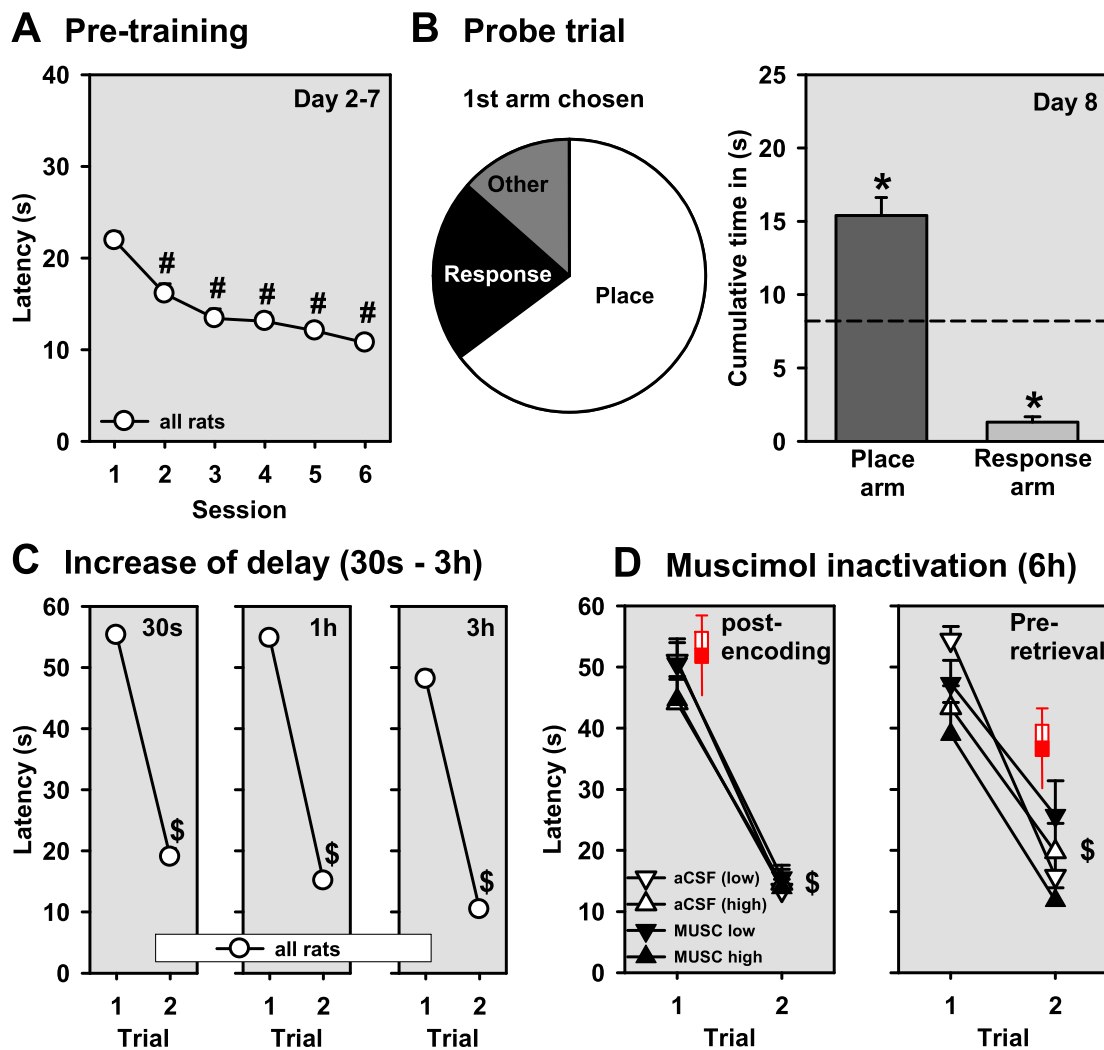


Fig. 4. : Performance of rats in experiment 1. **A**: Latency to the platform over 6 daily sessions, each encompassing 4 successive trials during pre-training. The value shown is the mean of the 4 trials of each session. **B**: Probe trial performance. Left: Pie chart illustrating the first swim path adopted by the rats in the probe trial (platform removed, rats released with a 180° rotation of the start arm). Illustrated is the percentage of rats swimming directly to the former location (SW) of the platform (in white), repeating the RL turn leading them to the NE arm (in black), or swimming directly to a different arm (in grey). The number of rats swimming directly to the SW was significantly above chance (i.e., 20%). Right: Average cumulated time in the place arm (SW, where the platform was located during training) and in the response arm (NE, where a RL turn led the rat right after its release in the maze). The interrupted line indicates chance level (i.e., 8.2 s; see methods for its computation). **C**: Latency to reach the platform in all rats (collapsed in a single group). Between trials 1 and 2, there was a 30 s, 1 h, or 3 h delay. Each mean corresponds to an average of 3 daily sessions/delay **D**: Same variable as in C, but the delay between trial 1 and trial 2 was of 6 h. Performance shown illustrate the effects of a low and a high dose of muscimol (MUSC low & high, respectively) as compared to the performance recorded after aCSF infusions on the previous day. Left: the infusion was made right after trial 1 (indicated by the syringe) to interfere with information holding. Right: the muscimol infusion was made 30 min before trial 2 (indicated by the syringe) to interfere with WM activation during the test trial (i.e., trial 2). Data illustrated are means + SEM. Statistics: # significant difference as compared to session 1, $p < 0.05$; * significantly different from chance level, $p < 0.05$; \$ significantly different from trial 1, $p < 0.01$. In D, only one symbol is used, but performance improvement was significant for each treatment condition (i.e., aCSF and MUSC, whether in the 'low' or 'high' group). There were 14 rats per condition (high MUSC, low MUSC).

we found neither a significant overall Group effect, nor a significant interaction implicating the Group factor. For pre-training scores (Fig. 4 A), we only noticed a significant Session effect ($F(5130) = 24.1$, $p < 0.001$), which was due to overall significantly better scores on sessions 2–6 as compared to session 1. Regarding the first arm chosen (Fig. 4B, pie chart), a significant proportion of rats ended their first swim path in the place arm, namely the arm where the platform had been located during the pre-training (64%, $\text{Chi}^2 = 23.0$, $p < 0.001$ as compared to chance). This spatial bias was confirmed by the fact that the average time rats spent in the place arm (Fig. 4B, bar graphs) was significantly above chance ($t(27) = 13.46$, $p < 0.001$), whereas the time spent in the response arm was significantly below chance ($t(27) = 3.22$, $p < 0.01$).

Subsequently to familiarization, rats were trained with inter-trial delays that were progressively increased from 30 s to 3 h (Fig. 4 C), before being shifted to the delay of 6 h and intracerebral infusions. We only found a significant Trial effect, be the delay of 30 s ($F(1,26) = 370.6$, $p < 0.001$), 1 h ($F(1,26) = 498.1$, $p < 0.001$), or 3 h ($F(1,26) = 527.4$, $p < 0.001$). This was also the case for the 6 h delay preceding the aCSF and MUSC infusions (not illustrated).

3.1.3. Effects of muscimol infusions

On days 18 and 21, rats received no infusion. On days 19 and 22, all rats were infused with aCSF, either immediately after the first trial (day 19) or 30 min before the second trial (day 22). On days 20 and 23, they were given MUSC instead of CSF, either the low or the high dose. The analyses considered two within-subject factors: Trial (1, 2) and Drug (aCSF, MUSC), as well as a between-subject factor: Dose (low, high).

Regarding the post-encoding infusions (Fig. 4D, left), we only found a significant Trial effect ($F(1,26) = 265.1$, $p < 0.001$), reflecting overall performance improvement on the second as compared to the first trial. There was also a tendency towards a significant Dose effect ($F(1,26) = 2.9$, $p = 0.10$), which was due to overall performance that tended to be better in the group that received the low dose of MUSC as compared to the other group. The Drug effect was not significant ($F(1,26) < 1$, ns). None of the interactions was significant: Trial x Dose ($F(1,26) = 2.2$, ns), Drug x Dose ($F(1,26) < 1.0$, ns), Trial x Drug ($F(1,26) < 1$, ns), and Trial x Dose x Drug ($F(1,26) < 1$, ns).

Regarding the infusions performed before trial 2 (Fig. 4D, right), the ANOVA showed a significant Trial effect ($F(1,26) = 110.1$, $p < 0.001$). There was also a significant Dose effect ($F(1,26) = 9.2$, $p < 0.01$), which was due to overall performance that was better in the group receiving the high dose of MUSC as compared to the other group. The Drug effect

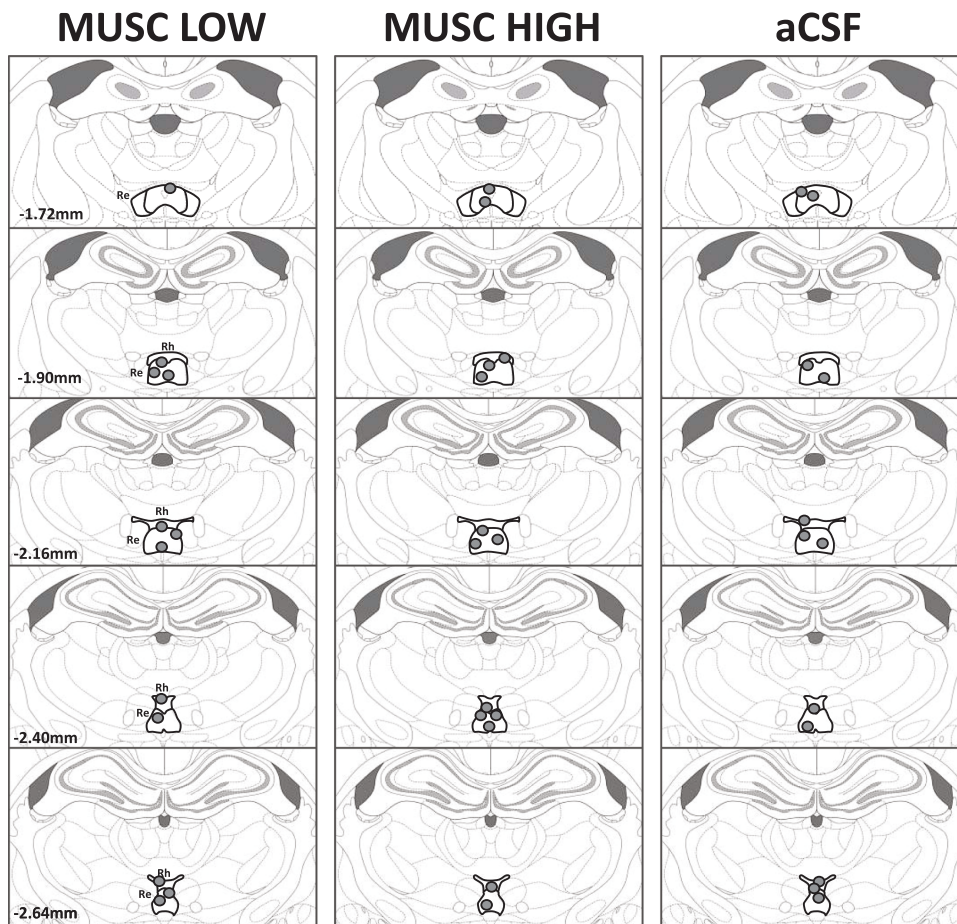


Fig. 5. : location of the infusion sites on coronal sections through the ReRh nuclei of the rats used in experiment 2. The indicated sites are from rats infused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF, right), infused with the low dose of muscimol (i.e., 0.26 nmol; left, MUSC LOW), or infused with the high dose of muscimol (i.e., 0.70 nmol; middle, MUSC HIGH). Coordinates are given in mm from Bregma according to Paxinos and Watson [31]. Each infusion site corresponds to the location of the tip of the infusion needle. The locations were comparable among groups.

was not significant ($F_{1,26} < 1$, ns). None of the interactions was significant: Trial \times Dose ($F_{1,26} = 2.2$, ns), Drug \times Dose ($F_{1,26} = 1.5$, ns), Trial \times Drug ($F_{1,26} = 1.1$, ns), and Trial \times Dose \times Drug ($F_{1,26} = 2.5$, ns).

In summary, neither post-encoding nor pre-retrieval inhibition of the ReRh nuclei altered spatial working memory performance.

3.2. Experiment 2

Given the negative results of our first experiment, this second experiment aimed at investigating the effects of pre-encoding infusions of muscimol. In comparison with experiment 1, our overall design was slightly modified. On days 19 and 22, all rats were infused with aCSF. On days 20 and 23, however, we had 3 treatment groups: one encompassing rats given another aCSF infusion, one with rats given an infusion of a low amount of MUSC, and a last one with rats given the high amount of MUSC.

3.2.1. Location of the infusion sites

Fig. 5 illustrates the location of the injection tips in the rats that received the high or the low amount of MUSC, or a control aCSF infusion. Typical infusion sites are shown in Fig. 6. Six rats were discarded due to inappropriate infusion locations (not illustrated). In all other rats ($n = 38$), infusion sites targeted the regions of interest between anteroposterior coordinates going from -1.72 to -2.64 mm from Bregma [31], as was the case in our previous experiments [20,34] and in the first experiment of the current study.

3.2.2. Pre-training and training

All data are illustrated in Fig. 7. The population of rats was divided in three groups. In one group, the rats were to be infused with aCSF on days 19, 20, 22 and 23. In a second group, the rats were to be infused with the low dose of muscimol. In the last group, the rats were to be infused with the high dose of muscimol (see Fig. 2). In panels A to C of Fig. 7, groups aCSF, 'low', and 'high' muscimol are collapsed. Indeed, we found neither a significant overall Group effect, nor a significant interaction implicating the Group factor. For pre-training scores, we only noticed a significant Session effect ($F_{5,175} = 25.2$, $p < 0.001$), which was due to overall scores that were significantly better on sessions 2–6 as compared

to session 1. Regarding the first arm chosen during the probe trial (Fig. 7B, pie chart), a significant proportion of rats ended their first swim path in the place arm, namely the arm where the platform was located during pre-training ($\chi^2 = 40.1$, $p < 0.001$ as compared to chance). This spatial bias was confirmed by the fact that, in the whole population of rats, the average time rats spent in the place arm (Fig. 7B, bar graphs) was significantly above chance ($t(37) = 18.1$, $p < 0.001$), whereas the time spent in the response arm was significantly below chance ($t(37) = 4.8$, $p < 0.001$).

Subsequently to familiarization, rats were trained with inter-trial delays that progressively increased from 30 s to 3 h (Fig. 7 C), before shifting to the delay of 6 h and intracerebral infusions. We only found a significant Trial effect, be the delay of 30 s ($F_{1,35} = 187.6$, $p < 0.001$), 1 h ($F_{1,35} = 398.4$, $p < 0.001$), or 3 h ($F_{1,35} = 137.3$, $p < 0.001$).

3.2.3. Effects of muscimol infusions

On days 18 and 21, rats received no infusion. aCSF was infused to all rats on days 19 and 22, half an hour before the first trial. Muscimol was infused on days 20 and 23 (see Fig. 2), also half an hour before the first trial. Six hours after the first trial, all rats were tested in the absence of a prior infusion. For each pair of days corresponding to the same treatment (no infusion, aCSF infusion to all, or low- or high MUSC dose infusions; Fig. 7D), we computed an average latency to the platform for trials 1 and trials 2.

Data analysis used a two-way ANOVA that considered factors Treatment (aCSF, low MUSC, high MUSC) and Trial (1,2). When no infusion was performed, the ANOVA only showed a significant Trial effect ($F_{1,35} = 125.8$, $p < 0.001$). The same was observed when aCSF was infused to all rats ($F_{1,35} = 119.4$, $p < 0.001$). When rats were given aCSF, the low or the high dose of MUSC, the ANOVA showed a significant overall Treatment effect ($F_{2,35} = 5.7$, $p < 0.01$) and a significant Trial effect ($F_{1,35} = 98.4$, $p < 0.001$), but the interaction was not significant ($F_{2,35} < 1$, ns). The Treatment effect was due to overall latencies (trial 1 and 2 collapsed) that were higher in rats given the high (by about 10 s; $p < 0.01$) or the low (by about 6 s; $p < 0.05$) dose of MUSC in comparison with the group given aCSF. It is noteworthy, however, that in both groups given MUSC, there was an improvement between both trials that did not differ from that found in the group of

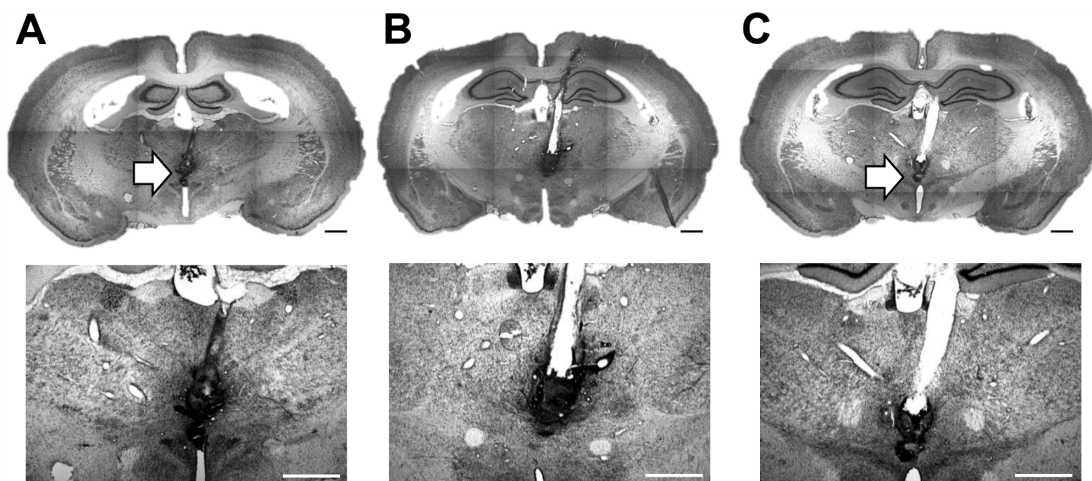


Fig. 6. : Photographs showing tissue in the region of the infusion on coronal sections stained with cresyl violet. The infusion site is shown at an anteriority from Bregma [31] between -2.1 mm and about -3.2 mm. A: from a rat infused with aCSF only; B: from a rat infused with the low dose of MUSC; C: from a rat infused with the high dose of MUSC. The arrow points to the location of the Re nucleus. The photographs on the bottom are a higher magnification of those shown on the top. Scale bar = 1 mm.

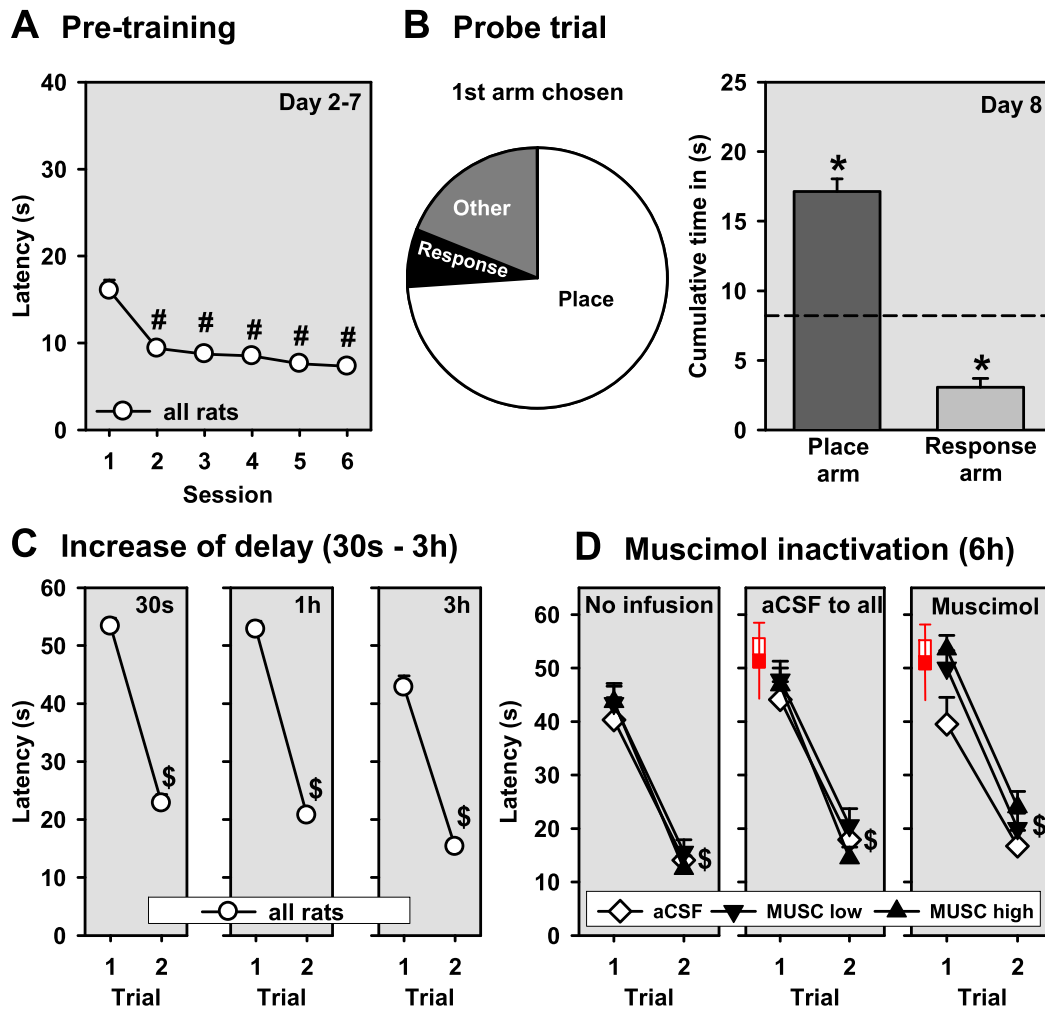


Fig. 7. Performance of rats in experiment 2. A: Latency to the platform over 6 daily sessions, each encompassing 4 successive trials during pre-training. The value shown is the mean of the 4 trials of each session. B: Probe trial performance. Left: Pie chart illustrating the first swim path adopted by the rats in the probe trial (platform removed, rats released with a 180° rotation of the start arm). Illustrated is the percentage of rats swimming directly to the former location (SW) of the platform (in white), repeating the R-L turn leading them to the NE arm (in black), or swimming directly to a different arm (in grey). The number of rats swimming directly to the SW was significantly above chance (i.e., 20%). Right: Average cumulated time in the place arm (SW, where the platform was located during training) and in the response arm (NE, where a right-left turn led the rat right after its release in the maze). The interrupted line indicates chance level (i.e., 8.2 s; see methods for its computation). C: Latency to reach the platform in all rats (collapsed in a single group). Between trials 1 and 2, there was a 30 s, 1 h, or 3 h delay. Each mean corresponds to an average of 3 daily sessions/delay. D: Same variable as in C, but the delay between trial 1 and trial 2 was of 6 h. Performance illustrates the effects of an infusion of aCSF (middle) or muscimol (MUSC; right) as compared to the performance recorded in the absence of a prior infusion (left). The infusion was made before trial 1 to interfere with encoding (indicated by the syringe). Data illustrated are means + SEM. In D, it is an average of 2 sessions per condition (no infusion, aCSF to all, or MUSC low or high as compared to aCSF). Statistics: # significant difference as compared to session 1, $p < 0.05$; * significantly different from chance level, $p < 0.05$; \$ significantly different from trial 1, $p < 0.01$. In D, only one symbol is used, but performance improvement was significant for each treatment condition (aCSF and MUSC, whether in the 'low' or 'high' group). Group size was as follows: aCSF, $n = 12$; MUSC low, $n = 12$; MUSC high, $n = 14$.

rats infused with aCSF.

In summary, while the high and low doses of muscimol had some overall behavioral impact, affecting mainly overall latencies, the pre-encoding inhibition did not result in significant alteration of spatial working memory performance in the double-H maze.

3.3. Experiment 3

The reversible muscimol-induced inhibition, while sparing functionality in fibers *en passage* and terminals, does not discriminate

between different types of neuronal populations. In the ReRh, there are other neurons than the glutamatergic, excitatory projection neurons. With a DREADD approach, it becomes possible to focus on specific types of neurons, and particularly on excitatory ones. Furthermore, preliminary experiments showed that the viral vector we used has a good tropism for the ReRh nuclei. In this third experiment, we used a DREADD approach to express inhibitory CNO receptors in the excitatory neurons of the ReRh in order to specifically reduce their signal transmission to the mPFC and Hip.

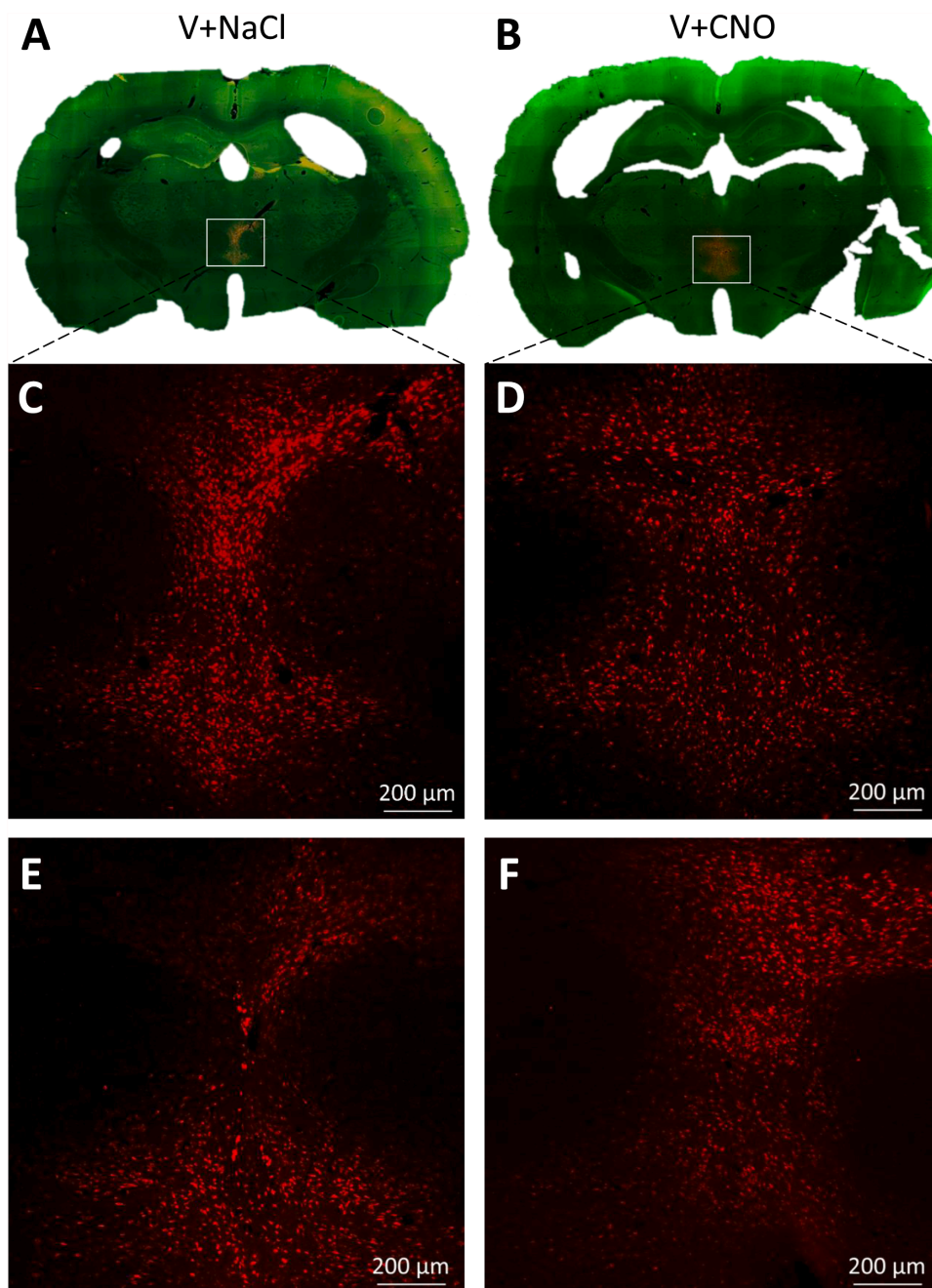


Fig. 8. : Photographs showing representative examples of infections of the ventral midline thalamus in rats injected with the hm4Di gene-bearing virus (V+) treated with NaCl (A, C, E) or with CNO (B, D, F). Photographs shown in A-D are from rats trained in the spatial working memory task. Photographs shown in E and F, are from rats used in the behavioural DREADD validation experiment.

3.3.1. Viral infection of the ReRh

Typical infections are shown in Fig. 8A-D. Following the evaluation of the infections, we discarded a total of 7 rats with no evidence for infection or with inappropriate (or too extended) infection locations. The resulting sample sizes were: $n = 7$ in the V+ /NaCl group, $n = 9$ in the V-/CNO group, and $n = 10$ in the V+ /CNO group. The extent of the

infection area is indicated in Table 1 as a percentage of the volume of the ReRh nuclei. ANOVA of these values showed no significant effect (Group, Region, interaction).

3.3.2. Pre-training and training

Data are illustrated in Fig. 9A-C.

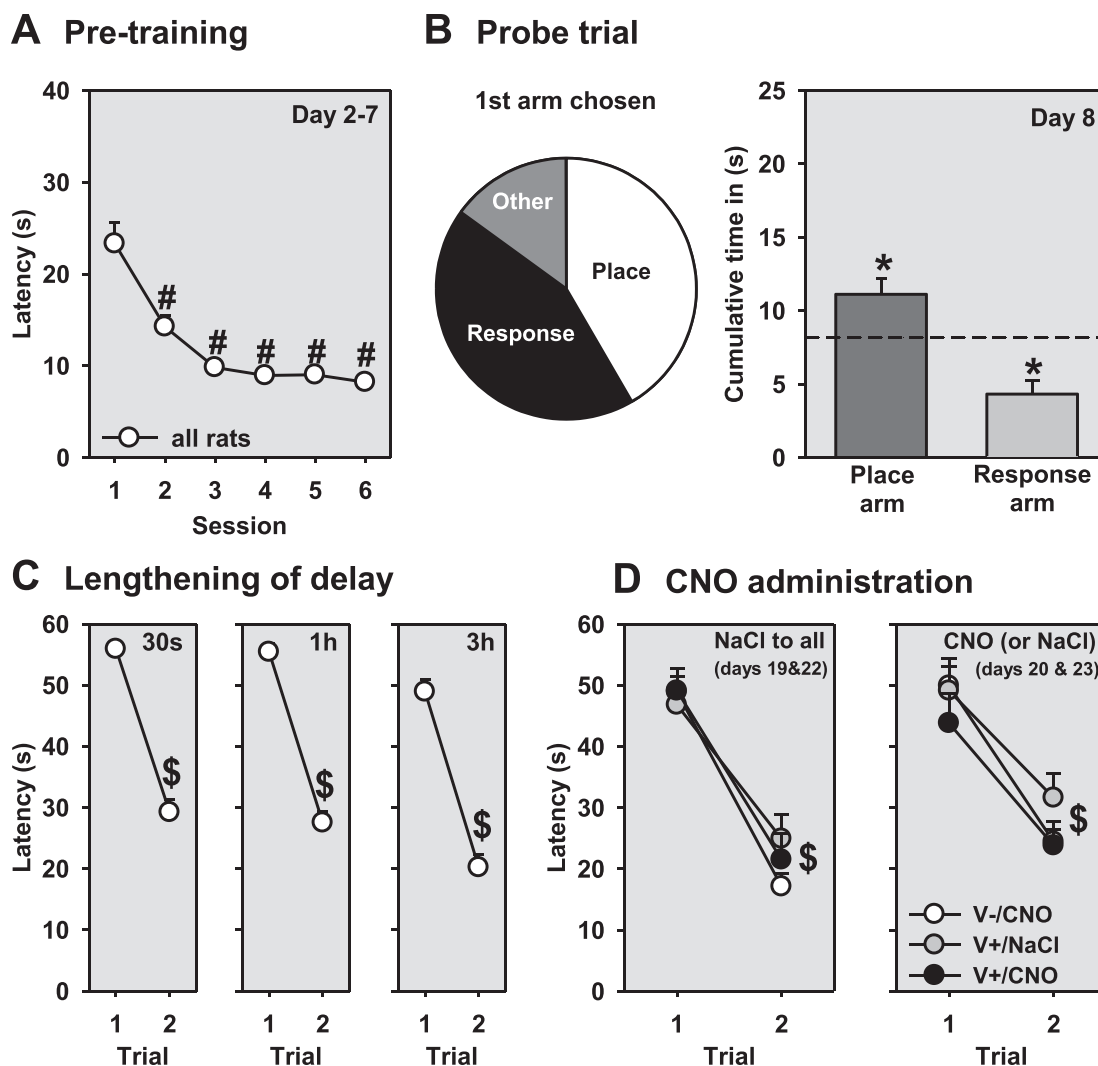


Fig. 9. : Performance of rats in experiment 3. **A:** Latency to the platform over 6 daily sessions, each encompassing 4 successive trials during pre-training. The value shown is the mean of the 4 trials of each session. **B:** Probe trial performance. Left: Pie chart illustrating the first swim path adopted by the rats in the probe trial (platform removed, rats released with a 180° rotation of the start arm). Illustrated is the percentage of rats swimming directly to the former location (SW) of the platform (in white), repeating the RL turn leading them to the NE arm (in black), or swimming directly to a different arm (in grey). The number of rats swimming directly to the SW was significantly above chance (i.e., 20%). Right: Average cumulated time in the place arm (SW, where the platform was located during training) and in the response arm (NE, where a RL turn led the rat right after its release in the maze). The interrupted line indicates chance level (i.e., 8.2 s; see methods for its computation). **C:** Latency to reach the platform in all rats (collapsed in a single group). Between trials 1 and 2, there was a 30 s, 1 h, or 3 h delay. Each mean corresponds to an average of 3 daily sessions/delay. **D:** Same variable as in C, but the delay between trial 1 and trial 2 was of 6 h. Performance shown illustrate the effects of ip CNO in V+ and V- rats as compared to the performance of V+ rats subjected to an ip injection of NaCl on days 20 and 23. The day before (days 19 and 22) all rats were injected with NaCl before trial 1. Data illustrated are means + SEM. Statistics: # significant difference as compared to session 1, $p < 0.05$; * significantly different from chance level, $p < 0.05$; \$ significantly different from trial 1, $p < 0.01$. In D, only one symbol is used, but performance improvement was significant for each treatment condition (V-/CNO, V+/NaCl, V+/CNO). Group size was as follows: V-/CNO, $n = 9$; V+/NaCl = 7; V+/CNO, $n = 10$).

For pre-training scores (Fig. 9 A), the Group x Session ANOVA only showed a significant Session effect ($F_{5,115} = 23.1$, $p < 0.001$), which was due to overall scores that were significantly better on session 1 as compared to sessions 2–6, and on session 2 as compared to sessions 3–6. There was no significant Group effect and no interaction. Regarding the first arm chosen during the probe test (Fig. 9 B, pie chart), 41% rats ended their first swim path in the response arm, namely the arm to which successive R-L turns led ($\chi^2 = 4.2$, $p < 0.05$ as compared to chance). A proportion of 41% rats swam to the place arm, corresponding

to the former location of the platform, which also differed from chance ($\chi^2 = 4.2$, $p < 0.05$ as compared to chance). The presence of a cognitive map was confirmed by the fact that, in the whole population of rats, the average time rats spent in the place arm during the probe trial (Fig. 9 B, bar graphs) was significantly above chance ($t(25) = 2.7$, $p < 0.05$), whereas the time spent in the response arm was significantly below chance ($t(22) = 4.1$, $p < 0.001$).

Subsequently to familiarization, rats were trained with inter-trial delays that were progressively increased from 30 s to 3 h (Fig. 9 C),

before shifting to the delay of 6 h and i.p. injections of CNO. Data were analyzed with ANOVA considering factors Treatment (V+/NaCl, V-/CNO, V+/CNO) and Trial (1,2). We only found a significant Trial effect, be the delay of 30 s ($F_{1,23} = 164.2$, $p < 0.001$), 1 h ($F_{1,23} = 149.5$, $p < 0.001$), or 3 h ($F_{1,23} = 166.1$, $p < 0.001$). Whatever the delay, there was no significant Treatment effect and no significant interaction. This was also the case for the 6 h delay (Fig. 9D) when no injection was performed before the evaluation trial (on days 18 and 21, not illustrated; $F_{1,23} = 44.8$, $p < 0.001$), or when NaCl was injected to all rats (on days 19 and 22; $F_{1,23} = 101.2$, $p < 0.001$). The same applied to the injection of CNO (on days 20 and 23; $F_{1,23} = 44.6$, $p < 0.001$). For none of these pharmacological conditions did we find a significant Group effect or a significant Group x Trial interaction. This shows that CNO had no effect in the rats expressing DREADD in the ReRh.

3.3.3. Behavioral validation of the DREADD-CNO approach

From previous experiments, we know that reversible inhibition of the ReRh after muscimol infusion alters cognitive flexibility in a task of set shifting in the double-H maze [20]. The same keeps true when the ReRh nuclei undergo DREADD-mediated chemogenetic inhibition [34]. This is why, in our third experiment, a separate group of maze-naïve rats were trained in the double-H and subjected to the strategy-shifting test after administration of CNO. These rats had been operated according not only to exactly the same procedure as the rats tested for spatial working memory in experiment 3, but also at the same moment. DREADD infection was verified and quantified as in the other series of DREADD rats. Following the evaluation of the infections, we discarded 6 rats with no evidence for infection or with inappropriate (or too extended) infection locations. One rat died. The resulting sample sizes were: $n = 4$ in the V+/NaCl group, $n = 8$ in the V-/CNO group, and $n = 8$ in the V+/CNO group. Typical infections are shown in Fig. 8E & F. The extent of the infection area is indicated in Table 1 as a percentage of the volume of the ReRh nuclei. ANOVA of these values showed no significant effect (Group, Region, interaction). The extent of the infection did not differ between rats tested for working memory and those tested for DREADD validation. Indeed, a Subpopulation (WM, DREADD validation) x Treatment (V+/CNO, V+/NaCl) x Region (Re, Rh) ANOVA showed none of the individual factors to exert significant effects, and the same was true for any of the interactions ($F_{1,25} < 2.1$, smallest p value > 0.16 ; see Table 1).

Results of the second probe trial of the DREADD validation test are shown in Fig. 10. In all three groups, time spent in the N (response memory) arm did not differ from chance, and there was no between-group difference on this variable, as shown by the ANOVA ($F_{1,17} < 1$, ns). In the NE (place arm), however, we found a time that was significantly above chance in CNO-only rats ($t(7) = 4.7$, $p < 0.01$), non significantly above chance in V+/NaCl rats ($t(3) = 1.2$, ns), and significantly below chance in V+/CNO rats ($t(7) = 5.2$, $p < 0.01$). Furthermore, for the time in NE arm, the ANOVA showed a significant Group effect ($F_{1,17} = 12.0$, $p < 0.001$), and multiple comparisons indicated significant differences between V+/CNO rats and rats from each of both other groups ($p < 0.05$). These results provide behavioral validation of the DREADD approach.

4. Discussion

The ReRh nuclei of the ventral midline thalamus contribute to a variety of cognitive functions (e.g., [11,35]), including spatial working memory [6,15–18]. In a typical working memory task, three sequential phases of information processing can be distinguished: information encoding (i.e., collection of an instruction), as occurs during a sample trial, information holding for short (a few seconds) to longer (several minutes to a few hours) delays, and information retrieval during a test trial. To which of these three phases the ReRh nuclei are crucial remains unknown for now, although a study by Maisson et al. [23] using optogenetic techniques in a T-maze alternation task suggests it could be

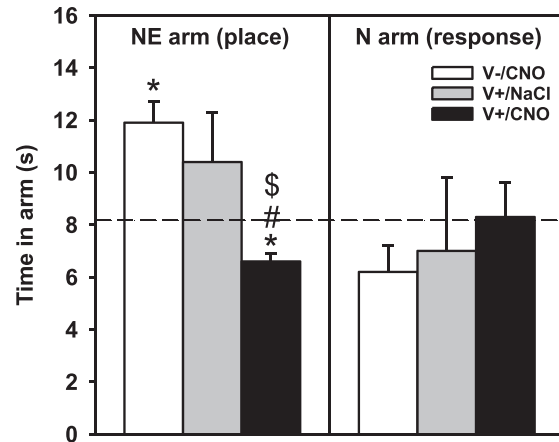


Fig. 10. : Behavioral validation of the DREADD approach in the cognitive flexibility task. Rats were trained for 2 days (start arm = S, target in NE arm, 4 trials/day), given a first probe trial on day 3 (start = SW, no platform in NE, trial duration = 60 s; not illustrated), trained for two additional days (as for the first two days), and then given a second and last probe trial (same conditions as for the former one; results shown in the figure). Before the first and the second probe trial, the rats were injected with CNO (1 mg/kg, i.p.) or, as a control, a saline solution. Bar graphs show the time spent in the NE arm (where the platform was located during training) and in the N arm (which they could enter by successive RL turns right after being released in the double-H maze) on the second probe trial. Data illustrated are means + SEM. Group size was as follows: V-/CNO, $n = 4$; V+/NaCl = 8; V+/CNO, $n = 8$. The interrupted line indicates the chance level. Statistics: * significantly different from chance; # significantly different from V-/CNO rats; \$ significantly different from V+/NaCl rats. V+/CNO rats given CNO were not able to shift to a place strategy, what is expected after an efficient inhibition of the ReRh, as found previously with muscimol inhibition [20] or DREADD-mediated inhibition [34].

encoding. The current study addressed this question in a memory task in which we previously found a positive correlation between c-Fos expression in the ReRh nuclei and SWM performance, leading to the possibility that the ReRh nuclei might contribute to spatial working memory retrieval [22]. Using a 6-h delay SWM task in our double-H maze, we inhibited the ReRh nuclei before encoding, using MUSC infusion as well as DREADD-mediated inhibition. With MUSC, we also inactivated the ReRh nuclei right after information encoding, and thus at the start of the holding phase, or before the retrieval test. Whatever the approach, we found none of these manipulations to produce a significant alteration in SWM performance. There was a significant overall drug effect with MUSC infused before encoding. However, whereas overall latencies to reach the platform were increased by the drug, performance unquestionably improved between trial 1 and 2, and this improvement trend paralleled that found in controls.

4.1. Treatment efficiency

When looking at such negative results, the first idea coming to mind is to question the efficiency of muscimol infusions and DREADD-mediated inhibition. Regarding MUSC infusions, the coordinates for infusion devices were identical to those of previous studies in which we found clear-cut alterations of a function supported by the prefrontal cortex (i.e., strategy shifting; [20]). Furthermore, our histological verifications showed that the infusion sites were comparable to those reported in Cholvin et al. [20]. In comparison with the literature on SWM, the amounts of MUSC we infused were relatively small in the current study as we privileged drug diffusion limitation. Theoretically, this could be another reason for our failure to observe SWM deficits. Indeed, MUSC, even at much higher amounts (e.g., 250 ng in 0.5 μ L), does not produce

complete inhibition of neuronal firing (e.g., [36]). Therefore, one cannot exclude that the spatial working memory task used herein is less sensitive than other tasks (e.g., Y-maze alternation) to ReRh nuclei inhibition, or that performance disruption would require a more pronounced inhibition. If so, our findings would not rule out a contribution of the ventral midline thalamus to working memory processes, but higher MUSC amounts (or stronger chemogenetic inhibition) would be required to reveal it. Yet, the amounts used in the current study were identical to those previously found to neutralize behavioral flexibility in a spatial navigation task [20]. As this flexibility was also neutralized by CNO after an inhibitory DREADD expression in excitatory neurons of the ReRh nuclei [34], what we confirmed herein in a separate set of rats, efficiency of the DREADD approach cannot be caught out either. In passing, it is worth noting that also Viena et al. [16] recently reported on behavioral flexibility deficits after ReRh nuclei inhibition, confirming an implication of these nuclei in such functions.

4.2. The ReRh and spatial working memory

Our current findings are at clear variance with most previous reports having addressed and verified a possible implication of the ReRh nuclei in SWM. In addition, they are not in line with the hypothesis we raised from our recently reported correlation between c-Fos expression in the ReRh nuclei and performance in the task used herein [22]. This shows that correlative imaging- and causal inhibition-based studies do not necessarily generate converging results.

So far, SWM has most often been evaluated in reinforced T-maze alternation tasks, but also occasionally in the radial maze and the water maze. In the water maze, Davoodi et al. [37] reported that pre-encoding or immediate post-encoding tetracaine inhibition of the ReRh nuclei altered SWM tested after a 75 min delay. This result suggests that the ReRh nuclei may contribute to post-encoding spatial information holding. Hembrook et al. [38] used a delayed non-matching to place task in an operant chamber. SWM was tested with delays of 1–25 s. Inhibition of the ReRh nuclei was obtained with pre-encoding infusion of different doses of muscimol, including a reasonably low one (i.e., 0.4 nmol, which is in between the two amounts infused in the current study). All muscimol doses used by Hembrook et al. [38] disrupted SWM, but the authors could not attribute the deficits to encoding, holding or retrieval failure. Hallock et al. [6] used a rewarded T-maze alternation task and pre-encoding muscimol (0.125, 0.25, and 0.5 µg, or 1.1, 2.2, and 4.4 nmol, respectively) to inactivate the ReRh nuclei. The three doses induced comparable deficits. Layfield et al. [15] used the same task with delays of 5 and 30 s, and pre-encoding amounts of muscimol of 0.125, 0.25 and 0.5 µg. A consistent deficit was found with the two lowest amounts at the longest delay. Duan et al. [18] optogenetically stimulated terminals of the Re nucleus in CA1 of the dorsal hippocampus at a 3 Hz frequency (delta range). The stimulation was applied with no interruption during information encoding, information holding, and retrieval. It reduced alternation, although less efficiently on the second than on the first test. A similar approach was used by Rahman et al. [39], who showed delta-frequency stimulation of Re terminals in the hippocampus to reduce Y-maze alternation in mice, but only when the stimulation was applied during the retrieval (not the encoding) phase. Hallock et al. [6] confirmed their 2013 behavioral findings in a study assessing the role of ReRh nuclei in hippocampal-prefrontal synchrony. Viena et al. [16] also found SWM impairment after ReRh inhibition. They used delays of 0, 30, 60 and 120 s, and the amounts of muscimol were the same (0.25 and 0.5 µg) as in Layfield et al. [15]. At all delays both amounts reduced T-maze alternation scores. Maïsson et al. [23] used an optogenetic strategy to inhibit the Re. They found that inhibition during encoding, not holding or retrieval phases, disrupted alternation. Altogether, these experiments converge towards the idea of an implication of the ReRh nuclei in SWM processes, with one study reporting on a possible role during encoding [23].

4.3. No effect of ReRh inhibition on SWM

In the current study, we could not alter SWM performance, be it with muscimol or with the DREADD approach. This is even more surprising that, in a recent study using exactly the same task as herein, we found a positive correlation between the levels of c-Fos expression in the ReRh nuclei and performance during the evaluation phase [22]. It is noteworthy that it is the second time that c-Fos imaging and inhibition data do not converge in our hands. Indeed, in a previous experiment on system consolidation of a spatial memory, we found a high increase of c-Fos expression during retrieval of a remote memory in a water maze task, but lidocaine-induced inhibition of the ReRh failed to prevent retrieval [33]. In the current study, one can wonder about the reason(s) of such discrepancy between imaging and inhibition results. In the absence of further data, it is difficult to propose a convincing answer. However, there were several methodological differences with the aforementioned experiments, of which almost all have measured alternation rates in a T-maze to evaluate SWM. We used a different device, another task with possibly weaker inter-session/inter-trial interference (see below), a different motivation, possibly a higher load on spatial memory as compared to the T-maze, and a different temporal load due to the longer post-encoding delay preceding the evaluation trial. These differences are discussed point by point hereafter.

4.3.1. Device, task and spatial load

Regarding the device and the task, it must be underlined that, during the retrieval phase, we recently found a more than 200% increase of c-Fos expression in CA1, as well as in the antero-ventral nucleus of the rostral thalamus, but no significant change in the mPFC [22]. This overall activation patterns indicates that, after a 6-h post-encoding rest, performance in the retrieval phase did not require a strong engagement of the mPFC, and perhaps therefore of the ReRh nuclei. However, in the same study, we also noticed that the level of c-Fos expression in the ReRh was positively correlated with performance, an observation compatible with a performance-determinant contribution of the ReRh. This possibility, however, is not supported by the inhibition results reported herein, as our rats, whatever the timing of the inhibition (i.e., pre-encoding, post-encoding, or pre-retrieval), performed at control levels.

As to the spatial load, we have to consider that, while being in the double-H maze, rats had easy access to surrounding cues, including directly through the transparent walls of the device (e.g., [21]). It is noteworthy that in our third experiment, overall spatial navigation performance appeared somewhat weaker than in the two first experiments. This probably reflected the lower ambient light intensity we had in experiment 3 (due to a technical problem), although without precluding cue-based navigation, as shown in Fig. 9B. It is possible, however, that the task has gained in difficulty. In the study by Viena et al. [16], the walls of the T-maze were opaque (see their Fig. 1). The same applies to experiments that used a maze made of wood [6,15,23]. Due to wall opacity, the allocentric spatial load of the T-maze task may have been overestimated [40], and egocentric or other (e.g., [40]) processes might have entered into play to support alternation (e.g., [41]). Thus, because of a higher spatial load in the double-H, the task may have been more depending on the hippocampus than on information exchanges between the mPFC and hippocampus, therefore less sensitive to ReRh disruption. Alternatively, egocentric or other processes, rather than those supporting SWM, might have been altered in the studies having used a delayed non-matching to sample task in the T-maze.

4.3.2. Interference

Our task was probably at weaker risk for interference in comparison with an alternation task in the T-maze. In the latter, trials/sessions are usually very close to each other and choice possibilities limited to only two arms. Furthermore, an arm's valence switches from correct to incorrect and back again over the successive pairs of trials in a same

session including several successive pairs of trials. This inter-trial interference is particularly pronounced when a short inter-trial interval separates trials and is reduced by using a long inter-trial interval (e.g., [42]). In our double-H maze task, successive sessions were separated by 24 h, there was a 6-h delay between the sampling and test trials, and rats had more choice possibilities (at least 4 arms were accessible from the start arm). A consequence of these three particularities could be a reduction of the risk for proactive interference. If this were the case, one speculation would be that mPFC information relayed by the ReRh nuclei are particularly required when a spatial working memory task carries proactive interference. Such a view is compatible with data showing that, in a spatial task in which prior knowledge may interfere with ongoing learning, activity of the PFC determines the capacity of the hippocampus to retrieve distinct representations, and thereby reduce confusion/interference [43]. In a previous study, a delayed-matching to sample task in a T-maze was subjected to interference effects between successive trials, and following lesions of the mPFC, the effects of interference resulted in degraded performance [44].

4.3.3. Motivation

Regarding motivation, all but one previous experiments tackling SWM following manipulations of the ventral midline thalamus used a task based on appetitive motivation ([37] is the exception). In the currently reported series of experiments, the motivation was aversive (as rats had to avoid fresh water), which could lead animals to mobilize cognitive resources that appetitive motivations would not engage to a comparable intensity level. Indirect evidence in favor of such a possibility comes from an article by Dudchenko et al. [45]. These authors disoriented intact rats before testing them in a radial maze, of which a dry version used a food reward and an aquatic version required an escape response. For both, the devices and their spatial environment were identical. In the dry and appetitive version of the task, pre-testing disorientation disrupted navigation performance. This, however, was not the case in the aquatic, and thus aversive, version of the task, in which stress related to escape behavior may have been more pronounced, therefore cognitive processes engaged at higher level. Dudchenko et al. [45] hypothesized that stress could modulate task motivation and thereby affect performance. The underlying aversion-determined boosting of cognitive mechanisms could make rats less sensitive to treatments that would reveal disruptive at lower stress levels.

4.3.4. Temporal load

Finally, we also have to consider the delay that we used in our series of experiments. In the T-maze alternation tasks, the shortest intervals separating a sample from a test trial are usually of a few seconds, and the longest interval do not exceed 2 min (e.g., [16]). Although Churchwell and Kesner [9] elegantly demonstrated that interactions between mPFC and CA1 were crucial when spatial working memory was evaluated after a 'long' post-encoding delay, their interval separating encoding and information retrieval was of 5 min, not of several hours. If, with Dudchenko [3], we consider that working memory is "a short term memory for an object, stimulus, or location" (see Introduction), the delay of 6 h we used could become problematic because it might exceed the typical time window of a short-term memory. Furthermore, we have trained our rats to keep the encoded spatial information for 6 h, a delay that we used in our former study from which we designed the current one (the reason for using this delay is justified in [22]). Strictly speaking, a 6-h delay is not in the range of short-term memory. Therefore, it cannot be excluded that our task assessed something different from SWM, perhaps something for which rats may in fact have engaged kind of a consolidation process after information encoding. From previous work, we know that a lesion of the ReRh nuclei disrupts neither spatial information encoding nor its perseveration over a few days [33]. Furthermore, while being tested in a typical SWM task, namely the water maze, with a very short delay between encoding and evaluation trials, a former study of our laboratory

showed that rats were able to keep the encoded spatial information for at least 24 h in spite of its irrelevancy at the end of each session [46]. Such consolidation, which could have been operating in the testing protocol used herein, could depend more on the Hip than on Hip-mPFC exchanges, and therefore be less sensitive to ReRh inhibition. However, the fact remains that muscimol-induced inhibition of the ReRh before encoding or right after it, or pre-encoding DREADD-mediated inhibition of these nuclei, had no significant incidence on subsequent performance in the evaluation trial. If encoding was the processing phase to which the ReRh nuclei are required, as advocated by Maïsson et al. [23], we should have found a deficit, even (and may be especially) after a 6-hour information holding time.

In this section of the discussion, each particular feature of our study (vs. previous ones) was discussed separately from the others. It goes without saying, however, that one explanation for the fact that we did not disrupt the performance of our rats by inactivating the ReRh nuclei may in fact lie in a combination of these features. If this were the case, establishing a role for the ReRh nuclei in SWM would probably require further experimental support from studies not limited to the use of a single test (i.e., T-maze alternation), a single type of motivation (i.e., appetitive), and only short inter-trial delays (i.e., of the order of a few min at most).

5. Conclusion

In conclusion, whereas several articles reported evidence in favor of a participation of the ReRh nuclei in SWM, our current findings are the first to contradict this point of view. As we introduced a new task and a delay longer than the usual ones (several hours vs. a few min at most and usually just a few seconds), a question that will be important to resolve is whether the ReRh nuclei are needed in T-maze alternation tasks and less in other SWM tasks, especially when a short delay is interposed between information encoding (sample trial) and retrieval (test trial), as in T-maze testing. Should it be the case, the pending question would be why is it the case? A possibility could be that, given the diversity of the connections of these nuclei (e.g., [10]), alternative pathways could be engaged to compensate for their inhibition during encoding, or holding, or retrieval phases of SWM. This could be especially at work when the holding delay is long, the testing situation is stressful, and interference possibilities are reduced in comparison with other tasks.

CRedit authorship contribution statement

Laurine Boch: Investigation, Formal analysis, review, editing, original draft, figures. **Thomas Morvan:** Investigation, testing, Formal analysis. **Thibaut Neige:** Investigation, testing, Formal analysis. **Nina Kobakhidze:** Investigation, testing, **Elodie Panzer:** review, editing. **Brigitte Cosquer:** Investigation, Resources, neurosurgery. **Anne Pereira de Vasconcelos:** Conceptualization, writing, review, editing, Supervision, Project administration. **Aline Stephan:** Conceptualization, Investigation, neurosurgery, writing, review, editing, Supervision, Project administration. **Jean-Christophe Cassel:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, writing, review, editing, Supervision, Project administration, Visualization.

Acknowledgements

This work was supported by the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). We are grateful to O. Bildstein, D. Egesi, and G. Edomwonyi for their assistance in animal care. LB is supported by a Unistra PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

Data availability

All data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

- [1] A. Baddeley, The episodic buffer: a new component of working memory, *Trends Cogn. Sci.* 4 (11) (2000) 417–423, [https://doi.org/10.1016/s1364-6613\(00\)01538-2](https://doi.org/10.1016/s1364-6613(00)01538-2).
- [2] A. Baddeley, G. Hitch, Working memory, in: G.H. Bower (Ed.), *The Psychology of Learning and Motivation*, 8, New York: Academic Press, 1974, pp. 47–89.
- [3] P.A. Dudchenko, An overview of the tasks used to test working memory in rodents, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28 (7) (2004) 699–709, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.002>.
- [4] T. Spellman, M. Rigotti, S.E. Ahmari, S. Fusi, J.A. Gogos, J.A. Gordon, Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory, *Nature* 522 (2015) 309–314, <https://doi.org/10.1038/nature14445>.
- [5] L.L. Colgin, Oscillations and hippocampal prefrontal synchrony, *Curr. Opin. Neurobiol.* 21 (3) (2011) 467–474, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.04.006>.
- [6] H.L. Hallock, A. Wang, A.L. Griffin, Ventral midline thalamus is critical for hippocampal-prefrontal synchrony and spatial working memory, *J. Neurosci.* 36 (32) (2016) 8372–8389, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0991-16.2016>.
- [7] W.B. Hoover, R.P. Vertes, Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat, *Brain Struct. Funct.* 212 (2) (2007) 149–179, <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>.
- [8] S.B. Floresco, Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without delay, *J. Neurosci.* 17 (5) (1997) 1880–1890, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-05-01880.1997>.
- [9] J. Churchwell, R.P. Kesner, Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: interactions and independent parallel processing, *Behav. Brain Res.* 225 (2) (2011) 389–395, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.045>.
- [10] J.-C. Cassel, A. Pereira de Vasconcelos, M. Loureiro, T. Cholvin, J.C. Dalrymple-Alford, R.P. Vertes, The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications, *Prog. Neurobiol.* 111 (2013) 34–52, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.08.006>.
- [11] M.J. Dolleman-van der Weel, A.L. Griffin, H.T. Ito, M.L. Shapiro, M.P. Witter, M. P. R. P. T. A. Vertes, Allen, The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior, in: *Learn Mem.* 26, 2019, pp. 191–205, <https://doi.org/10.1101/lm.048389.118>.
- [12] M. Ferraris, J.-C. Cassel, A. Pereira de Vasconcelos, A. Stephan, P.P. Quilichini, The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 125 (2021) 339–354, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.02.025>.
- [13] A.L. Griffin, Role of the thalamic nucleus reuniens in mediating interactions between the hippocampus and medial prefrontal cortex during spatial working memory, *Front Syst. Neurosci.* 9 (article 29) (2015), <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00029>.
- [14] R.P. Vertes, S.B. Linley, W.B. Hoover, Limbic circuitry of the midline thalamus, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54 (2015) 89–107, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.014>.
- [15] D.M. Layfield, M. Patel, H. Hallock, A.L. Griffin, Inactivation of the nucleus reuniens/rhomboid causes a delay-dependent impairment of spatial working memory, *Neurobiol. Learn Mem.* 125 (2015) 163–167, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.09.007>.
- [16] T.D. Viena, S.B. Linley, R.P. Vertes, Inactivation of nucleus reuniens impairs spatial working memory and behavioral flexibility in the rat, *Hippocampus* 28 (4) (2018) 297–311, <https://doi.org/10.1002/hipo.22831>.
- [17] M.G. Bobal, L.M. Savage, The role of ventral midline thalamus in cholinergic-based recovery in the amnesic rat, *Neuroscience* 285 (2015) 260–268, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.015>.
- [18] A.R. Duan, C. Varela, Y. Zhang, Y. Shen, L. Xiong, M.A. Wilson, J. Lisman, Delta frequency optogenetic stimulation of the thalamic nucleus reuniens is sufficient to produce working memory deficits: relevance to schizophrenia, *Biol. Psychiatry* 77 (12) (2015) 1098–1107, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.01.020>.
- [19] R. Cassel, C. Kelche, L. Lecourtier, J.-C. Cassel, J.C. The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats, *Behav. Brain Res.* 230 (2012) 333–342, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.021>.
- [20] T. Cholvin, M. Loureiro, R. Cassel, B. Cosquer, K. Geiger, D. De Sa Nogueira, H. Raingard, L. Robelin, C. Kelche, A. Pereira de Vasconcelos, J.-C. Cassel, The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions, *J. Neurosci.* 33 (2013) 8772–8783, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013>.
- [21] J. Gasser, A. Pereira de Vasconcelos, B. Cosquer, A.L. Boullier, J.-C. Cassel, Shifting between response and place strategies in maze navigation: effects of training, cue availability, and functional inactivation of striatum or hippocampus in rats, *Neurobiol. Learn. Mem.* 167 (2020), 107131, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107131>.
- [22] T. Morvan, L. Boch, E. Mikhina, B. Cosquer, A. Stéphan, A. Pereira de Vasconcelos, J.-C. Cassel, Ventral midline thalamus activation is correlated with memory performance in a delayed spatial matching-to-sample task: a c-Fos imaging approach in the rat, *Behav. Br. Res.* 418 (2022), 113670, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113670>.
- [23] D.J. Maisson, Z.M. Gemzik, A.L. Griffin, Optogenetic suppression of the nucleus reuniens selectively impairs encoding during spatial working memory, *Neurobiol. Learn Mem.* 155 (2018) 78–85, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.06.010>.
- [24] W.B. Hoover, R.P. Vertes, Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study, *Brain Struct. Funct.* 217 (2) (2012) 191–209, <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0345-6>.
- [25] C. Varela, S. Kumar, J.Y. Yang, M.A. Wilson, Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens, *Brain Struct. Funct.* 219 (3) (2014) 911–929, <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0543-5>.
- [26] R.D. Kirch, P.T. Meyer, S. Geisler, F. Braun, S. Gehrig, K.J. Langen, S. von Hörsten, G. Nikkha, J.-C. Cassel, M.D. Döbrössy, Early deficits in declarative and procedural memory dependent behavioral function in a transgenic rat model of Huntington's disease, *Behav. Brain Res.* 239 (2013) 15–26, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.048>.
- [27] R.D. Kirch, R.C. Pinnell, U.G. Hofmann, J.-C. Cassel, The Double-H Maze: A Robust Behavioral Test for Learning and Memory in Rodents, *J. Vis. Exp.* (2015), e52667, <https://doi.org/10.3791/52667>.
- [28] S. Pol-Bodetto, H. Jeltsch-David, L. Lecourtier, N. Rusnac, C. Mam-Lam-Fook, B. Cosquer, K. Geiger, J.-C. Cassel, The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training, *Behav. Brain Res.* 218 (2011) 138–151, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.043>.
- [29] J.-M. Edeline, B. Hars, E. Hennevin, N. Cotillon, Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications, *Neurobiol. Learn Mem.* 78 (1) (2002) 100–124, <https://doi.org/10.1006/nlme.2001.4035>.
- [30] E. van Duuren, G. van der Plasse, R. van der Blom, R.N. Joosten, A.B. Mulder, C. M. Pennartz, M.G. Feenstra, Pharmacological manipulation of neuronal ensemble activity by reverse microdialysis in freely moving rats: a comparative study of the effects of tetrodotoxin, lidocaine, and muscimol, *J. Pharm. Exp. Ther.* 323 (1) (2007) 61–69, <https://doi.org/10.1124/jpet.107.124784>.
- [31] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edition, Academic Press, San Diego, 2007.
- [32] J. Lopez, K. Herbeaux, B. Cosquer, M. Engeln, C. Muller, C. Lazarus, C. Kelche, B. Bontempi, J.-C. Cassel, A. Pereira, de Vasconcelos, Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval, *Hippocampus* 22 (4) (2012) 827–841, <https://doi.org/10.1002/hipo.20943>.
- [33] M. Loureiro, T. Cholvin, J. Lopez, N. Merienne, A. Latreche, B. Cosquer, K. Geiger, C. Kelche, J.-C. Cassel, A. Pereira de Vasconcelos, The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats, *J. Neurosci.* 32 (29) (2012) 9947–9959, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0410-12.2012>.
- [34] E. Quet, M. Majchrzak, B. Cosquer, T. Morvan, M. Wolff, J.-C. Cassel, A. Pereira de Vasconcelos, A. Stéphan, The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats, *Brain Struct. Funct.* 2020 225 (3) (2020) 955–968, <https://doi.org/10.1007/s00429-020-02048-z>.
- [35] M. Pezze, S. McGarrity, R. Mason, K.C. Fone, T. Bast, Too little and too much: hypoactivation and disinhibition of medial prefrontal cortex cause attentional deficits, *J. Neurosci.* 34 (23) (2014) 7931–7946, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3450-13.2014>.
- [36] J.-C. Cassel, M. Ferraris, P.P. Quilichini, T. Cholvin, L. Boch, A. Stephan, A. Pereira de Vasconcelos, The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: A crossroads for cognition-relevant information processing, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 126 (2021) 338–360, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.023>.
- [37] F.G. Davoodi, F. Motamedi, N. Naghdi, E. Akbari, Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on spatial learning and memory in rats using Morris water maze task, *Behav. Brain Res.* 198 (1) (2009) 130–135, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.037>.
- [38] J.R. Hembrook, K.D. Onos, R.G. Mair, Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat, *Hippocampus* 22 (4) (2012) 853–860, <https://doi.org/10.1002/hipo.20945>.
- [39] F. Rahman, R. Nanu, N.A. Schneider, D. Katz, J. Lisman, Optogenetic perturbation of projections from thalamic nucleus reuniens to hippocampus disrupts spatial working memory retrieval more than encoding, *Neurobiol. Learn Mem.* (179) (2021), <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107396>.
- [40] J.E. Futter, J.P. Aggleton, How rats perform spatial working memory tasks: limitations in the use of egocentric and idiothetic working memory, *Q. J. Exp. Psychol. (Hove)* 59 (1) (2006) 77–99, <https://doi.org/10.1080/02724990544000068>.

- [41] C. Hölscher, W. Jacob, H.A. Mallot, Learned association of allocentric and egocentric information in the hippocampus, *Exp. Brain Res* 158 (2) (2004) 233–240, <https://doi.org/10.1007/s00221-004-1896-z>.
- [42] W.A. Roberts, P.J. Kraemer, Some observations of the effects of intertrial interval and delay on delayed matching to sample in pigeons, *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process* 8 (4) (1982) 342–353.
- [43] K.G. Guise, M.L. Shapiro, Medial Prefrontal Cortex Reduces Memory Interference by Modifying Hippocampal Encoding, *e8, Neuron* 94 (1) (2017) 183–192, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.011>.
- [44] S. Granon, C. Vidal, C. Thinus-Blanc, J.P. Changeux, B. Poucet, Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions, *Behav. Neurosci.* 108 (5) (1994) 883–891, <https://doi.org/10.1037//0735-7044.108.5.883>.
- [45] P.A. Dudchenko, J.P. Gooridge, D.A. Seiterle, J.S. Taube, Effects of repeated disorientation on the acquisition of spatial tasks in rats: dissociation between the appetitive radial maze and aversive water maze, *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process* 23 (2) (1997) 194–210, <https://doi.org/10.1037//0097-7403.23.2.194>.
- [46] H. Jeltsch, F. Bertrand, R. Galani, C. Lazarus, S. Schimchowitsch, J.-C. Cassel, Intraseptal injection of the 5-HT1A/5-HT7 agonist 8-OH-DPAT and working memory in rats, *Psychopharmacol. (Berl.)* 175 (1) (2004) 37–46, <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1783-0>.

IV. Discussion générale

Dans nos conditions, l'inhibition des ReRh avec le muscimol n'a eu aucun effet significatif sur les performances des rats entre le premier et le deuxième essai, quel que soit le moment où l'agent pharmacologique a été infusé. Concernant l'encodage d'une information spatiale, l'approche pharmacogénétique par DREADD a conforté cette conclusion.

Ces résultats d'inactivations pharmacologiques apparaissent contradictoires avec la littérature publiée jusqu'alors. De même, ils ne concordent pas avec nos résultats montrant une corrélation entre l'activité du Re et les performances lors de l'essai test à 6h ([Morvan et al., 2022](#)). Dans notre étude d'inactivation, les noyaux ReRh ne contribuent pas aux performances en MTS et ne sont pas nécessaires au codage de l'information spatiale.

Les différents points de discussion détaillés dans l'article ([Boch al., et 2023](#)) apportent plusieurs éléments de réponse/réflexion concernant la discordance entre nos résultats et ceux de la littérature. J'en développerai quelques-uns ci-après, en me référant au tableau comparatif des différentes études ayant inactivé de manière réversible les noyaux ReRh.

Auteur	Année	Espèce	Tâche	Charge spatiale	ITI	Inter-Session délai (interférence pro-actives)	Motivation	Méthode d'inhibition	Moment d'inhibition	Résultats
Davoodi	2009	Rats Wistar	Piscine de Morris	++	75 minutes	NA	aversive (sorti de l'eau)	TTX (tétracaine hydrochloride), bloque les canaux sodium voltage dépendants	pendant encodage	Baisse de performances par rapport au rats contrôlés
Hembrook	2012	Rats Long-evans	2 tâches : - delayed Non-match to position - varying choice radial maze delayed non matching	-- +	- 0 sec - 5 sec - 25 sec	NA	appétitive (eau)	Muscimol 0,5 µL trois doses : - 0,4 nmol - 1 nmol - 2,5 nmol	toute la tâche	DNMTP : baisse performance à toutes les doses VC-DNM : baisse performance uniquement à la dose la plus importante
Hallock	2013	Rats Long-evans	2 tâches : - dépendant tactile-visual conditional discrimination task - conditional discrimination	—	? Le temps de parcourir le T-maze (très très court)	20 sec	appétitive (pastilles chocolatées)	Muscimol 0,5 µL trois doses : - 0,5 µg/µL - 0,25 µg/µL - 0,125 µg/µL	toute la tâche	CDWM : baisse performance à toutes les doses CD : pas de baisse de performance
Duan	2015	Rats Long-evans	delayed alternation T-maze	—	15 sec	2 min	appétitive (croquettes de nourriture)	Optogénétique : AAV5-CamKIIa-hCHR2 (H134R)-EYFP exprimé dans le RE, stimulation à la fréquence delta (3Hz) des terminaisons dans CA1 de l'HP	toute la tâche	Baisse des performances
Layfield	2015	Rats Long-evans	T-maze (en bois opaque)	—	- 0 sec - 5 sec - 30 sec	NA	appétitive (pastilles chocolatées)	Muscimol 0,5 µL trois doses : - 62 ng, soit 0,125 µg/µL - 125 ng, soit 0,25 µg/µL - 250 ng, soit 0,5 µg/µL	toute la tâche	DA 5 sec : baisse des performances uniquement avec 250ng DA 30 sec : baisse des performances en dose réponse
Hallock	2016	Rats Long-evans	2 tâches : - delayed alternation T-maze (en bois opaque) - conditional discrimination	—	30 sec	NA	appétitive (nourriture, non détaillée)	Muscimol 0,5 µL, 0,25µg/µL	toute la tâche	- baisse des performances en DA - baisse de la fréquence de décharge des neurones du CPFm - baisse de la cohérence theta entre le CPFm et l'HP au moment du choix - baisse de la cohérence theta gamma
Maïsson	2018	Rats Long-evans	2 tâches : - delayed alternation T-maze (en bois opaque) DNMP	—	20 sec	NA	appétitive (croquette de nourriture)	Optogénétique : AAV5-CAG-Arch-tetTomato exprimé dans le RE, stimulation à la fréquence delta (3Hz) des terminaisons dans CA1 de l'HP	- toute la tâche - encodage - maintient - choix (rappel)	Baisse des performances quand Re inhibé pendant toute la tâche, ou juste pendant l'encodage
Viena	2018	Rats Long-evans	T-maze en bois DNMS (forced alternation)	—	- 30 sec - 60 sec - 120 sec	10 - 15 sec	appétitive (pastilles chocolatées)	Muscimol 0,5 µL 2 doses : - 0,5 µg/µL - 0,25 µg/µL Ou Procaine hydrochloride à 20%	toute la tâche	Muscimol : Baisse des performances à toutes les doses et tous les délais + erreurs persévératives Procaine : Baisse des performances uniquement à 120 sec
Rahman	2021	Souris C57 BL/ 6J	Y-maze	—	10 sec	40 sec	appétitive (eau)	Optogénétique : AAV5-CamKIIa-hCHR2 (H134R)-EYFP exprimé dans le RE, stimulation à la fréquence delta (3Hz) des terminaisons dans CA1 de l'HP	- toute la tâche - encodage - délai + choix = rappel	Baisse des performances uniquement lors de l'inhibition pendant le rappel (RQ : grande variabilité dans les données)

Tableau 1 : Résumé des études d'inactivation des ReRh dans des tâches de MTS.

A. Choix de la méthodologie : le muscimol

1. Dose utilisée et spécificité neuroanatomique

Les doses de muscimol utilisées dans notre étude (0,10 et 0,26 nmol) sont relativement faibles, comparativement à ce qui est utilisé dans la littérature (*voir tableau 1*). Plus la concentration est importante, plus les risques de diffusion dans le tissu sont importantes, ce qui peut, à des doses élevées, questionner la spécificité d'action dans de petites régions, particulièrement les noyaux ReRh (Edeline et al., 2002; Hembrook et al., 2012). Bien que faibles, les doses que nous avons utilisées se sont déjà avérées efficaces /suffisantes pour empêcher la mise en place d'un comportement de changement de stratégie dans une tâche d'évaluation de la flexibilité comportementale (Cholvin et al., 2013; Quet et al 2020).

2. Avantages et inconvénients, quelles alternatives ?

Contrairement à d'autres outils pharmacologiques fréquemment utilisés pour réaliser des inactivations réversibles (telles que la tétradotoxine ou la lidocaïne), le muscimol induit une profonde inactivation des neurones sans modifier l'excitabilité des fibres passantes. Son mécanisme d'action repose sur sa nature, il s'agit d'un agoniste des récepteurs GABA A (ionotropes). Il possède une forte affinité pour les récepteur GABA A et n'est pas facilement déplacé par le GABA endogène (Krogsgaard-Larsen and Johnston, 1978; Enna and Gallagher, 1983)

Une fois le muscimol lié à son récepteur, le canal va s'ouvrir et laisser entrer les ions chlorures dans la cellule, induisant ainsi une hyperpolarisation rapide de la cellule, et finalement l'inhibition de l'excitabilité neuronale. Il a été montré chez le chat que sa durée d'action pouvait être de plusieurs heures, dépendamment de la dose administrée, mais Arikan et ses collègues ont montré chez le rat, grâce à une combinaison d'électrophysiologie et de microscopie, que son action pouvait couvrir jusqu'à 5h30 lorsqu'injecté dans le cervelet (Martin and Ghez, 1999; Arikan et al., 2002). C'est ce qui nous a conduits à choisir le délai inter-essai de 6h, puisque nous voulions pouvoir étudier de façon différentielle l'implication des ReRh dans chacun des processus, soit l'encodage, le maintien et l'engagement ou rappel de l'information.

Toutefois, d'autres méthodes d'inactivation réversibles auraient pu être envisagées. Les méthodes basées sur l'ingénierie génétique, tel que le DREADD, ou l'optogénétique, permettent un ciblage plus précis d'un point de vue temporel, mais aussi anatomique, notamment grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques. Néanmoins, notre tâche comportementale étant aquatique, l'approche optogénétique semblait inenvisageable au moment où nous l'avons réalisé. Or récemment, des dispositifs intracérébraux sans fils fonctionnant via *bluetooth* ont été utilisés dans des labyrinthes aquatiques (Masachs et al., 2021; Yang et al., 2021; Surdin et al., 2022). Ces avancées technologiques permettraient d'envisager une nouvelle étude où l'inactivation des ReRh pourrait se faire dans le DH, mais avec un délai inter-essai plus court, afin de se rapprocher davantage des délais utilisés dans la littérature, tout en tirant partie de la configuration spatiale du DH, plus complexe que les labyrinthes classiquement utilisés en T ou Y.

B. Mémoire de travail, mémoire à court terme ? Qu'avons-nous réellement testé dans notre protocole ?

1. Délai inter-essai

Compte tenu de la durée de notre délai inter-essai (ITI pour inter-trial interval), nous ne pouvons exclure que notre protocole ait davantage fait appel au registre de la mémoire à long terme (MLT) plutôt qu'à celui de la mémoire de travail, qui est considérée comme une mémoire à court terme. Cette possibilité est compatible avec l'activation de l'HIP, notamment dans CA1, et l'absence d'activation significative dans le CPFm (Figure 4 Morvan et al., 2022), région fortement impliquée dans la mémoire de travail (Funahashi and Kubota, 1994; Miller and Cohen, 2001; Churchwell and Kesner, 2011; Bratch et al., 2016).

2. Interférences proactives

L'utilisation d'un tel ITI modifie également la tendance aux interférences proactives. Les interférences proactives se définissent par le fait que des souvenirs anciens perturbent l'acquisition de nouvelles informations (pour revue (Anderson and Neely, 1996)). Ces interférences sont d'autant plus marquées que l'ITI est court et que le nombre de sessions augmente, puisque la confusion du contexte de l'essai en cours augmente (Roberts and Kraemer, 1982). Certains auteurs ont décrit l'implication du CPFm dans cette gestion des interférences proactives, et dans les processus attentionnels et de monitoring associés,

nécessaire à la planification d'action / comportement à venir (Gisquet-Verrier and Delatour, 2006). Dans notre tâche, la durée de l'ITI et la réalisation d'une seule session par jour réduirait drastiquement le risque d'interférence proactive, ce qui expliquerait le non-engagement du CPFm.

3. Quelle mémoire engagée chez nos animaux ?

Au fur et à mesure des jours d'apprentissage avec 6h de délai, nous avons cherché à vérifier la présence d'interférences proactives, et surtout le temps que les rats gardaient en mémoire la position de la plateforme (PF). Nous avons alors regardé, lors de l'essai d'échantillonnage, le nombre de rats qui se rendaient directement dans le bras qui contenait la plateforme la veille (PF à J-1). Une possible interprétation de ce comportement pourrait être que les rats maintiendraient en MLT la position de la PF de la veille, et la réutiliseraient le lendemain. Les résultats de la figure 23 représentent ce comportement, selon les groupes, et durant les 6 derniers jours du protocole, où l'ITI était de 6h.

On constate une augmentation de la tendance à visiter le bras où se trouvait la PF à J-1, jusqu'à une chute au 6^{ème} jour. Faut-il 6 jours pour apprendre la règle indiquant que la PF change bien de position chaque jour ? Les animaux, bien que surentraînés, avaient intégré le principe de la tâche, puisqu'ils performaient efficacement pendant la période d'augmentation du délai (J9 à J17)

Il est toutefois important de rappeler que la motivation créée par l'eau fraîche dans ce dispositif est beaucoup plus importante qu'une motivation appétitive créée par de la nourriture. La recherche de la PF refuge, seule échappatoire, permet à l'animal de s'extraire de l'eau fraîche aversive. Elle peut donc apparaître comme une priorité (vitale). Le fait que les rats retournent directement à la dernière information qu'ils possèdent pour échapper à la situation (position de la PF la veille) reflète cette (très forte) motivation. De plus, il a été montré que les souvenirs d'une tâche à motivation aversive sont plus persistants que ceux d'une tâche à motivation appétitive. Cela peut trouver une explication dans le retrait de l'animal du dispositif. Si la motivation est aversive, le retrait est gratifiant. A l'inverse, si la motivation est appétitive, le retrait d'une situation récompensée par de la nourriture, chez des animaux privés de nourriture, constituerait un stimulus aversif (Bolhuis et al., 1985).

Il aurait pu être intéressant de regarder précisément les différentes entrées lors de l'essai d'échantillonnage et voir si elles correspondaient au PF des jours précédents J-2, J-3 .. Cela dans l'optique de vérifier la durée du maintien en mémoire de la position de la PF.

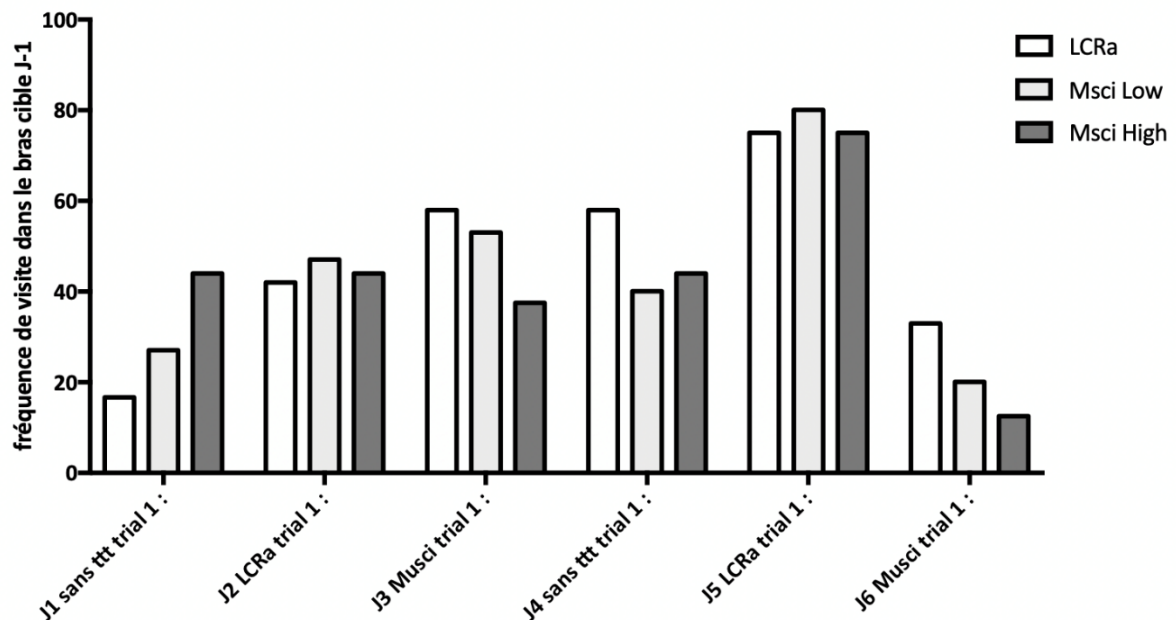


Figure 23 : Fréquence de la 1^{ère} visite du bras contenant la plateforme à J-1 lors du 1^{er} essai du lendemain

Fréquence de visite dans le bras cible à J-1, lors du premier essai du lendemain. LCRa : Groupe n'ayant reçu que du liquide céphalo-rachidien Msci Low : Faible dose de Muscimol, Msci High : Forte dose de Muscimol. LCRa n = 12 Msci Low n = 12 Msci High n = 14.

4. Interactions HIP-CPFm

Une question reste en suspens lorsque l'on s'intéresse à la MTS : dans quelle mesure la durée du délai détermine l'implication et la coopération du CPFm et de l'HIP ? Il est couramment décrit qu'avec l'augmentation des délais leurs interactions deviennent plus critiques pour les performances de animaux. C'est pourquoi, Lee et Kesner en 2003, se sont intéressés à la coopération de ces deux structures-clés dans une tâche de MTS au sein d'un labyrinthe radial. Combinant lésion et inactivation réversible avec du MSCI des deux structures de manière symétrique (HIP lésé, CPFm inactivé, et inversement), les deux auteurs ont cherché à comprendre l'implication de ces structures dans des tâches comprenant un délai court (10sec) ou légèrement plus longs (5min). Les résultats montrent qu'avec des délais courts, c'est l'inhibition des deux structures combinées qui perturbent la réalisation de la tâche. En

revanche, à un délai plus long (5min) seule l'inhibition de l'HIP impacte les performances des rats dans la tâche. Par conséquent, l'HIP et le mPFC traitent la MTS en parallèle lors de l'usage de délais courts, mais dès que le système nécessite de maintenir en mémoire l'information plus longtemps, le rôle de l'HIP devient essentiel, et le CPFm ne l'est plus (Lee and Kesner, 2003).

Dans notre tâche, il est fort probable qu'avec l'utilisation d'un délai long de 6h, l'HIP soit devenu l'acteur principal, et que le CPFm se soit désengagé, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus grâce à la quantification de c-Fos après l'essai test à 6h, montrant une absence d'activation dans le CPFm. L'HIP suffirait ainsi à réaliser la tâche, et en l'absence d'interaction entre l'HIP-CPFm, les ReRh ne seraient pas nécessaires.

L'ensemble des idées abordées ci-dessus tendent vers la conclusion que nous avons probablement testé une mémoire à long terme plutôt qu'une MTS. Dudchenko, dans son article de 2004, discute la difficulté de faire la distinction entre la MT et d'autres formes de mémoire chez le rongeur. Il propose que cette distinction se réfère simplement à la façon dont la mémoire est utilisée, plutôt qu'à sa nature. Par exemple, il est utile pour le rat d'oublier quels bras du labyrinthe il a visité la veille, ou pour nous d'oublier où nous avons garé notre voiture la semaine dernière (sauf si on dispose d'un parking ou garage réservé). C'est comme s'il fallait entraîner la MT à fonctionner pour une durée déterminée ; durée dépendante de la période de temps nécessaire à son utilisation (ex : le temps de faire ses courses) et de la saillance des stimuli à retenir (trouver la position de la PF pour s'extirper du DH = très saillant). **La mémoire de travail n'est peut-être pas réellement un type de mémoire, mais un type d'oubli (Dudchenko, 2004).**

C. La notion de charge spatiale : qu'est-ce qu'on entend par mémoire de travail spatiale ?

1. Accès aux indices allothétiques

Comme décrit dans l'article, l'une des grandes différences entre notre dispositif et ceux utilisés dans la littérature, repose sur la charge spatiale de la tâche. En effet, le DH est composé de parois transparentes qui permettent un accès visuel aux indices allothétiques présents dans la pièce, et alloue donc aux rats la capacité de se construire et d'utiliser une

représentation spatiale de leur environnement, au-delà du labyrinthe. Dans la plupart des études (voir tableau récapitulatif), les dispositifs sont constitués de bois, et sont donc opaques, laissant peu ou pas d'accès aux indices allothétiques, s'il y en a (rideau = pas d'indice). Cela pose une question sur la nature spatiale des tâches supposées évaluer la MTS.

2. Difficulté de la tâche

L'agencement de notre dispositif en DH est plus complexe que celui des labyrinthes en T ou en Y classiques. Les labyrinthes en T ou Y sont constitués de deux uniques bras de « réponse », les animaux ne disposant donc que d'une option « gauche-droite » dans l'exécution de leur choix, ce qui rend difficile l'interprétation du comportement de l'animal, dans la mesure où d'autres stratégies peuvent être utilisées, comme par exemple l'utilisation du positionnement du corps d'un essai à l'autre (Dudchenko, 2001; Futter and Aggleton, 2006). Le cas échéant, la dimension spatiale de la tâche serait fortement atténuée.

Finalement, peut être qu'un point majeur de confusion entre les articles évoqués ci-dessus incluant nos travaux joue sur le fait que la notion de "spatial" ne correspond pas à ce que l'on définit au laboratoire comme spatial. Dans la majorité des études, particulièrement celles utilisant un paradigme en T ou Y-maze, le caractère spatial de la tâche fait référence à la mobilité dans le labyrinthe et l'utilisation d'une stratégie de navigation qui pourrait être à dominante égocentrique. Dans notre paradigme, nous faisons référence à l'utilisation de la stratégie allocentrique, qui fait appel à l'utilisation des indices allothétiques au sein de la pièce. C'est peut-être même ce dernier point qui explique le fait que la performance dans le DH soit davantage dépendante de l'activité de l'HIP que de celle du CPFm, ce qui expliquerait que les ReRh soient peu ou pas impliqués dans notre étude.

V. Conclusion et perspectives

Enfin, tous les autres points discutés dans l'article, tel que le surentraînement, la notion d'interférences pro-actives liées à la longueur de l'ITI (souvent très courtes, voir tableau 1), ou encore la charge spatiale probablement surestimée dans la littérature, convergent pour expliquer les résultats que nous avons pu obtenir, en distinction avec l'ensemble des travaux publiés jusqu'alors.

En perspective de ces travaux, et grâce au développement de nouvelles techniques, comme celles abordées plus haut, il serait intéressant de regarder l'impact d'une inactivation optogénétique ciblée des ReRh dans notre tâche du DH, afin de caractériser leur implication à des délais plus courts. Il serait important de comprendre s'ils sont davantage nécessaires lors de tâches utilisant de courts délais de maintien de l'information (secondes à minutes), avec de forts risques d'interférences proactives (i.e. de confusion entre l'essai d'échantillonnage et l'essai test, d'autant plus important à mesure des sessions), et moins dans d'autres tâches de MTS avec des délais plus longs.

-PARTIE 2 : L'implication des ReRh dans la consolidation d'un souvenir spatial-

-Matériels et méthodes-

I. Animaux et considérations éthiques

Toutes les expériences ont été réalisées sur des rats mâles de souche Long- Evans (provenant du centre d'élevage R. Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). Ils étaient âgés de 7 semaines et pesaient environ 200g à leur arrivée au laboratoire. Cette souche de rats est souvent utilisée dans des tâches de mémoire spatiale, notamment en raison de leurs bonnes capacités visuelles et cognitives (Paul et al.,



Figure 24. Photographie de rats mâles de souche Long Evans âgés de 7 semaines

2009). Dès leur arrivée, ils sont hébergés par trois, afin de respecter le caractère grégaire de l'espèce, dans des cages en Makrolon (dimensions : 60x38x19,5cm, REF : 1354 Tecniplast). Ils ont accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture (régime standard, REF : 4RF21, Mucedola). Les pièces de stabulations sont cyclées sur une base de 12h de lumière pour 12 h d'obscurité par 24 h, avec allumage de la lumière à 7h en hiver et 8h en été. Les conditions de température ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) d'hygrométrie (30%) ainsi que le fond sonore (radio RFM pendant la période diurne) sont maintenues constantes. Après une semaine d'acclimatation, les rats sont manipulés la semaine suivante pendant 2 min, une fois par jour ouvrable, afin qu'ils s'habituent à l'expérimentateur, ainsi qu'à la manipulation. Pendant toute la durée de leur présence au laboratoire, une visite quotidienne est effectuée afin de vérifier leur bien-être. Leur poids est mesuré chaque semaine, comme l'un des indicateurs de bonne santé.

Les expériences ont été réalisées en accord avec les directives européennes (2010/63/EU) et nationales (décret n°3013-118, 1er février 2013, Département Français de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale) sur l'expérimentation animale. Les expériences ont été planifiées en privilégiant la règle des 3R (Remplacement, Raffinement et Réduction), et ont fait l'objet d'une saisine validée par le Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS, Saisine #13261-2018012918394046) et le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

L'établissement utilisateur d'animaux à des fins expérimentales (UMR 7364) porte le numéro d'agrément J-67-482-13 (date d'expiration : 27 octobre 2027).

II. Lésion conditionnelle de la voie cortico-thalamique par chirurgie stéréotaxique

A. Chirurgie stéréotaxique

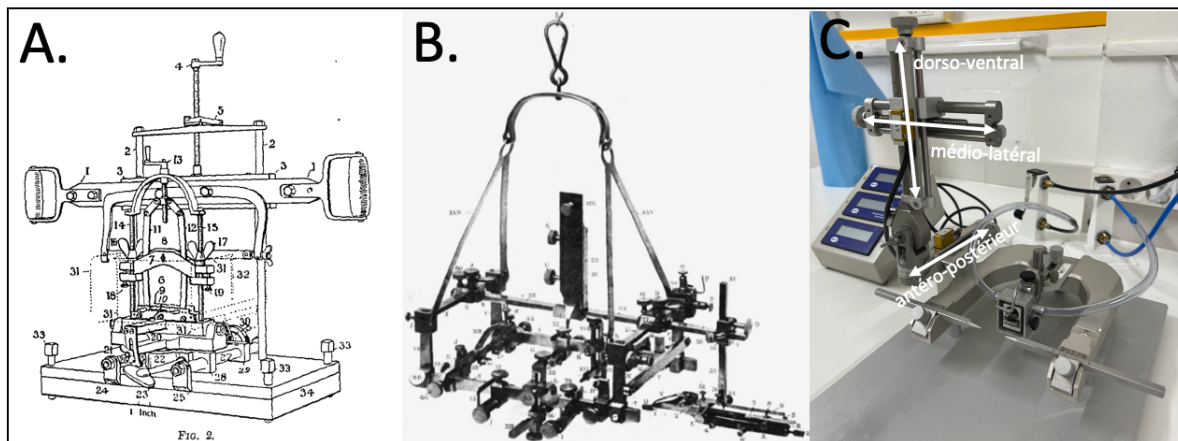


Figure 25. Cadres stéréotaxiques

A et B. Premiers plans dessinés par R. Clarke. C. Photographie du cadre stéréotaxique utilisé au laboratoire

La chirurgie stéréotaxique a été pensée par deux scientifiques britanniques, Robert Henry Clarke et Victor Horsley en 1906. Ils tentaient alors de mettre au point une méthode précise de lésion au sein du cervelet chez le singe (Horsley, n.d.). Le principe consiste à définir le crâne comme un référentiel fixe, et d'y appliquer un espace cartésien tridimensionnel. Le dispositif est constitué de 3 axes ; antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral, chacun d'entre eux possédant une échelle réglable au 10^e de millimètre. Le dispositif est ensuite fixé au crâne. Dans sa version initiale, il reposait sur les deux conduits auditifs externes, la racine du nez et les arcades orbitaires, et il était fixé latéralement au crâne osseux. Cette version n'a pas beaucoup évolué puisque l'on retrouve aujourd'hui, sur des appareils utilisés chez le rongeur, les barres d'oreilles, la barre de nez, auxquels on ajoute une pièce où reposent les incisives de l'animal. L'application de cette technique chez l'humain n'a eu lieu que 40 ans plus tard, par Ernest Spiegel et Henry Wycis, deux neurochirurgiens américains qui visaient à interrompre les voies thalamo-frontales chez des patients atteints de psychose, dans le but de « réduire leur réactivité émotionnelle ». (Gildenberg, 2001; Spiegel et al., 1947). Dans notre étude, nous

avons utilisé la chirurgie stéréotaxique afin d'injecter précisément différents AAVs dans le cortex préfrontal médian et les noyaux *reuniens* et rhomboïde du thalamus.

B. Lésion conditionnelle

La lésion spécifique d'une voie de projection permet d'accéder à une analyse plus fine sur le plan mécanistique, plutôt que la lésion d'une structure entière, car elle ouvre la possibilité de questionner les effets d'une altération d'une partie seulement de la circuiterie d'un réseau/système, tout en laissant le reste du système/de la structure intact(e).

Dans cette thèse la voie de projection du CPFm aux ReRh a été lésée grâce au système conditionnel Cre-Lox, en principe sans toucher aux fibres issues des ReRh et faisant synapse dans le CPFm. A l'exception d'éventuelles collatérales de la voie CPFm → ReRh, les autres connexions du système sont réputées intactes.

1. Le Système de Recombinaison Cre-LoxP

Ce système est basé sur l'utilisation de deux composants principaux qui lui donnent son nom : l'enzyme Cre, et les sites de recombinaisons loxP. Cre est une recombinase dérivée du bactériophage P1. Elle appartient à la famille des intégrases (Sternberg and Hamilton, 1981).

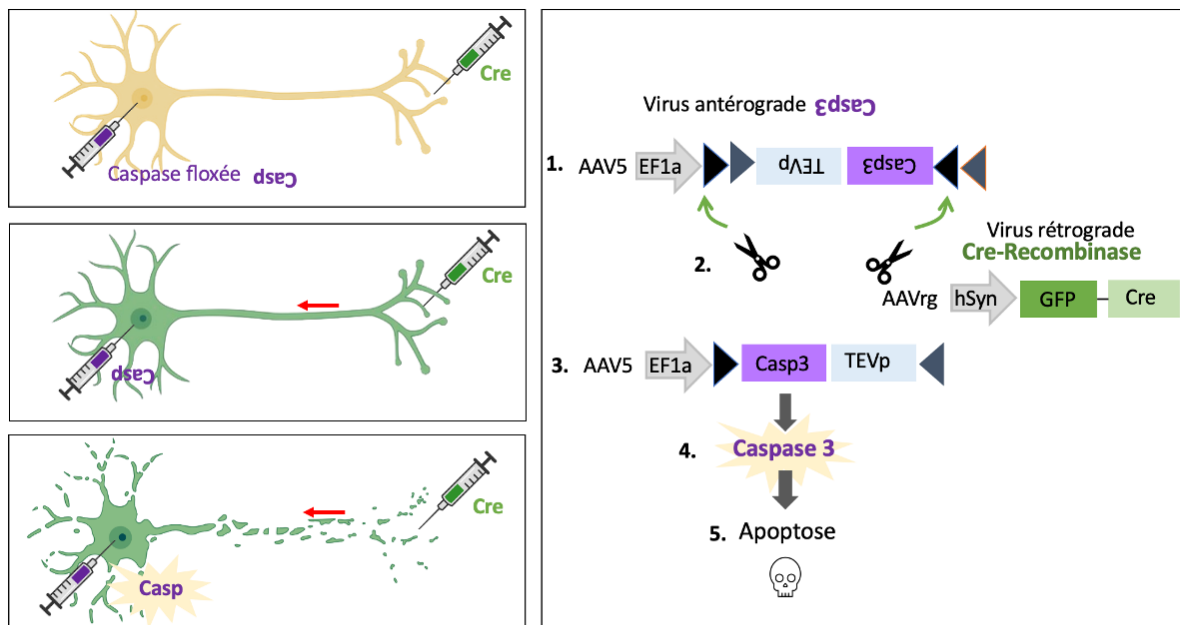


Figure 26. Fonctionnement du système d'inversion Cre-LoxP

1. La caspase est présente dans le virus, mais se trouve dans le sens opposé et ne peut être lue. 2. L'action de la Cre recombinase va agir au niveau des sites Lox P, et va conduire à l'inversion du gène de la caspase situé entre les deux sites Lox (3). Cette inversion va orienter la caspase dans le bon sens de lecture, permettre son activation (4) et induire l'apoptose (5).

Elle est capable de catalyser une recombinaison homologue entre les séquences d'ADN ciblées par les sites de recombinaison appelés loxP (locus of X-over of P1). Ces sites loxP sont de courtes séquences d'ADN, de 34 paires de bases (pb), composées de deux répétitions palindromiques de 13 pb et d'une séquence centrale de 8 pb (Nagy, 2000). C'est cette séquence centrale qui va donner une certaine direction à la séquence loxP. Si les deux sites loxP sont dans la même orientation sur l'ADN, la séquence floxée (séquence flanquée de deux sites loxP) sera excisée par l'action de la Cre-recombinase. Cependant, si les deux sites loxP sont dans une direction opposée, la séquence floxée sera inversée, ce qui la rendra compatible avec une transcription.

Dans ce projet de thèse, c'est cette dernière configuration qui a été mise à profit. L'utilisation du mécanisme d'inversion nous a permis d'induire sélectivement l'apoptose dans les neurones du CPFm projetant sur les ReRh. Pour déconnecter la voie de projection du CPFm aux ReRh, deux virus adénoassociés (AAV) ont été injectés par chirurgie stéréotaxique.

Le premier virus antérograde porte les gènes floxés de la caspase 3, ainsi que la protéase du virus de la gravure du tabac sous un promoteur du facteur d'élongation 1alpha (AAV2-Flex-taCasP3-TEVP, UNC Gene Therapy Center-Vector Core). Les gènes sont insérés entre les séquences loxP, dans le sens opposé au sens de lecture, ce qui empêche leur expression. Le second virus, rétrograde, est porteur du gène de la CRE-recombinase. Il est couplé à un fluorochrome eGFP (enhanced green fluorescent protein). Le tout est sous la dépendance du promoteur de la synapsine humaine hSyn. (AAVrg.hSyn.HI.eGFP-Cre.WPRE.SV40, Addgene, MA, USA). La caspase floxée est injectée dans le CPFm, et la Cre-recombinase est injectée au niveau des ReRh. La Cre va remonter des terminaisons des ReRh jusqu'aux corps cellulaires du CPFm, où elle va s'exprimer. Une fois exprimée dans les neurones du CPFm qui projettent sur le ReRh, la Cre va pouvoir reconnaître les sites LoxP autour du gène de la caspase, et par recombinaison homologue induire son expression. Dès lors, la caspase sera traduite. Elle pourra donc s'activer sous l'action de la protéase TEV afin d'entraîner une apoptose ciblée des neurones doublement infectés.

C. Protocole expérimental de la chirurgie

Les rats sont anesthésiés à l'aide d'isoflurane (IsofluVet[®], Dechra, anesthésiant, induction de l'anesthésie à 4% puis maintien de l'anesthésie au cours de la chirurgie à 1.5%), avant d'être rasés au niveau du crâne et placés dans le cadre stéréotaxique. Ils reçoivent alors une injection d'anesthésique local (mélange de Lurocaïne[®], Vétiquinol, 2 mg/kg et de Bupivacaïne, Mylan, 2 mg/kg) sous la peau du crâne et un anti-inflammatoire non stéroïdien (Métacam[®], Boehringer Ingelheim, 0.5 mg/kg) sous-cutané au niveau de la nuque. Les barres d'oreilles ont été préalablement recouvertes d'un anesthésique local (Anesderm Gé, Pierre Fabre, 5%), et un gel ophtalmique (Lubrithal[®], Dechra) est appliqué et renouvelé une fois à la moitié de la chirurgie pour éviter une irritation ou un dessèchement de la cornée.

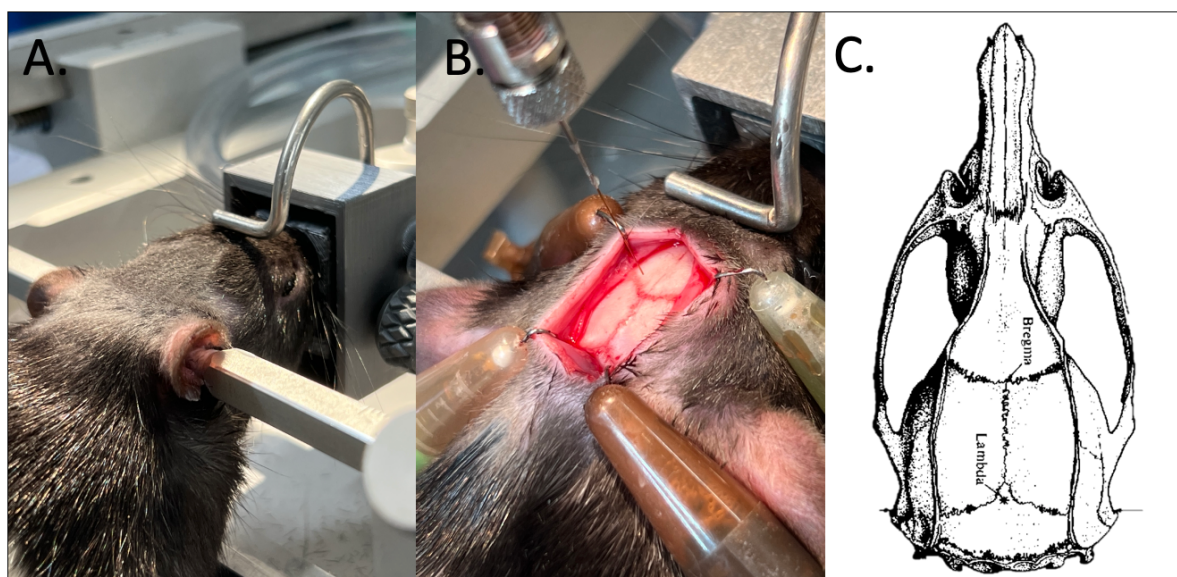


Figure 27. Repères anatomiques lors de la chirurgie stéréotaxique.

A. Photographie de la position du rat une fois installé dans le cadre stéréotaxique. B. Photographie des sutures du crâne, représentées schématiquement en C (Paxinos et al., 1985).

Pendant toute la durée de la chirurgie, les animaux sont placés sur un tapis chauffant afin de maintenir leur température corporelle. Après vérification de la profondeur de l'anesthésie, une petite incision du scalp est réalisée pour permettre la visualisation des sutures du crâne, et des écarteurs sont mis en place pour maintenir le champ opératoire accessible. Après avoir vérifié que le crâne de l'animal était parfaitement horizontal (position dite « flat-skull »), des petits trous (0,5mm diamètre) sont réalisés dans l'os du crâne, au niveau des futurs points d'instillation, avec une fraise dentaire. Ces trous permettront le passage de l'aiguille d'instillation (aiguille 31G, fibre de silice, Phymep, Paris) pour la descendre dans le parenchyme cérébral aux coordonnées voulues.

Les différentes coordonnées stéréotaxiques utilisées sont les suivantes (exprimées en mm) et ont été déterminées sur la base de l'atlas de Paxinos et Watson ([Paxinos Watson, 2014, 7^e édition](#)). L'atlas repose sur l'association entre les différentes sutures du crâne (voir figure 27 C), spécifiquement, le Bregma, et les différentes régions cérébrales :

Orientation par rapport au Bregma	ReRh (angle de 15°)	CPFm	PeriRe
AP	-1,8 et -2,3	+3	-2,6
ML	-1,9	-0,5 et +0,5	+0,6
DV	-7,1 et -7,2	-5, -3,8 et -2,2	-7,6

Tableau 2. Coordonnées d'injection en mm par rapport au Bregma

Les coordonnées du PeriRe ont été utilisées lors de la mise au point de l'approche de déconnexion virale, pour la voie - thalamo corticale, voir p.119

Avant et après chaque injection, on s'assure de la non-obstruction de l'aiguille, ce qui assure la bonne injection de la solution dans le parenchyme, en faisant perler le liquide à son extrémité. La perle est ensuite essuyée à l'aide d'un coton-tige. Pour chacune des injections, la descente de l'aiguille se fait lentement, après quoi une attente d'une minute permet au tissu d'absorber/de récupérer de la pression mécanique induite par la descente. L'injection est alors réalisée à une vitesse de 0,15uL/min. Une fois l'injection terminée, nous attendons 5 minutes supplémentaires pour permettre une bonne diffusion du liquide dans le parenchyme, et éviter les effets de remontée de la solution lors du retrait de la seringue.

A la fin de l'opération, la peau du crâne est recousue avec des points séparés « Donati », et les animaux sont placés sous une lampe chauffante et surveillés jusqu'à ce qu'ils soient totalement réveillés. Les animaux sont ensuite remis par trois dans leur cage de stabulation, et observés quotidiennement afin de pallier d'éventuels problèmes (points de sutures défaits, infections ...). Un délai de quatre semaines permettra l'expression optimale des AAV, mais aussi une bonne récupération post-chirurgicale des animaux avant le début des tests comportementaux.

D. Groupes expérimentaux

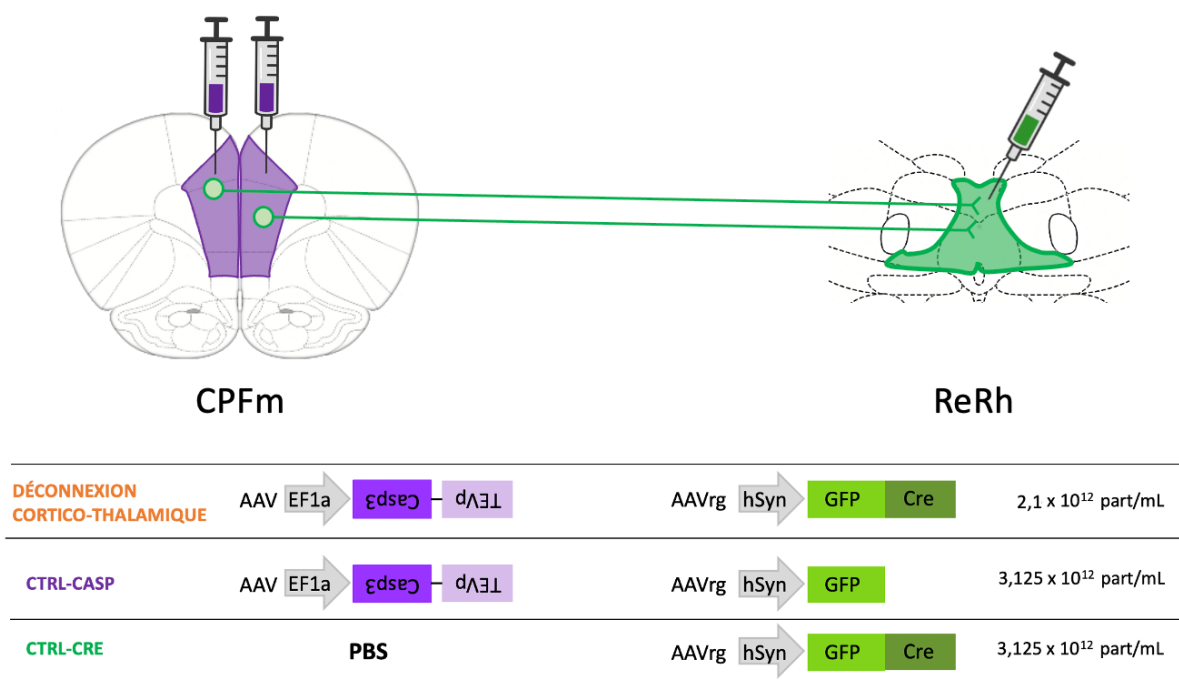


Figure 28. Groupes expérimentaux.

Représentation schématique des injections dans le CPFm et les ReRh. Dans le groupe DECO-CT, les neurones verts ne seront plus visualisables puisqu'ils vont mourir par apoptose, grâce à l'action de la caspase (AAV-Flex-ta-CasP3-TEVP). Dans le groupe CTRL-CASP, les neurones verts exprimeront la GFP de l'AAV-GFP (AAV.hSyn.eGFP), et le groupe CTRL-CRE exprimeront la Cre-GFP de l'AAV-Cre-GFP (AAVrg.hSyn.HI.eGFP-Cre.WPRE.SV40).

Trois groupes d'animaux sont formés, le premier groupe expérimental déconnexion cortico-thalamique (**DECO-CT**) a reçu la caspase (AAV-Flex-taCasP3-TEVP) dans le CPFm et la Cre-recombinase (AAVrg.hSyn.HI.eGFP-Cre.WPRE.SV40) dans les ReRh afin de déconnecter la voie du CPF au ReRh. Deux groupes contrôles ont ensuite été constitués afin de vérifier d'éventuels effets de la transfection virale, et d'un effet potentiel de l'un ou l'autre virus. Le premier groupe contrôle **CTRL-CRE** a reçu l'injection de Cre-recombinase dans les ReRh, et du PBS dans le CPFm. Le second groupe contrôle **CTRL-CASP**, a reçu la caspase dans le CPFm, et un AAV contrôle rétrograde dans les ReRh, porteur de la GFP seule, sans Cre-recombinase (AAV.hSyn.eGFP). Ces deux groupes contrôles permettront de valider ou non la déconnexion de notre groupe DECO-CT, en comparant le nombre de neurones rétromarqués GFP+ dans le CPFm. Dans les groupes CTRL-CRE et DECO-CT les neurones GFP+ exprimeront l'AAV-Cre-GFP, tandis que dans le groupe CTRL-CASP les neurones rétromarqués GFP+ exprimeront l'AAV-GFP.

Une remarque importante réside sur la localisation de la GFP au sein des cellules. En effet, dans la construction de l'AAV-Cre-GFP, la Cre et la GFP sont fusionnées, ce qui entraîne une localisation nucléaire de la GFP. Au contraire, l'AAV-GFP induit l'expression cytoplasmique de GFP dans les neurones infectés (Voir partie Résultats, p 126)

III. Études comportementales

Tous les tests comportementaux (à l'exception de l'actimétrie) ont été réalisés entre 8 et 14h, afin de limiter un impact éventuel des fluctuations nycthémerales sur les performances des animaux. L'ordre de passage a été contrebalancé au sein des groupes expérimentaux, et maintenu constant d'un jour à l'autre, afin que chaque rat ait une heure de passage fixe, mais que les éventuelles fluctuations nycthémerales entre les groupes expérimentaux soient équilibrées.

A. Actimétrie

1. Principe

Ce test a pour but d'évaluer l'activité locomotrice des animaux sur une longue période. A l'origine, ce test était réalisé dans les cages de stabulation des animaux, et donc dans un environnement familier ; or depuis plusieurs années, les rats du laboratoire sont stabulés par 3, ce qui nous oblige à les séparer pour la durée de ce test. Il en découle une certaine fluctuation des résultats actuels par rapport à ceux réalisés jadis, sans que pour autant le système n'empêche la mise en évidence d'une hyper- ou d'une hypoactivité.

Pour mesurer l'activité locomotrice, les rats sont placés individuellement dans de nouvelles cages propres. Nous mesurons ainsi l'activité locomotrice spontanée des animaux dans le sens longitudinal (i.e., d'un bout à l'autre de la cage).

2. Dispositif

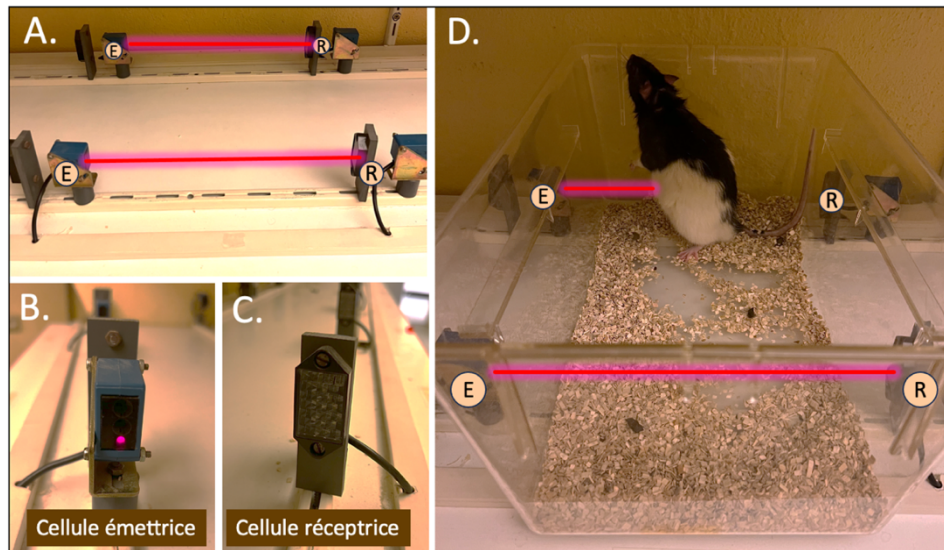


Figure 29. Mesure de l'activité locomotrice.

A. Configuration de deux paires de cellules d'actographie. B. Cellule émettrice et réceptrice C. Principe de fonctionnement de l'enregistrement de l'activité locomotrice en D.

Les cages (Makrolon, 42cm x 26cm x15 cm) sont positionnées sur des étagères équipées de cellules photoélectriques, qui émettent des faisceaux lumineux infrarouges, situés à chaque extrémité de la cage, et qui la traversent dans le sens de la largeur, à 4,5 cm au-dessus du sol et à 28 cm l'une de l'autre. Elles sont ciblées sur des réflecteurs. Cellules et réflecteurs sont placées à l'extérieur de la cage. Dès que le rat interrompt successivement les deux faisceaux, une traversée de cage est comptabilisée, quelle que soit la direction. Les données recueillies par un ordinateur le sont instantanément, mais elles sont sauvegardées à une fréquence que nous avons fixée à 5 minutes. Plusieurs périodes d'enregistrement sont prises en compte. Une phase dite d'habituation commence immédiatement après l'introduction des rats dans la salle de test ; elle dure trois heures. Cette phase est destinée à obtenir une mesure de l'activité locomotrice en réponse à l'introduction des rats dans un environnement nouveau (nouvelle cage, nouvelle pièce). On distingue ensuite l'activité locomotrice pendant les périodes diurnes et nocturnes. Les rats étant des animaux nocturnes, on attend une hausse de l'activité locomotrice pendant la période d'extinction des lumières artificielles. Sans ces lumières, la pièce est parfaitement obscure. Deux actimétries ont été réalisées, une avant et une après la chirurgie, afin de vérifier l'impact éventuel de nos injections virales sur l'activité locomotrice des rats.

B. Labyrinthe en croix surélevé

1. Principe

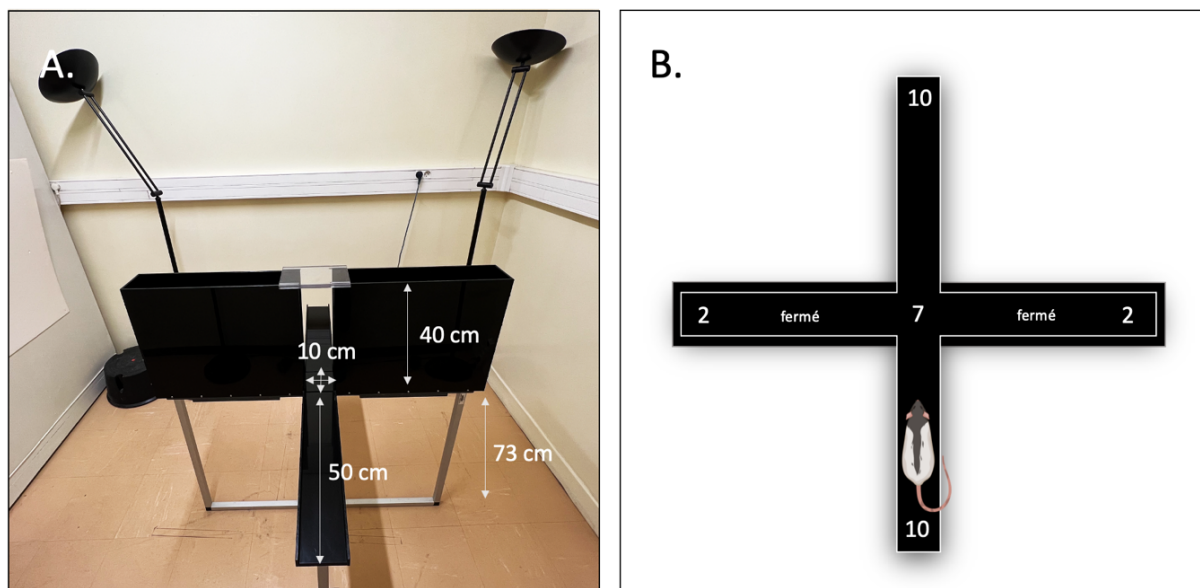


Figure 30. Labyrinthe en croix surélevé.

A. Photographie de la salle de test et sa configuration. Les dimensions ont été ajoutées en blanc. B. Labyrinthe vu d'au dessus de manière schématique. Les valeurs indiquées dans chaque bras correspondent à la luminosité mesurée en Lux.

Le labyrinthe en croix surélevé est utilisé pour évaluer le comportement de type anxieux chez les rongeurs (Pellow et al., 1985). Il crée un conflit entre deux motivations des rongeurs que sont l'envie d'explorer un nouvel environnement et la peur des espaces ouverts (où ils sont théoriquement visibles pour des prédateurs).

2. Dispositif

Le labyrinthe est composé de plexiglas noir, et comprend deux bras ouverts opposés (50 × 10 cm) et deux bras dits fermés car bordés par des parois d'une hauteur de 40 cm. Ces quatre bras convergent en angle droit au niveau d'une zone centrale carrée (10 × 10 cm), le tout formant une croix en vue aérienne, d'où son appellation. Pour éviter une éventuelle chute depuis un des bras ouverts, un léger bord surélevé (1,5cm) permet un certain degré de sécurisation à l'intention des rats. L'ensemble du labyrinthe surplombe le sol de 73 cm. Pour les tests, les rats ont été placés dans une cage de transport sans litière, et amenés dans la salle de test 5 min avant le début du test. Ils ont ensuite été déposés dans la partie centrale du labyrinthe face un bras fermé. L'expérimentateur est positionné à l'abri de la vue du rat, derrière un écran d'ordinateur, duquel il est possible de scorer le temps et le nombre d'entrée des rats dans les différents bras, puisqu'une caméra fixée au plafond permet de suivre en

direct le comportement de l'animal retransmis sur un écran. Le rat explore librement le labyrinthe pendant 5 min. A la fin du temps imparti, le rat est ramené à sa cage de stabulation, et le labyrinthe ainsi que la cage de transport sont nettoyés à l'alcool (70%), puis à l'eau, pour éliminer au mieux les odeurs avant le passage du prochain rat.

C. Piscine de Morris

1. Principe

La piscine de Morris est un labyrinthe aquatique. Le dispositif et les tâches de base ont été inventés par Richard Morris en 1981. La piscine de Morris permet de tester la mémoire spatiale des rats, c'est-à-dire la capacité qu'ils ont de se construire une représentation mentale de leur environnement et de l'utiliser à des fins de navigation ciblée.

2. Dispositif

La piscine de Morris est un dispositif circulaire en PVC blanc, d'un diamètre de 160 cm, et d'une hauteur de 60 cm, virtuellement découpé en quatre quadrants de surface égale (NO,

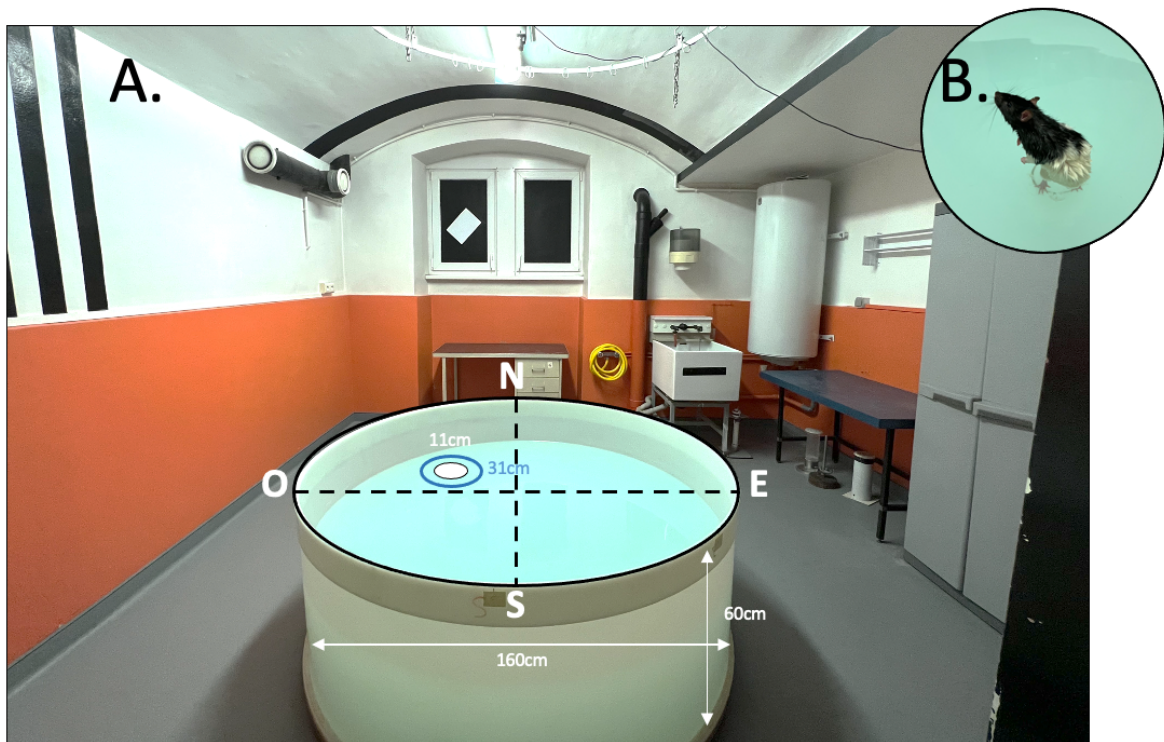


Figure 31. Photographie de la salle de test en Piscine de Morris.

A. Photographie de la salle de test et sa configuration. Les dimensions ont été ajoutées en blanc. B. Rat en train d'échantillonner une fois la plateforme trouvée.

NE, SO et SE). La piscine est remplie d'eau jusqu'à mi-hauteur (33 cm de hauteur, soit près de 660 litres). L'eau est opacifiée à l'aide de blanc de Meudon (185 g) afin que les animaux ne puissent plus distinguer la plateforme par transparence à partir de la surface de l'eau. L'eau

est fraîche ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) et constitue un milieu relativement aversif pour les rats, ce qui les motivera à vouloir s'en soustraire. Une plateforme (PF) immergée (11 cm de diamètre, 31 cm de hauteur, placée à 2 cm sous la surface de l'eau) constitue la seule échappatoire. Sa position fixe d'un jour à l'autre sera mémorisée par les rats en relation avec la configuration des différents indices spatiaux présents dans la pièce (formes contrastées au mur, évier... ; Figure 31). Une caméra est positionnée à la verticale au-dessus du centre de la piscine. Elle est reliée à un ordinateur utilisant le logiciel ANY-maze (Stoelting, Dublin, Ireland). Divers paramètres sont alors enregistrés ; la latence d'arrivée à la plateforme, la distance parcourue, la vitesse de déplacement et le temps passé dans les différentes zones, ce qui permet une analyse comportementale précise.

3. Protocole

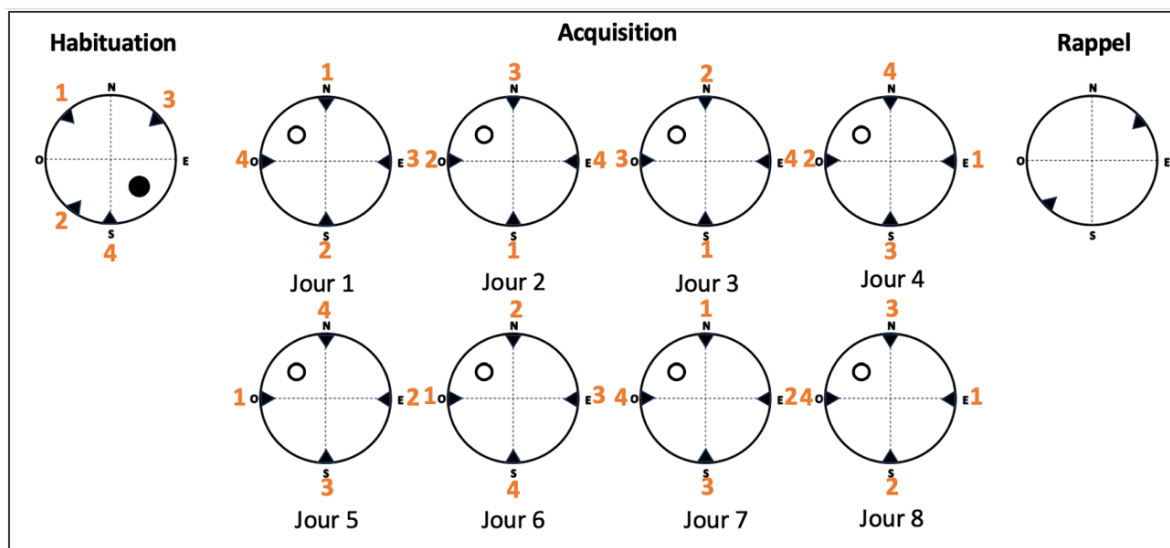


Figure 32. Protocole en piscine de Morris

A Habituation avec plateforme visible. **B.** Acquisition (8 jours) avec plateforme immergée et invisible. **C.** Test de rappel sans plateforme, 25 jours après l'acquisition, au cours duquel 2 points de lâcher différents sont utilisés.

Pour tester l'impact d'une déconnexion spécifique entre le CPFm et le ReRh sur la consolidation d'un souvenir spatial, le protocole de mémoire de référence en Piscine de Morris (Morris Water Maze ou MWM) a été utilisé (Figure 32). Il consiste en l'apprentissage de la position constante d'une PF, unique échappatoire, grâce à l'utilisation des indices spatiaux de la pièce. Il est pour cela nécessaire de conserver la disposition strictement identique de tous les éléments de la pièce d'un jour à l'autre.

Habituation : Cette phase a pour but de familiariser l'animal avec le dispositif et de lui apprendre qu'il existe une échappatoire dans le bassin. Pour cela, un disque noir opaque est disposé à la surface de la plateforme (placée dans le quadrant SE) pour la rendre visible. Cela permet aussi de vérifier l'absence de déficit visuel, motivationnel, sensori-moteur ou locomoteur, qui pourrait biaiser l'évaluation cognitive. De plus, pour empêcher l'accès aux indices spatiaux, un rideau est placé autour de la piscine. L'habituation consiste en une séance de 4 essais consécutifs, chaque essai étant d'une durée maximale de 60 sec. Les points de lâcher varient d'un essai à l'autre (NO, SO, NE, S). Les animaux sont toujours lâchés face à la paroi du dispositif. Si l'animal n'a pas trouvé la PF dans le temps imparti, il y est délicatement guidé par l'expérimentateur et laissé là pendant 15 sec avant de commencer l'essai suivant.

Acquisition : Lors de l'acquisition, les rats sont entraînés pendant 8 jours, durant 4 essais consécutifs par jour. Le disque noir présent sur la PF durant l'habituation est retiré, et la plateforme est immergée (2 cm sous la surface de l'eau opacifiée), ce qui la rend totalement invisible pour le rat. Elle est placée dans le quadrant NO, position qui ne changera pas tout au long de l'apprentissage. Les points de lâcher sont randomisés d'un essai à l'autre, mais aussi d'un jour à l'autre (N,S,E,O ; S,O,N,E ; ...). L'essai dure 60 sec au plus. Si l'animal trouve la PF avant, l'essai est stoppé automatiquement par le logiciel de vidéo-tracking.

Les variables mesurées durant l'acquisition sont la distance et la latence pour atteindre la PF, la vitesse de nage, ainsi que la thigmotaxis, c'est-à-dire le temps passé à nager à proximité des parois, qui traduit un comportement anxieux prenant le dessus sur l'appréhension cognitive de la tâche (Treit and Fundytus, 1988). En effet, ce dernier paramètre est souvent considéré comme un indice d'anxiété chez les rongeurs. En guise d'amélioration des performances, on s'attend à ce que ces paramètres (exceptée la vitesse de nage) diminuent au fur et à mesure de la progression des séances.

Test de rappel : Les tests de rappel permettent d'évaluer les capacités de mémoire à long terme de l'emplacement de la PF. Le protocole classiquement utilisé consiste à mesurer les performances de rappel au délai de 5 jours post-apprentissage pour évaluer la mémoire récente et à celui de 25 jours pour l'évaluation de la mémoire ancienne (Loureiro et al., 2012; Klein et al., 2019). Le test consiste en un essai unique de 60 sec durant lequel la PF est retirée de l'enceinte. Le lâcher du rat se fait dans le quadrant NE ou SO. Il est différent des points de

lâcher utilisés pendant l'acquisition. On mesure alors le temps que passe le rat dans chaque quadrant. Si le rat passe significativement plus de temps que le hasard (15s, 60s/4 quadrants) dans le quadrant où se trouvait la PF pendant l'acquisition (quadrant-cible), on considère que l'animal a mémorisé l'emplacement de la PF. Si ce temps ne diffère pas du hasard, on retiendra que l'animal n'est pas capable de rappeler la position de la PF. On mesure également la vitesse de nage, la thigmotaxis et le nombre de croisements de l'annulus. Il s'agit d'une zone comprenant la PF élargie d'un anneau de 10 cm (31 cm de diamètre, centrée sur la position exacte de la PF durant l'acquisition), qui sert d'indice de précision de la mémoire (Lopez et al., 2012).

IV. Histologie

A. Mise à mort

Les rats subissent une injection intra-péritonéale de Kétamine (Imalgène 1000, Merial, 200 mg/kg, anesthésiant) et de Xylazine (Rompun 2%, Bayer, 30 mg/kg, analgésique). Après perte de toute réaction à des stimulations nociceptives (pincement de la queue et de la patte), la cage thoracique est ouverte et les animaux sont soumis à une perfusion intracardiaque (débit 10mL/min) d'une solution de NaCl pendant 5 min, suivie, pendant 15 min, de paraformaldéhyde 4% (PAF) à 4°C afin de fixer les tissus. Pour cela, après la thoracotomie, l'aorte descendante est clampée afin de limiter la circulation des différentes solutions à la partie supérieure du corps de l'animal. Une fois perfusés, les animaux sont décapités, les cerveaux extraits de la boîte crânienne et post-fixés dans du PAF 4% pendant 2h. Ils sont ensuite laissés dans une solution de D-saccharose à 30% durant 48h à 4°C pour cryoprotection, puis sont congelés par immersion dans une solution d'isopentane à -40°C pendant 1 min et conservés à -80°C en attendant d'être coupés. Des coupes coronales d'une épaisseur de 40 µm sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm HM560, Thermo Scientific). Les structures d'intérêt sont le CPFm, les ReRh, ainsi que l'HIP dorsal et l'HIP ventral. Les coupes histologiques de ces structures sont récupérées en série dans des boîtes de 24 puits contenant une solution cryoprotectrice (solution tampon, éthylène glycol et glycérol). Ces coupes sont conservées dans cette solution à -20°C, d'où elles seront extraites au moment de réaliser des colorations.

B. Immunohistofluorescence

Une analyse histologique des tissus prélevés a systématiquement eu lieu, et ce dans les buts 1) de caractériser l'infection par l'AAV Cre-rétrograde au sein des ReRh, et 2) de quantifier la

proportion de la déconnexion en réalisant un comptage des neurones rétro-marqués dans le CPFm. La visualisation de l'infection virale peut s'observer directement au microscope. Cependant, un immunomarquage de la protéine NeuN a été réalisé afin de faciliter la visualisation et la délimitation des différentes structures cérébrales, et un immunomarquage anti-GFP a été ajouté sur les coupes du CPFm, permettant une amplification du signal dans les neurones rétro-marqués/de projection. La protéine NeuN (Neuronal Nuclei) est localisée dans les noyaux et le cytoplasme périnucléaire des neurones du système nerveux central des mammifères ([Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015](#)). Un anticorps anti-NeuN permet donc l'identification des neurones de manière spécifique.

1. Protocole

Une sélection de deux des huit puits comprenant des coupes issues des ReRh permet l'obtention d'environ 12 coupes, uniformément réparties sur toute l'étendue rostro-caudale de la structure d'intérêt. Elles sont réparties dans 3 puits de 300 µL chacun. Après trois rinçages de 10 min au PBS, les coupes sont mises en présence de sérum d'âne (tampon PBS à 5 % de sérum d'âne) pendant 1 h, et ce à température ambiante. Cette étape permet de bloquer les sites aspécifiques grâce aux nombreuses protéines présentes dans le sérum. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire pendant une nuit à température ambiante, sous agitation. Le lendemain, elles sont à nouveau rincées trois fois au PBS, et mises en présence de l'anticorps secondaire pendant 2h à température ambiante. Elles sont une dernière fois rincées trois fois au PBS, à raison de 10 min par rinçage, l'avant-dernier rinçage contenant du DAPI pour colorer les noyaux (1/2000). Les coupes sont alors montées sur lames gélatinées, rincées avec un peu d'eau ultra pure une fois sèches, avant d'être incluses entre lame et lamelle dans un milieu d'inclusion adéquat à l'immunofluorescence (Mowiol®, Sigma Aldrich).

C. Microscopie

L'ensemble des images ont été réalisées au microscope Axio Imager (Zeiss), un microscope à épifluorescence équipé d'un contrôle motorisé x-y-z. Les images ont été réalisées à l'aide du logiciel Zen (Zeiss). La même intensité lumineuse et le même temps d'exposition ont été utilisés pour toutes les coupes d'un même groupe. La mise au point a été réalisée sur le canal du fluorophore pour le marquage NeuN et les paramètres de prise d'images ont été déterminés en fonction du signal le plus fort, dans le but d'éviter toute surexposition.

D. Quantification

1. Quantification de l'aire d'infection virale avec le logiciel QuPath

Les coupes sont superposées aux planches neuroanatomiques correspondantes aux coordonnées antéropostérieures (AP) de la coupe, grâce à la détermination du niveau du bregma. Ainsi, il est possible de redessiner directement sur ordinateur l'entendue de l'infection virale dans notre région d'intérêt, cela en utilisant le logiciel Qpath. Ce logiciel va calculer la surface de la zone dessinée (μm^2) ce qui permet d'évaluer le pourcentage de la zone infectée, en effectuant le rapport entre l'aire infectée et l'aire totale. L'infection est caractérisée sur 6 coupes / rat, dont le nombre peut être considéré comme représentatif de l'ensemble de la structure. Nous avons choisi un critère relativement permissif, car les mêmes caractérisations d'infection se réalisent généralement sur 4 coupes. Une infection est considérée comme acceptable lorsque l'atteinte de la structure cible est supérieure à 20% et que celle des régions adjacentes est faible. Ces critères objectifs permettent d'exclure les animaux dont l'infection est insuffisante, ou mal localisée, sur le même principe que les lésions excitotoxiques réalisées dans une étude antérieure (Loureiro et al., 2012). Dans notre cas, il est particulièrement important d'être intransigeant sur l'infection des régions adjacentes, puisqu'elles peuvent potentiellement être la cible de projection du CPFm. Spécifiquement, plusieurs auteurs ont décrit d'intenses projections de la couche 6 du CPFm sur le noyau médiodorsal du thalamus (MD) (Gabbott et al., 2005; Anastasiades and Carter, 2021). Si l'infection de l'AAV Cre GFP empiétait en effet sur le MD, la voie de projection du CPFm au MD se verrait déconnectée, même si ça n'était qu'en partie, et nous perdrons toute spécificité.

2. Nombre de neurones/noyaux marqués avec le logiciel QuPath

Seuls les rats dont l'infection dans les ReRh est considérée comme acceptable sont conservés pour l'estimation quantitative de la déconnexion. Pour cela, une fois le signal GFP amplifié par immunohistofluorescence, nous procédons à un comptage semi-automatique des neurones rétro-marqués GFP+ dans le CPFm. Pour cela nous utilisons la fonction « Cell Detection » du logiciel Qpath.

Le but de ce comptage est de comparer les groupes CTRL-CRE et CTRL-CASP à notre groupe DECO-CT. La comparaison la plus pertinente sera celle avec le groupe CTRL-CRE, puisqu'il s'agit du même virus rétrograde injecté dans les ReRh. Dans le groupe CTRL-CASP, la GFP de l'AAV-GFP est cytoplasmique, et non nucléaire. Nous serons donc plus prudents quant à l'interprétation des résultats.

V. Statistiques

L'ensemble des données de cette thèse est représenté sous la forme de moyenne \pm erreur-type (ET). Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel Graphpad Prism 7. Sur l'ensemble des analyses, le seuil de significativité est placé à 0,05. Les test-t de Student (comparaison de 2 moyennes ou d'une moyenne à une valeur de référence) et ANOVA à 2 facteurs (à mesure répétée lorsque c'était approprié) ont été utilisés. Ces analyses de variance ont été complétées par des comparaisons multiples post-hoc de Newman-Keuls. Ce test est un bon compromis entre conservatisme et puissance. Dans le cas d'une distribution non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis, suivi du test de comparaisons multiples de Dunn ont été choisis.

-Résultats-

I. Mise au point de la déconnexion spécifique

A. Voie cortico-thalamique

Au commencement de ce travail de thèse, peu de littérature décrivait l'utilisation de l'approche Cre-Caspase pour induire une déconnexion spécifique entre deux régions cérébrales. Cette technique, mise au point par Yang et collaborateurs en 2013 n'avait alors que très peu été utilisée, et jamais dans les structures cibles de notre projet (Yang et al., 2013). Les seules études ayant utilisé cette technique jusqu'alors s'étaient focalisées sur les connexions entre le cerveau antérieur et l'hypothalamus, l'habenula et le tronc cérébral, ou encore le striatum et la partie dorsale du tronc cérébral (Laurent et al., 2017; Marciante et al., 2020; Ruediger and Scanziani, 2020).

La lésion spécifique de la voie du CPFm au ReRh est réalisée grâce à l'expression de la caspase sous la dépendance de la Cre-recombinase (Cre), rendue possible grâce à l'injection stéréotaxique de virus adénoassociés (AAV) (Morgan et al., 2014).

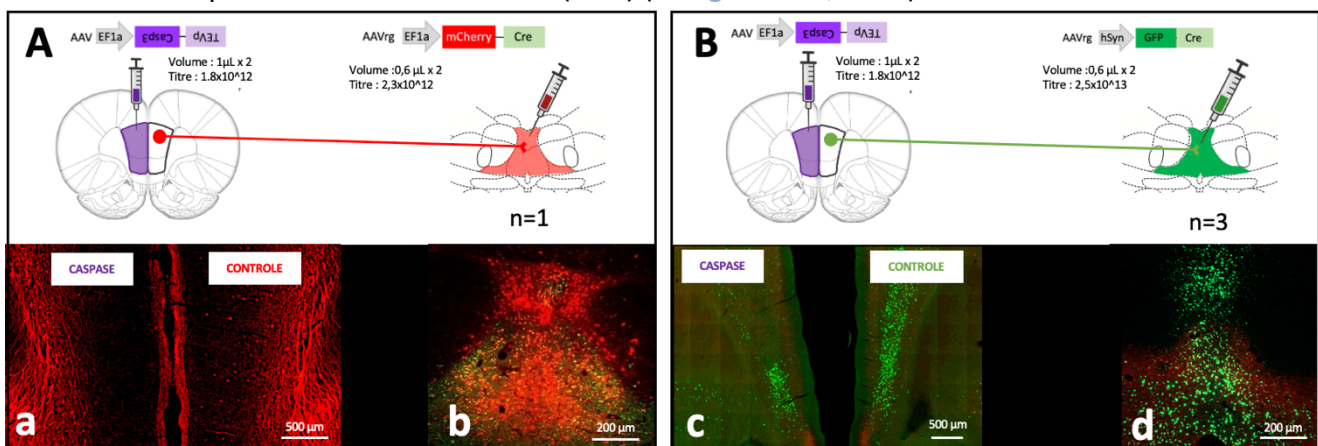


Figure 33. Mise au point de l'approche virale - Voie cortico-thalamique

La mise au point de la déconnexion s'est faite grâce à une injection unilatérale de caspase floxée dans le CPFm, dépendante de l'expression de la Cre. Deux vecteurs viraux porteurs de la Cre ont été testés ; l'AAV-Cre-mCherry en A. et l'AAV-Cre-GFP en B., tous deux injectés dans les ReRh. La procédure chirurgicale est illustrée dans les panels du haut. Dans les panels du bas, des photos typiques de chaque structure sont présentées, et correspondent à un délai de 5 semaines post-chirurgical. En A, la couleur verte correspond à l'immunohistofluorescence de la protéine Calrétinine, qui nous permet de délimiter les ReRh, et la couleur rouge correspond aux neurones exprimant la mCherry. En B, la couleur rouge correspond à l'immunohistofluorescence de la protéine Calrétinine dans les ReRh et de la protéine NeuN dans le CPFm, et la couleur verte correspond aux neurones exprimant la GFP.

Notre premier objectif consistait ainsi à mettre au point cette technique de déconnexion virale. D'abord, deux vecteurs viraux porteurs de la Cre ont été comparés : l'AAV-Cre-mCherry, et l'AAV-Cre-GFP. Dans les deux cas, ils ont été injectés dans les ReRh (b et d), à raison de 2

injections antéro-postérieures de 0,6 μ L. Cette première injection a été combinée avec une injection unilatérale de caspase dans le CPFm gauche (**a et c**), dans le but de comparer les deux hémisphères. Le côté n'ayant pas reçu la caspase nous a servi de contrôle, puisque la voie de projection CPFm \rightarrow ReRh est principalement ipsilatérale (Vertes, 2002). Une fois les injections virales réalisées, les rats ont été maintenus pendant une période de 5 semaines post-opératoires, afin de laisser suffisamment de temps aux virus pour s'exprimer.

Avant de décrire les résultats, il est important de spécifier quelques différences importantes quant à la constitution des deux virus rétrogrades, les AAV-Cre-GFP et AAV-Cre-mCherry. Elles reposent sur deux points ; leur promoteur, et la localisation de leur fluorophore. L'AAV-Cre-GFP est composé du promoteur hSyn (de l'anglais *human synapsin*), spécifique aux neurones. Aussi, dans sa construction, la Cre et la protéine rapportrice fluorescente de la GFP sont fusionnées. Puisque la Cre est nucléaire, cette fusion détermine la localisation de la GFP dans le noyau des neurones, ce qui explique le marquage ponctiforme et l'absence de fibres sur les photographies prises sur la **Figure 33 B**. En revanche, l'AAV-Cre-mCherry comporte le promoteur EF1a (*Elongation Factor 1 alpha*), entraînant une expression ubiquitaire. Dans ce vecteur viral, la Cre et la protéine rapportrice fluorescente mCherry ne sont pas fusionnées, induisant une localisation cytoplasmique de la mCherry, visualisable par un marquage important des fibres (**Figure 33A**).

Étape 1 : Vérification de la qualité de l'injection de la Cre dans les ReRh

Sur la **figure 33**, on peut observer, dans l'hémisphère contrôle, une grande variabilité entre le nombre de neurones rétromarqués dans le CPFm, ce qui est dû, d'une part à des différences d'affinités, de tropisme, ou de qualité de transport des particules virales entre les deux AAV rétrogrades, et d'autre part à des différences dans la qualité de l'infection des ReRh. En effet, le nombre de neurones rétromarqués dans le CPFm exprimant la GFP est fortement dépendant de l'étendue de l'infection de l'AAV rétrograde dans les ReRh. Une corrélation entre le nombre de neurones comptés dans le CPFm et l'étendue antéro-postérieure de l'infection par l'AAV-Cre dans les ReRh (nombre de coupes présentant un marquage spécifique aux ReRh) indique un coefficient de corrélation $r = 0,9981$, $p=0,04$. (non illustrée)

Afin de valider notre déconnexion, la première étape a consisté en la vérification de la localisation de l'injection de la Cre (AAV-Cre-mCherry ou AAV-Cre-GFP) dans les ReRh.

Cette hétérogénéité concernant le nombre de neurones rétro-marqués dans le CPFm peut également être observée entre les rats, ce qui est illustré sur la **Figure 34A**. Elle représente le nombre total de neurones rétro-marqués comptabilisé dans le CPFm, et ce chez les 3 rats ayant été retenus pour le comptage. Les rats dont l'infection par la Cre était unilatérale ou en dehors des ReRh ont été exclus. Cette même raison a mené à l'exclusion de 3 rats sur 4 dans le groupe ayant reçu l'AAV-Cre-mCherry, raison pour laquelle seuls les résultats de l'AAV-Cre-GFP seront présentés ci-après.

Étape 2 : Quantification de la déconnexion dans le CPFm

Le comptage du nombre de neurones rétro-marqués GFP dans le CPFm indique une réduction de 33,27% dans l'hémisphère ayant reçu l'injection de caspase. Un t-test pour échantillons appariés portant sur les 21 coupes des 3 rats (7 par rat), indique que cette différence est significative. ($t_{(20)} = 3,978$, $p = 0,0007$, **Figure 34B**).

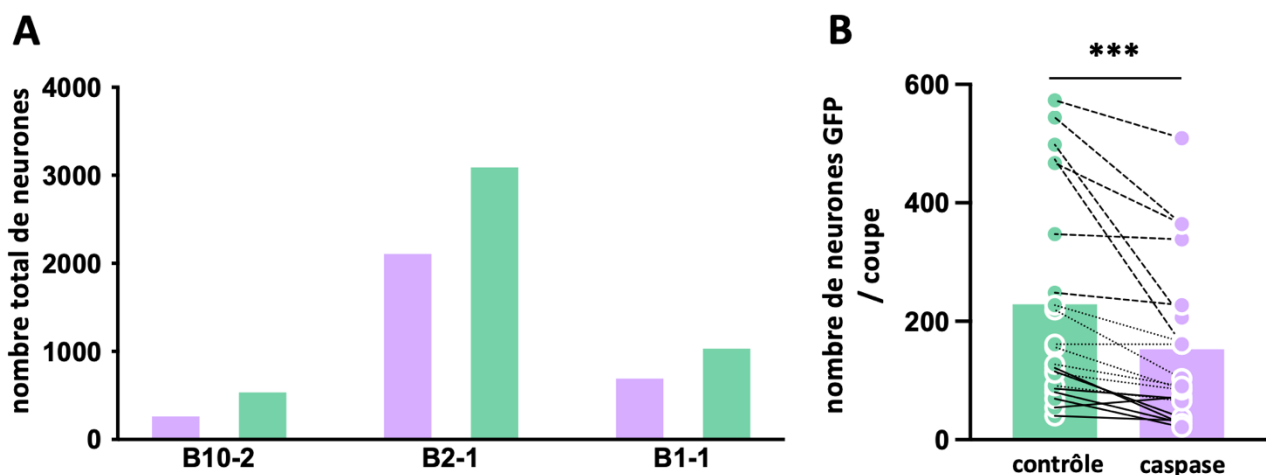


Figure 34. Comptage du nombre de neurones rétro-marqués dans le CPFm

A. Nombre total de neurones rétro-marqués, comptés dans le CPFm, suite à l'injection de l'AAV-Cre-GFP dans les ReRh. L'hémisphère ayant reçu la caspase est en violet, et l'hémisphère contrôle en vert. Le nombre total est égal à la somme des neurones comptés sur l'ensemble des niveaux d'antéro-postériorité du CPFm, sur 7 coupes, et ce pour chacun des trois rats B10-2, B2-1 et B1-1. **B.** Nombre de neurones comptés sur chaque coupe, et ce pour les 3 rats de la figure A. Les détails des différentes lignes connectant les points (pleines, en pointillés, ou en tirets) représentent les 3 différents rats. Statistiques : ***, $p < 0,001$ différence entre les deux hémisphères

Afin de quantifier l'étendue de la déconnexion sur l'ensemble du CPFm, le pourcentage de perte de neurones a été réalisé en fonction du niveau d'antéro-postériorité (A-P), et est représenté en **Figure 35**. On peut voir que le pourcentage de perte de neurones est le plus important au niveau d'A-P correspondant au site d'injection de la caspase. Ce pourcentage de perte est significativement différent de 0 ($t_{(2)}=16,94$, $p=0,0035$). Il s'agit cependant du seul niveau à l'être, ce qui peut être expliqué par la taille relativement faible de notre échantillon ($n=3$).

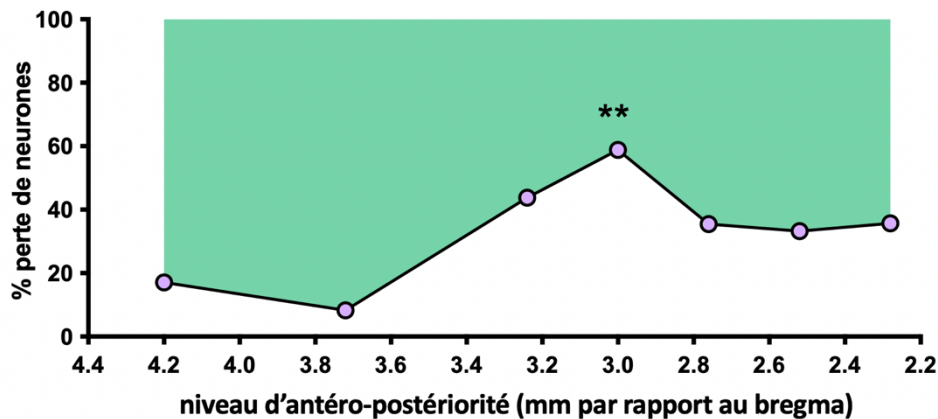


Figure 35. Pourcentage de perte de neurones selon le niveau d'antéro-postériorité par rapport au bregma

*L'évaluation de l'étendue de la perte neuronale a été réalisée sur 3 rats. Le pourcentage de perte a été calculé de la manière suivante : $100 - (\text{nombre de neurones comptés dans l'hémisphère caspase} * 100 / \text{nombre de neurones comptés dans l'hémisphère contrôle})$. Le site d'injection de la caspase est à 3mm par rapport au bregma. Le comptage des neurones a été réalisé sur 7 coupes/ rat. Statistiques : **: $p < 0,01$ différent de 0.*

Dans le but d'obtenir une validation conceptuelle de la technique de déconnexion virale, la déconnexion de la voie inverse a également été mise au point, projetant des ReRh au CPFm.

B. Voie thalamo-corticale

De la même manière que pour la voie cortico-thalamique, les deux AVV rétrogrades porteurs de la Cre, l'AAV-Cre-mCherry et l'AAV-Cre-GFP, ont été testés pour déconnecter la voie inverse, celle issue des ReRh et projetant vers le CPFm. La partie des ReRh qui projette spécifiquement au CPFm est celle des periRe (Dolleman van der Weel et al. 2019), détournée en blanc dans la **Figure 36**. Dans les deux cas, les AAV-Cre ont été injectés dans le CPFm de manière bilatérale (**a et c**), à raison d'une injection antéro-postérieure de 0,6 μL . Cette première injection a été combinée avec une injection unilatérale de caspase dans le PeriRe gauche (**b et d**), dans le but de comparer les deux hémisphères.

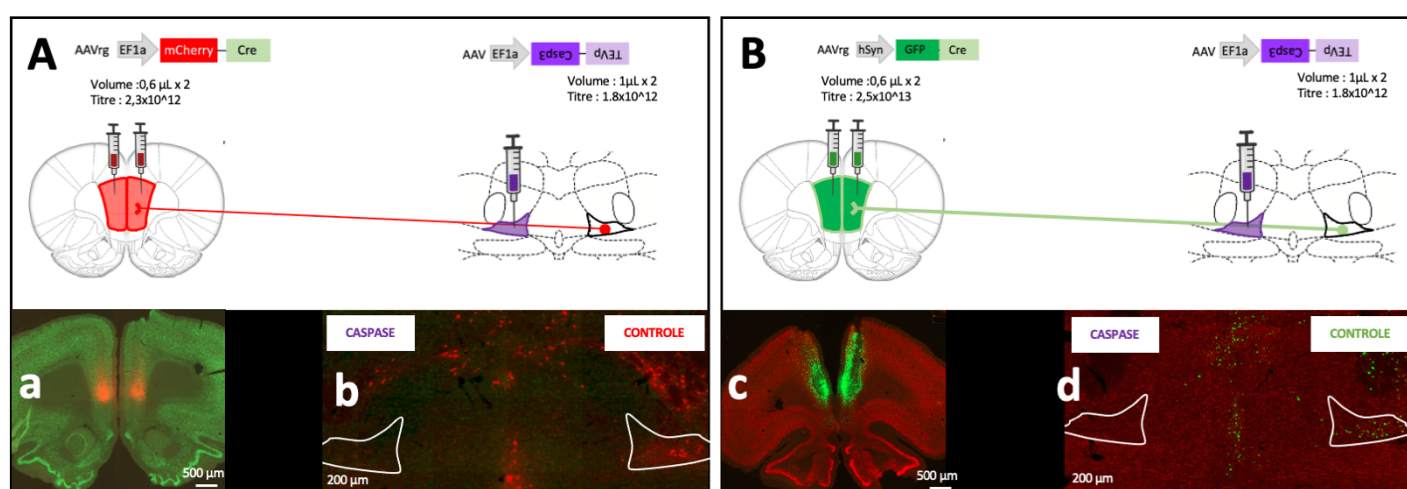


Figure 36. Mise au point de l'approche virale – Voie thalamo-corticale

La Figure 36 est construite de la même manière que la Figure 33 ; l'AAV-Cre-mCherry est représenté en A. et l'AAV-Cre-GFP en B. La procédure chirurgicale est représentée dans les panels du haut. Dans les panels du bas, des photos typiques de chaque structure sont représentées, et correspondent à un délai de 5 semaines post-chirurgicale. Le CPFm reçoit le vecteur viral comportant la Cre, et le PeriRe gauche celui comportant la caspase.

En A, la couleur verte (a) correspond à l'immunohistofluorescence de la protéine NeuN, et la couleur rouge correspond aux neurones exprimant la mCherry. Le CPFm est représenté en a, et les ReRh en b. En B, la couleur rouge correspond à l'immunohistofluorescence de la protéine NeuN, et la couleur verte correspond aux neurones exprimant la GFP. Le CPFm est représenté en c, et les ReRh en d.

Étape 1 : Vérification de la qualité de l'injection de la Cre dans le CPFm

L'étude du site d'injection de la Cre dans le CPFm nous a mené à l'exclusion de 2 rats de chaque groupe, du fait d'infections asymétriques (n=3) ou unilatérales. (n=1) De cette manière, nous obtenons un total de 4 rats dans chaque groupe, sur lesquels nous procédons au comptage des neurones rétro-marqués dans les PeriRe.

Étape 2 : Quantification de la déconnexion dans les PeriRe—AAV-Cre-mCherry

Le comptage du nombre de neurones rétro-marqués mCherry dans les PeriRe indique une réduction de 68,7% dans l'hémisphère dans lequel la caspase a été injectée. Un t-test pour échantillons appariés portant sur le nombre moyen de neurones par coupe (n=4 rats, 14 coupes par rat) indique que cette différence est significative ($t_{(3)}=4,847$, $p=0,0168$) (**Figure 37**).

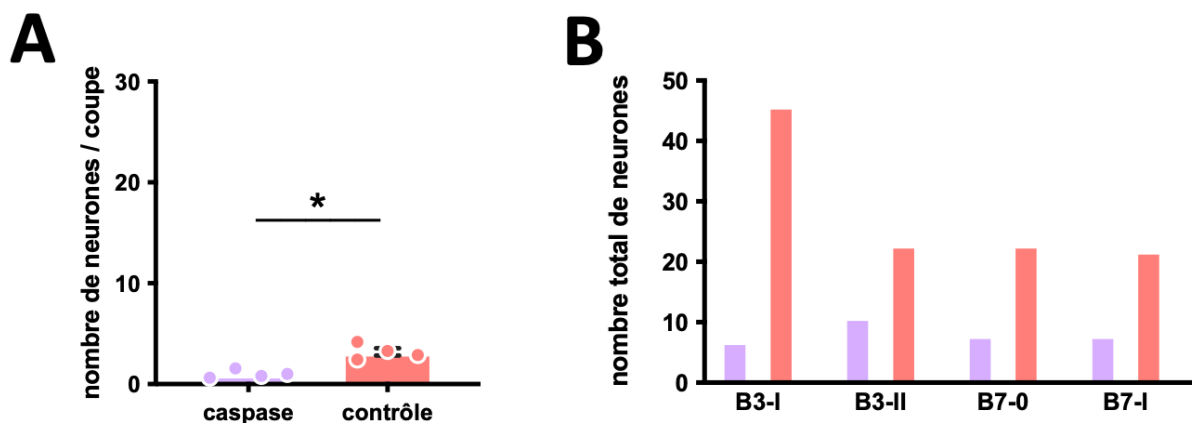


Figure 37. Comptage du nombre de neurones rétro-marqués dans les PeriRe – AAV-Cre-mCherry

A. Nombre moyen de neurones rétro-marqués dans les PeriRe par coupe suite à l'injection de l'AAV-Cre-mCherry dans le CPFm, et ce pour les 4 rats de la figure B. Le nombre moyen de neurones comptés dans le PeriRe ayant reçu la caspase est en violet ; le contrôle est en rouge. **B.** Nombre total de neurones rétro-marqués dans les PeriRe, soit la somme des neurones sur l'ensemble des niveaux d'A-P, sur 14 coupes/rat. Statistiques : *, $p < 0.05$ différence entre les PeriRe avec et sans caspase.

La **figure 37B** montre le nombre total de neurones rétro-marqués dans les PeriRe, chez les 4 rats du groupe AAV-Cre-mCherry. Ce nombre est très faible, en moyenne de $1 \pm 0,2$ neurones dans le PeriRe ayant reçu la caspase, et de $3,2 \pm 0,3$ neurones dans le PeriRe contrôle.

Ce résultat est d'une part dû à la petite taille de la structure. Néanmoins, il est problématique puisqu'il rend difficile, voire impossible, toute interprétation de cette déconnexion. En effet, si on considère un pourcentage de perte de la voie, ce chiffre atteint 70,2% en moyenne, ce qui semble très efficace a priori, mais ne l'est pas en réalité si l'on compare plus tard avec le nombre de neurones rétro-marqués suite à l'utilisation de l'AAV-Cre-GFP.

La **figure 38** représente le nombre de neurones dans chaque PeriRe, selon les niveaux d'AP, sur 14 coupes (n=4). L'ANOVA à deux facteurs, indique un effet de la Caspase ($F_{1,19} = 21,42$, $p=0,0002$), du Niveau d'AP ($F_{13,19} = 3,478$ $p = 0,0069$), ainsi qu'une Interaction entre ces 2

facteurs ($F_{13,19} = 2,297$, $p=0,0485$). L'analyse post-hoc réalisée par un test de Bonferroni indique que la différence de neurones comptés avec et sans caspase est significative pour le niveau d'AP -1,7 mm ($p=0,0003$) par rapport au Bregma, correspondant au niveau d'injection de la caspase.

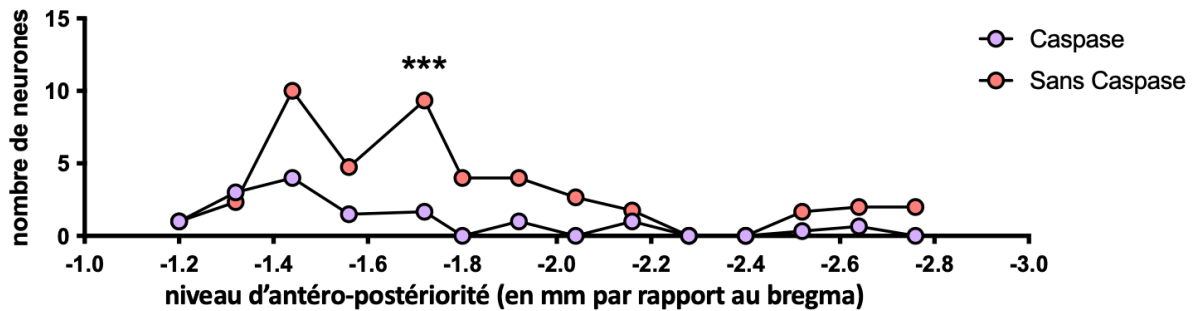


Figure 38. Nombre de neurones comptés sur l'ensemble des niveaux antéro-postérieurs des PeriRe – AAV-Cre-mCherry

L'évaluation de l'étendue de la déconnexion a été réalisée sur 4 rats. Pour chaque niveau d'AP, le nombre de neurones comptés dans le PeriRe contrôle (en rouge), versus caspase (en violet), est représenté. Le site d'injection de la caspase était à -1.7 mm par rapport au bregma. Le comptage des neurones a été réalisé sur 14 coupes pour chaque rat. Statistiques : ***: $p < 0,001$ différence entre les PeriRe avec et sans caspase

Étape 3 : Quantification de la déconnexion dans les PeriRe—AAV-Cre-GFP

Le comptage du nombre de neurones rétro-marqués GFP dans les PeriRe indique une réduction de 93,5% dans l'hémisphère ayant reçu l'injection de caspase. Un t-test pour échantillons appariés portant sur le nombre moyen de neurones par coupe ($n=4$ rats, 14 coupes/rat), indique que cette différence est significative ($t_{(3)}=4,018$, $p=0,0277$).

La **figure 39B** montre le nombre total de neurones rétro-marqués dans les PeriRe, chez les 4 rats du groupe AAV-Cre-GFP.

En comparant avec les résultats obtenus précédemment, on remarque que la somme totale des neurones rétro-marqués suite à l'injection de l'AAV-Cre-GFP est beaucoup plus importante qu'avec l'AAV-Cre-mCherry, puisqu'on a comptabilisé un nombre total de neurones dans le PeriRe contrôle d'en moyenne $189,3 \pm 51$, contre seulement $28,5 \pm 5,8$ pour l'AAV-Cre-mCherry (**Figure 37B**). De manière logique, le nombre moyen de neurones rétro-marqués par coupe dans le PeriRe contrôle est également plus élevé avec l'AAV-Cre-GFP, en moyenne de $16,9 \pm 3,7$, que l'AAV-Cre-mCherry, en moyenne de $3,2 \pm 0,3$. Cette différence est significative ($t_{(3)}=3,807$, $p=0,0319$).

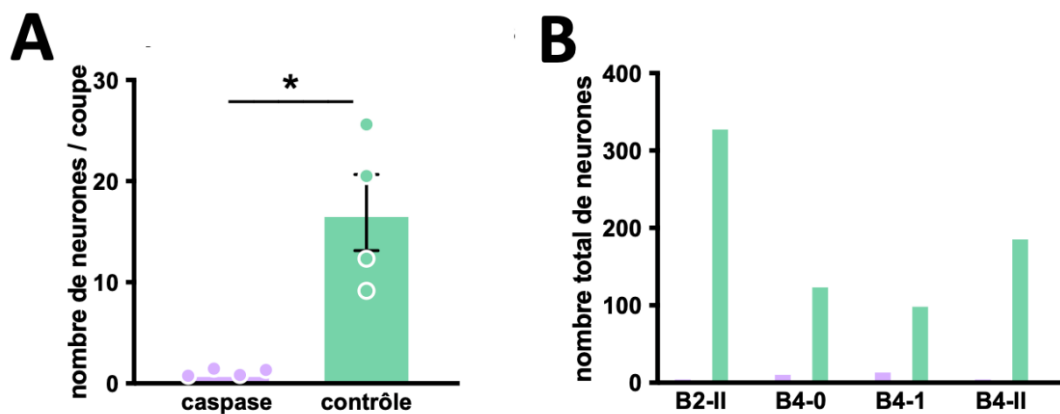


Figure 39. Comptage du nombre de neurones rétro-marqués dans les periRe – AAV-Cre-GFP

A. Nombre moyen de neurones rétro-marqués dans les PeriRe par coupe suite à l'injection de l'AAV-Cre-GFP dans le CPFm, et ce pour les 4 rats de la figure B. Le nombre moyen de neurones dans le PeriRe ayant reçu la caspase est en violet, et contrôle en rouge. **B.** Nombre total de neurones rétro-marqués dans les PeriRe, soit la somme des neurones sur l'ensemble des niveaux d'A-P, sur 14 coupes, pour chaque 4 rat. *Statistiques* : *, $p < 0,05$ différence entre les PeriRe avec et sans caspase.

Cependant, le nombre de neurones comptabilisés dans les PeriRe ayant reçu la caspase est similaire entre les deux AAV, puisque l'on recense $1 \pm 0,2$ avec l'AAV-Cre-mCherry, et $1,1 \pm 0,3$ pour l'AAV-Cre-GFP. ($t_{(3)}=0,6742$, n.s). De ce fait, l'utilisation de l'AAV-Cre-GFP mène à une efficacité plus élevée qu'avec l'AAV-Cre-mCherry, puisqu'en marquant davantage de neurones, nous réussissons à déconnecter une plus grande partie de la voie thalamo-corticale. La **figure 40** représente le nombre de neurones dans chaque PeriRe, selon les niveaux d'AP, sur 14 coupes ($n=4$). L'ANOVA à deux facteurs, indique un effet de la Caspase ($F_{1,26} = 60,90$, $p < 0,0001$), mais pas du Niveau d'AP ($F_{13,26} = 1,641$ ns), ni d'Interaction entre les 2 facteurs ($F_{13,26} = 2,036$, ns). L'analyse post-hoc réalisée par un test de Bonferroni indique que la différence de neurones comptés avec et sans caspase est significative pour les niveaux d'AP - 2,04, -2,4, -3 et -3,12 mm par rapport au Bregma.

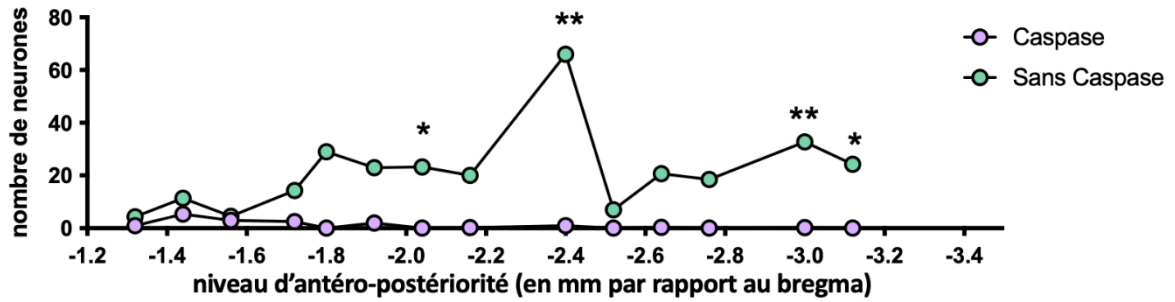


Figure 40. Nombre de neurones comptés sur l'ensemble des niveaux antéro-postérieurs des periRe -- AAV-Cre-GFP

L'évaluation de l'étendue de la déconnexion a été réalisée sur 4 rats. Pour chaque niveau d'AP, le nombre de neurones comptés dans le PeriRe contrôle (en vert), versus caspase (en violet), est représenté. Le site d'injection de la caspase était à -1,7 mm par rapport au bregma. Le comptage des neurones a été réalisé sur 14 coupes pour chaque rat. Statistiques : * : $p < 0,01$; ** : $p < 0,001$ différence entre les PeriRe avec et sans

Pour conclure, l'AAV-Cre-GFP semble plus efficace, puisqu'il conduit à un plus grand nombre de neurones rétro-marqués, ce qui permet *in fine* de déconnecter une plus grande partie des neurones. Nous continuons donc nos expériences avec l'AAV-Cre-GFP.

Étape 4 : Vérification de la spécificité de la technique de déconnexion virale – Comparaison de la lésion periRe et noyaux submédiens du thalamus

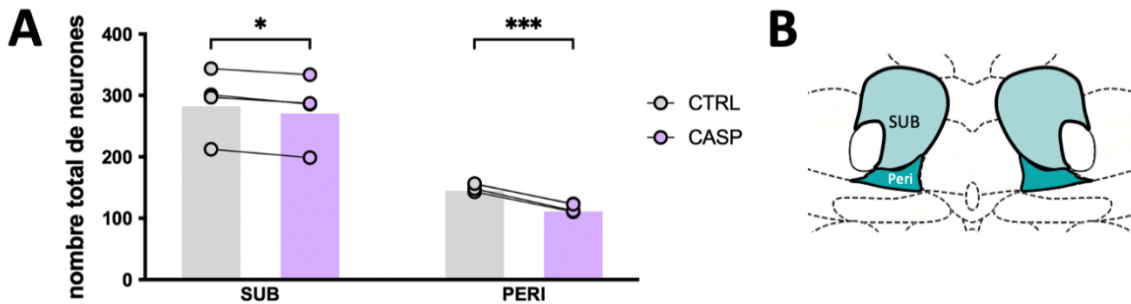


Figure 41. Comparaison du nombre total de neurones entre les periRe et les Sub

Nombre de neurones total dans les PeriRe et les noyaux submédiens par coupe suite à l'injection de l'AAV-Cre-GFP dans le CPFm, et ce pour 4 rats. Le nombre moyen de neurones dans le PeriRe ayant reçu la caspase est en violet, et contrôle en gris. **B.** Localisation des noyaux submédiens par rapport aux PeriRe. Statistiques : * , $p < 0.05$; *** , $p < 0,0001$ différence entre les hémisphères avec et sans caspase.

La dernière étape de notre mise au point ne pouvait éluder la question de la spécificité de l'action de la caspase. Pour cela, un marquage immunocytochimique de la protéine NeuN a

été réalisé. Le but était de quantifier le nombre total de neurones NeuN+ dans les PeriRe avec ou sans caspase, mais surtout, de pouvoir comparer avec une structure proche de l'injection de la caspase, mais ne recevant pas de projection du CPFm : les noyaux submédiens du thalamus (Sub). En effet, les neurones de ces noyaux projettent fortement au cortex orbitofrontal, mais pas au CPFm (Yoshida et al., 1992).

La quantification du nombre total du nombre de neurones dans les noyaux Sub indique une différence moyenne de $12,2 \pm 1,3$ neurones entre les deux hémisphères avec ou sans caspase, contre $33,7 \pm 0,8$ neurones de différences pour les PeriRe (**Figure 41A**). L'ANOVA à deux facteurs, indique un effet de la Caspase ($F_{1,3} = 1345$, $p < 0,0001$), de la Structure ($F_{1,3} = 26,73$, $p = 0,0140$), et une Interaction entre les 2 facteurs ($F_{1,3} = 132,4$, $p = 0,0014$). L'analyse post-hoc réalisée par un test de Bonferroni indique que le nombre total de neurones comptés dans les deux hémisphères, avec et sans caspase, diffère significativement, et ce pour les deux structures ($p = 0,0158$ pour les Sub, $p < 0,0001$ pour les PeriRe).

Bien que cette différence apparaisse surprenante concernant le Sub, elle peut s'expliquer par le passage de la fibre d'instillation, qui cause des dommages mécaniques non évitables lors de l'injection virale. Cependant, lorsque l'on regarde le pourcentage de perte de neurones dans les deux structures, on obtient $4,4\% \pm 0,8$ pour les Sub, et $22,3\% \pm 0,7$ pour les PeriRe, et cette différence est significative ($t_{(3)} = 15,39$, $p = 0,0006$).

Bien qu'une faible proportion de neurones du Sub ait été altérée, probablement dû à un dommage mécanique lors la descente de l'aiguille d'instillation, ces résultats suggèrent que l'effet de la caspase est acceptablement spécifique au PeriRe ipsilatéral, où les neurones Cre-GFP ont été déconnectés, représentant 20% du nombre total des neurones. Cette étape nous permet de valider notre approche de déconnexion virale, même si celle-ci n'est que partielle.

II. Déconnexion bilatérale de la voie cortico-thalamique

L'objectif de ces travaux était d'observer l'impact de la déconnexion bilatérale des voies de projections du CPFm aux ReRh sur la persistance d'un souvenir spatial dans une tâche de piscine de Morris. Pour cela, les différents AAV ont été injectés grâce à une chirurgie stéréotaxique. Les 3 groupes expérimentaux sont représentés dans la **Section Matériels et Méthodes, Figure 28**. Le groupe Déco-CT représenté en orange ci-après, a reçu l'AAV-Caspase bilatéralement dans les CPFm, et l'AAV-Cre-GFP dans les ReRh. Les deux groupes contrôles, Ctrl-Cre et Ctrl-Casp ont reçu, respectivement, du PBS dans le CPFm et l'AAV-Cre-GFP dans les ReRh, et l'AAV-Caspase dans le CPFm ainsi qu'un virus contrôle AAV-GFP, sans Cre.

Étant donné la relative nouveauté de l'approche au sein du laboratoire, nous avons mesuré d'autres variables pouvant impacter les performances mnésiques, telles que l'activité locomotrice pré- et post-chirurgicale, mais aussi le niveau d'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé. Les animaux réalisent ensuite l'acquisition en piscine de Morris, avant d'être testés en mémoire spatiale à long terme ancienne, soit au délai de 25j, avant d'être mis à mort.

Les cerveaux sont perfusés, congelés, avant d'être coupés en fines tranches, puis soumis à différents immunomarquages permettant une vérification des différents sites d'injection. A l'origine, chaque groupe expérimental est constitué de 20 rats. Comme il n'est pas possible de faire passer la totalité des 60 rats en une journée dans les différentes tâches comportementales, la cohorte a été réalisée en deux temps. La **figure 42** représente le déroulé du design expérimental.

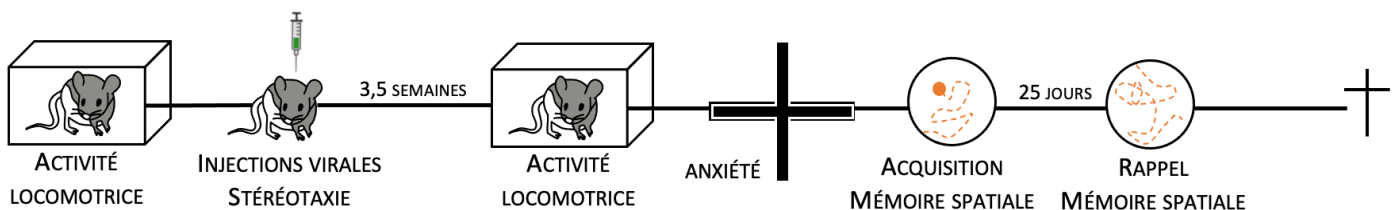


Figure 42. Design expérimental

A leur arrivée au laboratoire, les rats sont regroupés par 3, puis gardés dans leur cage d'élevage pour acclimatation pendant 1 semaine. Les évaluations commencent par une mesure individuelle de l'activité motrice sur 24h. Ensuite, les rats sont opérés. Après 3 semaines et demie, une nouvelle mesure de l'activité locomotrice est réalisée. A 4 semaines post-chirurgicales, le test du labyrinthe en croix surélevé est réalisé pour mesurer le niveau d'anxiété des animaux. Après cela, l'acquisition en Piscine de Morris débute ; elle dure 8 jours. Le test de rappel est réalisé 25 jours après la fin de l'acquisition.

A. Localisation et étendue des injections virales

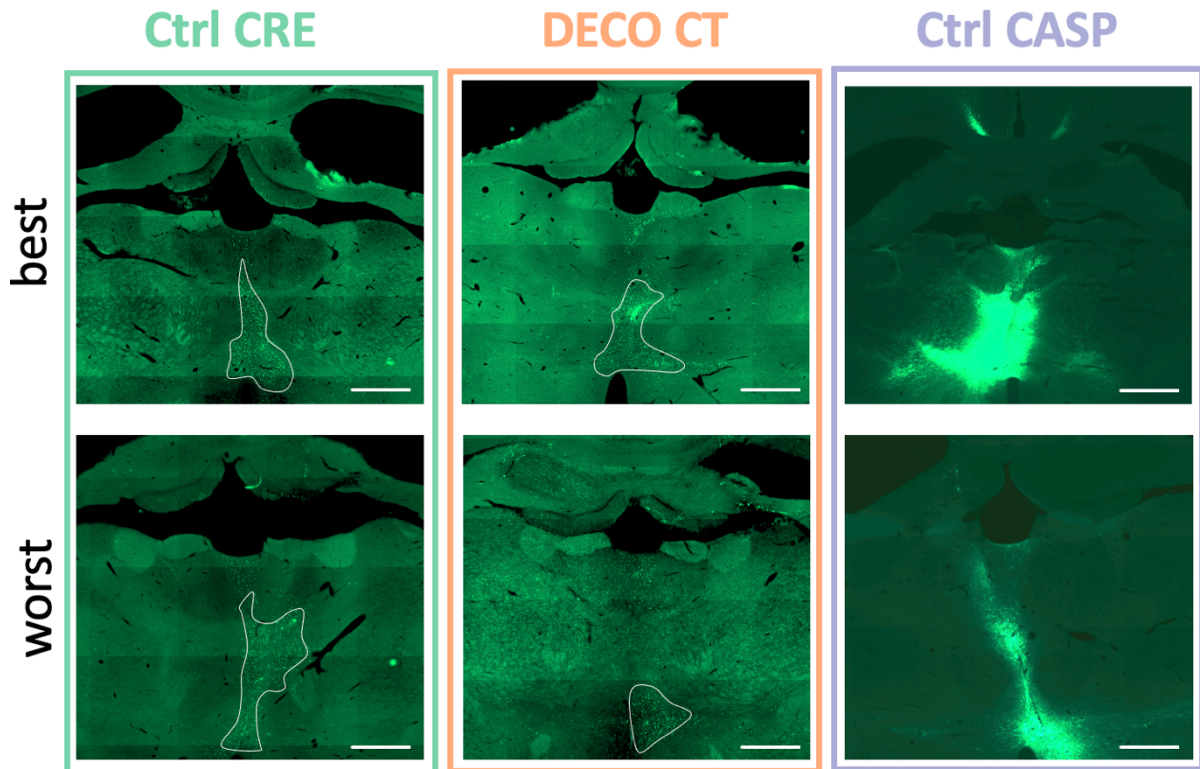


Figure 43. Sites d'injection de l'AAV-Cre-GFP dans les ReRh

Photographies d'une coupe de cerveau pour un rat correctement injecté dans les panels supérieurs (best), et exclu (trop peu d'infection ou infection asymétrique) en bas (worst), pour chaque groupe expérimental. Les coupes sont toutes à un niveau d'AP proche de -1,8 mm, soit un des deux sites d'injection de l'AAV-Cre-GFP (groupes Ctrl Cre et Deco CT) ou de l'AAV-GFP (Ctrl Casp). La localisation de la GFP est nucléaire pour les groupes Ctrl Cre et Deco-CT, et cytoplasmique pour le groupe Ctrl Casp, expliquant la différence d'intensité des images. L'aire d'infection est détournée en blanc pour les groupes Ctrl Cre et Déco CT. Les échelles sont égales à 500 μ m.

Comme décrit plus haut dans la mise au point de la technique, l'analyse histologique de la déconnexion commence par la vérification du site d'injection du vecteur viral rétrograde, l'AAV-Cre-GFP, dans les ReRh. Cette analyse ayant été réalisée sur 6 coupes représentatives de l'ensemble des niveaux A-P de la structure. Les rats dont l'infection représentait moins de 20% de la totalité de la structure (Re + Rh + Peri Gauche et Peri Droit) ont été exclus. De ce fait, l'effectif final de chaque groupe expérimental est n=10 pour le groupe Déco-CT, n=12 pour le groupe Ctrl Cre, et n=17 pour le groupe Ctrl Casp. L'analyse histologique de l'étendue des infections virales indique que le groupe Déco-CT possède une infection moyenne de $31,9\% \pm 2\%$ de la région ReRh ainsi que des deux PeriRe. Celle-ci est de $31,2\% \pm 3\%$ pour le groupe Ctrl Cre, et de $47,1\% \pm 3\%$ pour le groupe Ctrl Casp. Il est important de noter que la

supériorité dans l'infection du groupe Ctrl Casp peut être dû au fait que la GFP est cytoplasmique, et non pas nucléaire, comme dans les deux autres groupes. La quantification du marquage ponctiforme dans les groupes Déco-CT et Ctrl-Cre a également été plus laborieuse. Les différents virus utilisés (AAV-GFP vs AAV-Cre-GFP), mais aussi l'induction d'une telle différence de marquage, empêchent la comparaison directe entre les groupes Déco-CT, Ctrl Cre avec le groupe Ctrl-Casp.

La seconde étape de validation histologique repose sur l'analyse du nombre de neurones rétro-marqués dans le CPFm. Cette étape n'a malheureusement pas encore pu être réalisée et les comptages sont en cours. Les résultats comportementaux présentés ci-après sont donc préliminaires et à considérer avec précaution, car ils pourraient être revus une fois les vérifications histologiques finalisées.

B. Mesure de l'activité locomotrice avant et après la chirurgie

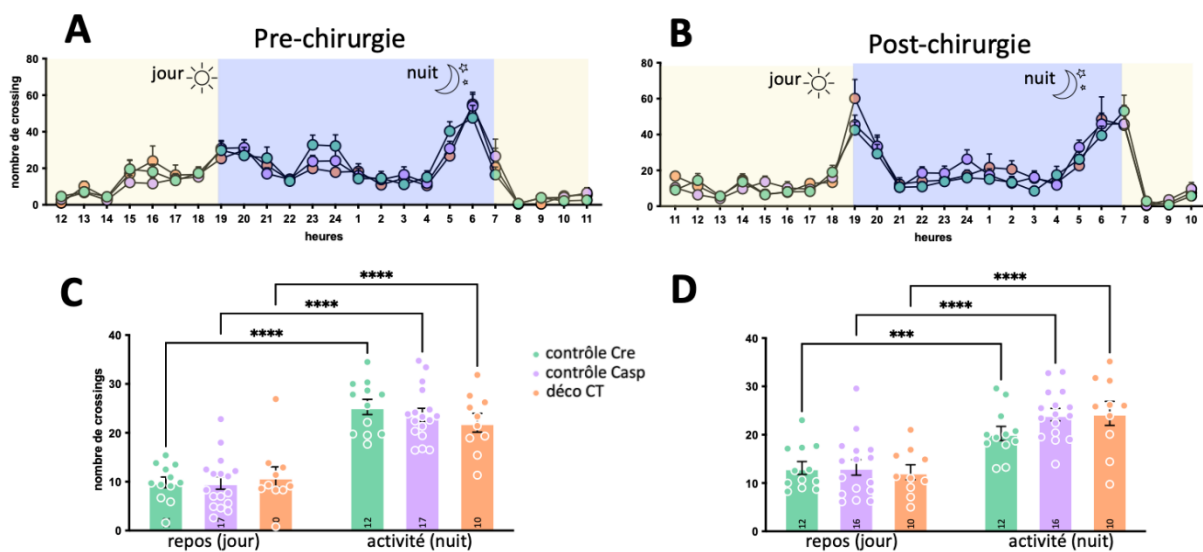


Figure 44. Mesure de l'activité locomotrice

Mesure de l'activité locomotrice avant (A et C) et après (B et D) la chirurgie. Les panels A et B détaillent le nombre de passages réalisés par heure sur la totalité des 24h d'enregistrement, pour les trois groupes, Ctrl Cre en vert, Ctrl Casp en violet et Déco-CT en orange. Les panels C et D regroupent le nombre de passages selon les périodes d'activité (en bleu sur les panels A et B), et de repos (en jaune). Le nombre d'animaux dans chaque groupe est indiqué en bas, sur chaque histogramme. Lors de la mesure de l'activité en post-chirurgie, une cellule du groupe Ctrl Casp a cessé de fonctionner, expliquant l'échantillon $n=16$ et non pas $=17$. Statistiques : *** : $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

La mesure de l'activité locomotrice a été réalisée de manière préalable à la chirurgie, afin de déterminer un niveau basal qui sera comparé aux mesures relevées après les chirurgies. Ces mesures nous permettent de vérifier l'absence de déficit locomoteur, ou d'impact éventuel des injections virales sur ce comportement. Un tel déficit, s'il était avéré, pourrait correspondre à des altérations comportementales susceptibles de biaiser l'interprétation des données obtenues en piscine de Morris.

L'analyse de variance à deux facteurs indique un effet de la Période d'activité ($F_{1,36} = 192,5$, $p < 0,0001$), mais pas du Groupe ($F_{2,36} = 0,1827$, ns), et on ne constate pas d'Interaction significative entre ces deux facteurs ($F_{2,36} = 1,477$, ns). L'analyse post-hoc réalisée à l'aide d'un test de Bonferroni indique une différence significative du nombre de passages entre la période jour et la période nuit, et ce pour les trois groupes (**Figure 44 C**). Cette différence était attendue, les rats étant plus actifs en période nocturne qu'en période diurne.

Les mêmes résultats sont obtenus concernant l'analyse réalisée après la chirurgie, avec un effet significatif de la Période d'activité uniquement ($F_{1,35} = 120,2$, $p < 0,0001$), effet qui s'exprime dans tous les Groupes, comme le montre l'analyse post-hoc de Bonferroni (**Figure 44 D**)

Enfin la comparaison entre l'activité locomotrice pré- et post-chirurgicale indique un effet de la Chirurgie lors de la comparaison des **périodes de repos (jour)** ($F_{1,36} = 10,30$, $p = 0,0028$), où l'analyse post-hoc de Bonferroni indique une tendance à une augmentation de l'activité locomotrice pour les groupes Ctrl Cre ($p = 0,0648$), et Ctrl Casp ($p = 0,0506$). Il n'y a cependant **pas de différence entre les Groupes** ($F_{2,36} = 0,02565$, $p = 0,9747$). Lors des **périodes actives (nuit)**, la comparaison pré- et post-chirurgie indique un effet d'interaction ($F_{2,36} = 4,027$, $p = 0,0264$), où l'analyse post-hoc de Bonferroni indique une diminution significative de l'activité locomotrice uniquement chez le groupe Ctrl Cre ($p = 0,0323$). Il n'y a **pas de différence entre les Groupes**. ($F_{2,36} = 0,1913$, $p = 0,8267$).

Ces résultats indiquent une tendance à l'augmentation de l'activité locomotrice chez les deux groupes contrôles à la suite de la chirurgie, mais uniquement lors de la période de repos. A l'inverse, on note une diminution de l'activité locomotrice lors de la période d'activité uniquement dans le groupe Ctrl Cre. Toutefois, la chirurgie n'entraîne aucune différence entre

les groupes expérimentaux. Ces résultats sont néanmoins à considérer avec une relative prudence, puisque des travaux d'entretien au sein du bâtiment ont eu lieu lors de la première actographie pré-chirurgie, ce qui pourrait avoir stressé nos rats et affecté leurs déplacements.

C. Mesure de l'anxiété

Le test du labyrinthe en croix surélevé a été réalisé 4 semaines après les chirurgies pour vérifier un éventuel effet de cette dernière sur l'anxiété des animaux.

L'analyse de variance à deux facteurs du temps passé dans les différents bras indique un effet Zone ($F_{2,72} = 76,31$, $p < 0,0001$), mais **pas du Groupe** ($F_{2,36} = 0,1151$, ns), et il n'y a pas d'Interaction significative entre les deux facteurs ($F_{4,72} = 0,6602$, ns). L'analyse post-hoc réalisée à l'aide d'un test de Bonferroni indique que chacun des 3 groupes expérimentaux passe significativement plus de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts et au centre. **(Figure 45A).**

L'analyse de variance à deux facteurs du nombre d'entrée dans les différents bras indique un effet Zone ($F_{2,72} = 217,7$, $p < 0,0001$), mais aussi un effet du Groupe ($F_{2,36} = 6,663$, $p = 0,0035$) ; on ne note pas d'interaction significative ($F_{4,72} = 1,033$, ns). L'analyse post-hoc réalisée à l'aide d'un test de Bonferroni indique que dans chacun des 3 groupes expérimentaux, les rats réalisent significativement plus de passages au centre, et d'entrées dans les bras fermés que dans les bras ouverts. Dans le groupe Ctrl Casp on comptabilise significativement plus d'entrées que dans le groupe Déco-CT ($p < 0,001$), et cette différence est à la limite de la significativité lorsque la comparaison porte sur le groupe Ctrl-Cre ($p = 0,0540$). **(Figure 45B).** Ce résultat est difficile à expliquer et pourrait correspondre à une fluctuation d'échantillonnage pour la variable en question.

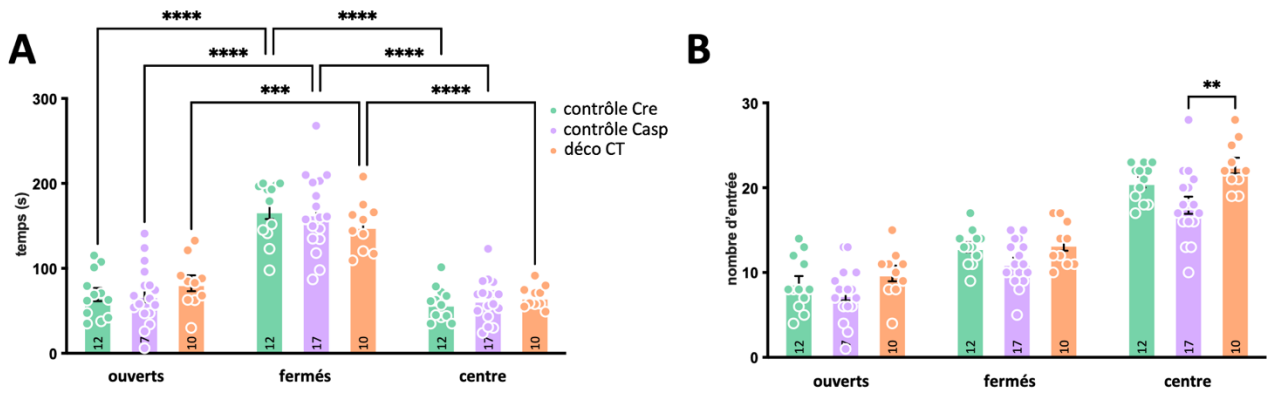


Figure 45. Résultats du labyrinthe en croix surélevé

La **figure A**. représente le temps passé dans les différents bras (ouverts et fermés), ainsi que dans le centre du labyrinthe. La **figure B** montre le nombre d'entrées dans ces différentes parties.
 Statistiques : ** $p < 0,01$ *** ; $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Ces résultats n'indiquent aucune différence dans le niveau d'anxiété entre les groupes, puisque tous passent autant de temps dans les différents bras du labyrinthe.

D. Tâche de mémoire spatiale en piscine de Morris

Lors de la phase d'habituation, la distance parcourue pour atteindre la PF visible diminue au fur et à mesure de la progression des Essais ($F_{3,108} = 42,55$, $p < 0,0001$), et cela de la même manière dans tous les Groupes ($F_{2,36} = 0,3609$, ns) (**Figure 46A**). Il en va de même pour la thigmotaxis qui diminue au fil des Essais ($F_{3,108} = 43,59$, $p < 0,0001$), sans que n'apparaisse une différence entre les Groupes ($F_{2,36} = 0,5350$, ns) (**Figure 46B**). La vitesse de nage moyenne lors des quatre essais est également équivalente entre les groupes ($F_{2,36} = 1,437$, ns) (**Figure 46C**).

Ces résultats indiquent que la déconnexion cortico-thalamique n'impacte pas les capacités visuelles ou sensorimotrices des animaux dans ce test.

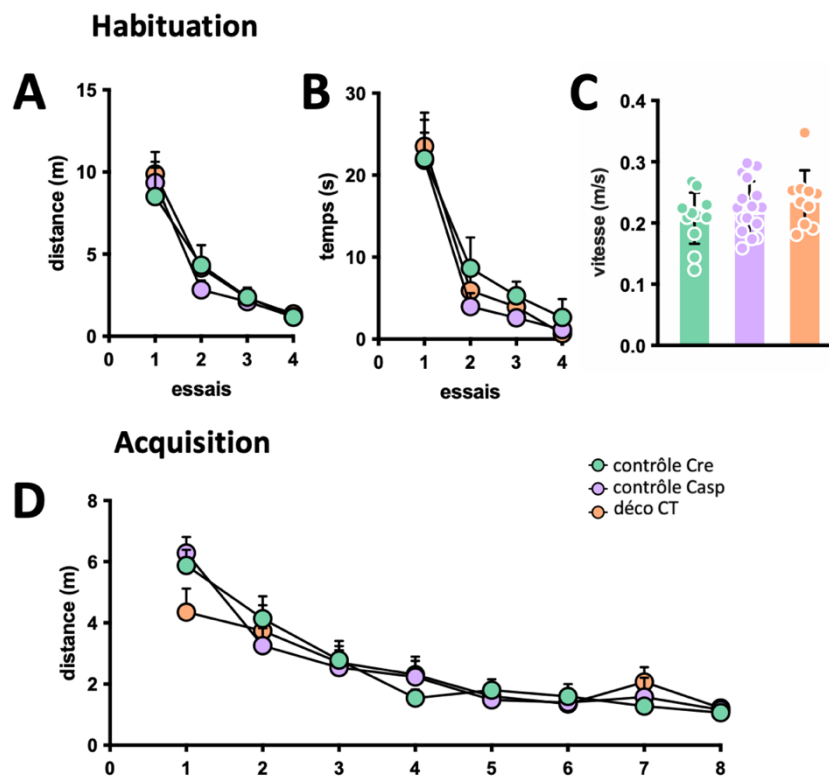


Figure 46. Performances des animaux lors des phases d'habituation et d'acquisition en Piscine de Morris

En A,B et C sont présentés les résultats de l'habituation A. Distance (en mètres) parcourue avant de rejoindre la plateforme lors des 4 essais. B. Temps (en secondes) passé dans la zone de thigmotaxis lors des 4 essais, indice d'anxiété. C. Vitesse moyenne de nage. D. Distance (en mètres) moyenne (sur les 4 essais quotidiens) parcourue au cours des 8 jours d'acquisition.

Lors de l'acquisition, la distance parcourue pour retrouver la PF immergée diminue de manière progressive au cours des jours. L'analyse de variance à deux facteurs indique un effet Jours

($F_{7,252} = 43,24$, $p < 0,0001$), mais il n'y a pas d'effet significatif du Groupe ($F_{2,36} = 0,01566$, ns), ni d'Interaction entre les deux facteurs ($F_{14,252} = 1,488$, ns) (**Figure 46D**).

Ces résultats traduisent un apprentissage de la position de la PF, puisque les performances des animaux s'améliorent au fil des jours, et ce de manière comparable entre les trois groupes.

Concernant le **test de rappel**, le temps passé dans le quadrant cible NO est significativement supérieur au hasard (60 sec/4 quadrant = 15sec) dans les trois groupes, à savoir Ctrl Cre ($t_{11}=4,169$, $p=0,0016$), Ctrl Casp ($t_{16}=5,669$, $p < 0,0001$), et Déco-CT ($t_9=2,840$, $p=0,0194$), ce qui traduit un souvenir de la position de la PF 25 jours après la fin de l'acquisition.

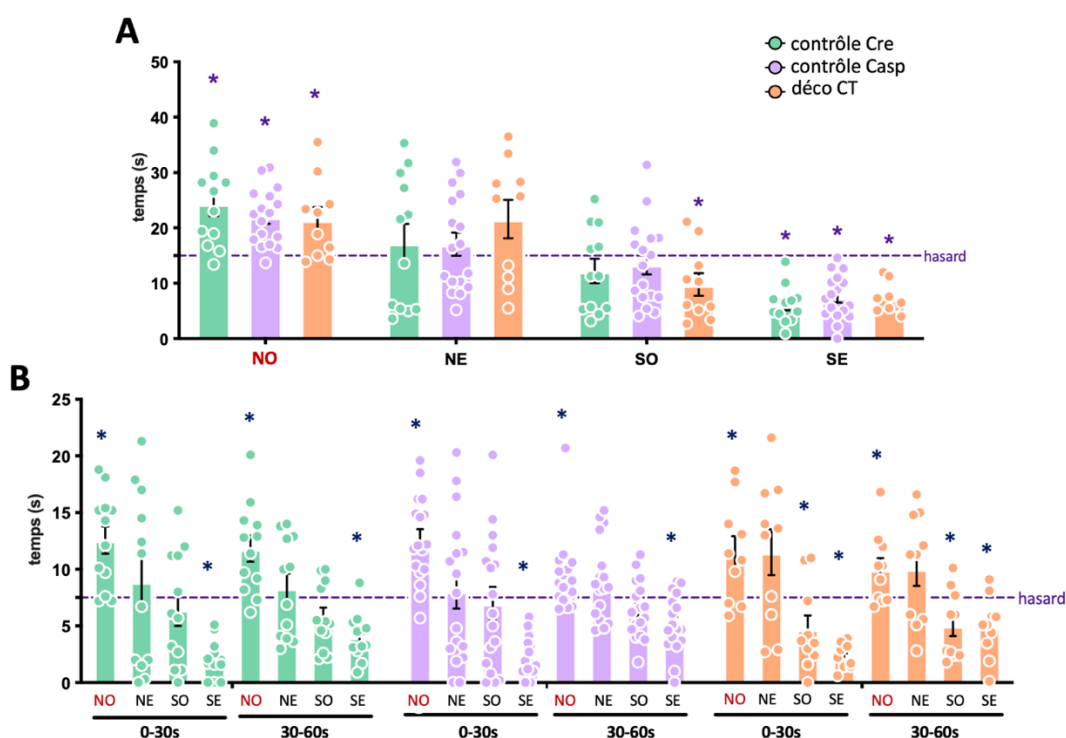


Figure 47. Temps passé dans les différents quadrants lors du probe test

La **figure A**. représente le temps passé dans les différents quadrants lors du probe test. La **figure B** correspond à un détail de la figure A, où le probe test a été découpé selon les 30 premières et les 30 dernières secondes du probe test. Le quadrant cible NO est indiqué en rouge. Les points de lâcher ont été contrebalancés entre les groupes (NE et SO). Statistiques : * différence vis-à-vis du hasard (15 sec en A, et hasard = 7,5 sec en B)

L'analyse de variance du temps passé dans les différents quadrants indique un effet Quadrant ($F_{3,108} = 25,18$, $p < 0,0001$), mais pas d'effet Groupe ($F_{2,36} = 1,287$, ns), ni d'effet significatif de l'Interaction entre ces deux facteurs ($F_{6,108} = 0,7002$, ns). L'analyse post-hoc réalisée avec le test de Bonferroni indique une différence entre la cible NO et les quadrant SO et SE, différence non significative lorsque la comparaison est faite avec le quadrant NE.

Les deux quadrants de lâcher sont le NE pour une partie des rats et le SO pour l'autre. La dernière analyse semble mettre en évidence le fait que les rats tendent à confondre la cible NO et le quadrant adjacent NE, dans chacun desquels ils passent plus de temps que dans les deux autres. Il se trouve que le nombre de rats ayant été lâché du NE ou du SO n'est pas équivalent entre les groupes (Ctrl Cre : $n^{NE}=6$ $n^{SO}=6$; Ctrl Casp : $n^{NE}=8$ $n^{SO}=9$; Déco-CT : $n^{NE}=7$ $n^{SO}=3$), ce qui pourrait correspondre à un biais qui provient des rats écartés sur la base des critères histologique (voir l'annexe 1 pour plus de détails au sujet d'une analyse qui prend ce biais en considération).

Afin de trouver une éventuelle différence dans la stratégie de recherche de la PF au cours du temps (Dolleman-van der Weel et al., 2009), nous avons analysé le temps passé dans les différents quadrants lors des 30 premières secondes et lors des 30 dernières secondes du probe test (**Figure 47B ; facteur 'Temps' ci-après**). L'analyse du temps passé dans la cible NO lors des 30 premières vs 30 dernières secondes du test indique un effet Temps ($F_{1,36}=8,583$, $p=0,0059$, mais **pas d'effet Groupe** ($F_{2,36}=0,6676$, ns), ni d'interaction entre ces 2 facteurs ($F_{2,36}=1,610$, ns). L'analyse post hoc de Bonferroni indique que le groupe Ctrl Casp passe significativement moins de temps dans la cible lors des 30 dernières secondes, en comparaison avec les 30 premières secondes ($p=0,0039$), ce qui suggèrent un « abandon » de la recherche après 30 secondes de test. Cependant, la comparaison du temps passé dans la cible NO reste significativement supérieure au hasard (ici 7,5 secondes) pour tous les groupes, et ce sur les deux périodes du test. **De ce fait, il n'y a pas de différence majeure entre les groupes dans la répartition de leur recherche au cours du probe trial.**

Ces résultats indiquent l'absence d'effet de la déconnexion de la voie cortico-thalamique lors du test de rappel à 25 jours.

Afin d'analyser de manière plus précise le comportement des animaux lors du rappel, certains paramètres de précision de la mémoire ont été analysés, et sont représentés en **figure 48**. La latence d'accès à la position virtuelle de la PF n'indique aucune différence entre les Groupes ($F_{2,36}=0,2051$, ns), tout comme le nombre de croisements de l'annulus, zone correspondant à la surface de la plateforme élargie d'un bandeau de 10 cm autour de la PF ($F_{2,36}=0,5972$, ns). Il ne semble pas non plus que les trois groupes diffèrent en termes d'anxiété au moment

du test, puisque le temps passé dans la zone thigmotaxis est équivalente entre les trois groupes. ($F_{2,36} = 0,6163$, ns).

Enfin, l'analyse du croisement de la position virtuelle de la PF lors des 30 premières versus 30 dernières secondes du test n'indique aucun effet de la Période du test ($F_{1,36} = 1,564$, ns), ni du Groupe ($F_{2,36} = 0,4893$, ns), pas plus que de l'Interaction entre ces deux facteurs ($F_{2,36} = 5,622$, $p=0,0075$). L'analyse post-hoc de Bonferroni met en évidence une augmentation du nombre de croisements de la PF lors des 30 dernières secondes, uniquement chez le groupe Ctrl-Cre ($p=0,00113$).

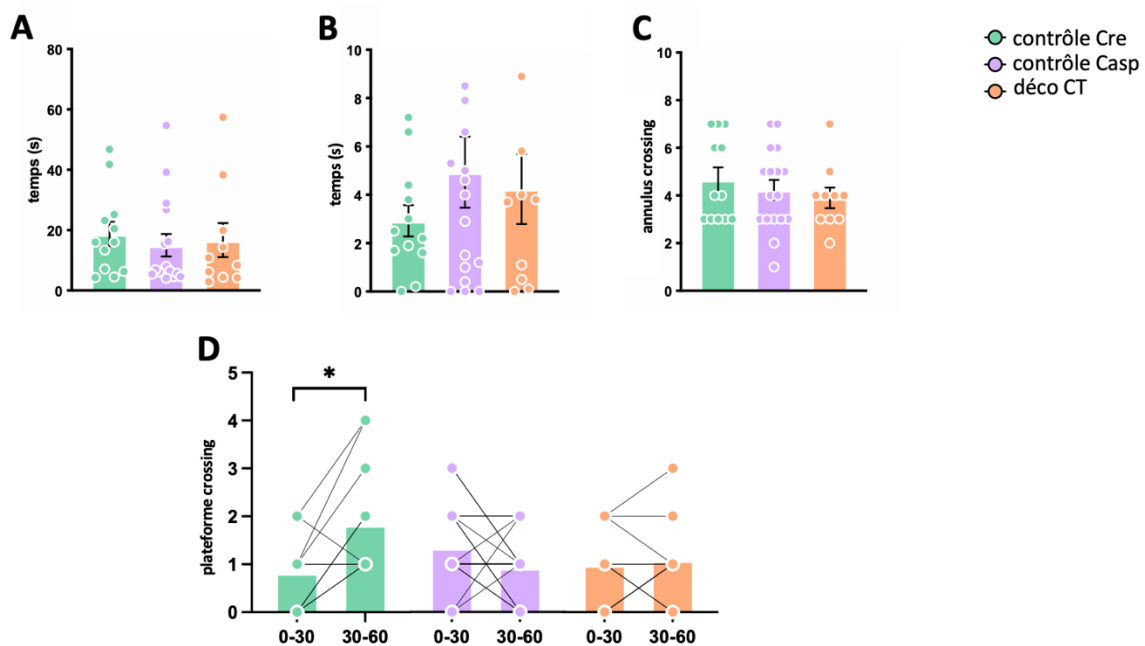


Figure 48. Indices de précision de la mémoire lors du probe test

La **figure A** : Latence d'entrée dans la position virtuelle de la PF. **B**. Temps passé dans la zone thigmotaxis. **C**. Nombre de croisements de l'annulus. **D**. Nombre de croisements de la PF, lors des 30 premières et 30 dernières secondes du probe test. Statistiques : * : $p<0,05$

En résumé, aucun indice supplémentaire en lien avec la précision de la mémoire ne distingue les groupes expérimentaux. La déconnexion de la voie cortico-thalamique n'a pas perturbé la consolidation d'un souvenir spatial dans cette tâche.

Ces résultats restent néanmoins préliminaires, puisque la quantification du nombre de neurones rétomarqués dans le CPFm est encore en cours. Cette analyse histologique permettra de valider et d'estimer la déconnexion de la voie cortico-thalamique, éventuellement de revenir sur ces données comportementales.

-Discussion et conclusion générale-

I. Le rôle des ReRh dans la consolidation d'un souvenir

La consolidation d'un souvenir épisodique est un processus progressif, qui nous permet d'enregistrer des moments et informations en lien avec un contexte spatio-temporel. Le stockage à long terme de ces informations est une fonction fondamentale du système nerveux, dont nous ne connaissons pas encore tous les rouages et mécanismes. L'un des défis majeurs des neurosciences actuelles consiste à éclaircir les processus sous-jacents à la consolidation de la mémoire, à savoir, où, quand et comment précisément elle s'effectue.

Au fil de cette thèse, nous avons vu que pour avancer dans ces questionnements, il est nécessaire d'étudier le dialogue entre les régions cérébrales clés impliquées dans la consolidation de la mémoire, en particulier l'HIP, où l'information est initialement encodée, et le CPFm, vers lequel la trace mnésique, toute ou partie, est progressivement transférée. Au regard des connexions neuroanatomiques entre ces deux structures, le transfert bidirectionnel d'informations ne peut se faire de manière directe, monosynaptique. Les noyaux ReRh, appartenant à la ligne ventrale du thalamus médian, possèdent des connexions réciproques vers l'HIP et le CPFm, ainsi que des neurones projetant simultanément vers ces deux structures, ce qui les positionne de manière idéale pour 'arbitrer' et coordonner le dialogue entre l'HIP et le CPFm ([Hoover and Vertes, 2012](#); [Varela et al., 2014](#))

Au cours des 15 dernières années de recherche, les études sur les ReRh se sont multipliées. Elles ont permis d'accroître les connaissances neuroanatomiques, fonctionnelles et comportementales sur l'implication des ReRh dans diverses fonctions cognitives. Le fil conducteur de ces travaux repose sur l'idée que ces noyaux sont capables d'influencer l'activité de l'HIP ([Wouterlood et al., 1990](#); [Dolleman-Van der Weel et al., 1997](#)), du CPFm ([Di Prisco and Vertes, 2006](#)), mais également de jouer sur la synchronisation de leur activité commune ([Ferraris et al., 2018](#)). Au laboratoire, notre équipe a précédemment montré que ces noyaux étaient impliqués dans les processus de consolidation systémique, et ce dans diverses tâches de mémoires dépendantes de l'HIP. Loureiro et al. ont d'abord mis en évidence qu'une lésion des noyaux ReRh provoquait un défaut de rappel à 25 jours mais pas à 5 jours après l'acquisition dans une tâche de mémoire spatiale. L'inactivation réversible de ces noyaux juste avant le rappel n'altérait pas les performances des animaux, suggérant un rôle dans la persistance des souvenirs, mais pas dans l'encodage ni le rappel des informations

appries (Loureiro et al., 2012). Ces résultats ont été ensuite reproduits, confirmant l'implication des ReRh dans les processus *offline* de la consolidation systémique d'un souvenir spatial (Ali et al., 2017; Klein et al., 2019). Ces mêmes conclusions ont ensuite été validées dans une tâche de conditionnement de peur au contexte (Quet et al., 2020b).

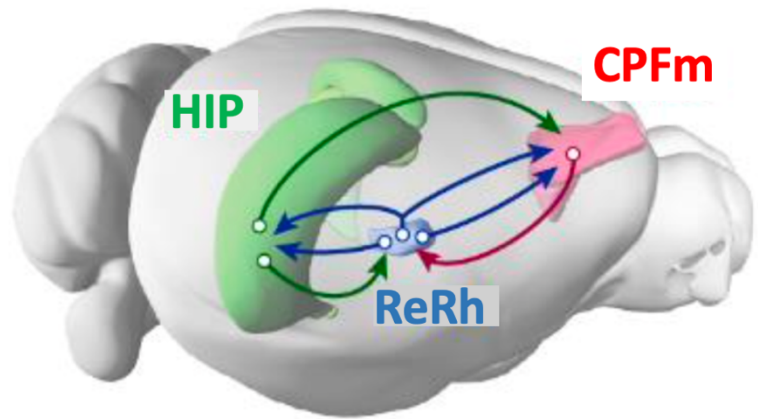


Figure 49. Représentation schématique des connexions au sein du réseau HIP-CPFm-ReRh

De manière intéressante, deux autres tâches, l'une de conditionnement de peur au son et l'autre de transmission sociale de préférence alimentaire, ont également été testées, mais n'ont pas permis de conclure à une implication des noyaux ReRh dans ces derniers paradigmes (Quet et al., 2020a, 2020b). Pris dans leur ensemble, ces travaux mettent en évidence une implication des ReRh spécifiquement dans la consolidation systémique de mémoires hippocampo-dépendantes.

Cette thèse s'inscrit ainsi à la suite de l'ensemble des travaux menés. Elle avait pour objectif d'étudier de manière plus spécifique les différentes voies au sein du circuit **Figure 49**. En effet, les lésions réalisées jusqu'alors ne permettaient pas de distinguer l'implication de l'une ou l'autre voie du circuit comme prédominante, puisque toute communication était rompue (afférences et efférences). Pour contourner ce problème, nous avons réalisé une déconnexion spécifique de la voie cortico-thalamique, représentée en rouge sur la **Figure 49**, et ce grâce à une approche génétique combinant deux constructions virales. Le premier AAV est injecté dans le CPFm. Il contient la caspase-3 floxée, dont l'expression dépend d'une recombinaise. Le second AAV est rétrograde, et contient la Cre associée à une protéine rapportrice fluorescente (GFP). Il est injecté dans les ReRh. La combinaison de ces deux injections va permettre l'induction d'une apoptose spécifique des neurones de projection du CPFm aux ReRh. Nous avons ensuite testé l'impact de cette déconnexion dans la persistance d'un souvenir spatial dans la piscine de Morris, approche comportementale utilisée précédemment au laboratoire et couramment dans la littérature.

II. Limitation dans les choix de l'approche méthodologique : La consolidation systémique, un processus graduel difficile à étudier

Comme nous l'avons vu plus haut, la consolidation est un processus graduel, et qu'on ne peut délimiter clairement dans le temps, si ce n'est à partir de l'encodage et jusqu'au rappel d'une information. De ce fait, le choix de la méthode pour étudier l'implication spécifique d'une voie dans la consolidation systémique devient relativement limité, puisque la plupart des méthodes d'inactivation réversible sont efficaces seulement pendant quelques heures alors que la consolidation systémique se déroule sur plusieurs semaines chez le rongeur.

L'une de ces possibilités aurait pu être l'approche DREADD. Le couplage de deux injections, celle d'un récepteur DREADD Cre-dépendant dans le CPFm et une Cre-rétrograde dans les ReRh, aurait autorisé l'inhibition de la voie cortico-thalamique de manière spécifique. Se pose toutefois la question du moment d'administration du ligand synthétique. Des injections intrapéritonéales de CNO auraient dû être réalisées à répétition, puisque la durée d'action du CNO est de quelques heures seulement (1 à 6h, efficacité maximale 30 min post injection) (Whissell et al., 2016), rendant la manipulation des rats plus que délicate. Une alternative aurait été de dissoudre du CNO dans l'eau de boisson, de sorte à inhiber en permanence les récepteurs DREADD synthétiques (Vetere et al., 2017). Une telle approche est cependant très coûteuse (> 10.000 €, juste pour le CNO pour une expérience comptant 200 rats). Cependant, l'utilisation de nouveaux ligands comme le DCZ ou deschloroclozapine un ligand d'une grande efficacité et moins coûteux rend cette approche attractive (Nagai et al., 2020)

A. Avantages et limites de l'approche de déconnexion

L'approche que nous avons choisi d'utiliser afin de léser spécifiquement la voie cortico-thalamique repose sur la combinaison de deux injections virales. La 1ère construction virale permet d'injecter la caspase-3 floxée dans la structure cible des voies de projection, le CPFm dans notre cas, sous le contrôle d'un virus adénoassocié recombinant. Puis la 2e construction virale apporte la recombinaise au niveau des corps cellulaires des neurones de projection dans les ReRh. La combinaison de ces deux injections induit une apoptose des neurones de projection du CPFm aux ReRh.

L'un des avantages premiers repose sur l'utilisation des AAV comme méthode d'apport de la Cre et de la caspase. Décrits comme peu ou pas toxiques (Tenenbaum et al., 2004; Kotterman and Schaffer, 2014), ils permettent surtout de cibler précisément une région cérébrale, grâce à l'utilisation d'un promoteur spécifique, qui dans la construction virale peut cibler une catégorie cellulaire particulière. Aussi, le choix du sérotype (de 1 à 11) permet d'être plus ou moins adapté à différentes régions cérébrales. Les différents sérotypes sont classifiés selon les protéines présentes sur la capsid du virus ; le niveau d'interaction entre les protéines de cette capsid et celles de la membrane varient d'une région cérébrale à l'autre (Aschauer et al., 2013). Grâce à de précédentes expériences, il aurait été idéal dans notre cas d'utiliser un AAV8 pour cibler les ReRh, puisque ce sérotype présente une affinité toute particulière avec les ReRh, sans infecter les noyaux adjacents, comme les noyaux submédiants (Quet et al., 2020b) (Figure 50).

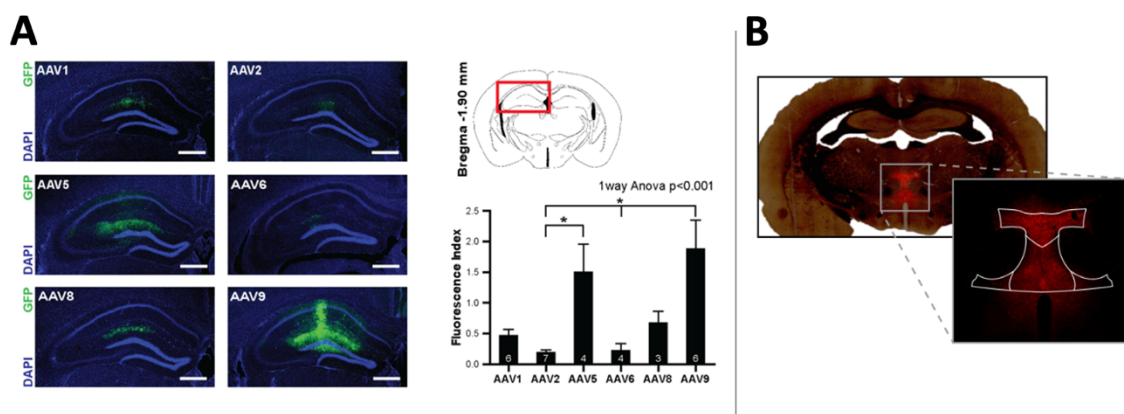


Figure 50. Expression de différents AAVs selon leur sérotype.

A. Représentation de l'expression de différents AAVs dans l'HIP de souris, dépendamment de leur sérotype, issu d'Aschauer et al, 2013 B. Représentation du tropisme particulier de l'AAV8 pour les ReRh, issu de Quet et al 2020b

Dans notre cas, le choix du sérotype nous était imposé par la nécessité d'utiliser un virus rétrograde, le but étant de transporter la Cre depuis les terminaisons des ReRh vers les corps cellulaires des neurones du CPFm.

Aussi, la présence d'un rapporteur fluorescent permet d'une part de vérifier la bonne localisation et la diffusion des injections. Cependant, la petite taille du génome des AAVs (4,8 Kb), n'a pas permis l'inclusion d'un rapporteur fluorescent dans l'AAV-Caspase, la caspase

étant une enzyme de grande taille, rendant impossible la visualisation et délimitation de son périmètre d'action.

La limite principale de notre approche repose sur sa relative récence, et de ce fait, sur le peu d'études ayant utilisé ces mêmes vecteurs viraux en combinaison. Plusieurs études décrivant l'utilisation de l'AAV-Caspase ont eu recours à des souris génétiquement modifiées exprimant la Cre dans certaines régions cérébrales spécifiques, ou certaines sous-populations neuronales, pour induire une lésion spécifique, non pas d'une voie de projection, mais d'une population neuronale cible (Yang et al., 2013; Bao et al., 2017; Basting et al., 2018; Rigney et al., 2019; Nadel et al., 2020). Par exemple, le papier princeps de Yang et collaborateurs a étudié l'ablation sélective des neurones exprimant des récepteurs à la progestérone dans l'hypothalamus ventromédian, sur des comportements « sexe-spécifique ». Les seules études ayant utilisé cette technique pour déconnecter des voies de projections entre deux structures cérébrales s'étaient focalisées sur les connexions entre le cerveau antérieur et l'hypothalamus, l'habenula et le tronc cérébral, ou encore le striatum et la partie dorsale du tronc cérébral (Laurent et al., 2017; Marciante et al., 2020; Ruediger and Scanziani, 2020). De ce fait, cette méthode n'avait pas encore été mise au point avec les structures que nous ciblons.

B. L'AAV-Cre rétrograde, toxique pour les neurones ?

La récence de l'approche nous a également mené à un problème inattendu et très peu rapporté dans la littérature, perturbant fortement l'avancée de ce projet. En effet, nous avons remarqué que l'AAV-Cre-GFP causait des pertes neuronales considérables là où il était injecté, ce phénomène étant indépendant de l'injection de l'AAV-Caspase. Nous avons pu mettre cette toxicité en évidence lors de la vérification histologique de la localisation de l'injection dans les ReRh, en réalisant un marquage NeuN, pour délimiter plus facilement les régions situées aux alentours. Ce marquage des neurones, permettant de vérifier l'intégrité du tissu, n'est pas courant dans la littérature, puisque, le plus souvent, seul un marquage DAPI (marquant le noyau des cellules) est réalisé. Le marquage DAPI ne permet pas de mettre en évidence une éventuelle lésion, puisque nous avons montré une massive infiltration gliale la région d'injection, laissant ainsi indétectable la perte neuronale. En effet, les noyaux des neurones disparus sont remplacés par ceux des cellules gliales. A ma connaissance, seules deux études

ont rapporté un phénomène similaire à la suite de l'injection intracérébrale de l'AAV-Cre-GFP, soit dans l'aire tegmentale ventrale (Erben et al., 2022), soit dans la substance noire (Rezai Amin et al., 2019) ce qui suggère que le phénomène que nous avons constaté n'est pas dépendant de la région injectée.

L'étude approfondie de ce phénomène a conduit à la réalisation d'un manuscrit soumis pour publication et présenté en Annexe de cette thèse (voir Annexe n°2, p.***). Ainsi, afin de comprendre la dynamique de la toxicité de l'AAV-Cre-GFP, nous avons quantifié différents paramètres (l'aire de l'infection virale, de la perte neuronale, ou encore de la réponse gliale) après plusieurs délais post-mortem : 1, 2,5, 5 et 10 semaines post-injection. Les résultats nous ont permis de mettre en évidence que ce phénomène de neurotoxicité était progressif, avec une augmentation de la réponse gliale et de la perte neuronale au fil du temps. En réduisant le titre de la solution virale (d'un facteur 4 x), nous avons réussi à réduire drastiquement la toxicité, rendant possible l'utilisation de la technique de déconnexion virale dans notre projet.

Le développement exponentiel de ces approches virales afin de manipuler l'expression de diverses protéines spécifiquement dans une région ou sous population neuronale ne doit pas être considéré comme anodin . Ils doivent faire l'objet d'une vérification approfondie de la toxicité potentielle du virus. De ce fait, il est nécessaire d'être précautionneux et d'impérativement vérifier l'intégrité des régions ciblées, puisque la lecture des résultats peut s'avérer totalement erronée, sans la vérification adéquate ou l'ajout de groupes expérimentaux spécifiques.

C. Pas d'implication de la voie cortico-thalamique dans la persistance d'un souvenir ?

La piscine de Morris est une tâche classiquement utilisée pour étudier la formation et la persistance d'un souvenir spatial chez le rat. Dans cette thèse, nous avons montré qu'une déconnexion de la voie cortico-thalamique avant l'acquisition d'un souvenir spatial ne semble pas interférer avec la consolidation d'un souvenir spatial, puisque les rats sont capables d'apprendre et de rappeler la position de la plateforme de manière similaire à celle des contrôles.

Il est important de rappeler que l'interprétation de nos résultats ne peut être définitive, puisqu'une quantification des neurones rétro-marqués dans le CPFm est encore en cours. Cette quantification pourra apporter plusieurs réponses. D'une part, la comparaison entre les groupes Déco-CT et Ctrl Cre permettra d'estimer le taux de perte de neurones chez les Déco-CT. La comparaison entre les groupes Ctrl Cre et Ctrl Casp servira à valider le fait que l'AAV-Caspase n'a pas induit de lésion neuronale non spécifique. Pour rappel, le gène de la caspase n'est pas visualisable en tant que tel, et ne devrait pas s'exprimer sans l'association d'une recombinaison. Néanmoins la comparaison entre ces deux groupes contrôle n'est pas idéale, et sera à interpréter prudemment puisque, bien qu'ils aient le même sérotype rétrograde, les virus injectés dans le ReRh sont différents. L'un engendre l'expression de la GFP de manière cytoplasmique (AAV-GFP, groupe Ctrl Casp), tandis que l'autre est nucléaire (AAV-Cre-GFP). Cette différence influence directement la qualité de la quantification, puisque celle-ci dépend du contraste entre le marquage (GFP+ dans les neurones) et le bruit de fond. Le marquage des fibres avec l'AAV-GFP rend bien plus difficile la caractérisation précise du marquage (amas de fibres ou neurones).

Au vu de la complexité de l'approche utilisée, et surtout de l'aspect encore préliminaire de nos résultats, nous ne pouvons exclure que la voie cortico-thalamique soit impliquée dans la consolidation systémique d'un souvenir spatial.

D. Efficacité de la déconnexion.

La première question que l'on peut se poser concerne l'efficacité de la déconnexion. Quel pourcentage de la voie du CPFm aux ReRh avons-nous réussi à léser ? Cette question reste malheureusement sans réponse puisque le nombre total de neurones composant cette voie n'est pas connu, ce qui n'est pas le cas de la voie inverse. En effet, Hoover et Vertes en 2012 ont publié une étude détaillée du nombre de neurones comptabilisés dans les ReRh à la suite d'injection de traceurs rétrogrades fluorescents dans le CPFm, mais aussi dans l'HIP. A la suite de leur injection dans le CPFm, ils indiquent en moyenne, sur 6 coupes, un total de 1160 neurones (Hoover and Vertes, 2012). Une étude similaire sur la voie thalamo-corticale serait nécessaire pour pouvoir estimer l'efficacité de la déconnexion dans nos conditions expérimentales.

E. Plasticité et réorganisation cérébrale

Le second point d'interrogation repose sur une éventuelle réorganisation des circuits cérébraux à la suite de notre déconnexion. La capacité du cerveau à être plastique a pu favoriser la mise en place de mécanismes de compensation et ou de réorganisations fonctionnelles de l'ensemble du circuit (Hylin et al., 2017).

L'un des candidats les plus probables de cette réorganisation est le cortex entorhinal (EC). En particulier, le Re projette au EC, qui lui-même projette à l'HIP (Vertes, 2006; Witter et al., 2017), et leurs terminaisons se superposent au sein de la *stratum lacunosum moleculare* dans CA1 (Herkenham, 1978; Wouterlood et al., 1990; Dolleman-Van Der Weel et al., 1994; Vertes, 2006). L'un comme l'autre sont également capables de moduler l'excitabilité de l'HIP, en agissant sur les cellules pyramidales et les neurones GABAergiques. De plus, la combinaison de leur activation induit une facilitation dans CA1 (Zhang and Bertram, 2002; Dolleman-van der Weel et al., 2017; Vu et al., 2020).

Le EC reçoit également des projections du CPFm (Apergis-Schoute et al., 2006; Agster and Burwell, 2009; Witter et al., 2017), et comme le Re, le EC est impliqué dans la consolidation de souvenirs hippocampo-dépendants (Remondes and Schuman, 2004). Ensembles, les neurones du CPFm, du Re et du EC sont synchronisés avec les ondes lentes (Isomura et al., 2006, 2006; Ferraris et al., 2018; Clawson et al., 2019; Hauer et al., 2019). L'ensemble de ces observations tend à renforcer l'idée d'un réseau adapté pour intervenir dans et moduler les différentes oscillations cérébrales pendant le sommeil à ondes lentes, une période cruciale pour la consolidation systémique (Ferraris et al., 2021).

Un autre candidat à cette réorganisation pourrait également être l'amygdale (BLA), puisqu'elle est connectée de façon réciproque au CPFm, à l'HIP et au Re (Herkenham, 1978; Pitkänen et al., 2000; Petrovich et al., 2001; Gabbott et al., 2002; McKenna and Vertes, 2004; Hoover and Vertes, 2007) , et qu'elle a déjà été décrite pour agir sur l'encodage des souvenirs hippocampo-dépendants (McIntyre et al., 2012). Aussi, au laboratoire, Ali et al. ont montré qu'à la suite d'une lésion excitotoxique des ReRh, une baisse de l'activation du CPFm était associée à une augmentation significative de la BLA lors de la récupération d'un souvenir spatial ancien. Cette hyperactivité induite ou associée à la lésion des ReRh pourrait également contribuer à une altération du processus de consolidation. Dans cette même étude, les

auteurs ont réussi à contrer les déficits de consolidation chez les animaux lésés, grâce à une exposition post-lésion pendant 40 jours à un environnement enrichi. La restauration du souvenir à long terme a été corrélée à un rétablissement de l'activation du CPFm, et à une réduction significative de l'hyperactivité observée dans la BLA. Des données récentes mettent également en lumière une collaboration entre le Re et la BLA dans les processus visant à atténuer les souvenirs de peur consolidés (Silva et al., 2021).

III. La voie cortico-thalamique, un rôle dans les processus mnésiques ?

Lorsque l'on fait référence au traitement de l'information dans le cerveau, il est fréquent de distinguer les processus *online* des processus *offline*. Un exemple concret serait celui des cellules de lieu (p.6). Lorsqu'un animal explore un environnement, des cellules de lieu de l'HIP sont activées sélectivement à différentes positions dans l'espace (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Ces neurones sont ainsi actifs, créant ainsi une certaine séquence d'activité pendant l'exploration : on parle de processus *online*. L'activité de ces cellules de lieu est coordonnée par l'activité de l'ensemble de l'HIP, à savoir les oscillations ou rythmes thêta (~4–10 Hz) (Colgin, 2016). Actifs lors de l'exploration d'un nouvel environnement, on pense que ces rythmes thêta sont impliqués dans l'encodage de nouvelles informations (Colgin, 2013). Lorsque l'animal s'arrête d'explorer, il va retourner à une période d'éveil calme et possiblement s'endormir. Les oscillations thêta et gamma vont ainsi diminuer et laisser place à d'autres types d'oscillations telles que les ondes lentes ou les sharp-wave-ripples. Pendant ces périodes de repos, et donc a posteriori du comportement, la réactivation des séquences d'activité des cellules de lieu, vont permettre le maintien et à la consolidation des souvenirs à long terme (Buzsáki, 1989). On parle alors de processus *offline* (Milstein et al., 2023)

Le CPFm est impliqué dans les fonctions exécutives, qui comprennent la prise de décision, la planification et l'organisation d'une action orientée vers un but (rev Dalley et al., 2004), et il a été montré que cette structure est essentielle pour la flexibilité comportementale et la capacité à changer de stratégie pour adapter au mieux le comportement au contexte (Ragozzino et al., 2003). De ce fait, il est possible d'imaginer préférentiellement une implication de cette voie cortico-thalamique dans le traitement immédiat, *online*, de l'information, plutôt que dans ceux en lien avec les processus *offline*.

Par exemple, cette voie a déjà été étudiée par Xu et Sudhof en 2013. Dans un protocole de conditionnement de peur au contexte, ils ont montré que l'inactivation spécifique des neurones du CPFm projetant vers le Re (induite par l'expression de la toxine tétanique), provoquait une surgénéralisation de la peur au contexte à un délai court post-apprentissage (24h) ; les souris expriment alors une peur dans un contexte dégradé, indiquant une perte de spécificité du souvenir. Ces résultats indiquent que les neurones du Re sont capables de réguler l'activité de l'HIP et du CPFm au cours de l'acquisition d'un conditionnement de peur au contexte (processus online). Ensuite, grâce à une approche optogénétique, ces auteurs ont montré que l'activité des neurones Re durant la phase d'acquisition définissait le niveau de spécificité avec lequel le conditionnement de peur au contexte serait consolidé à long terme. Différentes stimulations, toniques (4 Hz continu) ou phasiques (30 Hz durant 0,5 sec toutes les 5 sec), durant le conditionnement de peur, permettait de définir la spécificité du souvenir encodé. La stimulation phasique générait une augmentation de l'immobilité comportementale dans un contexte dégradé, indiquant une perte de spécificité, tandis que la stimulation tonique induisait une réduction de l'immobilité comportementale dans ce même contexte, signe de l'augmentation de la spécificité du souvenir. Ainsi, l'activité du Re durant l'acquisition détermine le niveau de détail avec lequel le souvenir est encodé et consolidé à long terme (Xu and Südhof, 2013).

Ces résultats peuvent être mis en regard avec d'autres résultats non publiés issus de notre laboratoire. Nous avons testé, à la suite de la déconnexion CPFm→ReRh, la capacité des animaux à réaliser une tâche de flexibilité comportementale dans le Double-H, tâche fortement dépendante de l'activité du CPFm et de l'HIP. Les résultats indiquent que les rats sont incapables de changer leur stratégie, lorsque leur voie cortico-thalamique est déconnectée, par comparaison aux contrôles. Ces résultats étaieraient l'idée de l'implication de la voie dans les processus *online* de traitement de l'information, puisque cette notion de flexibilité est mesurable et strictement nécessaire pendant la réalisation de la tâche.

A. Comment expliquer cette dichotomie entre processus online et offline?

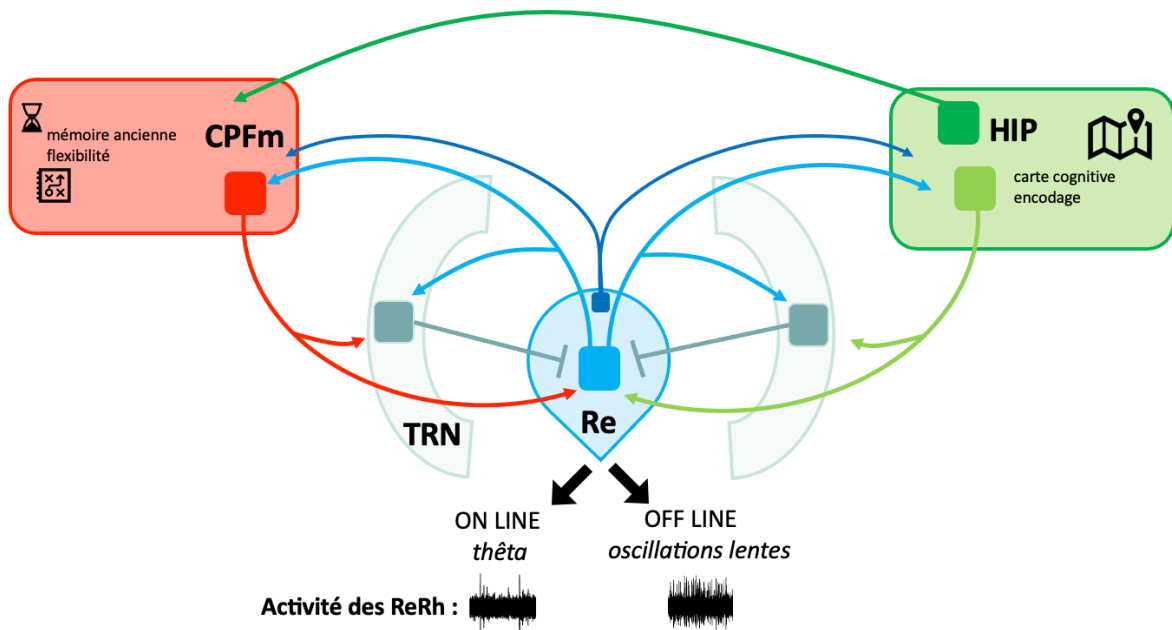


Figure 51. Schéma hypothétique du fonctionnement des ReRh au sein du circuit hippocampo-cortico-thalamique, modifié de Cassel et Pereira de Vasconcelos, 2015

Imaginons un fonctionnement hypothétique de l'activité des ReRh dans deux situations (processus online versus offline), et ce en lien avec le noyau réticulaire thalamique TRN. Dans le cadre de notre projet, c'est la voie cortico-thalamique, en rouge qui a été déconnectée. De ce fait, les collatérales du CPFm vers le TRN le sont également. Cette déconnexion a plusieurs effets ; i) un « arrêt » de l'excitation apportée par le CPFm, et ii) une levée de l'inhibition provenant du TRN. Ces deux modifications au sein du circuit pourrait, *in fine*, ne pas modifier l'activité du Re en tant que telle, puisque le manque d'activation en provenance du CPFm pourrait être compensé par une baisse de l'inhibition par le TRN. Le TRN est décrit comme ayant un contrôle inhibiteur relativement faible, dont l'action principale est d'agir sur la magnitude de l'input cortical, sans en modifier son contenu. Il est donc à même d'agir sur l'amplification du signal émis par le cortex, sans en modifier le fond (Halassa and Acsády, 2016). De plus, Zimmerman et Grace ont montré en 2018, que l'inhibition pharmacogénétique de la voie entre le cortex infralimbique du CPFm vers les ReRh menait à une augmentation de la décharge des neurones du Re, suggérant un possible contrôle du CPFm sur l'activité tonique du Re. De ce fait, on peut penser que la déconnexion cortico-thalamique empêcherait, d'une

part le CPFm d'envoyer des informations/un feedback vers les ReRh et ainsi de modifier leur activité, et d'autre part le TRN de moduler la magnitude de l'information corticale. Ainsi, l'adaptation du Re dans les processus *online* devient impossible. (Zimmerman and Grace, 2018).

Les résultats obtenus en Double-H énoncés juste avant, (non publiés), confirmeraient cette hypothèse, puisque la voie cortico-thalamique est indispensable à la réalisation d'une tâche de flexibilité comportementale. En effet, des rats déco-CT, ne sont pas capables de modifier leur stratégie de navigation en réponse à un feedback négatif dans un labyrinthe en Double-H. Ils devraient passer d'une stratégie égocentrée à une stratégie allocentrée, dépendante de l'HIP, mais n'en sont plus capables. L'activité des ReRh en l'absence de feedback du CPFm, 'responsable' de la prise de décision/flexibilité, ne serait plus à même d'informer l'HIP de la nécessité de changer de stratégie. D'un point de vue neuroanatomique, les terminaisons du CPFm dans le Re joignent directement les neurones qui projettent sur l'HIP (Vertes et al., 2007). A la suite de la déconnexion, ce sont ces terminaisons précisément qui sont abolies.

Quant à la consolidation systémique d'un souvenir spatial, on peut faire l'hypothèse que les informations pourraient tout de même circuler au sein du réseau. En effet, l'HIP, nécessaire lors de l'encodage, va au fur et à mesure de l'apprentissage, pouvoir activer les ReRh par la voie directe hippocampo-thalamique, en vert clair, mais aussi envoyer ces informations au CPFm, directement également (en vert foncé).

Ferraris et al, en 2018 ont grâce à une approche en électrophysiologie, enregistré l'activité des neurones du Re, du CPFm et de l'HIP chez des rats anesthésiés, un état proche de celui du sommeil à ondes lentes. Ils ont démontré que l'HIP et le CPFm étaient couplés grâce à une synchronisations des bursts gamma. Les oscillations gamma permettent la liaison fonctionnelle entre des régions distantes, mécanisme central pour diverses fonctions cognitives. L'inactivation pharmacologique du Re réduisait significativement le nombre de neurones de l'HIP et du CPFm couplés avec les bursts gamma, indiquant que l'activité du Re est capable d'influencer le couplage entre l'HIP et le CPFm (Ferraris et al., 2018). De plus, la même équipe a décrit un peu plus tard, que l'activité du Re précédait systématiquement celle du CPFm, mais pas toujours celle de l'HIP, suggérant que le Re serait capable de diriger l'activité des neurones du CPFm (Angulo-Garcia et al., 2020). Aussi, Hauer et al, en 2019, ont

décrit une activité phase-dépendante des neurones du Re. Lors d'une activité oscillatoire thêta, les neurones du Re présentaient des patterns de décharge à haute fréquence, de manière tonique. A l'inverse, lors des ondes lentes, présentaient un profil plus lent, avec des *bursts* rythmiques, couplés aux ondes lentes. Afin d'évaluer une relation de causalité entre l'activité du Re et la coordination du CPFm et de l'HIP, les auteurs ont fait exprimer un récepteur DREADD inhibiteur dans le Re. Cette inhibition a entraîné une dégradation considérable de la synchronie entre l'HIP et le CPFm (Hauer et al., 2019).

L'ensemble de ces résultats coïncideraient ainsi avec les hypothèses énoncées plus haut. Ainsi, même en l'absence de la voie cortico-thalamique, le Re serait toujours capable de coupler l'HIP et le CPFm, puisque ses efférences (en bleu sur le schéma Figure 51) sont intactes, tout comme, ses collatérales (en bleu foncé) projetant à la fois vers l'HIP et le CPFm, qui pourraient jouer un rôle central dans ces processus de consolidation systémique (Varela 2014). De plus, la voie du CPFm au EC pourrait alors également participer au processus de consolidation, comme cela a déjà été mis en évidence (Remondes and Schuman, 2004), d'autant plus que les neurones du CPFm projetant aux ReRh ou bien au EC sont deux populations distinctes (Schlecht et al., 2022).

Ces hypothèses restent à être validées, mais proposent ainsi deux « modes de fonctionnement » des ReRh. Le premier engagerait une activité à haute fréquence, spécifique à la réalisation de processus *online*. L'autre reposerait davantage sur une activité plus lente des neurones, mais couplée aux oscillations lentes, et serait associée aux processus *offline*, comme la consolidation systémique. Ces hypothèses déconstruiraient ainsi l'idée du circuit HIP-CPFm-ReRh comme une simple boucle nécessitant un circuit fermé pour fonctionner, mais reflèteraient plutôt celle d'un circuit dynamique, où les ReRh se verraient différemment impliqués en fonction du type de processus / de tâche en cours. Enfin, il faut tout de même garder à l'esprit que l'HIP, le CPFm et le Re représentent trois structures clés, mais intégrées dans un réseau beaucoup plus complexe.

IV. Perspectives

Plusieurs perspectives à court ou long terme sont ouvertes par ces travaux. Si l'on considère des perspectives à court terme, il serait intéressant de caractériser la neurochimie de la voie cortico-thalamique, qui pour l'instant, est décrite comme exclusivement excitatrice (Bokor et al, 2002).

Pour cela, il s'agirait de réaliser différents marquages immunohistochimiques, correspondant aux cibles d'intérêt sur les coupes de CPFm, et d'analyser ensuite le co-marquage entre les protéines testées, et les neurones GFP+. Par exemple, des marquages de la tyrosine hydroxylase (enzyme de biosynthèse de la dopamine) pourrait être envisagée car la plus forte densité d'innervation dopaminergique se trouve dans la partie ventrale du CPFm (Tassin et al., 1978). Aussi, la choline acétyltransférase (l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'acétylcholine) pourrait être ciblée, puisqu'une augmentation de la transmission de l'acétylcholine dans le CPFm est associée à de meilleurs performances mnésiques (Heidbreder and Groenewegen, 2003).

L'autre possibilité serait d'analyser la composition en neurotransmetteurs des neurones cortico-thalamiques, par hybridation in situ, une technique récemment mise au point dans notre équipe au laboratoire. Ces perspectives ouvriraient la possibilité ensuite de cibler des populations neuronales spécifiques grâce à l'utilisation de constructions virales contenant des promoteurs particuliers.

Si l'on s'intéresse aux perspectives à plus long terme de ce projet, elles reposent, comme énoncé plus haut, sur la meilleure caractérisation du circuit hippocampo-cortico-thalamique et son rôle dans la consolidation systémique. La question porte alors sur le comment, quand et où les noyaux ReRh contribuent à la persistance de la mémoire, et comment ils orchestrent l'échange d'informations entre l'HIP et le CPFm. La première étape serait d'étudier les autres voies de ce circuit (Hip → ReRh ; ReRh → Hip ; ReRh → CPFm), afin de comprendre le rôle que peuvent jouer chacune d'entre elle, et savoir si l'une ou toutes sont indispensables à la consolidation d'un souvenir spatial. En continuant le cheminement formulé plus haut (p.146) on pourrait s'attendre à une altération de la consolidation lors des déconnexions ReRh → HIP et ReRh → CPFm, puisqu'elles mèneraient dans les deux cas à une lésion des collatérales vers l'HIP et le CPFm.

Il serait particulièrement intéressant de déconnecter spécifiquement les neurones des ReRh qui envoient des collatérales à la fois vers le CPFm et l'Hip (8-10 % des neurones du ReRh), puisqu'ils possèdent une position idéale pour envoyer des informations de manière à coordonner à ces deux structures (Varela 2014).

Une autre perspective serait de s'interroger sur la dynamique temporelle de l'implication des ReRh dans la consolidation systémique. Des lésions permanentes des ReRh perturbent la consolidation systémique du souvenir spatial, sans altérer les performances d'apprentissage (Loureiro et al., 2012; Klein et al., 2019). Il serait ainsi intéressant de déterminer la ou les fenêtres temporelles déterminantes du rôle des ReRh dans la consolidation systémique, sans exclure une implication possible à un stade très précoce de la consolidation. En effet, Cholvin et al. 2018 ont montré qu'une lésion des ReRh pouvait altérer la stabilité spatiale des cellules de lieux CA1, ce qui, par d'éventuelles interférences avec les mécanismes d'encodage, pourrait *in fine* contribuer aux déficits de mémoire à long terme observés par Loureiro et al (Cholvin et al., 2018). Cette hypothèse est soutenue par la mise en évidence que des mécanismes de marquage précoce (« *tagging* ») des neurones corticaux pendant l'encodage, sont nécessaires à la formation d'une trace mnésique durable (Lesburgueres et al., 2011; Bero et al., 2014; Rogerson et al., 2014). Une approche DREADD utilisant le ligand dans l'eau de boisson (ex DCZ) permettrait ainsi de tester cette hypothèse et d'inhiber les ReRh pendant une période précoce (jour 1 à jour 12 post apprentissage), ou tardive (jour 13 à jour 25) de la consolidation systémique.

Enfin, pour progresser dans la caractérisation des mécanismes par lesquels les ReRh pourrait participer à la consolidation systémique, il serait nécessaire de coupler des approches électrophysiologiques et comportementales. Si le rôle du Re dans la synchronisation entre l'HIP et le CPFm a pu être mis en évidence (Ferraris et al., 2018; Hauer et al., 2019; Angulo-Garcia et al., 2020), ces études n'ont pas testé la persistance du souvenir d'un point de vue comportemental. Ceci permettrait de valider la relation de causalité entre les mécanismes physiologiques et la persistance du souvenir. Récemment, Bozic et al, en 2023, ont testé l'inhibition ou l'activation optogénétique du Re dans une tâche de conditionnement de peur au contexte, et ont enregistré l'activité dans l'HIP et le CPFm. Après avoir mis en évidence une synchronisation entre l'activité du Re avec les ondes lentes du CPFm et les *ripples* hippocampiques, les auteurs ont montré une augmentation de cette synchronisation à la suite

de l'apprentissage. A l'inverse, cette synchronisation s'est vue significativement réduite à la suite d'une privation de sommeil. L'activation ou l'inhibition optogénétique du Re pendant le sommeil à ondes lentes post-acquisition n'a pas entraîné de modifications des performances mnésiques, dans un sens ou dans l'autre (Bozic et al., 2023). De ce fait, le rôle crucial des ReRh come un médiateur du dialogue hippocampo-cortical est bien établi, mais des études supplémentaires seraient nécessaires pour associer un lien de causalité entre la persistance du souvenir et les mécanismes décrits jusqu'alors. C'est en combinant des approches de traçage viral, photométrie à fibres (*fiber photometry* en anglais), et optogénétique, que Silva et al ont décrit l'implication de la voie du Re a la BLA dans l'extinction d'une peur conditionnée (pour détail voir paragraphe introduction (Silva et al., 2021))

V. Conclusion

Le fil conducteur de cette thèse repose sur le circuit hippocampo-cortico-thalamique, et son lien avec les processus mnésiques. Le but de cette thèse était de progresser dans la compréhension de la dynamique qui sous-tend la mémoire de travail ainsi que la persistance des souvenirs spatiaux.

Un premier projet avait pour but d'élucider un aspect autour duquel la littérature était divergente, celle d'une implication des ReRh dans un **processus *online*** du traitement de l'information, particulièrement dans le maintien à court terme d'une information spatiale. De ce fait, nous avons questionné le rôle des ReRh pendant le déroulement d'une tâche de mémoire spatiale de travail, afin de préciser la participation éventuelle des ReRh à des processus d'encodage, de maintien, et/ou d'utilisation de l'information. Pour ce faire, nous avons développé une tâche dans un labyrinthe aquatique en utilisant un long délai post-échantillonnage (6 heures), et nous avons utilisé deux méthodes d'inactivation réversible, l'une impliquant le muscimol, l'autre impliquant une approche pharmacogénétique ayant recours au DREADD. Les résultats montrent que les noyaux ReRh ne contribuent pas à la mémoire de travail spatiale quel que soit le processus ciblé (encodage, maintien, usage de l'information), et ne sont pas nécessaires au codage de l'information spatiale. Néanmoins, une forte corrélation entre la latence pour atteindre la plate-forme après le délai de 6 h et le nombre de neurones c-Fos-positifs dans le Re apparaissent contradictoires avec les résultats comportementaux puisqu'aucune inactivation des ReRh n'a eue d'incidence sur le rappel de

l'information. Cette contradiction pointe vers la nécessité de réaliser des expériences complémentaires, en utilisant des approches d'inactivation aiguë des noyaux ReRh couplées à d'autres tâches, éventuellement non spatiales.

Le second projet s'est lui concentré sur le rôle des ReRh dans la consolidation à l'échelle des systèmes. La consolidation systémique est un processus *offline*, progressif, qui n'est pas clairement délimité dans le temps. Nous avons tenté de déterminer si la voie cortico-thalamique était nécessaire à la persistance d'un souvenir spatial dans la tâche de la piscine de Morris. La lésion spécifique de la voie cortico-thalamique ne semble pas interférer avec la consolidation d'un souvenir spatial, puisque les rats sont capables d'apprendre et de rappeler la position de la plate-forme. Ces résultats sont néanmoins préliminaires, et nécessitent d'être validés histologiquement.

L'ensemble de ces travaux ouvre de nouvelles perspectives d'études pour tenter de percer les mystères du circuit hippocampo-cortico-thalamique impliqué dans la formation de la mémoire à long terme, ainsi que la dynamique au sein de ce circuit qui sous-tend aussi la mémoire à court terme. A plus longue échéance, il s'agit d'entrevoir des perspectives nouvelles dans la lutte contre les déficits de mémoire liés à des traumatismes ou lors de maladies neurodégénératives.

-Annexe 1-

I. Mise au point du protocole de mémoire à long terme en Piscine de Morris

Afin d'étudier le rôle de la voie cortico-thalamique dans les processus de consolidation mnésique, nous avons choisi le test de la piscine de Morris, utilisé au préalable au laboratoire, avec lequel Loureiro et al. (2012) ont démontré l'implication des ReRh dans la consolidation, résultats confirmés par la suite (Ali et al., 2017 ; Klein et al., 2019). Cependant, à mon arrivée au laboratoire en 2020 (stage de Master 2), le protocole utilisé ne permettait plus la mise en place d'un souvenir durable, puisqu'à la suite de l'apprentissage et des 25 jours de délai post-acquisition, les rats contrôles présentaient de piètres performances susceptibles d'indiquer qu'ils n'étaient plus capables de rappeler la position de la PF. Une mise au point du protocole en MLT a donc été de mise.

En effet, le test de la piscine est un test relativement peu stressant pour le rat (l'eau fait partie de son écosystème naturel), et certains auteurs ont d'ailleurs décrit la rétention du souvenir spatial à long terme comme étant assez fragile dans ce test (Sutherland et al., 2001). Ce test est beaucoup moins stressant qu'un protocole de conditionnement de peur au contexte, durant lequel les rats reçoivent des chocs électriques qu'ils associent au contexte dans lequel ces chocs sont délivrés. Ce dernier paradigme permet la mise en place d'une trace mnésique très robuste, à forte charge émotionnelle, et donc nettement plus durable (LaLumière et al., 2017).

Genoux et collaborateurs ont décrit qu'un apprentissage était plus efficace lorsqu'il était distribué dans le temps, on parle d'apprentissage à essais discrets, plutôt que rapprochés ou massés (Genoux et al., 2002). Une mise au point de notre protocole en mémoire à long terme a donc été réalisée en comparant deux protocoles d'acquisition différents ; l'un avec 4 essais **massés** chaque jour, ce qui implique un intervalle inter-essai de 30 secondes (protocole utilisé jusqu'alors), et l'autre avec 4 essais **discrets**, et un intervalle inter-essai de 15 min, et cela lors de chaque jour d'entraînement. La comparaison entre ces deux protocoles (essais massés vs. essais discrets) a été réalisée sur 16 rats naïfs (n=8 dans chaque groupe, massés et discrets) entraînés pendant 8 jours, et suivie de 3 tests de rappels ; à J25, J27 et J29.

Enfin, Lopez et collaborateurs (Lopez et al., 2008) ont décrit l'importance du nombre et de la saillance des indices au sein de la pièce de test au regard de la persistance et de la précision

du souvenir. Nous avons finalement ajouté un indice visuel distal au sein de la pièce, ce qui a contribué à rendre le souvenir plus persistant.

Lors de la phase d'habituation, la distance parcourue pour atteindre la PF, d'abord visible, diminue au fur et à mesure des quatre Essais ($F_{3,42} = 14,85$, $p < 0,0001$), et ceci de la même manière dans tous les Groupes ($F_{1,14} = 4,554$, ns) (**Figure 52A**). Il en va de même pour la

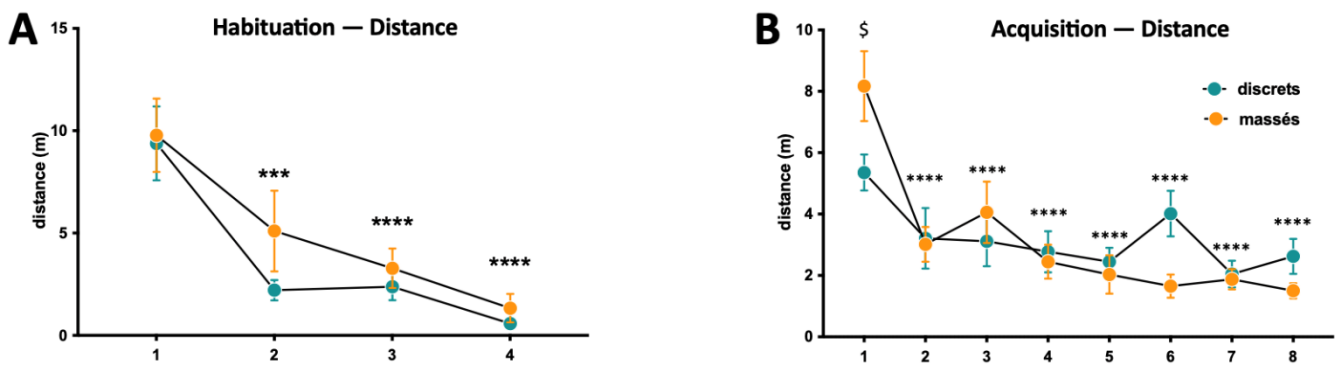


Figure 52. Résultats de l'habituation et acquisition lors de la mise au point

Figure A : Distance (en mètres) parcourue avant de rejoindre la plateforme lors des 4 essais. **B**. Distance (en mètres) moyenne parcourue au fil des 8 jours d'acquisition.
 . Statistiques : § : différence entre les groupes ; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$ différence avec essai 1 en A., différence avec jour 1 en B.

thigmotaxis (non illustrée), qui elle aussi diminue au fil des Essais ($F_{3,42} = 19,72$, $p < 0,0001$), sans différence entre les Groupes ($F_{1,14} = 0,1927$, ns). La vitesse de nage est également équivalente entre les groupes (non illustrée) ($t_{14} = 1,759$, ns).

En résumé, il n'existe pas de différences a priori dans les capacités visuelles ou sensorimotrices des animaux.

Lors de l'acquisition, la distance parcourue pour retrouver la PF immergée diminue de manière progressive au fil des jours. L'analyse de variance à deux facteurs indique un effet Jours ($F_{7,98} = 12,31$, $p < 0,0001$), pas d'effet du Groupe ($F_{1,14} = 0,04882$, ns), mais on note une Interaction entre les 2 facteurs ($F_{7,98} = 2,873$, $p = 0,0090$), (**Figure 52 B**). L'analyse post-hoc de Bonferroni indique que les deux groupes diffèrent uniquement lors du jour 1, les rats du groupe discrets se rendant globalement plus directement à la PF ($p = 0,0319$). On peut supposer que les essais discrets pourraient favoriser une meilleure (ou plus rapide) intégration de l'information en début d'apprentissage.

Ces résultats traduisent un apprentissage de la position de la PF, puisque les performances des animaux s'améliorent au fil des jours, et ce de manière comparable entre les 2 groupes.

Concernant **le test de rappel à J25**, le temps passé dans le quadrant cible NO est significativement supérieur au hasard pour le groupe discrets ($t_7=4,064$, $p=0,0048$), et tend à l'être dans le groupe massés ($t_7=2,059$, $p=0,0784$). Le temps passé dans le quadrant de lâcher NE l'est également pour les deux groupes (discrets $t_7=4,003$, $p=0,0052$; massés $t_7=3,846$, $p=0,0063$)

L'analyse de variance du temps passé dans les différents quadrants indique un effet Quadrant ($F_{3,42} = 34,37$, $p<0,0001$), mais **pas d'effet Groupe** ($F_{1,14} = 1,326$, ns), ni d'Interaction significative entre les 2 facteurs ($F_{3,42} = 1,410$, ns). L'analyse post-hoc à l'aide du test de Bonferroni indique une différence entre la cible NO et les quadrants SO et SE, mais pas avec le quadrant NE. Une nouvelle fois, cette absence de différence pourrait refléter **une confusion entre le quadrant de lâcher NE, et la cible NO, chez les deux groupes expérimentaux**, même si ce résultat semble être plus marqué chez le groupe massé, comme cela apparaît sur la *heat map* **Figure53B**.

Afin de savoir si ce phénomène était propre au quadrant de lâcher NE, nous avons réalisé 2 probes tests supplémentaires, en lâchant les animaux à J27 du quadrant SO, puis à J29 du quadrant SE. Cette étape a également consisté en une extinction du souvenir, nous permettant d'en comparer l'efficacité. En effet, plus la trace d'un souvenir est forte et ancrée en mémoire, plus le processus d'extinction est long (Suzuki et al., 2004).

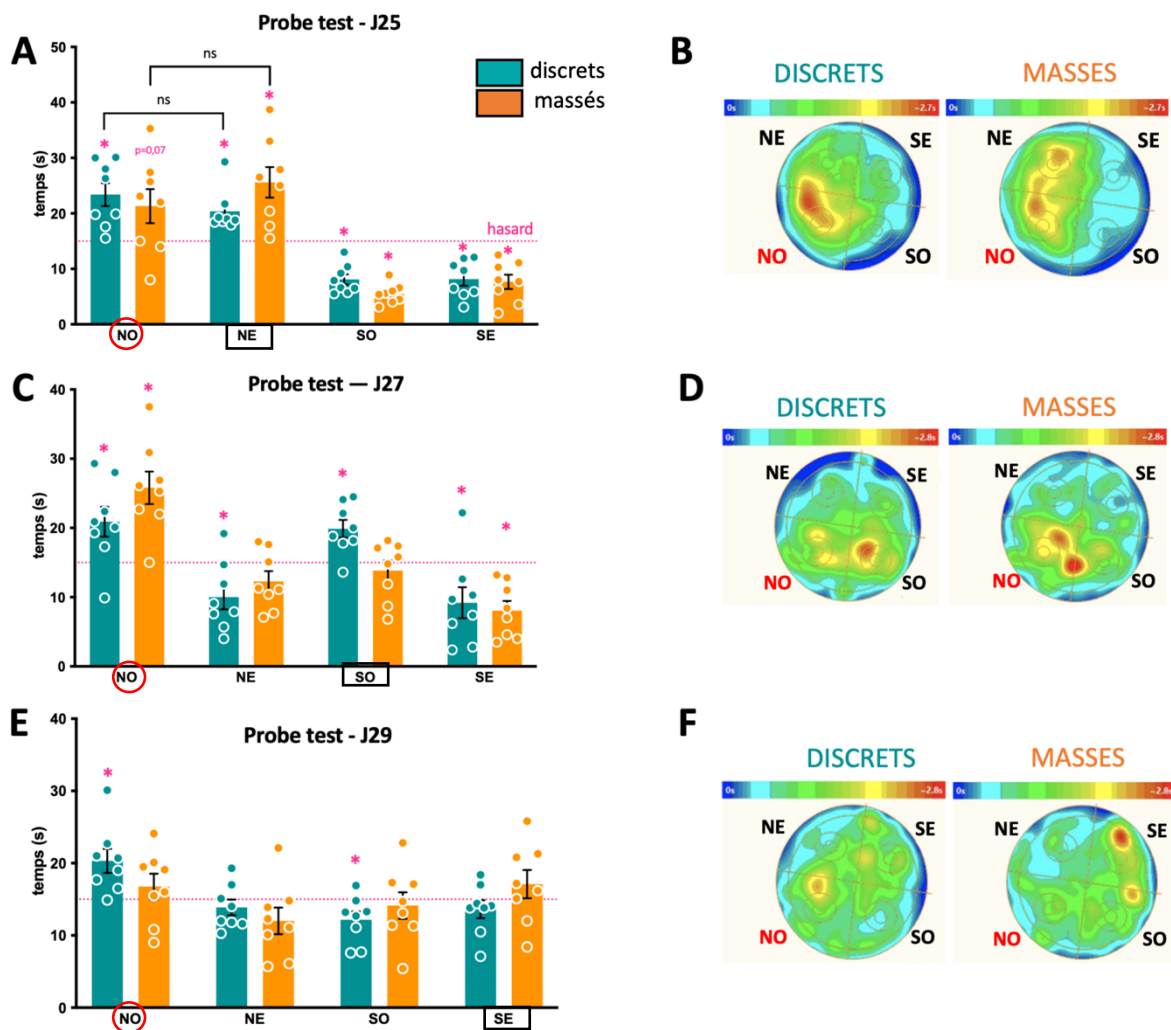


Figure 53. Temps passé dans les différents bras lors des probes tests, et heat map

Figure A. le temps passé dans les différents quadrants lors du probe test à J25 avec un lâcher du NE, et en B. la *heat map* des deux groupes, discrets et massés. C. temps passé dans les différents quadrants lors du probe test à J27 avec un lâcher en SO, et en D. la *heat map* des deux groupes. E. temps passé dans les différents quadrants lors du probe test à J29, avec un lâcher en SE, et en F. la *heat map* des deux groupes. Le quadrant cible correspond toujours à NO (entouré en rouge) et le quadrant de lâcher est encadré.

Statistiques : * différence vis-à-vis du hasard (15 sec)

Concernant le **test de rappel à J27**, le temps passé dans le quadrant cible NO est significativement supérieur au hasard pour le groupe discret ($t_7=2,736$, $p=0,0291$), et aussi pour le groupe massé ($t_7=4,627$, $p=0,0024$). Le temps passé dans le quadrant de lâcher SO l'est également pour le groupe discret ($t_7=3,816$, $p=0,0066$), mais pas pour le groupe massés ($t_7=0,7725$, ns)

L'analyse de variance du temps passé dans les différents quadrants indique un effet Quadrant ($F_{3,42} = 19,56$, $p < 0,0001$), mais **pas d'effet Groupe** ($F_{1,14} = 0,1795$, ns), ni d'Interaction ($F_{3,42} = 2,552$, ns). L'analyse post-hoc grâce au test de Bonferroni indique une différence entre la cible NO et tous les autres quadrants chez le groupe massés. En revanche, chez le groupe discret, il n'y a pas de différence entre la cible NO et quadrant de lâcher SO, visible sur la heat map **Figure 53 D**.

Enfin, lors **du dernier test de rappel à J29**, le temps passé dans le quadrant cible NO est significativement supérieur au hasard pour le groupe discret ($t_7 = 3,296$, $p = 0,0149$), mais ne l'est plus pour le groupe massés ($t_7 = 0,9944$, ns). Le temps passé dans le quadrant de lâcher SE ne diffère pas du hasard, et ce pour les deux groupes. (discrets $t_7 = 1,091$, ns; massés $t_7 = 0,4719$, ns)

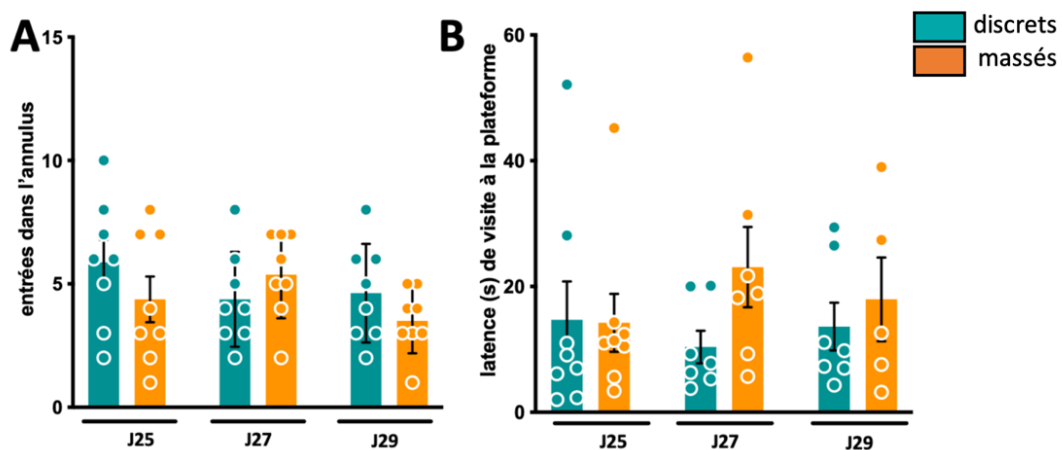


Figure 54. Indices de précision de la mémoire lors des probes test

Figure A. Nombre d'entrée dans l'annulus lors des trois probes tests. B. Latence avant de croiser la position virtuelle de la PF lors des trois probes test. Le groupe discret est en bleu, et massé en orange.

L'analyse de variance du temps passé dans les différents quadrants indique un effet Quadrant ($F_{3,42} = 3,953$, $p = 0,0143$), mais **pas d'effet Groupe** ($F_{1,14} = 0,000$, ns), ni d'effet de l'Interaction ($F_{3,42} = 1,561$, ns). L'analyse post-hoc réalisée à l'aide du test de Bonferroni indique une différence entre la cible NO et les quadrants NE et SO, mais pas lorsque la comparaison est faite avec le quadrant SE.

Enfin, quelques indices de précision de la mémoire ont été analysés. L'analyse du nombre de croisements de l'annulus n'a indiqué **aucun effet entre les Groupes** ($F_{1,14}=0,4294$, ns), tout comme celle de la latence de 1^{ère} visite de la PF ($F_{1,14}=1,448$, ns).

Ces dernières analyses n'orientent pas le choix de l'un ou l'autre des protocoles comme plus efficace pour rendre le souvenir plus fort et précis. Les rats semblent encore incapables de se focaliser sur le quadrant cible lors du probe trial.

Pour finir, nous avons creusé davantage la question de l'impact du point de lâcher sur les performances de rappel. De manière intéressante, nous avons réanalysé les résultats du probe test de la piscine auquel nous avons soumis les rats de la cohorte déconnexion cortico-thalamique. Puisqu'aucun effet n'a été mis en évidence entre les différents groupes (Ctrl Cre, Ctrl Casp et Déco-CT), nous avons regroupé les différents animaux selon leur point de lâcher (NE ou SO), et ainsi regardé le temps passé dans les différents quadrants (**Figure 55**).

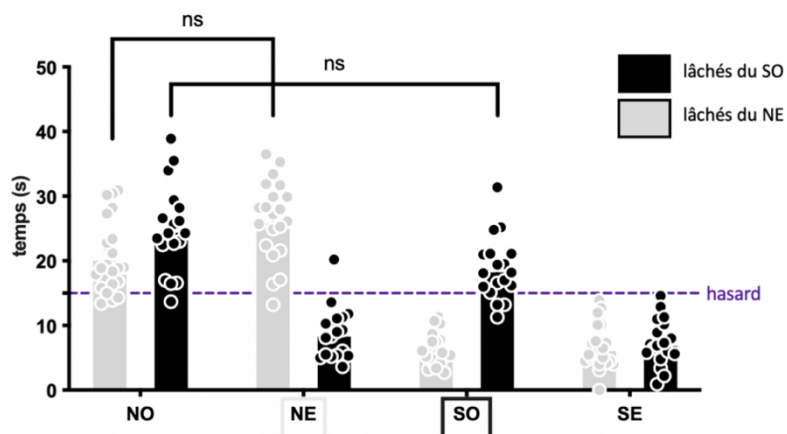


Figure 55. Comparaison de l'effet du point de lâcher avec les résultats de la cohorte 'déconnexion bilatérale', où 2 points de lâcher ont été utilisés, à savoir NE et SO.

Temps passé dans les différents quadrants selon un lâcher du SO en noir (n=18), ou du NE en gris clair (n=21). Le quadrant cible est le NO.

L'analyse de variance du temps passé dans les différents quadrants indique un effet Quadrant ($F_{3,111}=56,71$, $p<0,0001$), pas d'effet Lâcher uniquement ($F_{1,37}=0,5692$, ns) et une Interaction quadrant x lâcher ($F_{3,111}=49,74$, $p<0,0001$). L'analyse post-hoc (test de Bonferroni) indique que les rats lâchés du NE ne distinguent pas la cible NO, par rapport à leur quadrant de lâcher

NE. Il en est de même pour les rats lâchés du SO qui ne distinguent pas la cible NO de leur quadrant de lâcher SO (**Figure e55**). Les rats passent donc davantage de temps dans le quadrant d'où ils sont lâchés, et ce temps ne diffère pas de celui passé dans le quadrant cible. Dans chacun des groupes, les temps passés dans la cible NO (lâcher NE ($t_{20}=4,481$, $p=0,0002$); lâcher SO ($t_{17}=6,476$, $p<0,0001$), mais aussi dans le quadrant de lâcher (lâcher NE ($t_{20}=8,473$, $p<0,0001$); lâcher SO ($t_{17}=3,290$, $p=0,0043$), sont significativement supérieurs au hasard.

La suite de l'analyse post hoc de Bonferroni indique également qu'il n'y a pas de différence significative entre le temps passé en NO selon un lâcher du SO ou du NE.

En conclusion, le point de lâcher n'impacte pas le temps passé dans le quadrant cible, même s'il influence la stratégie de recherche de la PF, notamment en augmentant le temps passé dans le quadrant de lâcher.



Figure 56. Photographie de la pièce de test lors de la mise au point, et après l'ajout de l'indice

La position de la PF est représentée en rouge. L'ajout de cet indice contrastant sur la fenêtre noire a été choisi dans l'idée de favoriser une meilleure distinction par les rats entre le NO du NE.

L'ensemble de ces résultats convergent vers l'idée que l'un ou l'autre des protocoles utilisés (discrets ou massés) n'affecte pas la force du souvenir, puisqu'aucune des analyses réalisées n'a pu mettre en évidence de différence entre les groupes discrets vs massés. Nous avons donc choisi de maintenir notre protocole actuel (essais massés), mais nous avons ajouté un indice visuel dans la pièce, permettant de marquer un contraste visuel plus important sur les indices au Nord de la pièce de test (**Figure 19**). En effet, Lopez et al. (2012) ont décrit l'importance du nombre et de la saillance des indices allothétiques dans la pièce de test, au regard de la persistance et de la précision du souvenir. Aussi, nous avons choisi deux points de lâcher différents NE et SO, équidistants de la position de la PF en NO.

-Annexe 2-

II. Publication soumise : “Disconnecting prefrontal cortical neurons from the ventral midline thalamus : loss of specificity due to progressive neural toxicity of an AAV-Cre in the rat thalamus”

Elodie Panzer^{1,2}, Laurine Boch^{1,2}, Brigitte Cosquer^{1,2}, Iris Grgurina^{1,2}, Anne-Laurence Boutillier^{1,2}, Anne Pereira de Vasconcelos^{1,2,3}, Aline Stephan^{1,2,3,4}, Jean-Christophe Cassel^{1,2,3,4}

¹ Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

² LNCA, UMR 7364 - CNRS, F-67000 Strasbourg, France

³ With equivalent contribution

⁴ To whom correspondence should be addressed :

LNCA – UMR 7364, Faculté de Psychologie, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France

Email : jcassel@unistra.fr

Abstract

The reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei of the thalamus are bidirectionally connected with the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (Hip). Fiber-sparing lesions of ReRh neurons disrupt many cognitive functions, including systemic consolidation of configural memories. As such lesions alter ReRh-mPFC as well as ReRh-Hip pathways, it is impossible to know which pathway contributes to memory persistence. Addressing this issue requires selective, pathway-restricted and direction-specific disconnections. By associating a retrograde adeno-associated virus (AAV) expressing Cre recombinase with an anterograde AAV expressing a Cre-dependent caspase, such disconnection is theoretically feasible. We injected an AAVrg-Cre-GFP into the ReRh nuclei and an AAV5-taCasp into the mPFC. A proportion of mPFC neurons died, but unexpected and ultimately massive neurotoxicity of the AAVrg-Cre-GFP was found in the ReRh, contrasting with normal density of DAPI staining. Other staining demonstrated a progressively increasing density of reactive astrocytes and microglial cells in the site of neurodegeneration. Reducing the viral titer (by a 4-fold dilution + injecting half the volume) reduced toxicity to virtually none; partial disconnection between the mPFC and the ReRh was still observed. We conclude on the imperative need to verify the existence of potential collateral damage inherent in this type of approach and likely to distort the interpretation of the experimental data. It is essential to implement controls in order to distinguish collateral phenotypic effects of the approach from those linked to the desired disconnection. It is also essential to know for how long neurons expressing the Cre-GFP protein remain operational post-infection.

Keywords: Adeno-associated virus – Disconnection – Thalamus – Toxicity – Viral vector

Introduction

Historically, the about 60 nuclei forming the thalamus have been distinguished according to whether their cortical projections concentrate on restricted regions or are diffuse (Lorente de No, 1938). The former were attributed to a *specific* subdivision of the thalamus, the latter to a *non-specific* one, a view that has nevertheless been challenged since then (Bentivoglio et al., 1991; Groenewegen and Berendse, 1994). The reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei are part of the non-specific thalamus; they belong to its ventral midline roofing the third ventricle. The Re projects to – and receives afferents from – more than 50 different brain regions. The Rh also projects to about 50 brain regions, but the regions providing its innervation are more limited in number (e.g., Cassel et al., 2021). Within this rich connectivity network, the ReRh occupy an ideal position in the bidirectional information flow between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the hippocampus (Hip). The Hip provides monosynaptic input to the mPFC (Hoover and Vertes, 2007; Jay and Witter, 1991), which is not the case the other way around (e.g., Vertes, 2004). From mPFC to Hip, signals cross more than one synapse, with a relay in e.g., the entorhinal cortex or the ReRh nuclei (e.g., Xu and Südhof, 2013).

If one is focusing in more detail on this connectivity network, it is to note that the ReRh nuclei have bidirectional connections with both the Hip (more with its ventral than dorsal region and only with CA1 neurons) and the mPFC (i.e., anterior cingulate, infralimbic, prelimbic regions). Furthermore, a small proportion (5-10%) of Re neurons send collaterals to both structures (Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2014). Electrophysiological data demonstrate that the Re produces hippocampo-cortical synchronization of delta, gamma and theta oscillations during a variety of cognitive tasks (Dolleman-van-der-Weel et al., 2019). A decade ago, we found (Loureiro et al., 2012), and later confirmed (Ali et al., 2017; Klein et al., 2019; Quet et al., 2020), that N-methyl-D-aspartate lesions of the ReRh nuclei disrupted remote memory for spatial and contextual information without altering encoding or consolidation of recent memory. These findings demonstrate a contribution of the ReRh to systems-level consolidation and persistence of some types of memories (e.g., Cassel et al., 2013; Ferraris et al., 2021).

In our previous work (Ali et al., 2017; Klein et al., 2019; Loureiro et al., 2012; Quet et al., 2020), the damage disrupted projections from the ReRh to both the mPFC and Hip indistinctly and,

at the same time, removed potentially important targets for projections arising therefrom. Therefore, it is impossible to know if one of these connecting pathways (e.g., from mPFC to ReRh) is more involved in systemic consolidation than another (e.g., from ReRh to HIP or ReRh to mPFC) or, as an alternative, if the whole system operates in a closed loop to support memory persistence. To address such an issue, it would be necessary to perform selective, pathway-restricted and direction-specific disconnections. By associating a retrograde adeno-associated virus (AAV) expressing Cre recombinase with an anterograde AAV expressing a Cre-dependent caspase, such disconnection becomes possible, as shown previously in other brain systems (e.g., Basting et al., 2018; Laurent et al., 2017; Marciante et al., 2020; Nadel et al., 2020; Walker et al., 2022).

In the current study, we started surgeries by using the virus preparations at half the concentration recommended by the supplier (i.e., 2.5×10^{13} GC/mL). AAVrg-Cre-GFP was injected into ReRh nuclei, AAV5-taCasp into medial mPFC. We were able to establish that, at the concentrations used, AAVrg-Cre-GFP caused protracted but ultimately severe neurodegeneration in and around the injection site. In addition, a DAPI staining failed to highlight this lesion because of an important glial infiltration in the area of neuronal loss. The lesion area could be clearly evidenced with an immunostaining of the nuclear neuronal protein NeuN. To the best of our knowledge, this is the first study to provide evidence for AAVrg-Cre-GFP toxicity in the ReRh nuclei. Recent work had shown similar consequences after injections of AAVrg-Cre-GFP in the ventral tegmental area (Erben et al., 2022) or the substantia nigra (Rezai Amin et al., 2019), what, with our results, suggests a region-independent effect.

In the following experiments we aimed to elucidate the dynamic of the neurotoxicity by analyzing the impact of AAVrg-Cre-GFP at different post mortem periods; 1 week, 2.5 weeks, 5 and 10 weeks. We quantified different parameters such as viral infection area, neuronal loss expanse, and glial response. After all, we managed to find appropriate parameters that would permit selective damage to prefrontal neurons projecting to the ReRh.

Experimental procedures

The study encompassed 4 experiments. In the first one, the AAVrg-Cre-GFP was injected into the ReRh at half the titration provided by the supplier. In the second experiment, the effects of the AAVrg-Cre-GFP were followed over 10 weeks, with verifications at 1, 2.5, 5 and 10 weeks post-injection. In the third experiment, we tested different titrations at a single post-infection delay (i.e., 5 weeks). In the fourth experiment, we verified that the combination of the AAV5-taCasp and the AAVrg-Cre-GFP at a non-toxic titration for the ReRh leads to damage in the cortico-thalamic pathway.

Animals

All experimental animals were used in compliance with the rules of the European Community Council Directive (2010/63/EU) and the French Agriculture Ministry. All approaches have been validated by the ethical committee of the University of Strasbourg (CREMEAS—authorizations #13261-2018012918394046). We used 44 adult Long–Evans male rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) weighing between 130 and 250g at their arrival at the laboratory (they were 4 to 7 weeks old). They were housed 2 or 3 per cage in quiet facilities, under a 12-h light/dark cycle (light on at 7:00 a.m.) with food and water ad libitum, controlled temperature (22°C), and a hygrometry of about 55%. Before any experimental manipulation, rats were individually handled for 2min/day over five consecutive days. We used 9 rats for the first experiment (Exp 1: 6 for the mPFC injection and 3 for the ReRh injection); 16 rats for the time-course experiment (Exp 2: 1 week, n = 6; 2.5 weeks, n = 6; 10 weeks, n = 4), 19 rats for testing different titrations (Exp 3: initial titer divided by 4, 8, 20 and 200; T/4, n = 4; T/8, n = 4; T/20, n = 5; T/200, n = 6, respectively). Experiment 4 used the 4 rats of the T/8 group of experiment 3.

Virus

The viral vector carrying the floxed caspase gene was the anterograde AAV5.EF1a.Flex-taCasP3-TEVp (UNC Gene Therapy Center-Vector Core), AAV5-taCasp hereafter. It was diluted twice in PBS from the stock solution ($4,2 \times 10^{12}$ particles/mL). The viral vector carrying the Cre-recombinase gene is the retrograde AAVrg.hSyn.eGFP-Cre-WPRE-SV40 (Addgene, MA, USA), AAVrg-Cre-GFP hereafter. For Exp 1, it was diluted twice in PBS from the stock solution ($2,5 \times 10^{13}$), despite Addgene's recommendation to use the stock solution as is. For precise dilution

see Table 1. This retrograde serotype has been engineered by Tervo et al. (2016) from an AAV2.

Virus	Serotype	Promoter	References (website)	Plasmid	Initial titration (vg/mL)	Used titration (vg/mL)	Injected volume	Figures
AAV-taCasp	5	EF1 α	https://www.med.unc.edu/genetherapy/vectors/in-stock-aav-vectors/shah/	pAAV.EF1a.flex-taCasp3-TEVp.WPRE.hGH	4.2×10^{12}	2.1×10^{12}	Exp. 1 (5WKS): 2 x 0.5 μ L, mPFC (unilat)	Fig. 1
							Exp. 1: 1 μ L, PeriRe (unilat)	Not illustrated
							Exp. 2 (10WKS): 2 x 1 μ L, Hip (unilat)	Not illustrated
							Exp. 2 (1WK + 2.5WKS) + 4: 3 x 0.6 μ L, mPFC (unilat)	Fig. 8
AAV-Cre-GFP	retrograde	hSyn	https://www.addgene.org/105540/	pENN.AAV.hSyn.HI.eGFP-Cre.WPRE.SV40	2.5×10^{13}	2.5×10^{13} (T)	Used for SDS-PAGE gel	Fig. Supp 2
						1.25×10^{13} (T2)	Exp. 1: 2 x 1 μ L, ReRh 2 x 0.5 μ L, mPFC (bilat) Exp. 2	Fig. 2, 3 and Supp 3
						6.25×10^{12} (T4)	Exp. 3: 2 x 0.5 μ L, ReRh	Fig. 7
						3.125×10^{12} (T8)	Exp. 3: 2 x 0.5 μ L, ReRh	Fig. 7
						1.25×10^{12} (T20)	Exp. 3: 2 x 0.5 μ L, ReRh	Fig. 7
						1.25×10^{11} (T200)	Exp. 3: 2 x 0.5 μ L, ReRh	Not illustrated

Table 1: Summary table of viruses used, their characteristics, the initial titer, the injected titers, the injected volumes and the corresponding illustrations. Abbreviations: Exp = experiment; Fig. = Figure; n.i. = not illustrated in the article; Suppl = supplementary; T = titer; wks = weeks (concerns duration of post-injection survival time).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

This electrophoresis has been done in order to verify the purity of our AAVrg-Cre-GFP sample. 5 μ L of AAVrg-Cre-GFP virus (AAVrg.hSyn.eGFP-Cre-WPRE-SV40, Addgene, MA, USA) was mixed with 4X Laemmli buffer (Bio-rad, #1610747), with addition of 1/10 β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, #444203), to obtain a final 1X solution that was heated at 100°C for 4 min. Virus was then loaded on Midi-PROTEAN TGX Stain-Free™ Precast Gel (26 wells, 4–20%, Bio-

Rad #5678095) and left to migrate for 40 minutes, at 150 V. This was followed by a UV-induced 1-min activation of the gel, using a ChemiDoc molecular imager (Bio-Rad), producing fluorescence that allows for visualization of the viral proteins on the gel.

Stereotactic Injections

After one week of acclimatization and another week of manipulation of the rats, the viral vectors were stereotactically injected in the brain. First, rats were anesthetized by Isoflurane (Isoflu-Vet®, Dechra, 4% for induction and 1,5% for maintenance) and placed into the stereotactic frame. Viral injections targeting the ReRh or the mPFC were made using slow microinfusions (over 5 min) via a silicium infusion needle (30G, Phymep). After leaving the needle in situ for an additional 5 min to ensure diffusion of the virus in the target structure, it was slowly retracted. Infusion sites were at following coordinates (in mm): AP - 1.8 and - 2.3 (from bregma), DV -7.1 and -7.2 (from skull), ML 1.9 (from midline of the sagittal sinus) for the ReRh, and AP 3.0, DV -5.0, -3,8 and -2,2, and ML 0,5 and -0,5 (Paxinos and Watson, Seventh Edition, 2018) for the mPFC. For ReRh sites, we used an angle of 15°.

For the volumes injected, see Table 1. After the last infusion, the scalp was sutured. All rats that underwent surgery were allowed to recover under a warm lamp for 20 –30 min before being placed back into their homecage.

Histology

Perfusion and tissue sectioning

All rats were subjected to a lethal dose of ketamine (200mg/kg, i.p.) and xylazine (30mg/kg, i.p.) and perfused transcardially with a cold (4°C) 4% paraformaldehyde (PFA) solution. Brains were removed and transferred to a 20% sucrose solution for 48h at 4°C before being snap frozen (isopentane, -40°C) and stored at -80°C. Serial coronal sections (40µm) were cut through the prefrontal cortex and the midline thalamus using a cryostat at -20° C (Leica CM3050S). The sections were kept floating in a cryoprotective solution at -80° C until being processed for histological staining.

Fluorescent Immunohistochemistry

The localization and extent of the viral infection could be observed directly under a fluorescence microscope, without any immunostaining. However, a NeuN protein immunostaining was performed in order to facilitate the observation of the different brain regions. Some sections were also immunostained for calretinin and calbindin, two neuronal cytoplasmic proteins. Sections were also stained for either GFAP (a marker of astrocytes) or Iba1 (a marker for microglia). Anti-GFP immunostaining was performed in the mPFC.

Every immunostaining was performed on free-floating brain sections evenly distributed along the entire rostro-caudal extent of the ReRh or the mPFC, as previously described (e.g. Klein et al., 2019). Briefly, sections were rinsed three times during 10min in a PBS merthiolate buffer before being soaked for 1h in 5% normal horse serum in PBS containing 0.5% Triton X-100. The sections were then transferred into the primary antibody solution and kept there overnight at room temperature. Then, they were rinsed 3x10 min in PBS, and soaked for 2 hours in a buffer solution containing the secondary antibody. Finally, they were rinsed three times in PBS (the second rinsing contained DAPI to stain cell nuclei) and mounted with Mowiol® (Sigma Aldrich).

All the antibodies used are described in Table 2.

Antibody target	Host species	Source	Reference	Conjugated fluorochrome	Dilution
GFAP	Rabbit	Millipore®	AB5804	None	1/1000
Iba1	Guinea Pig	Synaptic systems	HS-234 004	None	1/500
NeuN	Mouse	Millipore®	MAB377	None	1/1000
Calretinin	Mouse	Swant®	6B3	None	1/1000
Calbindin	Rabbit	Millipore®	ABN2192	None	1/500
Guinea Pig	Goat	Invitrogen™	A21450	Alexa Fluor 647	1/500
Rabbit	Goat	Invitrogen™	A32733	Alexa Fluor 647	1/500
Mouse	Donkey	Invitrogen™	A32744	Alexa Fluor 594	1/1000

Table 2: Methodological precisions about the antibodies used for the various immunostainings performed in our four experiments.

Image acquisition

All images were acquired with Axio Imager (Zeiss), an epifluorescent microscope equipped with a motorized x–y–z stage control. Mosaics were performed using the Zen (Zeiss) software. The same light intensity, and exposure time were used for all sections. Focus was made on the NeuN channel, and parameters were determined according to the strongest signal. Areas of interest in stained sections were taken using a 10x objective.

Quantification

All quantifications were done with the free access software QuPath (e.g., Bankhead et al., 2017; Humphries et al., 2012).

As the immunostainings were not made in a single batch, differences in fluorescence signal were normalized with visualization parameters.

The quantifications were done on 7 to 12 slides (mean: 9.11) per rat for GFP and NeuN, on 3 to 9 slides (mean: 4.58) per rat for Iba1, and on 4 to 8 slides (mean: 4.78) per rat for GFAP. We then calculated the mean of all slides for a single rat, before calculating the mean of all rats of every group.

Area delineation

In order to estimate the extent of the viral infection, neuronal loss, and glial responses, we outlined the associated regions with the “Polygon” tool (see Supplementary Fig. 1). To avoid any bias, we only selected the channel of interest (e.g. : Alexa Fluor 594 for neuronal loss) and outlined the region for every rat of every group (1WK, 2.5WKS, 5WKS, 10WKS) before starting the next channel.

Intensity measurements

The intensity of the GFP fluorescent signal was measured with the “Add intensity features” tool of QuPath, in every viral infection area. The parameters were as follows: Preferred pixel size: 2 μm ; Region: ROI ; Tile diameter: 25 μm ; Channels: GFP ; Basic features: Mean ; Haralick distance: 1 ; Haralick number of bins: 32.0.

Cell density

In order to evaluate the density of the different cell types (neurons, astrocytes, microglia), we used the “Classifier” tool.

We first run the StarDist extension script, which was trained to detect and segment nuclei on a DAPI staining (Weigert et al., 2020).

Once the nuclei were detected, we trained a classifier to sort the nuclei that showed positive to another staining, for example the (DAPI+NeuN)-positive nuclei were sorted as neurons (see Supplementary Fig. 1).

This training was made on 1 slide per rat, by one experimenter per channel, and in shades of grey to facilitate visualization of contrasts. For the reasons mentioned above, we trained a different classifier for every immunostaining batch.

Once the classifier was trained, it was run on the viral infection area of every slide.

Statistical Analyses

Unless otherwise specified and depending on the experiment, data analyses used Student’s t tests or two-way ANOVAs, with repeated measures where appropriate. Likewise, where appropriate, these analyses were completed by multiple comparisons using the Newman–Keuls multiple range test. In the case of non parametric distributions, we used a Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn multiple comparisons test. Homogeneity of variance and normality of distribution were tested systematically. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Experiment 1: Retrograde AAVrg-Cre-GFP injections into the ReRh nuclei combined with intracortical injections of anterograde AAV5-taCasp

We injected $2 \times 1 \mu\text{L}$ of the retrograde AAVrg-Cre-GFP preparation into the ReRh nuclei. The injected solution had a titer of 1.25×10^{13} vg/mL. This is half the titer preconized by Addgene; in the website catalog, the viral solution is presented as to be used in living animals as provided. It is also noteworthy that studies published in the literature have used titers $> 10^{12}$ vg/mL, with injection volumes usually of the μL order (e.g., Cearley and Wolfe, 2007; Chen et al., 2021; Shen et al., 2016, Stewart et al., 2021; see also Erben et al., 2022 regarding the titer). All of our rats injected with the AAVrg-Cre-GFP also received a unilateral injection of the AAV5-

taCasp (2 x 0.5 μ L) into the medial prefrontal cortex (mPFC), using a solution with a titer of 2.1×10^{12} vg/mL. The contralateral side was left unoperated and served as control. The rats were kept for a post-surgical survival time of 5 weeks. Histological observations are illustrated in Figures 1 and 2.

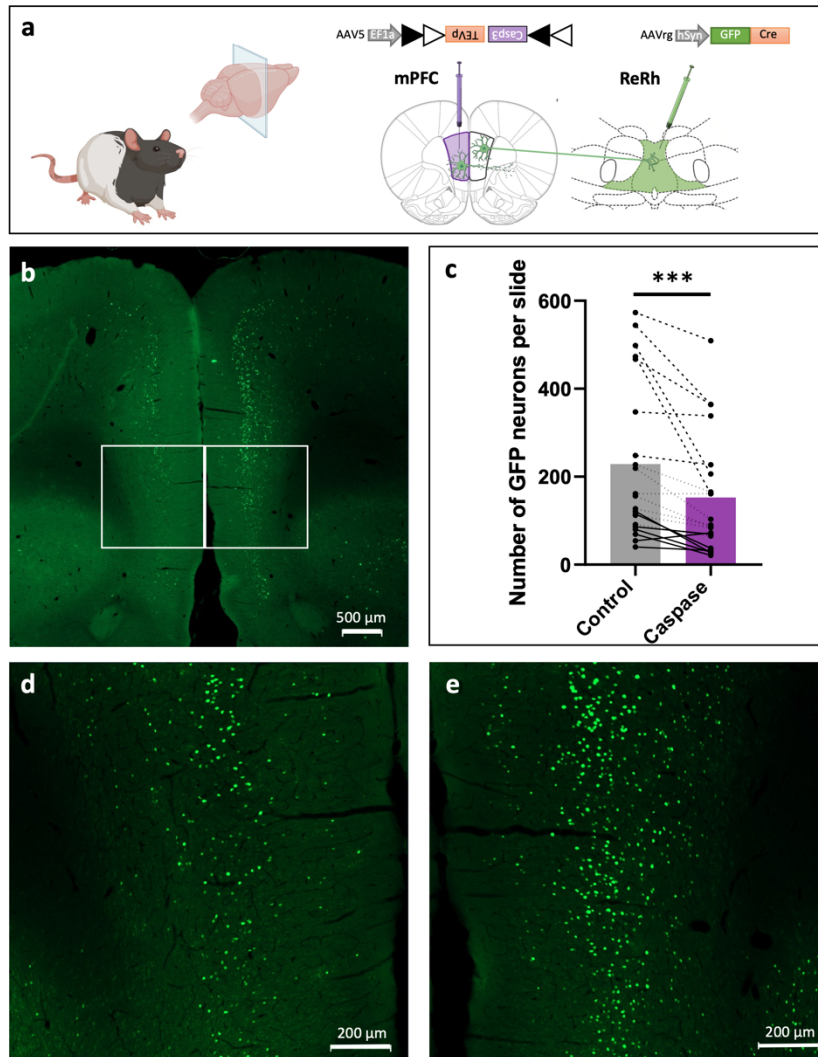


Figure 1: (a) Surgical protocol used in Experiment 1. The AAV containing the floxed caspase gene was injected unilaterally into the medial prefrontal cortex (mPFC) of Long-Evans male rats, which also received an injection into the reuniens and rhomboid (ReRh) nuclei of the virus containing the Cre-GFP gene coding for the fluorescent fusion protein. (b) Image showing GFP-positive neuronal nuclei in the mPFC. (d) and (e) are higher magnifications of the cortical regions delimited by squares in (b); (d) is the side in which the AAV5-taCasp has been injected; the contralateral side (e) is used as the non-injected control. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs. (c) Number of neurons counted on each section prepared from the brain of 3 rats; filled circles joined by solid lines are from one rat, those joined by dashed lines are from another rat, and filled circles from the last rat are joined by stippled lines. The bars show the average value on the side injected with the AAV-taCasp (left) and its contralateral control (right). Statistical analysis: ***, $p < 0.001$.

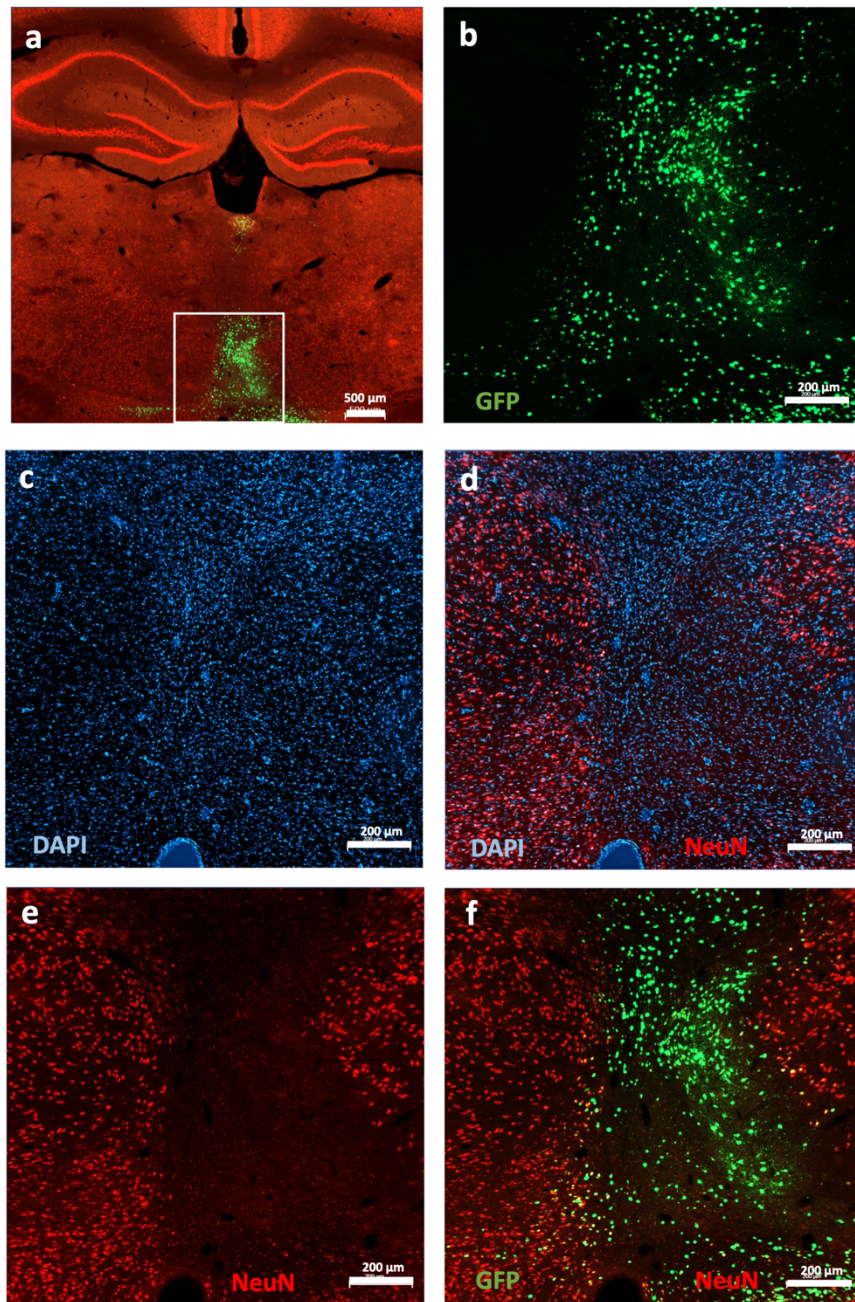


Figure 2: (a) Images showing the localization of the transduction in the ReRh nuclei on a section immunostained for the neuronal nuclear protein NeuN. (b) is a higher magnification of the thalamic region delimited by the square in (a); only GFP staining is shown. (c) same region as in (b) with DAPI staining in the ventral midline thalamus. (d) same region as in (c) with DAPI and NeuN staining merged; notice that there is a DAPI-positive region almost completely devoid of NeuN staining. (e) same region as in (c) and (d), but with only NeuN-positive staining. (f) same region as in (c), (d) and (e) with NeuN and GFP staining merged. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

In the mPFC, we found a reduction of the number of GFP-positive cells on the side in which the AAV5-taCasp had been injected as compared to the contralateral hemisphere (Fig 1). These GFP-positive cells were quantified, and the resulting data analyzed using a t-test for paired samples. On the side injected with the AAV5-taCasp, the number of GFP-positive neurons was reduced by about 40% in average as compared to the opposite hemisphere. Statistical analyses considering the 21 sections from the 3 rats (7 per rat) with correct injections showed that this difference was significant ($t_{(20)} = 5.385$, $p < 0.001$; Fig 1).

In the ventral midline thalamus (VMT), we induced a widespread transduction of the AAVrg-Cre-GFP, as illustrated by the localization of GFP-positive cells within and in the close vicinity of the ReRh nuclei (Fig 2a, 2b). The brain sections through the ventral midline thalamus were processed for DAPI staining and anti-NeuN immunostaining. DAPI staining appeared normal in the region infected with the AAVrg-Cre-GFP (Fig 2c, 2d). Indeed, the stained nuclei showed no abnormal density in comparison with surrounding regions. This infected region, however, was almost completely devoid of NeuN-positive cells (Fig 2d, 2e, 2f), possibly indicating an unexpected loss of neurons. Such loss would point to neuronal toxicity of the AAVrg-Cre-GFP construct.

As we could not exclude that this toxicity might have been related to an alteration of the viral construct, we checked that this construct had not been altered with a sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). It resulted in the separation of all the proteins into three distinct bands corresponding to the three AAV-capsid proteins VP1, VP2 and VP3 (see supplementary Fig 2). The absence of an extra band indicates the absence of any virus contamination. Furthermore, we could not exclude a priori that subsequently to the nuclear production of the fused CreGFP protein, the recognition of NeuN by the anti-NeuN antibody could have been altered (e.g., due to epitope masking). Therefore, we performed additional immunostaining with antibodies raised against either calbindin or calretinin, two calcium-binding proteins expressed by ReRh neurons either separately or conjointly, and characterizing different neuronal subpopulations of this thalamic brain region (Viana et al., 2021). This additional staining confirmed that, in the vicinity of the AAVrg-Cre-GFP injection/transduction site, both single- and dual-labelled cells had almost completely disappeared (see supplementary Fig 3). This observation confirmed that neurons were actually lost.

Were these observations specific to the ventral midline thalamus, which, for unknown reasons, could have shown a particular fragility to the viral infection or the AAV2 serotype? To address this question, we injected 2 x 0.5 μL of AAVrg-Cre-GFP into the medial prefrontal cortex (mPFC) of 6 rats, at a titer of 1.25×10^{13} . After a postsurgical survival time of 5 weeks, we also found evidence for neuronal degeneration in the mPFC (supplementary Fig 4), indicating that the neurotoxicity was apparently not specific to a particular brain region. Again, DAPI staining appeared normal in the region of the mPFC that revealed almost devoid of neurons (not illustrated). The combination of the intrathalamic injection of the AAVrg-Cre-GFP and the intracortical injection of the AAV5-taCasp constructs resulted in damage to mPFC neurons. However, information provided by DAPI and NeuN staining in the ventral midline thalamus appeared paradoxical, what clearly required further investigation.

Experiment 2: Time line of AAV-Cre-GFP effects

Neuronal toxicity

To further our investigation, based on the observations shown in Figure 2, we decided to characterize the effects of the retrograde AAVrg-Cre-GFP at various post-injection delays, with a maximal delay of 10 weeks post-surgery. This second experiment aimed to follow the chronology of the presumed neuronal toxicity of the viral construct. Our hypothesis was that, at shorter delays, toxicity could have been weaker or even absent. Therefore, we injected 2 x 1 μL of the retrograde AAVrg-Cre-GFP preparation into the ReRh nuclei, using the same titration as in experiment 1 (i.e., 1.25×10^{13} vg/mL). As we only focused on the possible toxicity of AAVrg-Cre-GFP, no AAV5-taCasp construct was systematically injected into the prefrontal cortex. The rats were killed at postsurgical delays of 1, 2.5, and 10 weeks. Data are illustrated in Figure 3. Evidence for transduction was found at all post-surgical delays, with an overall picture of fluorescence at 10 weeks post-surgery that was attenuated compared to that observed after 5 weeks in experiment 1 (Fig 3a, 3c, 2b and 3e). At earlier time points (Fig 3a and 3c), the amount of GFP-positive cells in the ventral midline thalamus was clearly larger. Because of these apparent differences, we decided to quantify the extent of the area in which fluorescence was increased in comparison with the background. We also quantified the intensity of the GFP signal (see Experimental procedures) and the density of NeuN-positive nuclei in this area (see supplementary Figure 1). Identical quantifications were performed on the histological material obtained in Experiment 1, thus corresponding to the 5-week post-

surgical delay. Whereas the extent of the area of GFP fluorescence appeared relatively constant across delays, we observed a delay-dependent decrease of the GFP signal intensity: the longer the delay, the weaker this intensity (Fig 3a, 3c, 2b and 3e). In parallel, we observed a progressive decrease of the density of NeuN-positive nuclei in the ventral midline thalamus (Fig 3b, 3d, 2e and 3f). This was confirmed by an analysis of our quantitative data (Fig 4). Regarding the extent of the transduction area, a one-way ANOVA showed no significant Group effect ($F_{(3,15)} = 0.23$, $p = 0.87$). A Kruskal-Wallis (K-W) one-way ANOVA of the intensity of GFP-positive clusters within the transduction limits showed a significant Group effect ($p < 0.001$). Using the Dunn test to perform multiple comparisons, we found the difference between the 1-week and 10-week delays to be significant ($p < 0.002$); the other differences did not reach significance. Regarding the density of NeuN-positive nuclei, the one-way ANOVA showed a significant Group effect ($p < 0.0001$). Multiple comparisons (Newman-Keuls test) showed significant differences between the 10-week and either the 1-week ($p < 0.001$) or the 2.5-week ($p < 0.001$) delays; and between the 5-week and either the 1-week ($p < 0.01$) or the 2.5-week ($p < 0.01$) delays; the difference between 5 and 10 weeks did not reach significance. The extent of the area of neuronal loss (on frontal sections; Fig 4e) as well as the ratio between the area of neuronal loss and the area of viral transduction (Fig 4f) were also quantified. Regarding the former, an ANOVA showed a significant Group effect ($F_{(3,15)} = 45.25$, $p < 0.001$). The following differences were significant: 1 week vs. 5 weeks ($p < 0.001$) and 10 weeks ($p < 0.001$); 2.5 weeks vs. 5 weeks ($p < 0.01$) and 10 weeks ($p < 0.001$); 5 weeks vs. 10 weeks ($p < 0.001$). As to the ratio between both areas, the K-W ANOVA showed a significant Group effect ($p < 0.001$), the only significant difference being between 1 and 10 weeks ($p < 0.01$).

Thus, taken together, these data point to an AAVrg-Cre-GFP that produced a protracted neuronal toxicity ending up, within 10 post-surgical weeks, in an almost complete loss of neurons in the region of transduction. Most of the toxic effects are reached between 2.5 and 5 weeks post-surgery. Again, as in experiment 1, DAPI staining appeared relatively constant, all along (SupplementalFig 5). As the DAPI density was also quantified, we performed a K-W ANOVA that showed a significant Group effect ($p < 0.001$). With the Dunn test, we found the difference between the 10-weeks and either the 1-week ($p < 0.05$) or the 2.5-weeks ($p < 0.05$) delays to be significant; other differences did not reach significance.

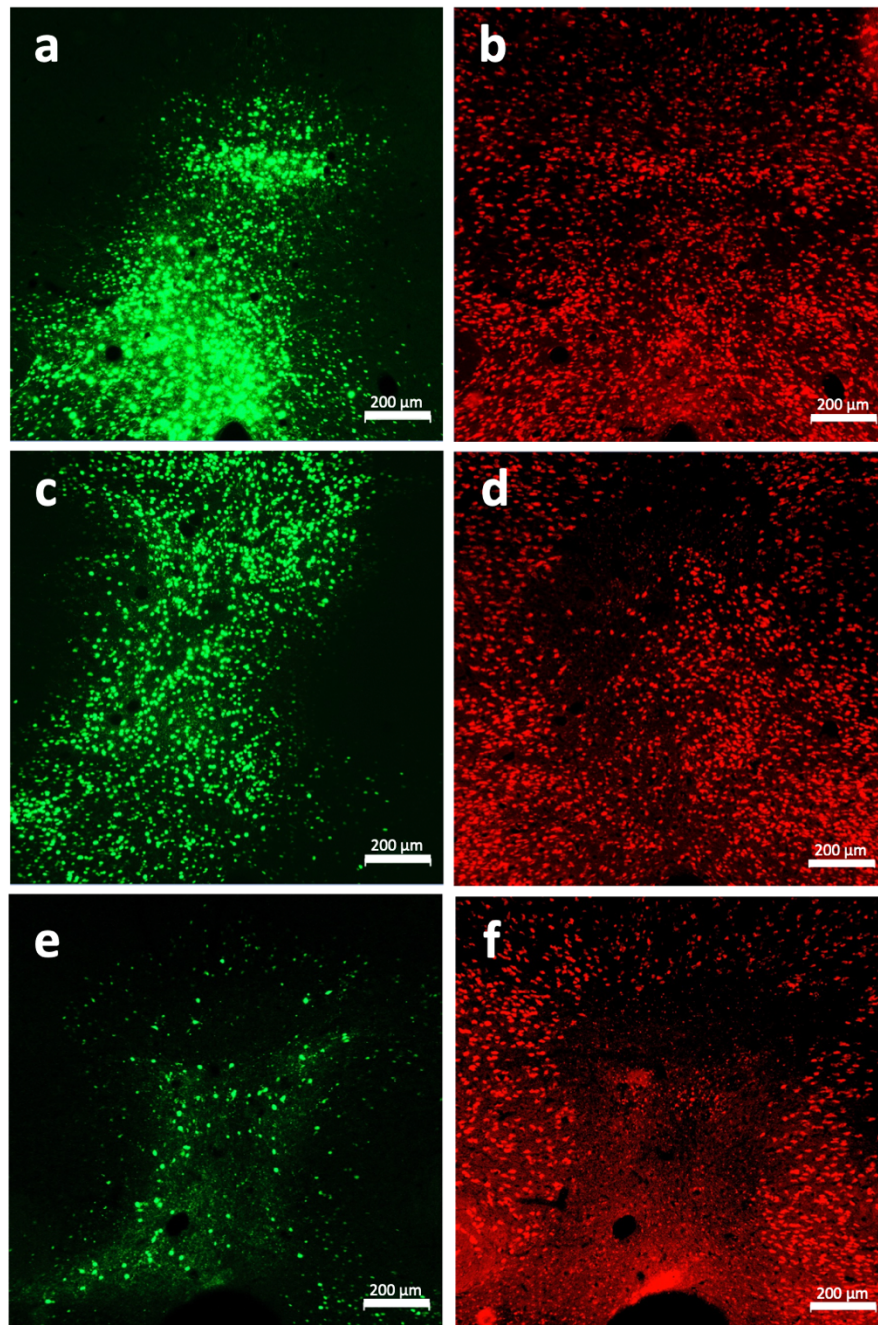


Figure 3: Illustrations of the transduction found in the ReRh nuclei at post-injection delays of 1 (**a,b**), 2.5 (**c,d**) and 10 weeks (**e,f**). Rats have been injected with the AAVrg-Cre-GFP into the ReRh nuclei. (a), (c), (e) show GFP-positive nuclei in the ReRh, (b), (d), (f) show NeuN immunostaining in the same regions as shown on their left. Notice the evidence for a progressive disappearance of NeuN-positive cells within the region of transduction, which parallels a reduction of the GFP-positive signal. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

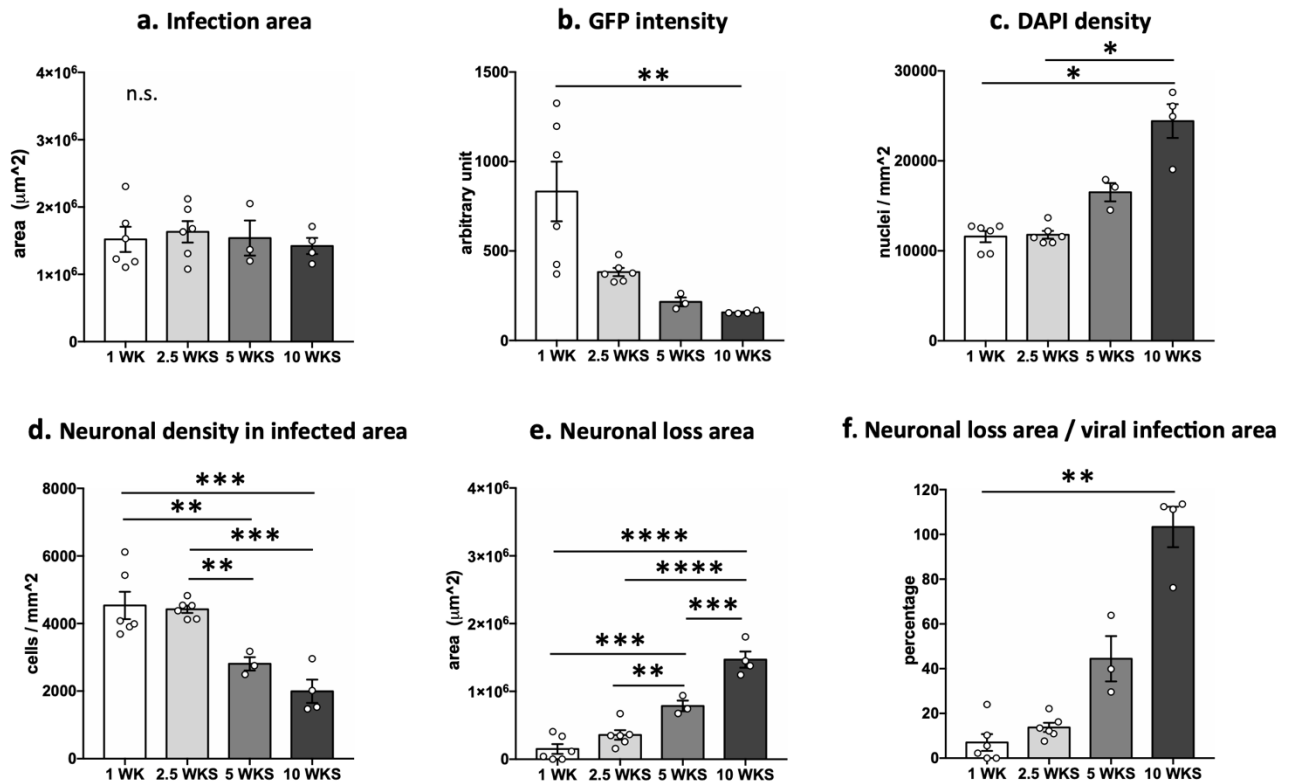


Figure 4: Bar graphs illustrating our quantitative approaches. **(a)** Extent of the transduction area at various post-injection delays (1, 2.5, 5 and 10 weeks; data corresponding to 5 weeks are from experiment 1, the others from experiment 2). **(b)** Quantitative estimation of GFP intensity in the transduction area; the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.01$ (**). **(c)** Quantitative estimation of DAPI density in the transduction area; at 10 weeks post-injection, the density was significantly larger than at the 1-week (*, $p < 0.05$) and 2.5 (*, $p < 0.05$) delays; the other differences were not significant. **(d)** Quantitative estimation of the neuronal density in the transduction area; significance for the indicated differences is: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. **(e)** Quantitative estimation of the extent of the area of neuronal loss within the region of transduction; significance for the indicated differences is: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. **(f)** Computation of the ratio between the extent of the area of neuronal loss and the area of transduction; the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.01$ (**)

Glial reactions

How can one explain that neurons undergo progressive degeneration following AAVrg-Cre-GFP injections into the ventral midline thalamus when the density of DAPI-stained cells remains apparently unchanged over the same time? Because DAPI does not distinguish

between neurons and glial cells (it stains AT regions of DNA), we hypothesized that cells within the region of transduction and neuronal loss could be glial cells reflecting a glial reaction, especially astrocytes and microglia. Indeed, astrocytes and microglia are major actors of neuroinflammation and come into play in case of neurodegeneration, whatever the latter's origin (e.g., Kwon and Koh, 2020). This is why we performed two additional immunostainings, one targeting astrocytes (with an antibody against GFAP), the other targeting microglial cells (with an antibody against Iba1). The data are illustrated in Fig 5 and Fig 6. At 1 week post-surgery, the GFAP immunoreactivity was virtually absent from the ventral midline thalamus. Clearly detectable at the 2.5-week delay, it reached a maximal staining intensity at the 5- and 10-week delays, suggesting a delay-dependent increase of astrocytic migration/reaction. A similar temporality was observed for microglial cells, the Iba1-positive staining being minimal (but not absent) at the 1-week delay and maximal at the 10-week delay. These staining signals were quantified. We measured the area covered by GFAP-positive or Iba1-positive staining, the density of cells within the stained areas, as well as the ratio between the area covered by the glial scar/region of microglial activation and that of the transduction as deduced from the GFP-positive staining. Regarding GFAP, K-W ANOVA of the area covered by the glial scar showed a significant Group effect ($p = 0.02$). The only significant difference shown by a Dunn test was between 1 and 10 weeks ($p < 0.05$). The one-way ANOVA of GFAP density showed a significant Group effect ($F(3,14) = 11.24, p < 0.001$). Multiple comparisons indicated significant differences between 1 week and either 5 ($p < 0.01$) or 10 weeks ($p < 0.001$), but also between 2.5 weeks and 5 ($p < 0.05$) or 10 weeks ($p < 0.01$). K-W ANOVA of the ratios showed a significant Group effect ($p = 0.039$), but none of the differences reached significance. As to Iba1, one-way ANOVA of the activation area showed a significant Group effect ($F(3,15) = 13.77, p < 0.001$), and multiple comparisons revealed significant differences between 1 week and 2.5 ($p < 0.05$), 5 ($p < 0.05$) and 10 weeks ($p < 0.001$), as well as 2.5 weeks ($p < 0.01$) or 5 weeks ($p < 0.05$) and 10 weeks. For the density of the Iba1 signal, a K-W ANOVA showed a significant Group effect ($p < 0.001$), which was due to a significant difference between 1 and 10 weeks ($p < 0.01$), only. Finally, a K-W ANOVA of the ratio showed the Group effect to be significant ($p < 0.001$), pairwise comparisons pointing to a larger ratio at 10 weeks as compared to 1 ($p < 0.01$) or 2.5 weeks ($p < 0.05$).

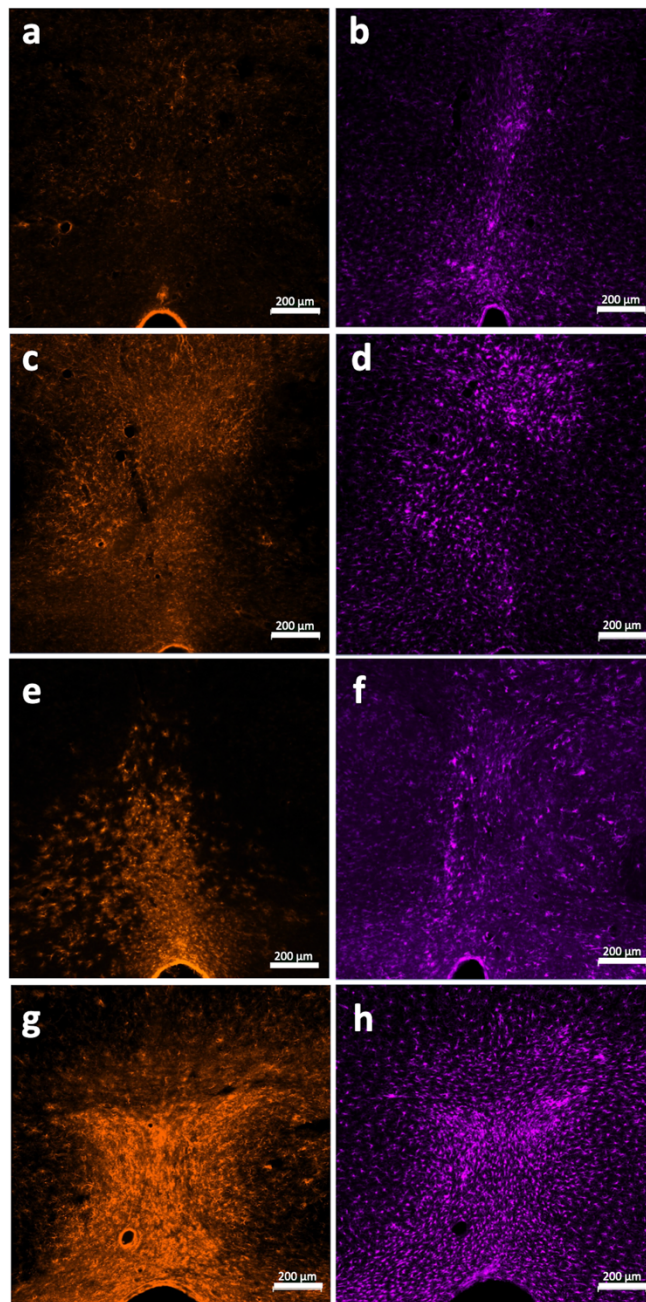


Figure 5: Images showing GFAP (astrocytes; on the left) and Iba1 (microglia; on the right) immunostaining in the region of transduction at various delays after the injection into the ReRh nuclei of the AAV-Cre-GFP, namely 1 week (**a,b**), 2.5 weeks (**c,d**), 5 weeks (**e,f**), and 10 weeks (**g,h**). Notice the delay-dependent increase of staining accounting for reactive astrocytes and microglia. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

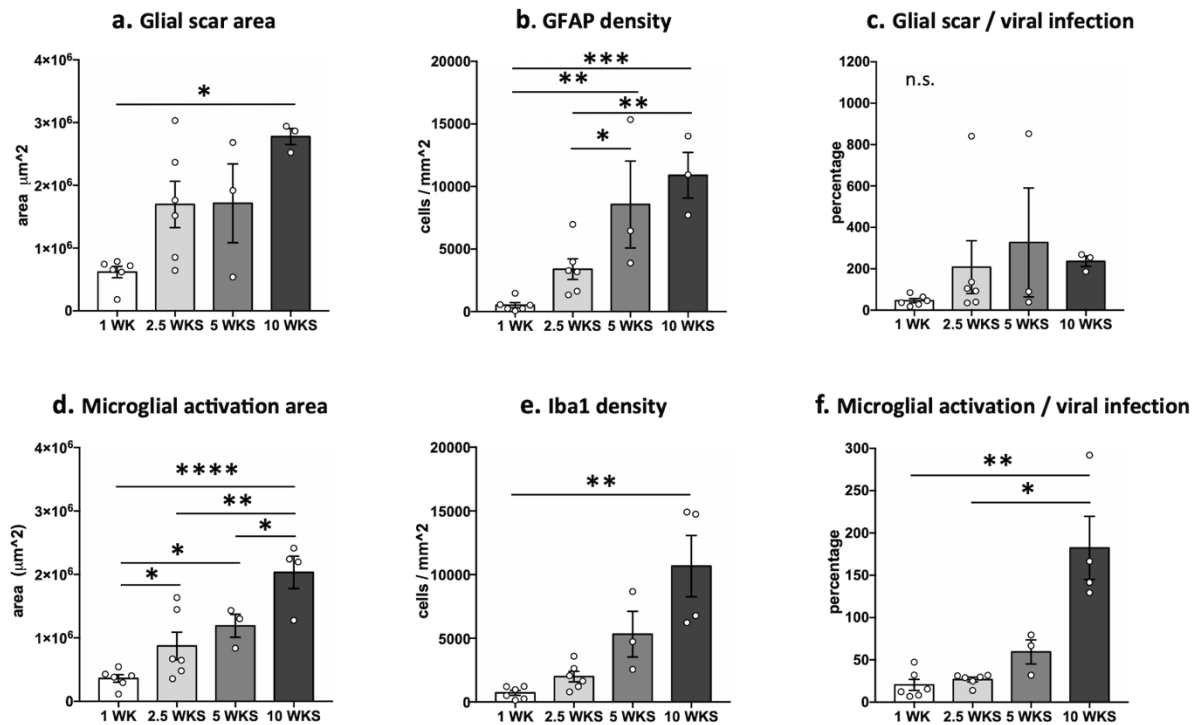


Figure 6: Bar graphs illustrating our quantitative approaches. **(a)** Extent of the glial scar at various post-injection delays (1, 2.5, 5 and 10 weeks; data corresponding to 5 weeks are from experiment 1, the others from experiment 2); the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.05$ (*). **(b)** Quantitative estimation of GFAP staining density in the transduction area; at 10 weeks post-injection, the density was significantly larger than at the 1-week (***) and 2.5 (**, $p < 0.01$) delays, and at 5 weeks post-injection, the density was also significantly larger than at 1 week (**, $p < 0.01$) and 2.5 weeks (*, $p < 0.05$). **(c)** Computation of the ratio between the extent of the area of the glial scar and the area of transduction; no difference was significant. **(d)** Quantitative estimations of the extent of the glial scar at the various post-injection delays; analyses showed a progressive extension over time; significance for the indicated differences is: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. **(e)** Quantitative estimation of the density of Iba1 staining in the transduction area over time; the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.01$ (**). **(f)** Computation of the ratio between the extent of the area of microglial activation and the area of transduction; the difference between 1 and 10 weeks post-injection was significant, $p < 0.01$ (**), as well as that between 2.5 weeks and 10 weeks, $p < 0.05$ (*).

Altogether these data indicate that the AAVrg-Cre-GFP injection resulted in a progressive glial reaction, as attested for by the progressive increase of GFAP- and Iba1-positive staining. That this reaction was linked to the neurotoxic effects of the AAVrg-Cre-GFP is suggested by the high positive correlation between the area of neuronal loss and the area of microglial activation on sections passing through the ventral midline thalamus ($r = 0.924$, $p < 0.001$; see Supplementary Fig. 6).

Experiment 3 : Reduction of the viral titer

Next, we tested if the injection of AAVrg-Cre-GFP using a smaller solution volume (i.e., $2 \times 0.5 \mu\text{L}$) and a reduced titer would result in attenuated toxicity in the ReRh nuclei. Four titers were tested: 6.25×10^{12} , 3.125×10^{12} , 1.25×10^{12} , 1.25×10^{11} vg/mL. The volume/titer producing toxicity in the aforementioned experiments was not included. Rats were kept for a 5-week post-surgical survival time, a delay at which we had observed strong toxicity with the highest titer used. Data are illustrated in Fig 7. In this figure, one can see that the second lowest titer (i.e., 1.25×10^{12} vg/mL) used resulted in limited fluorescence which confined along the cannula track and showed minimal spreading in the target region. A similar picture was observed with the lowest titer (i.e., 1.25×10^{11} vg/mL; not illustrated). Clearly, the transduction was by far insufficient or even inefficient with these two titers. With the next higher titer (i.e., 3.125×10^{12} vg/mL), the transduction had spread in the ReRh nuclei and the NeuN immunostaining showed no evidence for local neuronal toxicity. With the highest titer, the transduction appeared correct, but there was evidence for neuronal toxicity in and around the injection site, although to a much weaker extent as with the titer used in experiments 1 and 2.

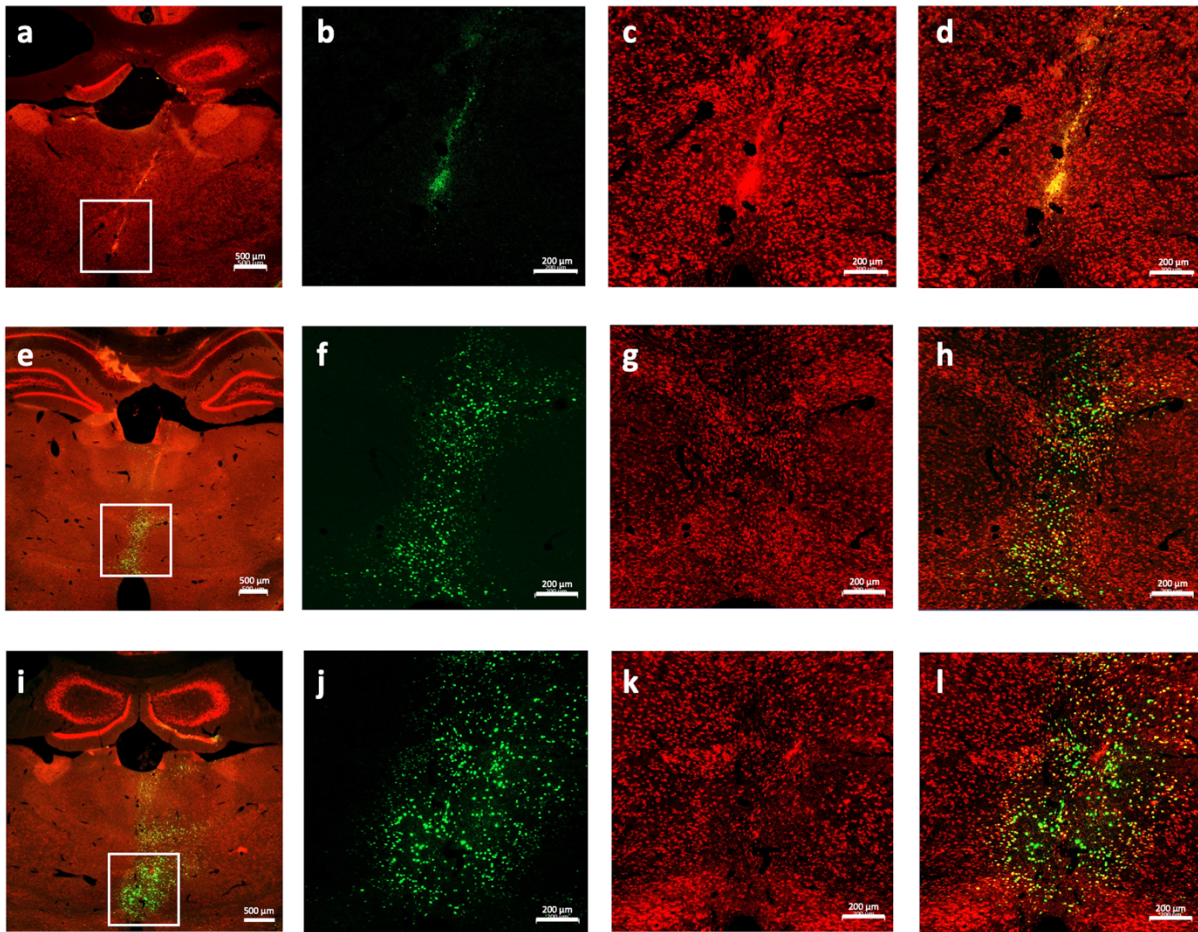


Figure 7: Images showing the localization of the transduction in the ReRh nuclei on sections immunostained for the neuronal nuclear protein NeuN. Compared with experiments 1 and 2, the volume injected at each injection site was divided by 2 (i.e., 0.5 μ L instead of 1 μ L). In this experiment, we also reduced the titer. **(a-d)** are from rats injected with the AAV-Cre-GFP virus at a titer of 1.25×10^{12} vg/mL. **(e-h)** are from rats injected with the AAV-Cre-GFP virus at a titer of 3.125×10^{12} vg/mL. **(i-l)** are from rats injected with the AAV-Cre-GFP virus at a titer of 6.25×10^{12} vg/mL. The post injection delay was of 5 weeks in all cases. On the left **(a, e, i)**, NeuN and GFP are merged and low magnification indicates the location of the transduction region. All other photographs show a higher magnification focusing on the transduction region: GFP fluorescence is shown alone **(b,f,j)**, NeuN staining is shown alone **(c,g,k)**, and a merge of both is shown **(d,h,l)**. Notice that with the lowest titer the transduction was extremely limited, which is not the case with the two other titers; we found no evidence for toxicity. With the titer of 6.25×10^{12} vg/mL, we obtained a good transduction, but neuronal toxicity was observed. With the titer of 3.125×10^{12} vg/mL, the transduction was still acceptable, but we found no evidence for neurotoxicity. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.

Experiment 4 : Combination of the retrograde AAVrg-Cre-GFP injections into the ReRh nuclei (at a non-toxic titer) with an intracortical injections of anterograde AAV5-taCasp

Next, we asked if AAVrg-Cre-GFP used at a titer of 3.125×10^{12} vg/mL in combination with an intracortical injection of the AAV5-taCasp could result in damage to cortical neurons projecting to the ReRh nuclei. To answer this question, rats were injected with both viral preparations, AAV5-taCasp in the medial prefrontal cortex (same conditions as in experiment 1) and AAVrg-Cre-GFP in the ReRh nuclei (i.e., 3.125×10^{12} vg/mL). The AAV5-taCasp was injected unilaterally and the contralateral side was used as control. Histological observations are illustrated in Figures 8. In the mPFC, we found a reduction of the number of GFP-positive cells on the side in which the AAV5-taCasp had been injected as compared to the contralateral hemisphere (Fig 8). On the side injected with the AAV5-taCasp, the number of GFP-positive neurons was reduced by about 40 % in average as compared to the opposite hemisphere (Fig 8); this reduction was comparable to the one found in Exp 1. Statistical analyses on all sections showed this reduction to be significant ($t_{(27)} = 5.790$, $p < 0.001$).

Thus, when the titer of AAVrg-Cre-GFP injected into the ReRh was reduced from 1.25×10^{13} to 3.125×10^{12} and coupled to an intracortical injection of the AAV5-taCasp, we avoided the intrathalamic toxicity of the first virus and found a capability for the combination to damage.

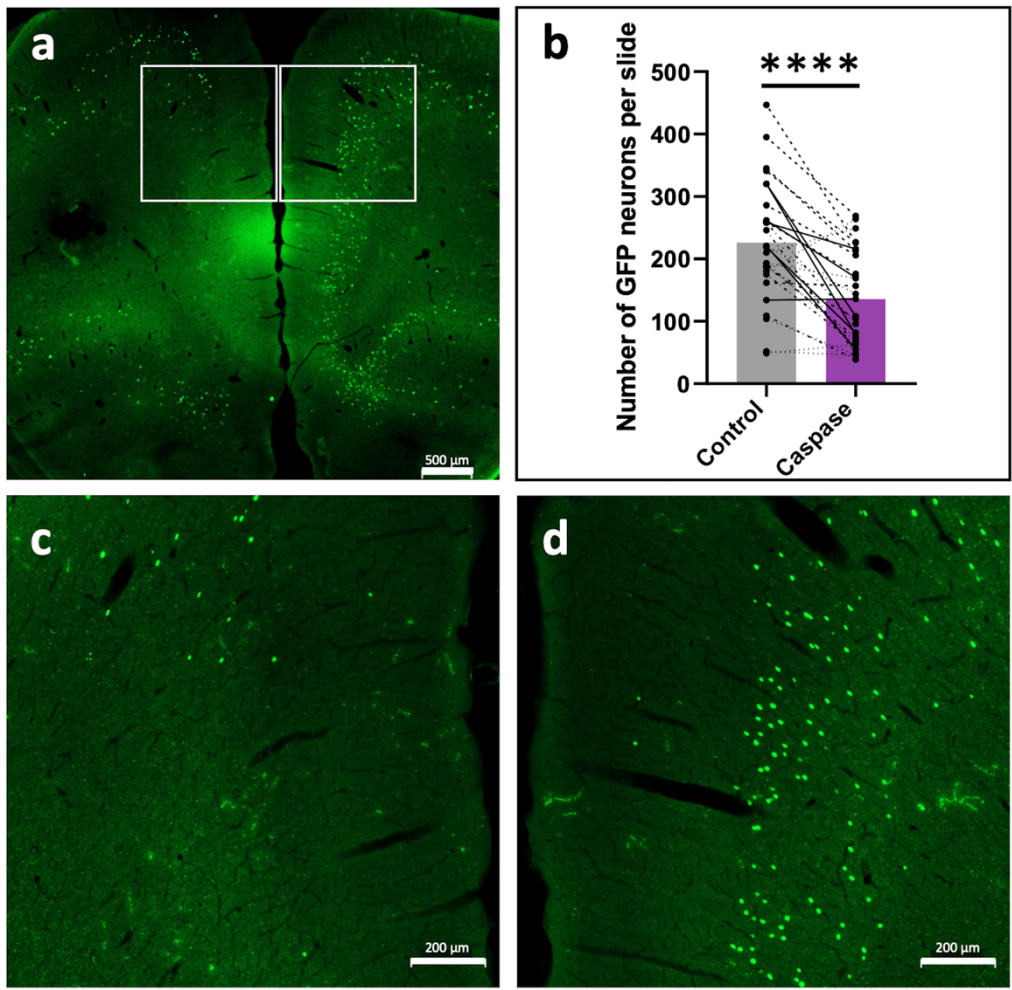


Figure 8: The AAV containing the floxed caspase gene was injected unilaterally into the medial prefrontal cortex (mPFC) of Long-Evans male rats, which also received an injection into the reuniens and rhomboid (ReRh) nuclei of the virus containing the Cre-GFP gene coding for the fusion protein. This time, however, the titer used was the same as the one with which we found no neurotoxicity in experiment 3. **(a)** Image showing GFP-positive neuronal nuclei in the mPFC. **(c)** and **(d)** are higher magnifications of the cortical regions delimited by squares in (a); (c) is the side in which the AAV5-taCasp has been injected; the contralateral side (d) is used as the non-injected control. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs. **(b)** Number of neurons counted on each section prepared from the brain of 3 rats; filled circles joined by solid lines are from one rat, those joined by dashed lines are from another rat, and filled circles from the last rat are joined by stippled lines. The bars show the average value on the side injected with the AAV5-taCasp (left) and its contralateral control (right). Statistical analysis: ***, $p < 0.001$.

Discussion

The start point of the current series of experiments consisted in combining an AAVrg-Cre-GFP injected into the ReRh nuclei with an AAV5-taCasp injected into the mPFC in order to selectively damage neurons that project from the cortical region to the thalamic one. While a proportion of neurons in the mPFC were actually killed, we observed an unexpected and ultimately massive neurotoxicity of the AAVrg-Cre-GFP in the ReRh. This neurotoxicity contrasted with an apparently normal density of DAPI-positive nuclei. Staining of reactive astrocytes and microglial cells demonstrated a progressively increasing density of these cells within the limits of the viral transduction. By reducing the viral titer (by a 4-fold dilution + injecting half the volume), we obtained a dramatic reduction of the toxicity to virtually none, but kept the possibility to induce an at least partial disconnection between the mPFC and the ReRh nuclei.

Neuronal ablation a combination of virus-delivered Cre and Cre-dependent caspase

Cre-dependent caspase has been used to selectively ablate populations of neurons of the central nervous system in recent studies. A typical approach consists in using transgenic mice (or rats) preferentially expressing Cre in particular neurons of the brain. These regions are then infected with a viral vector carrying a floxed caspase (e.g., Basting et al., 2018; Bossert et al., 2023; Hatter and Scott, 2023; Laurent et al., 2017; Mazuski et al., 2020; Nadel et al., 2020; Walker et al., 2022; Whylings et al., 2021). In the current study, we combined the injection of two AAV vectors, one retrograde with the Cre injected into the ReRh nuclei, and another one, anterograde, with the caspase injected into the mPFC. Our goal was to damage neurons of the mPFC that project to the ventral midline thalamus. To the best of our knowledge, it is the first time that such an approach targeting mPFC to ReRh projections is used in rats. The combination of a Cre-containing AAV with a caspase-containing AAV has been the methodological option in at least one other study, which aimed to damage the neurons of the median preoptic nucleus projecting to the paraventricular nucleus (Marciante et al., 2019). In a previous study, Xu and Südhof (2013) had blocked the projections from the mPFC to the Re. However, they bilaterally injected a 2xFlox-TetTox AAV into the mPFC and a WGA-cre AAV into the Re and subsequently assessed contextual fear generalization, which was affected. If one disregards the undesired effects of AAVrg-GFP-Cre in the ReRh nuclei, our histological verifications demonstrate the feasibility of the combined anterograde and retrograde AAV

approach. Indeed, for AAVrg-GFP-Cre, whether with a viral titer causing neurotoxicity in the ventral midline thalamus (Figure 1) or with a titration reduced by a factor 4 and half the volume injected (Figure 8), we have been able to observe an about 40% reduction of the number of GFP-positive neurons on the injected side as compared to the contralateral control side. Obviously, this finding does not allow us to conclude that we have destroyed neurons projecting from the mPFC to the ReRh nuclei in a proportion that would be sufficient to induce detectable behavioural alterations. To do this, one would need to have AAV5-taCasp bilaterally in the mPFC and test the rats in a battery of behavioural evaluations that have proved sensitive to damage to the ReRh nuclei (e.g., the cognitive shifting test used by Cholvin et al., 2013, or the systemic memory consolidation tests used by Loureiro et al., 2012, or Quet et al., 2020). Moreover, in the current study, it was not possible to know what proportion of cortical neurons have been destroyed among cortical neurons projecting to the ReRh nuclei. There were at least two reasons to this: first, the number of cortical neurons projecting to the ReRh nuclei is not known; second, we have no idea about the proportion of mPFC neurons projecting to the VMT that have been labelled with the retrograde virus.

Neurotoxicity of the GFP-Cre fusion protein

Our current report is the first to show neurotoxicity of AAVrg-Cre-GFP when the viral construct is injected into the ventral midline thalamus of rats. Such toxicity is not particular to the VMT as it was also observed in the mPFC when the viral construct was injected in this cortical region. Other studies found similar results with an AAV-Cre-GFP injected in other brain regions. For instance, Rezai Amin et al., (2019) have injected AAV2.hSyn.eGFP-Cre.WPRE.SV40 into the substantia nigra of mice that survived surgery for at least 8 weeks. They found toxicity to both dopaminergic neurons in the pars compacta and GABAergic neurons in the pars reticulata, with evidence for apoptosis and autophagy for both populations. The authors of this study have raised the possibility that it is the Cre-GFP fusion protein that has revealed toxic, rather than Cre or GFP alone. Erben et al. (2022) injected an AAV1.hSyn.HI.eGFP-Cre.WPRE.SV40 unilaterally or bilaterally into the ventral tegmental area of mice. Four weeks after the injections, the number of cells immunoreactive for tyrosine hydroxylase and DAT was reduced to a dramatic extent, what occurred neither with an AAV1-GFP nor with an AAV9-GFP or an AAV9-Cre virus that were used as controls. When the viral titer was reduced by a 1000-fold order (i.e., from the 10^{13} to a 10^{10} GC/mL), the undesirable neurotoxicity was

circumvented. As speculated by Rezai Amin et al. (2019), the authors of this study also suspected the GFP-Cre fusion protein to be the toxic agent. The factor in these two studies common to ours is the GFP-Cre fusion protein, its nuclear localization and its expression under the effect of a strong promoter (i.e., hSyn), and thus its nuclear accumulation. Theoretically, this toxicity might be avoided with a viral vector that would only transduce Cre, as suggested by Erben et al. (2022). This does not preclude the viral construct from being used at the titer used in our two first experiments, but specific effects would only be expected in a relatively narrow post-injection window, the duration of which remaining to be determined precisely yet. It would probably not exceed much more than a week post-injection. Regarding the toxicity of the Cre-GFP protein, one could also argue that when the AAV5-taCasp is injected in the region from which the terminals infected with the AAVrg-Cre-GFP arise, neurons are not killed by the caspase but by the nuclear accumulation of Cre-GFP after retrograde infection. This possibility, which would be potentially problematic to all neurons projecting to the ReRh nuclei and obviously undermine specificity of the disconnection approach, cannot be excluded based on the results of the current study. However, whether with the high or the low titer of the AAVrg-Cre-GFP preparation we used, we found that, in average, in the mPFC in which the AAV5-taCasp had been injected, the number of GFP-positive neurons was significantly lower than on the contralateral side in which no injection was made. This is evidence for caspase having played its expected role.

Glial reactions and possible confusion/misinterpretation

Degeneration of neurons is usually accompanied by an inflammatory reaction, whether in neurodegenerative diseases (Kwon and Koh, 2020; Stephenson et al., 2018) or following neurotoxic treatments, stroke, traumatic injury, infections (e.g., Hosseini and Korte, 2023; Tran et al., 2022). Inflammatory reaction implicates, among other processes, activation of astrocytes and microglia, both types of cells having also physiological functions in a healthy brain, where they are in a so-called resting state. When resting, they are for instance implicated in homeostasis regulation, blood-brain barrier maintenance, synaptic support and communication, phagocytosis (e.g., Garland et al., 2022). Evidence for an inflammatory reaction has been obtained in the current study, as attested for by the progressive increase of reactive astrocytic and microglial signals over the weeks that followed the injection into the ReRh nuclei of the AAVrg-Cre-GFP. Indeed, after one week, there were little GFAP-positive

astrocytic and Iba1-positive microglial cells in the region of viral transduction. Already 2.5 weeks after the injection, but much more so 5 and 10 weeks thereafter, the staining had increased to reach an ultimately massive level. At both later stages, almost all neurons had disappeared from the injection site. The conjunction of both phenomena, namely neuronal degeneration and gliosis, can reveal extremely misleading. Indeed, if the histological material is examined after only DAPI staining, the cellular density, as it can be deduced from the number of stained cell nuclei, may seem unaltered. To achieve a precise idea of what is going on in the region in which the AAVrg-Cre-GFP was injected, it is mandatory to perform a staining accounting for the presence of neurons. As long as this staining does not demonstrate that neurons are present in the vicinity of AAVrg-Cre-GFP injection, it is impossible to differentiate possible effects of the AAVrg-Cre-GFP/AAV5-taCASP combination (i.e., to the Cre/loxP recombination, and thus of a specific disconnection) from those of the AAVrg-Cre-GFP (i.e., the Cre-GFP toxicity). The picture could even be further complicated by synergistic interactions between both types of effects thereby leading to additional confusion.

Reducing the titer, a possible solution to reduce neurotoxicity

Erben et al. (2022) have reported that neuronal toxicity of Cre-GFP could be substantially reduced by reducing the titer of the viral preparation. Our own findings confirm that titer reduction reduces toxicity, although after a substantially weaker titer reduction (i.e., divided by 4, after half-dilution of the mother solution) than in the Erben et al. study (i.e., divided by 1000). We also found that when the highest titer we used was reduced by a factor 10 or 100, the transduction we obtained was largely insufficient. Regarding these results, one has to call for some degree of caution. In fact, we only assessed the effect of our titer reduction at one post-injection time point, namely 5 weeks after the infection. However, as long as the metabolic machinery of an infected neuron is functioning, there is no reason to believe that Cre-GFP synthesis is going to vanish or that nuclear metabolism might, in fine, balance Cre-GFP production such as to keep the protein's concentration under a fatal toxicity threshold. It is well possible that by reducing the titer, rather than preventing toxicity, we have done nothing more than attenuating the slope of Cre-GFP production. This would mean that the neuron would not, in absolute terms, be protected from toxicity, but that Cre-GFP production would take longer to reach the toxicity threshold. Therefore, having observed virtually no toxicity after 5 weeks post-injection with the reduced titer does not mean that no toxicity

would be observed after an additional 5 weeks. This possibility will have to be verified experimentally in a forthcoming study.

Conclusion

We used an approach combining two AAVs, one delivering a floxed gene coding for caspase and one delivering a gene coding for a Cre-GFP fusion protein. The former was injected into the mPFC, the latter into the ReRh nuclei, with the aim to damage neurons interconnecting these two brain regions. Our main finding was the severe neuronal toxicity of the AAVrg-Cre-GFP in the ReRh nuclei, although evidence was obtained that neurons of the mPFC projecting to the ReRh could actually be damaged. The unexpected effects of the AAVrg-Cre-GFP reported herein clearly point to : **i)** the imperative need to verify the existence of potential collateral damage inherent in this type of approach and likely to distort the interpretation of the experimental data, and **ii)** the necessity to implement the essential controls in order to distinguish the phenotypic effects linked to this collateral damage from those linked to the desired disconnection, since, as we report here, the two types of damage can co-exist. It is also essential to know for how long neurons expressing the Cre-GFP protein remain operational after their infection.

Acknowledgements

The authors would like to wholeheartedly acknowledge Ms Marion Santisteban and Mr Olivier and Brice Bildstein, as well as Daniel Egesi and George Edomwony for their contribution to animal care. We also thank University of Strasbourg, CNRS and INSERM for their support of research, as well as the Agence Nationale de la Recherche for providing dedicated funds to the project CHARM (coord. P. Quilichini). Finally, we are grateful to Ms Charleen Dias for her help during immunostaining and the quantification of our histological material, and especially to Dr Alexis Bemelmans for very constructive discussions on toxicity of viral constructs and derived proteins.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

No such technologies have been used.

References

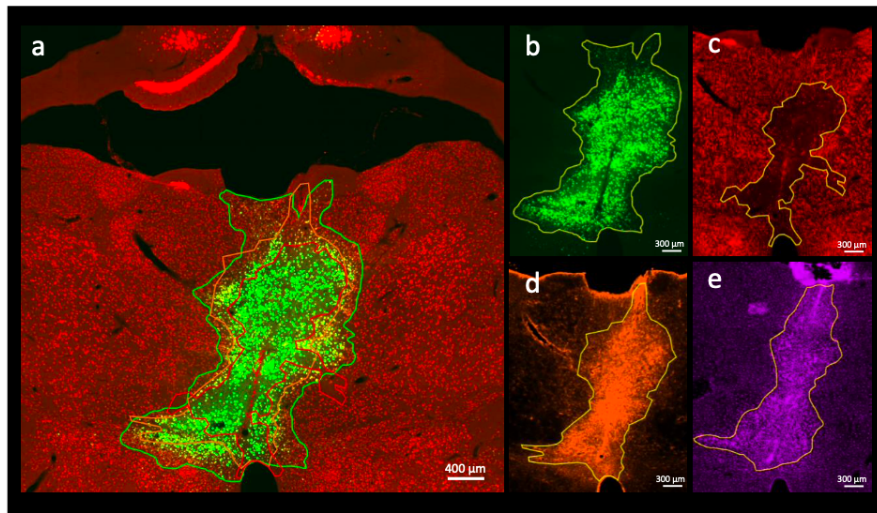
- Ali M, Cholvin T, Muller M-A, Cosquer B, Kelche C, Cassel J-C, Pereira De Vasconcelos A (2017) Environmental enrichment enhances systems-level consolidation of a spatial memory after lesions of the ventral midline thalamus. *Neurobiol Learn Mem* 141:108–123.
- Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW (2021) QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 7(1):16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
- Basting T, Xu J, Mukerjee S, Epling J, Fuchs R, Sriramula S, Lazartigues E (2018) Glutamatergic neurons of the paraventricular nucleus are critical contributors to the development of neurogenic hypertension. *J Physiol* 596:6235–6248.
- Bentivoglio M, Balercia G, Kruger L (1991) The specificity of the nonspecific thalamus: the midline nuclei. *Prog Brain Res* 87:53-80.
- Bossert JM, Mejias-Aponte CA, Saunders T, Altidor L, Emery M, Fredriksson I, Batista A, Claypool SM, et al. (2023) Effect of Selective Lesions of Nucleus Accumbens μ -Opioid Receptor-Expressing Cells on Heroin Self-Administration in Male and Female Rats: A Study with Novel *Oprm1-Cre* Knock-in Rats. *J. Neurosci* 43:1692–1713.
- Cassel J-C, Ferraris M, Quilichini P, Cholvin T, Boch L, Stephan A, Pereira De Vasconcelos A (2021) The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: A crossroads for cognition-relevant information processing? *Neurosci Biobehav Rev* 126:338–360.
- Cassel J-C, Pereira De Vasconcelos A, Loureiro M, Cholvin T, Dalrymple-Alford JC, Vertes RP (2013) The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog Neurobiol* 111:34–52.
- Cearley CN, Wolfe JH (2007) A Single Injection of an Adeno-Associated Virus Vector into Nuclei with Divergent Connections Results in Widespread Vector Distribution in the Brain and Global Correction of a Neurogenetic Disease. *J. Neurosci* 27:9928–9940.
- Chen Y-H, Wu K-J, Hsieh W, Harvey BK, Hoffer BJ, Wang Y, Yu S-J (2021) Administration of AAV-Alpha Synuclein NAC Antibody Improves Locomotor Behavior in Rats Overexpressing Alpha Synuclein. *Genes* 12:948.
- Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira De Vasconcelos A, Cassel J-C (2013) The Ventral Midline Thalamus

- Contributes to Strategy Shifting in a Memory Task Requiring Both Prefrontal Cortical and Hippocampal Functions. *J. Neurosci* 33:8772–8783.
- Dolleman-van Der Weel MJ, Griffin AL, Ito HT, Shapiro ML, Witter MP, Vertes RP, Allen TA (2019) The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior. *Learn Mem* 26:191–205.
- Erben L, Welday JP, Murphy R, Buonanno A (2022) Toxic and Phenotypic Effects of AAV_Cre Used to Transduce Mesencephalic Dopaminergic Neurons. *Int J Mol Sci* 23:9462.
- Ferraris M, Cassel J-C, Pereira De Vasconcelos A, Stephan A, Quilichini PP (2021) The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 125:339–354.
- Garland EF, Hartnell IJ, Boche D (2022) Microglia and Astrocyte Function and Communication: What Do We Know in Humans? *Front. Neurosci.* 16:824888.
- Groenewegen HJ, Berendse HW (1994) The specificity of the ‘non specific’ midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci* 17:52-7
- Hatter JA, Scott MM (2023) Selective ablation of VIP interneurons in the rodent prefrontal cortex results in increased impulsivity. *PLoS One* 18:e0286209.
- Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct* 217:191–209.
- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212:149–179.
- Hosseini S, Korte M (2023) How viral infections cause neuronal dysfunction: a focus on the role of microglia and astrocytes. *Biochem Soc Trans* 51:259–274.
- Humphries MP, Maxwell P, Salto-Tellez M. QuPath: The global impact of an open source digital pathology system (2021) *Comput Struct Biotechnol J.* 19:852-859. doi: 10.1016/j.csbj.2021.01.022.
- Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313:574–586.
- Klein MM, Cholvin T, Cosquer B, Salvadori A, Le Mero J, Kourouma L, Boutillier A-L, Pereira De Vasconcelos A, Cassel J-C (2019) Ventral midline thalamus lesion prevents persistence of

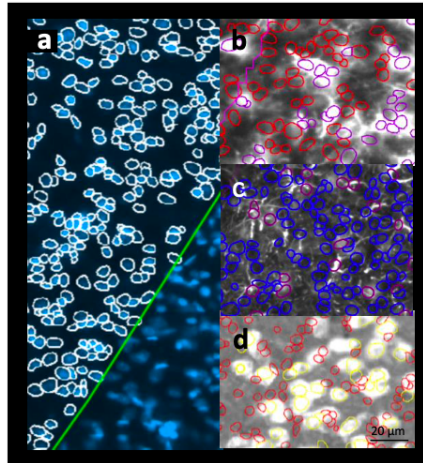
- new (learning-triggered) hippocampal spines, delayed neocortical spinogenesis, and spatial memory durability. *Brain Struct Funct* 224:1659–1676.
- Kwon HS, Koh S-H (2020) Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9:42.
- Laurent V, Wong FL, Balleine BW (2017) The Lateral Habenula and Its Input to the Rostromedial Tegmental Nucleus Mediates Outcome-Specific Conditioned Inhibition. *J Neurosci* 37:10932–10942.
- Lorente de No R (1938) Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. In: *Physiology of the Nervous System* (Fulton J), pp 291-340. London: Oxford University Press.
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel J-C, Pereira De Vasconcelos A (2012) The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *J Neurosci* 32:9947–9959.
- Marcianite AB, Wang LA, Little JT, Cunningham JT (2020) Caspase lesions of PVN-projecting MnPO neurons block the sustained component of CIH-induced hypertension in adult male rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 318:H34–H48.
- Mazuski C, Chen SP, Herzog ED (2020) Different Roles for VIP Neurons in the Neonatal and Adult Suprachiasmatic Nucleus. *J Biol Rhythms* 35:465–475.
- Nadel JA, Pawelko SS, Copes-Finke D, Neidhart M, Howard CD (2020) Lesion of striatal patches disrupts habitual behaviors and increases behavioral variability. *PLoS One* 15:e0224715.
- Paxinos G, Watson C (2014) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition, Elsevier.
- Quet E, Majchrzak M, Cosquer B, Morvan T, Wolff M, Cassel J-C, Pereira De Vasconcelos A, Stéphan A (2020) The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats. *Brain Struct Funct* 225:955–968.
- Shen M, Jiang C, Liu P, Wang F, Ma L (2016) Mesolimbic leptin signaling negatively regulates cocaine-conditioned reward. *Transl Psychiatry* 6:e972–e972.
- Stephenson J, Nutma E, Van Der Valk P, Amor S (2018) Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology* 154:204–219.
- Steward O, Coulibaly AP, Metcalfe M, Dam JM, Yee KM (2021) AAV vectors accumulate in the pineal gland after injections into the brain or spinal cord. *Mol Ther Methods Clin Dev* 23:406–417.

- Tervo DGR, Hwang B-Y, Viswanathan S, Gaj T, Lavzin M, Ritola KD, Lindo S, Michael S, et al. (2016) A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron* 92:372–382.
- Tran VTA, Lee LP, Cho H (2022) Neuroinflammation in neurodegeneration via microbial infections. *Front Immunol* 13:907804.
- Varela C, Kumar S, Yang JY, Wilson MA (2014) Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Struct Funct* 219:911–929.
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Viena TD, Rasch GE, Silva D, Allen TA (2021) Calretinin and calbindin architecture of the midline thalamus associated with prefrontal–hippocampal circuitry. *Hippocampus* 31:770–789.
- Walker RA, Suthard RL, Perison TN, Sheehan NM, Dwyer CC, Lee JK, Enabulele EK, Ray MH, et al. (2022) Dorsal Raphe 5-HT Neurons Utilize, But Do Not Generate, Negative Aversive Prediction Errors. *eNeuro* 9:ENEURO.0132-21.2022.
- Weigert M, Schmidt U, Haase R, Sugawara K, Myers G (2020) Star-convex Polyhedra for 3D Object Detection and Segmentation in Microscopy. in: 2020 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV), pp 3655–3662.
- Whylings J, Rigney N, De Vries GJ, Petrulis A (2021) Reduction in vasopressin cells in the suprachiasmatic nucleus in mice increases anxiety and alters fluid intake. *Horm Behav* 133:104997.
- Xu W, Südhof TC (2013) A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science* 339:1290–1295.

A. Delineation of infected area or area affected by neurodegeneration

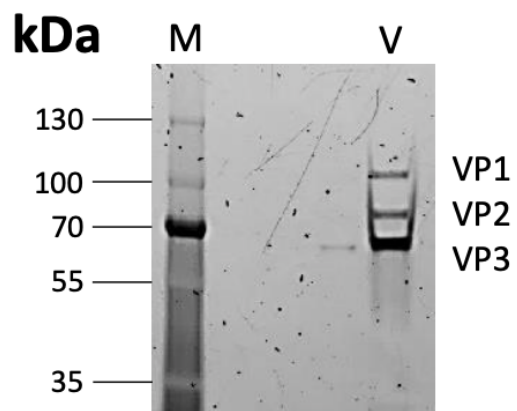


B. Stardist & Classifier

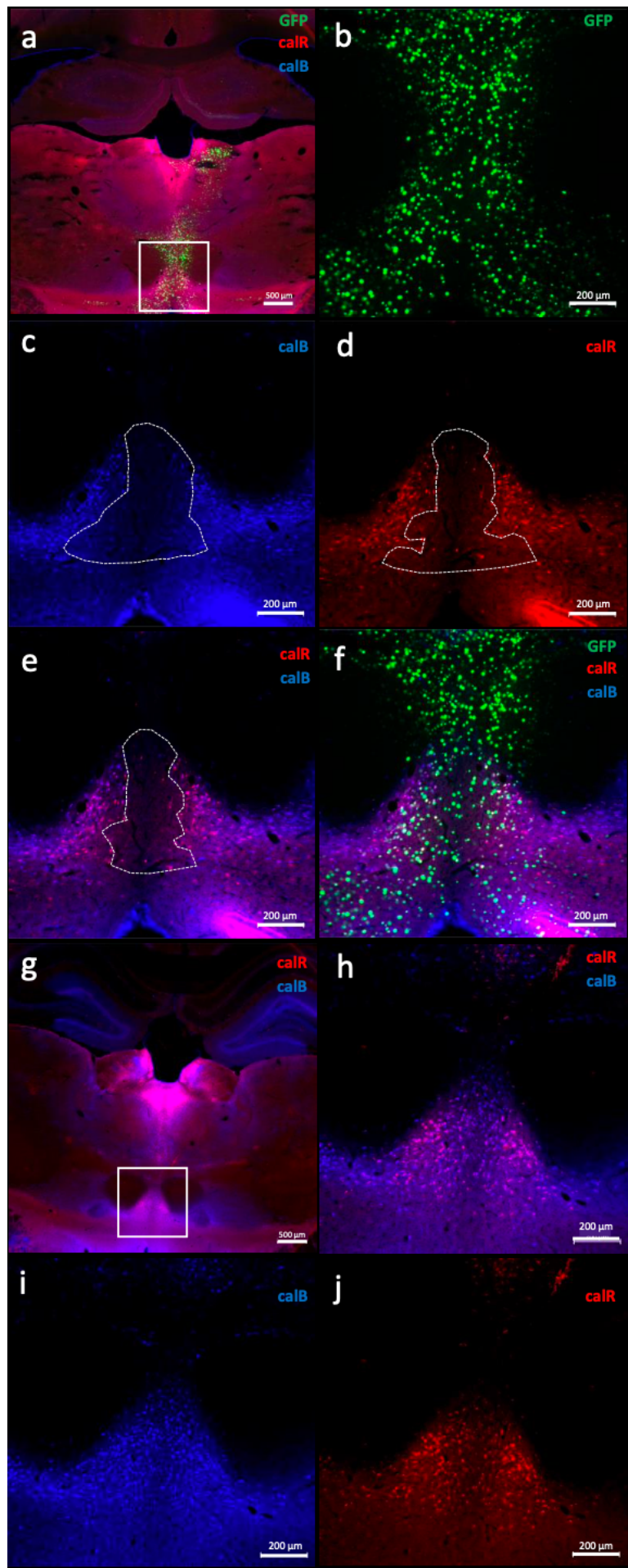


Codes according to Schmidt et al., 2018, International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI), Granada, Spain. Weigert et al., Star-convex Polyhedra for 3D Object Detection and Segmentation in Microscopy. The IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV), Snowmass Village, Colorado, USA.

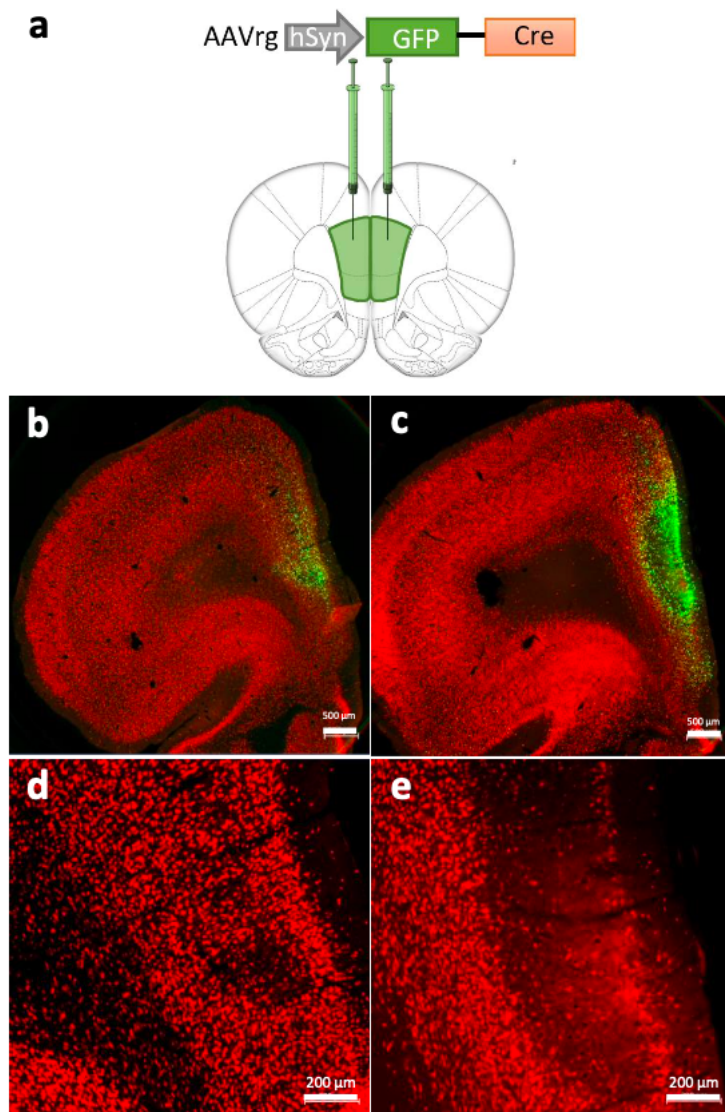
Supplementary Figure 1: (A) Illustration of the quantification methods with the QuPath software. (a,b) Example of how the delineation of the AAV-Cre-GFP infected region was performed, (c) of the neuronal loss, (d) of the glial scar, and (e) of the microglial activation zone. (a) is the superposition of NeuN immunostaining and the GFP-positive AAV-Cre-GFP infection, and of the associated delineated areas. (B) Example of how we counted the cells with different classifiers. (a) First, we ran a StarDist extension script to detect all the cell nuclei (circled in white) with the DAPI staining. (b) Then, we sorted these nuclei as microglia when they were Iba1-positive (circled in purple), (c) as astrocytes if they were GFAP-positive (circled in purple), or (d) neurons when they were NeuN-positive (circled in yellow).



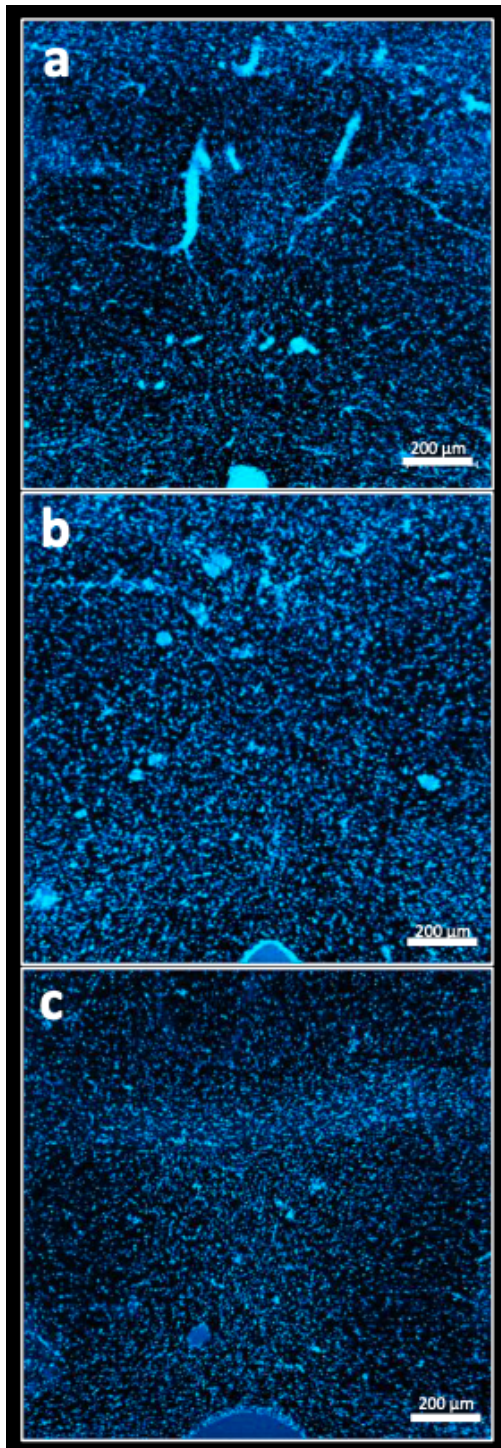
Supplementary Figure 2: AAVrg-Cre-GFP capsid protein integrity determined by SDS- PAGE. A molecular-weight size marker has been loaded into the M well and 5 μ L of AAVrg- Cre-GFP have been loaded into the V well. VP1, VP2 and VP3 are the three capsid proteins of AAVs. The absence of any other band reveals the absence of any contamination in our viral sample.



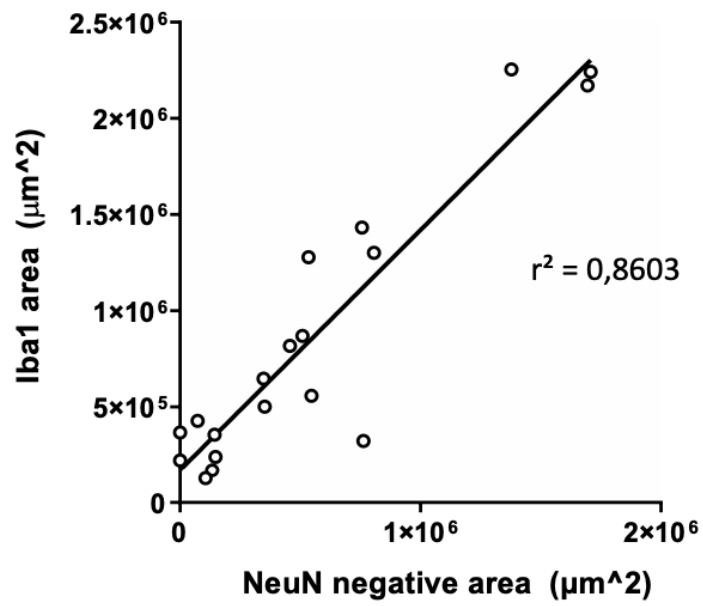
Supplementary Figure 3: *Verification that the absence of NeuN staining is not due to any epitope masking. This verification was performed by additional immunostaining against either calbindin or calretinin. (a) Image showing the localization of the AAVrg-Cre-GFP (in green) transduction in the ReRh nuclei on a section immunostained for calretinin (calR, in red) and for calbindin (calB, in blue); blue and red are superimposed on this photograph. (b) is a higher magnification of the thalamic region delimited by the square in (a); only GFP staining is shown. (c) same region as in (b) with calbindin staining in the ventral midline thalamus. The dotted line encircles the region devoid of calbindin staining. (d) same region as in (c) with calretinin staining in the ventral midline thalamus. (e) same region as in (d) with calretinin and calbindin stainings merged. (f) same region as in (e) with AAVrg-Cre-GFP, calretinin and calbindin stainings merged. (g) Image showing the ventral midline thalamus of a control rat, that did not receive any AAVrg-Cre-GFP injection on a section immunostained for calretinin (in red) or for the calbindin (in blue). (h) is a higher magnification of the thalamic region delimited by the square in (g); calretinin and calbindin stainings are merged. (i) same region as in (h) with calbindin staining in the ventral midline thalamus. (j) same region as in (i) with calretinin staining in the ventral midline thalamus. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.*



Supplementary Figure 4: (a) Surgical protocol used in Experiment 1 to verify if the neuronal toxicity phenomenon also occurs in the mPFC. The AAVrg-Cre-GFP was injected bilaterally into the mPFC of Long-Evans male rats. (b) and (c) Images showing the localization of the transduction in the mPFC on sections immunostained for the neuronal nuclear protein NeuN. (b) is the section with the lowest neuronal loss; (c) is the section with the largest one. (d) and (e) are higher magnifications of the cortical regions shown in (b) and (c); only NeuN staining is visualized. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.



Supplementary Figure 5: *Illustrations of the DAPI staining found in the ReRh nuclei at post-injection delays of 1 (a), 2.5 (b), and 10 weeks (c). Rats have been injected with the AAVrg-Cre-GFP into the ReRh nuclei. (a), (b), (c) show nuclear DAPI staining. Notice that DAPI staining appears normal at every post-injection delay. Dimensions of the scale bar are shown directly in the photographs.*



Supplementary Figure 6: Regression showing the positive correlation between the area of neuronal loss and the area of microglial activation in the ReRh of rats that received the AAVrg-Cre-GFP.

-Annexe 3-

III. Le nouveau chapitre de la thèse

De janvier à juin 2023, j'ai suivi une unité d'enseignement proposé par l'Université de Strasbourg intitulée « Nouveau chapitre de la thèse ». Elle a pour objectif de faire prendre conscience aux doctorants l'ensemble des compétences développées au cours de la thèse, et de pouvoir les valoriser dans un milieu industriel. Les objectifs étaient d'analyser ses propres compétences et savoir-faire, pour les utiliser plus facilement lors d'un entretien d'embauche. Pour cela, il a été nécessaire de vulgariser et clarifier les travaux réalisés pendant la thèse afin qu'ils soient compréhensibles par un public non spécialiste. Plusieurs méthodes de présentation et de communication nous ont été transmises, comme le fait de toujours illustrer ses propos par des exemples concrets. Ce travail s'est concrétisé par un rapport écrit, évalué par un spécialiste des ressources humains, ainsi qu'un entretien de 10 minutes avec 2 membres invités (chefs d'entreprises locales). Le rapport de ce travail est présenté ci-après.

« Valorisation des compétences, Le nouveau Chapitre de la Thèse, NCT 2023 »

Laurine BOCH, Doctorante en Neurosciences

École doctorale des Sciences de la vie et de la santé ED414

CNRS UMR 7364 Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives

Intitulé du Rapport NCT : Implication de la connexion entre deux régions cérébrales dans la persistance d'un souvenir.

Mentor : Daniel STECK

L'intitulé académique du sujet de thèse : Les voies cortico-thalamo-hippocampiques engagées dans la persistance d'un souvenir

Noms des directeur/directrice de thèse : Jean-Christophe Cassel et Anne Pereira de Vasconcelos

Date prévisionnelle de soutenance : Décembre 2023

CADRE GENERAL ET ENJEUX DE LA THESE

CONTEXTE

RESUME SUCCINCT DE LA THESE

LA THESE DANS SON CONTEXTE

MA PLACE DANS CE CONTEXTE

DEROULEMENT, GESTION ET COUT DU PROJET

PREPARATION, CADRAGE DU PROJET

FACTEURS DE RISQUE A PRIORI, ET SOLUTION POUR LES MINIMISER

FACTEURS DE REUSSITE A PRIORI

COMPÉTENCES, SAVOIR-FAIRE, QUALITES PROFESSIONNELLES ET PERSONNELLES ILLUSTRÉES PAR DES EXEMPLES

RESULTATS ET IMPACTS DES RECHERCHES

IMPACT DE LA THESE

IMPACT PERSONNEL ET IDENTIFICATION DES PISTES PROFESSIONNELLES

CADRE GENERAL ET ENJEUX DE LA THESE

Contexte

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, on estime dans l'ensemble de la population qu'entre 5 et 8% des personnes âgées de 60 ans et plus sont atteintes de démence à un moment donné. Le nombre total de personnes atteintes de démence devrait atteindre 82 millions en 2030 et 152 millions d'ici 2050. C'est pourquoi il devient urgent de comprendre les mécanismes qui sous-tendent la formation de la mémoire, afin d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques pour pallier ces déficits mnésiques.

La mémoire consiste en la capacité de restituer ou d'utiliser une information apprise il y a longtemps. La persistance des souvenirs avec le temps nécessite que les informations initialement perçues et encodée dans un état labile soient progressivement consolidées. Ce processus de consolidation peut se réaliser grâce à des modifications à l'échelle des synapses, qui sont les points de contacts entre les neurones, mais aussi à l'échelle des structures cérébrales. Plusieurs théories sur la consolidation de la mémoire ont vu le jour, toutes décrivant la nécessité de l'interaction entre deux structures cérébrales : l'hippocampe, et le cortex préfrontal. Nos souvenirs se créent et s'organisent dans les circuits de l'hippocampe, puis, au cours du temps, ils sont pris en charge, au moins en partie par des réseaux du cortex préfrontal. Ainsi la réactivation des circuits hippocampo-corticaux permet le maintien à long terme de l'information. Cependant, les connexions anatomiques précises du circuit hippocampo-cortical intervenant dans la consolidation systémique restent méconnues.

L'échange d'informations entre deux structures cérébrales repose sur leur connexion anatomique. Or on sait que les connexions entre l'hippocampe et le cortex préfrontal ne sont pas directes : ces deux structures ont donc besoin d'un relai pour communiquer. C'est dans ce contexte que notre laboratoire s'est intéressé au rôle de deux petites structures cérébrales : les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) appartenant au thalamus. Ces noyaux ReRh possèdent des relations anatomiques privilégiées, car réciproques avec l'hippocampe et avec le cortex préfrontal médian. De plus, notre équipe a montré que ces noyaux thalamiques sont indispensables à la persistance d'un souvenir. Notre équipe a ainsi mis en évidence la nécessité d'un circuit comprenant l'hippocampe, le cortex préfrontal et le thalamus dans la consolidation à long terme d'un souvenir, confortant l'idée surprenante que des noyaux du thalamus puissent jouer un rôle crucial dans la persistance d'un souvenir.

Résumé succinct de la thèse

Dans ce contexte, mon projet de thèse cherche à mieux comprendre le circuit de la mémoire à long terme, et tente d'ouvrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre les déficits de mémoire liés à des traumatismes ou à des maladies neurodégénératives.

Mon travail de thèse a constitué en l'étude d'une des connexions au sein du circuit liant l'hippocampe, le cortex préfrontal et le thalamus, et de comprendre sa fonction particulière dans la consolidation de la mémoire. Pour cela, nous avons déconnecter la voie anatomique du cortex préfrontal aux noyaux réunis et rhomboïde du thalamus, grâce à des outils génétiques.

L'utilisation des virus adéno-associés (AAV) s'est développée au cours des dernières décennies, car ils peuvent facilement être modifiés pour délivrer des gènes spécifiques dans des cellules cibles. Ils sont notamment utilisés dans de nouvelles thérapies géniques, qui permettent un traitement ciblé adapté à chaque patient. Au laboratoire, nous avons utilisé une combinaison de deux AAV, pour faire exprimer uniquement dans les neurones du cortex préfrontal projetant sur les ReRh, un signal les menant à dégénérer. Cette méthode nous a permis de déconnecter notre voie d'intérêt, sans porter atteinte au reste du circuit. Mes travaux ont voulu évaluer l'impact de la déconnexion sur la persistance d'un souvenir, chez le rat.

La thèse dans son contexte

J'ai réalisé ma thèse au LNCA, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, à Strasbourg. Il est composé de 4 équipes de recherche, dont la thématique commune est la plasticité. Le laboratoire comporte une cinquantaine de personnes au total. L'équipe dans laquelle je travaille s'intitule « Épigenétique et dynamique des systèmes de mémoire », et est constituée de 5 chercheurs, 6 doctorants et 2 ingénieurs. Cette équipe s'intéresse à la dynamique fonctionnelle de la consolidation d'une trace mnésique et aux mécanismes moléculaires et cellulaires responsables des déficits de mémoire dans certaines maladies neurodégénératives. Elle cherche à établir le fonctionnement des réseaux associés à la

mémoire, mais aussi dans un contexte pathologique, de chercher à établir de nouvelles pistes thérapeutiques dans la maladie à corps de Lewy, ou encore dans la maladie de Huntington.

Dans ce contexte, chaque année, l'école doctorale de Strasbourg permet à 30 étudiants en Master de sciences de la vie d'obtenir une bourse de 3 ans, financée par le ministère de l'Enseignement Supérieur et de l'Innovation. L'attribution de cette bourse se fait sur concours, début juillet. C'est grâce à ce financement que j'ai pu réaliser ma thèse de Neurosciences au laboratoire.

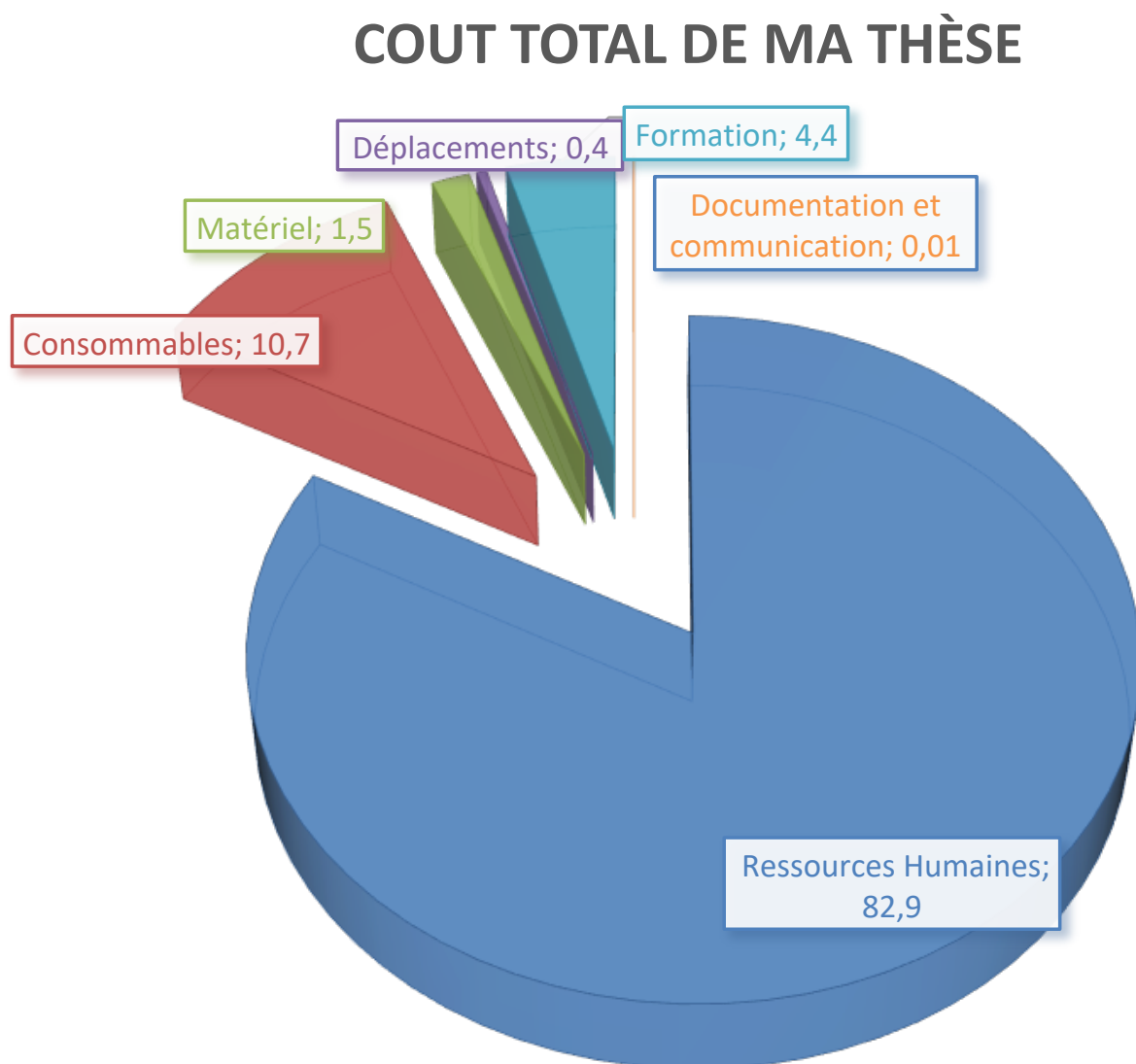
Ma place dans ce contexte

J'ai toujours été très curieuse, et eu à cœur de comprendre comment fonctionnaient les choses. Ce trait de caractère s'est conforté à partir du collège avec les premiers cours de biologie, en lien avec les sciences du vivant. Avec le temps, j'ai aussi compris que ce qui me tenait à cœur était d'aider les autres. C'est donc assez naturellement que j'ai choisi de réaliser une Licence en Psychologie à Strasbourg. Dès la première année, j'ai découvert avec enthousiasme les cours de Neurophysiologie et Neuroanatomie qui m'ont tout de suite passionnée. C'est le Pr. Jean-Christophe Cassel, mon actuel directeur de thèse, qui dispensait ces cours, et qui m'a « entraîné » dans le domaine des Neurosciences. Après plusieurs discussions avec lui, j'ai pu réaliser un stage au laboratoire en 2017, sur ma thématique de recherche actuelle. C'est alors que j'ai trouvé une profonde motivation et un véritable attrait pour le sujet, et la thématique de la mémoire. De nature déterminée, et persévérante, j'ai tout mis en œuvre pour m'orienter dans cette voie, et ai réussi à intégrer un master de neurosciences cognitive, master appartenant au domaine des sciences de la vie. Le changement de discipline (psychologie vers biologie) m'a demandé de nombreux efforts et beaucoup d'implications pour apprendre toutes les bases que je n'avais pas eu en licence de psychologie, par exemple en neurochimie. Malgré la survenue de la crise sanitaire et du confinement en 2020, j'ai tout mis en œuvre afin de pouvoir continuer mon travail de master, ce qui m'a permis d'accéder au concours de l'école doctorale afin d'obtenir ma bourse de thèse. C'est ce financement qui m'a permis de réaliser un doctorat.

Au début de cette thèse, la méthode utilisant les AAV n'en n'étant qu'au stade de la mise au point, et nécessitant plusieurs semaines d'attentes, notamment pour l'expression optimale

des virus (4-5 semaines), j'ai pu participer à un second projet, resté jusqu'alors en suspens dans l'équipe. En effet, au-delà de la consolidation, les noyaux ReRh sont impliqués dans une variété de fonctions cognitives, notamment la mémoire de travail spatiale. J'ai donc pu commencer ma thèse en complétant les travaux déjà réalisés au sein de l'équipe, ce qui m'a permis de publier deux articles dans des journaux internationaux. J'ai ensuite fait preuve de flexibilité et d'adaptation pour gérer en parallèle ces deux projets dans le cadre de ma thèse.

Déroulement, gestion et cout du projet



Nature de la dépense	Détails *		Coûts totaux (euros TTC)			
			Nombre d'unités	Coût unitaire moyen		Total
Ressources Humaines	Salaire brut mensuel	Charges				
Doctorant	2000	820	36	2820		101520
Encadrant 1	6200	2480	36	8680	10%	31248
Encadrant 2	4700	1800	36	6500	10%	23400
Encadrant 3	4000	1600	36	5600	20%	40320
Assistant Ingénieur	2500	1000	36	3500	30%	37800
Sous-total Ressources Humaines						234288
Consommables		Coût Unité	Nombre d'unités			
Fournitures expérimentales	Rats (Long-Evans)	40	333			13320
	Nourriture	20 (pour 10kg)	3	60		60
	Sciure	10 (10kg)	5	50		50
	Enrichissement (batons en bois)	0,25	400			100
	Blouse	50	4	200		200
	Gants	15 (100)	10			1500
	Scalpels	10 (les 50)	4			40
	Lames	20 (50)	40			800
	Lamelles	10 (100)	40			400
	Cônes	100 (Lot 10x96)	2			200
	Plaques de 24 puits	2,8	500	1400		1400
SAISINE 13261		Coût Unité	Nombre d'unités			
Matériel viral	Instruments chirurgie	400	1			400
	Seringues	400	4			1600
	AAV (Cre rétrograde)	500	4			2000
	AAV (caspase)	300	4			1200
Produits chimiques	Carboglace	50	2			100
	Lubrithal	7	4			28
	Isoflurane	80 (250mL)	5			400
	Bupivacaine	10 (50mL)	5			50
	Lurocaine	10 (50mL)	5			50
	Métacam	60 (20mL)	5			300
	Xylazine (Rompum)	60 (25mL)	10			600
	Kétamine (Imaglène)	12 (10mL)	10			120
	PFA 3%	44 (5L)	1			44
	NaCl 0,9	20 (1kg)	3			60
	Sucrose	22	1			22
	PFA 32%	44	4			176
Immunomarquages	NeuN	470	2			940
	Iba1	480	1			480
	GFAP	480	1			480
	Ac Secondaire Bleu	480	1			480
	Ac Secondaire Rouge	480	2			960
	Ac Secondaire Rouge Profond	480	1			480
	Ac Secondaire Vert	480	2			960
SAISINE 11427		Coût Unité	Nombre d'unités			
	Muscimol	50 (25ml)	2			100
	Cannules	10 (10)	9			90
	Ciment	30	1			30
	Xylazine (Rompum)	60 (25mL)	1			60
	Euthasol	30 (100mL)	1			30
	Kétamine (Imaglène)	12 (10mL)	1			12
	Crézyl violet					
Sous-total Consommables						30322

Infrastructures					
Entretien, gardiennage, secrétariat					
Loyers des locaux	Loyer brut	Charges locatives			
Electricité, eau, chauffage, ... (si non inclus dans les charges locatives)	Inconnu	Inconnu			
Autres					
Sous-total Infrastructures					
Matériel (amortissements)		Cout Unité	Nombre d'unités		
Ordinateur portable	1000	1	1000		1000
Caméra	40	1	40		40
Licence Anymaze (tracking)	1000	1	1000		1000
Ordinateur (perso)	2200	1	2200		2200
Logiciels de bureau	/	/			
Disque dur externe	50	2	100		100
Sous-total Matériel					4340
Déplacements	Transport	Hebergement + Frais inscription			
Neurofrance 2021 (en ligne)	/	80			80
ED Days 2021 (en ligne)	/	/			0
Congrès FENS, Paris	80	380			460
Neurofrance 2023 Lyon	56	500			556
Sous-total Déplacements					1096
Formation	100/h	100			10000
Formations					
Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)	frais d'inscription	380	3		1140
	Formation niveau concepteur + chirurgie rongeur	1000			1000
	CVEC	92	3		276
Sous-total Formation					12416
Documentation et communication		Cout Unité	Nombre d'unités		
Impression Poster		15	2		30
Sous-total Documentation et communication					30
Charges financières (intérêts des emprunts)					
Sous-total Charges financières					0
Charges exceptionnelles					
Sous-total Charges exceptionnelles					0
TOTAL					282462

Préparation, cadrage du projet

Facteurs de risque à priori, et solution pour les minimiser

A la fin de mon master, j'avais obtenu de bonnes notes, mais je n'étais pas tout en haut du classement qui permettait d'avoir la bourse. Ce classement s'effectuait comme suit : les étudiants étaient classés avec la moyenne de leur note de master, et celle obtenue lors de l'oral au concours. J'ai dû faire preuve de beaucoup d'efforts, de combativité et de ténacité pour obtenir la bourse ministérielle.

Aussi, plusieurs méthodes de mon projet nécessitaient une mise au point. L'utilisation de virus n'avait encore jamais été réalisée au laboratoire. La mise au point de cette technique a nécessité du temps, et l'implication d'Elodie, une autre doctorante. Cela m'a alors permis de m'impliquer dans un projet resté jusqu'alors en suspens dans l'équipe, le travail sur la mémoire à court terme décrit plus haut. Ce travail a abouti sur la publication de deux articles dans des journaux internationaux.

Enfin, un dernier risque important concerne le manque de moyens financiers au sein de notre équipe, dont les ressources sont modestes. En effet, plusieurs demandes de financement se sont vues refusées, ce qui nous a obligé à faire des choix, concernant le matériel expérimental, ou la réduction du nombre d'animaux par exemple. Le manque de moyen s'est surtout fait ressentir lorsque nous avons eu affaire à un gros problème concernant l'utilisation des virus ; nous avons découvert très tardivement (après plus d'un an et demi de thèse) que nos virus ont eu un impact négatif à peine décrit dans la littérature, et qu'ils causaient des pertes neuronales dans le cerveau des rats. Il aurait été beaucoup plus simple, mais surtout plus rapide de faire appel à une entreprise afin de concevoir un nouveau virus adapté à notre étude, mais l'achat ou la conception des virus représente un budget non négligeable, et nous avons dû trouver une solution avec les ressources du laboratoire. Nous avons alors choisi d'étudier l'effet de l'injection des virus à différents délais et concentrations, dans le but de caractériser un peu plus le phénomène néfaste causé par les virus, et ce pour mettre en valeur ce travail dans une publication scientifique. Cette situation sera décrite plus précisément dans le paragraphe des compétences, ci-après.

Facteurs de réussite à priori

Mon projet de thèse a été réalisé dans un laboratoire spécialisé dans la mémoire, et les différentes tâches comportementales étaient donc maîtrisées par l'équipe. Excepté l'utilisation des virus, l'ensemble des techniques de laboratoires étaient calibrées et donnaient donc de bonnes chances de réussites techniques.

De plus, l'entente au sein du laboratoire et de l'équipe est très bonne, et nous formons une équipe soudée, et complémentaire, ce qui nous permet d'avoir de bonne attente quant à l'implication et le travail fourni par tous.

Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles illustrées par des exemples

Scientifique

Mon travail de thèse m'a permis de repousser les connaissances actuelles dans mon domaine, de m'apprendre à analyser et interpréter des données. J'ai pu les penser et les arranger afin qu'elles correspondent aux normes d'un article scientifique international, mais aussi dans ma thèse. Ce travail m'a également permis d'effectuer une veille scientifique approfondie et à analyser de manière critique les dernières publications dans le domaine. Je suis à l'affût des dernières avancées techniques et études récentes dans mon domaine de recherche, et serais donc capable de me former sur un autre sujet, puisque je sais comment et où trouver les dernières publications.

Communication

D'un point de vue relationnel, ma thèse aura été très enrichissante, car j'ai pu faire du monitorat, et donc une première expérience en tant que « professeur » à la faculté. J'ai aussi pu participer à de nombreux évènements grand public, comme la Fête de la Science, ou la semaine du cerveau, pour laquelle je suis intervenue dans des collèges et lycées d'Alsace pour donner une conférence vulgarisée sur la mémoire et le sommeil. Enfin j'ai pu présenter mes travaux lors de différents congrès internationaux. Enfin, au quotidien, au laboratoire, l'ensemble des réunions se faisaient en anglais, et de nombreux étudiants étrangers ont

permis de créer un environnement riche et multiculturel. Toutes ces expériences m'ont appris à m'adapter, et à ajuster mon discours selon le public.

Encadrement / Management

J'ai eu la chance d'avoir plusieurs expériences d'encadrement lors de ma thèse, grâce à de nombreux étudiants en stage, une étudiante étrangère (communication en anglais uniquement) présente durant 6 mois pour son Master 2, une étudiante en BTS pour 2 mois et plusieurs étudiants pour 30h de stage. Ces expériences ont confirmé le fait que j'aime gérer, interagir et travailler en groupe, que je sais faire preuve de flexibilité et d'organisation pour adapter les emplois du temps de chacun, mais aussi de rigueur.

Relationnel

D'un point de vue humain, je suis très à l'écoute lorsque quelqu'un en a besoin, et réciproquement, je n'hésite pas à demander de l'aide à mon entourage et à ma hiérarchie lorsque j'en ai besoin afin que l'on puisse trouver ensemble une solution au problème rencontré. Cela est d'autant plus important puisque j'ai eu la chance d'avoir trois encadrants donc d'autant plus de discussions possibles, qui permettent d'ouvrir les idées. Cette configuration a d'autant plus développé mon esprit d'équipe, et mon empathie.

Flexibilité / Persévérance

Avant d'effectuer mon master en Neurosciences, qui appartient à la faculté de biologie, j'ai réalisé une licence en psychologie. J'ai dû faire preuve de travail et de persévérance pour d'une part avoir les notes suffisantes pour être acceptée en master, mais aussi pour m'adapter à un domaine de connaissances qui n'était pas le mien. Cela m'a permis de sortir de ma zone de confort, et de m'adapter rapidement afin d'atteindre mes objectifs. Cette situation s'étant reproduite pour l'obtention de la bourse ministérielle, je sais que je suis capable de fournir une grande quantité de travail et de persévérer lorsque c'est nécessaire.

Organisation

La thèse permet d'apprendre à gérer son emploi du temps, puisqu'elle se réalise sur une période restreinte, durant laquelle il est nécessaire de faire face à de nombreux imprévus. La

prévision des expérimentations en amont, la gestion de la réservation du matériel, des salles, et des tâches permet d'éviter au maximum ces imprévus.

Éthique

L'expérimentation animale nécessite un cadre très strict. Il est nécessaire d'avoir une éthique irréprochable, en définissant en amont de chaque expérience des points limites, avec un suivi très précis du bien-être des animaux. Dans nos expériences, nous avons toujours cherché à respecter la règle des trois R : réduire, raffiner et remplacement, en utilisant par exemple un nombre minimum d'animaux, mais d'en tirer un maximum d'informations pour le projet.

Résolution de problème

La thèse m'a permis d'apprendre, tout en étant le plus efficient possible, à résoudre les problèmes. Comme abordé plus haut, le plus gros problème auquel j'ai pu être confronté fut lorsque nous avons découvert que les virus que nous utilisions causaient des pertes neuronales dans le cerveau des rats. La solution la plus simple (acheter un autre virus et recommencer les expériences) n'étant pas réalisable par manque de moyens financiers, nous avons mis à profit d'anciennes données acquises jusqu'alors pour publier un article. Cette solution nous a permis de faire plus, tout en consommant moins.

Résultats et impacts des recherches

Impact de la thèse

Mes travaux de thèse vont permettre de donner lieu à plusieurs publications scientifiques et ce sur divers sujets. Deux publications portant sur la mémoire à court terme (projet secondaire) ont été publiés dans des journaux internationaux. Enfin les travaux portant sur les problèmes rencontrés à la suite de l'utilisation des virus sont encore en cours d'écriture, mais permettront d'avertir et prévenir quant à l'utilisation des AAVs en recherche, afin d'en garantir l'efficacité. Nous publierons également un article sur la mémoire à long terme une fois les analyses terminées, durant l'été.

Concrètement, mes travaux de thèse permettent d'apporter davantage de connaissances sur deux types de mémoire (court et long terme), ce qui est essentiel au regard de diverses

pathologies, qu'elles soient psychiatriques, où on retrouve des dysfonctions de la mémoire à court terme, ou neurodégénératives, où la mémoire à long terme fait défaut.

Impact personnel et identification des pistes professionnelles

D'un point de vue personnel la thèse m'aura permis de grandir, savoir ce dont je suis capable et ce dont j'ai besoin pour m'épanouir professionnellement. J'ai appris à avoir confiance en moi, en mes idées, et ai appris à les partager avec un vaste panel de personnes, qu'elles soient du domaine scientifique ou non. J'ai réalisé que ce qui me plaisait vraiment était le partage et l'aspect relationnel.

Au fil de la thèse, je me suis rendu compte que mes attentes professionnelles avaient évoluées. Je souhaitais initialement être enseignant-chercheur, et donc faire suivre ma thèse par divers contrats postdoctoraux avant de pouvoir postuler aux concours de la fonction publique. Cependant, et grâce aux diverses formations suivies lors de ma thèse, j'ai pris conscience que je ne souhaite pas m'orienter vers la recherche dans la fonction publique. La difficulté d'obtention de financement est un vrai frein, et les chercheurs passent la majorité de leur temps à répondre à des appels d'offre. Bien qu'ils aient un poste stable et une grande liberté dans leur quotidien, je pense que l'environnement dans une entreprise pourrait me correspondre. Lors de ma thèse j'ai découvert que j'aimais encadrer et fédérer les gens avec qui je travaille. J'aimerais donc avoir une certaine forme de management / leadership dans mon travail. Aussi je souhaiterais rester dans le domaine des Neurosciences, car ce domaine me passionne toujours autant, mais j'aspire à trouver un travail ayant une application clinique. C'est pourquoi, et grâce aux différents entretiens réseaux que j'ai eu la chance de faire, (Marie, Chargé d'innovation, IHU, Strasbourg / Etienne, Medical Science Liaison, Ipsen, Paris) j'ai réalisé que les métiers **d'expert scientifique régional**, ou **chargé de projet en recherche clinique** sont des métiers qui m'intéresseraient beaucoup. Les deux postes nécessitent d'importantes qualités relationnelles, et conservent un pied dans le domaine de la recherche, tout en participant activement à améliorer la qualité de vie des gens.

Stage de M2

- Bibliographie
- Comportement (tests de mémoire spatiale) chez le rat

Projet 1 : Rôle d'une connexion entre deux régions cérébrales dans la mémoire à long terme

« Problème » : Le projet 1 demande une mise au point qui prend du temps (temps d'attente suite à l'utilisation de virus que l'on injecte dans le cerveau des rats) une Master 2 réalise cette mise au point lors de son stage

Projet 2 : Rôle d'une structure cérébrale dans la mémoire à court terme

Encadrement d'une Master 2 pour 6 mois de stage

Apprendre les techniques, l'analyse des résultats, et relecture de son mémoire.

Gros Problème : le virus que l'on utilise fait des « trous » de neurones dans le cerveau de nos rats

→ Compréhension du problème en réalisant une cohorte supplémentaire 32 rats, et valorisation de ce travail grâce à l'écriture d'un article dans un journal scientifique

Meeting FENS, Paris,
Présentation Poster sur projet 2

Rédaction

- Manuscrit de Thèse.
- Article sur les « trous »
- Préparation de la soutenance

Soutenance de thèse

Janvier 2020

Octobre 2020

Janvier 2021

Mai 2021

Septembre 2021

Janvier 2022

Mi thèse
Juin 2022

Juillet 2022

Octobre 2022

Février 2023

Juin 2023

Décembre 2023

Etudes au microscope des résultats de Master (laissés jusqu'alors en suspend dû à la pandémie de Covid 19)

Monitorat en Licence 2 de Psychologie

Etude comportementale projet n°2
1 cohorte de 60 rats

Ecriture d'un premier article sur le projet n°1 (figures, statistiques, relectures)

Meeting

Participations à 2 congrès en ligne : Neurofrance, et les EDDays, avec présentation d'un poster sur les résultats du projet n°2)

Ecriture d'un second article sur le projet n°1

Monitorat L2 Psy

Formation à la chirurgie chez le rongeur

Etude comportementale projet 1 reprend, car fin de la mise au point.

Nouvelle cohorte compréhension des « trous »
+ nouveaux paramètres idéaux pour l'utilisation des virus

Chirurgie et microscopie
Analyse et quantifications du phénomène

Monitorat L2 Psy

Nouvelle cohorte avec paramètres optimisés (30 rats)
Chirurgie + comportement pour répondre à notre question initiale

Deuxième moitié de la cohorte (30 rats) Chirurgie et comportement

Meeting Neurofrance, Lyon, présentation poster projet 1

Analyses histologiques

-Références-

- Agster KL, Burwell RD (2009) Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus* 19:1159–1186 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.20578>
- Albe-Fessard D, Besson JM (1973) Convergent Thalamic and Cortical Projections — The Non-Specific System. In: *Somatosensory System* (Iggo A, ed), pp 489–560 *Handbook of Sensory Physiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-65438-1_14
- Alcalá-Vida R, Lotz C, Brulé B, Seguin J, Decraene C, Awada A, Bombardier A, Cosquer B, Pereira De Vasconcelos A, Brouillet E, Cassel J-C, Boutillier A-L, Merienne K (2022) Altered activity-regulated H3K9 acetylation at TGF-beta signaling genes during egocentric memory in Huntington’s disease. *Prog Neurobiol* 219:102363 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008222001496>
- Ali M, Cholvin T, Muller MA, Cosquer B, Kelche C, Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A (2017) Environmental enrichment enhances systems-level consolidation of a spatial memory after lesions of the ventral midline thalamus. *Neurobiol Learn Mem* 141:108–123 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742716302386>
- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571–591 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452289904247>
- Anastasiades PG, Carter AG (2021) Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends Neurosci* 44:550–563 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223621000722>
- Anderson MC, Neely JH (1996) Interference and Inhibition in Memory Retrieval. In: *Memory*, pp 237–313. Elsevier. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780121025700500100>
- Angulo-Garcia D, Ferraris M, Ghestem A, Nallet-Khosrofiyan L, Bernard C, Quilichini PP (2020) Cell Assemblies in the Cortico-Hippocampal-Reuniens Network during Slow Oscillations. *J Neurosci* 40:8343–8354 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0571-20.2020>
- Apergis-Schoute J, Pinto A, Paré D (2006) Ultrastructural organization of medial prefrontal inputs to the rhinal cortices. *Eur J Neurosci* 24:135–144 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1460-9568.2006.04894.x>
- Arai R, Jacobowitz DM, Deura S (1994) Distribution of calretinin, calbindin-D28k, and parvalbumin in the rat thalamus. *Brain Res Bull* 33:595–614 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0361923094900868>
- Arikan R, Blake NMJ, Erinjeri JP, Woolsey TA, Giraud L, Highstein SM (2002) A method to measure the effective spread of focally injected muscimol into the central nervous system with electrophysiology and light microscopy. *J Neurosci Methods* 118:51–57 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027002001437>
- Aschauer DF, Kreuz S, Rumpel S (2013) Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain Qiu J, ed. *PLoS ONE* 8:e76310 Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076310>
- Babb SJ, Crystal JD (2006) Episodic-like Memory in the Rat. *Curr Biol* 16:1317–1321 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982206016083>
- Baddeley A (1992) Working Memory. *Science* 255:556–559 Available at:

- <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1736359> [Accessed July 12, 2023].
- Baddeley A (2000) The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci* 4:417–423 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364661300015382>
- Baddeley AD, Hitch G (1974) Working Memory. In: *Psychology of Learning and Motivation*, pp 47–89. Elsevier. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079742108604521>
- Baeg EH, Kim YB, Kim J, Ghim J-W, Kim JJ, Jung MW (2007) Learning-Induced Enduring Changes in Functional Connectivity among Prefrontal Cortical Neurons. *J Neurosci* 27:909–918 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.4759-06.2007>
- Bao H, Asrican B, Li W, Gu B, Wen Z, Lim S-A, Haniff I, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Philpot B, Song J (2017) Long-Range GABAergic Inputs Regulate Neural Stem Cell Quiescence and Control Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Stem Cell* 21:604–617.e5 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590917304204>
- Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93:74–104 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/h0077579>
- Basting T, Xu J, Mukerjee S, Epling J, Fuchs R, Sriramula S, Lazartigues E (2018) Glutamatergic neurons of the paraventricular nucleus are critical contributors to the development of neurogenic hypertension. *J Physiol* 596:6235–6248 Available at: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/JP276229>
- Bero AW, Meng J, Cho S, Shen AH, Canter RG, Ericsson M, Tsai L-H (2014) Early remodeling of the neocortex upon episodic memory encoding. *Proc Natl Acad Sci* 111:11852–11857 Available at: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1408378111>
- Bertram EH, Zhang DX (1999) Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92:15–26 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645229800712X>
- Boch L, Morvan T, Neige T, Kobakhidze N, Panzer E, Cosquer B, Pereira de Vasconcelos A, Stephan A, Cassel J-C (2022) Inhibition of the ventral midline thalamus does not alter encoding, short-term holding or retrieval of spatial information in rats performing a water-escape working memory task. *Behav Brain Res* 432:113979 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432822002479>
- Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F (1988) The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 19:1083–1092 Available at: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.19.9.1083>
- Bokor H, Csáki Á, Kocsis K, Kiss J (2002) Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat: Reuniens connection to hippocampus and septum. *Eur J Neurosci* 16:1227–1239 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1460-9568.2002.02189.x>
- Bolhuis JJ, Burešová O, Bureš J (1985) Persistence of working memory of rats in an aversively motivated radial maze task. *Behav Brain Res* 15:43–49 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432885900166>
- Bozic I, Rusterholz T, Mikutta C, Del Rio-Bermudez C, Nissen C, Adamantidis A (2023) Coupling between the prelimbic cortex, nucleus reuniens, and hippocampus during NREM sleep remains stable under cognitive and homeostatic demands. *Eur J Neurosci* 57:106–128

- Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ejn.15853>
- Braak H, Braak E (1991) Alzheimer's disease affects limbic nuclei of the thalamus. *Acta Neuropathol (Berl)* 81:261–268 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF00305867>
- Bratch A, Kann S, Cain JA, Wu J-E, Rivera-Reyes N, Dalecki S, Arman D, Dunn A, Cooper S, Corbin HE, Doyle AR, Pizzo MJ, Smith AE, Crystal JD (2016) Working Memory Systems in the Rat. *Curr Biol* 26:351–355 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982215015614>
- Brown V, Tait D (2010) Behavioral Flexibility: Attentional Shifting, Rule Switching and Response Reversal. In, pp 209–213.
- Bullitt E (1990) Expression of *C - fos* -like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296:517–530 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.902960402>
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002) The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. *Neuron* 35:625–641 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627302008309>
- Buzsáki G (1989) Two-stage model of memory trace formation: A role for “noisy” brain states. *Neuroscience* 31:551–570 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452289904235>
- Buzsáki G (2019) *The Brain from Inside Out*, 1st ed. Oxford University Press. Available at: <https://academic.oup.com/book/35081>
- Buzsáki G, Moser EI (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci* 16:130–138 Available at: <https://www.nature.com/articles/nn.3304>
- Cacucci F, Lever C, Wills TJ, Burgess N, O'Keefe J (2004) Theta-Modulated Place-by-Direction Cells in the Hippocampal Formation in the Rat. *J Neurosci* 24:8265–8277 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2635-04.2004>
- Cassel J-C, Ferraris M, Quilichini P, Cholvin T, Boch L, Stephan A, Pereira de Vasconcelos A (2021) The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: A crossroads for cognition-relevant information processing? *Neurosci Biobehav Rev* 126:338–360 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014976342100138X>
- Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A, Loureiro M, Cholvin T, Dalrymple-Alford JC, Vertes RP (2013) The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog Neurobiol* 111:34–52 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008213000841>
- Cassel R, Kelche C, Lecourtier L, Cassel J-C (2012) The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats. *Behav Brain Res* 230:333–342 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432812001192>
- Çavdar S, Onat FY, Çakmak YÖ, Yananli HR, Gülçebi M, Aker R (2008) The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reuniens nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat. *J Anat* 212:249–256 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7580.2008.00858.x>
- Cholvin T, Hok V, Giorgi L, Chaillan FA, Poucet B (2018) Ventral Midline Thalamus Is Necessary for Hippocampal Place Field Stability and Cell Firing Modulation. *J Neurosci* 38:158–172 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2039-17.2017>

- Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, Cassel J-C (2013) The Ventral Midline Thalamus Contributes to Strategy Shifting in a Memory Task Requiring Both Prefrontal Cortical and Hippocampal Functions. *J Neurosci* 33:8772–8783 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6618831/>
- Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K (2013) Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497:332–337 Available at: <https://www.nature.com/articles/nature12107>
- Churchwell JC, Kesner RP (2011) Hippocampal-prefrontal dynamics in spatial working memory: Interactions and independent parallel processing. *Behav Brain Res* 225:389–395 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586941/>
- Clawson W, Vicente AF, Ferraris M, Bernard C, Battaglia D, Quilichini PP (2019) Computing hubs in the hippocampus and cortex. *Sci Adv*.
- Clayton NS, Bussey TJ, Dickinson A (2003) Can animals recall the past and plan for the future? *Nat Rev Neurosci* 4:685–691 Available at: <https://www.nature.com/articles/nrn1180>
- Clayton NS, Dickinson A (1998) Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395:272–274 Available at: <https://www.nature.com/articles/26216> [Accessed July 20, 2023].
- Colgin LL (2013) Mechanisms and Functions of Theta Rhythms. *Annu Rev Neurosci* 36:295–312 Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-neuro-062012-170330>
- Colgin LL (2016) Rhythms of the hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 17:239–249.
- Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT (1990) Projections to the rostral reticular thalamic nucleus in the rat. *Exp Brain Res* 80 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF00228857>
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28:771–784 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014976340400096X>
- Davies JR, Garcia-Pelegrin E (2022) Episodic-like memory in common bottlenose dolphins. *Curr Biol* 32:3436–3442.e2 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982222009915>
- Davis RL, Zhong Y (2017) The Biology of Forgetting—A Perspective. *Neuron* 95:490–503 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627317304981>
- De Witte L, Brouns R, Kavadias D, Engelborghs S, De Deyn PP, Mariën P (2011) Cognitive, affective and behavioural disturbances following vascular thalamic lesions: A review. *Cortex* 47:273–319 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001094521000225X>
- Delatour B, Gisquet-Verrier P (1999) Lesions of the prelimbic–infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: Evidence for a role in working memory? *Behav Neurosci* 113:941–955 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.113.5.941>
- Dempsey EW, Morison RS (1941) THE PRODUCTION OF RHYTHMICALLY RECURRENT CORTICAL POTENTIALS AFTER LOCALIZED THALAMIC STIMULATION. *Am J Physiol-Leg Content* 135:293–300 Available at: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplegacy.1941.135.2.293>
- D’Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning

- and memory. *Brain Res Rev* 36:60–90 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017301000674>
- Di Prisco GV, Vertes RP (2006) Excitatory actions of the ventral midline thalamus (rhomboid/reuniens) on the medial prefrontal cortex in the rat. *Synapse* 60:45–55 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/syn.20271>
- Diekelmann S, Born J (2010) The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11:114–126 Available at: <http://www.nature.com/articles/nrn2762>
- Doeller CF, Barry C, Burgess N (2010) Evidence for grid cells in a human memory network. *Nature* 463:657–661 Available at: <https://www.nature.com/articles/nature08704>
- Dolleman-van der Weel MJ, Griffin AL, Ito HT, Shapiro ML, Witter MP, Vertes RP, Allen TA (2019) The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior. *Learn Mem* 26:191–205 Available at: <http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.048389.118>
- Dolleman-Van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP (1997) Nucleus Reuniens Thalami Modulates Activity in Hippocampal Field CA1 through Excitatory and Inhibitory Mechanisms. *J Neurosci* 17:5640–5650 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6793818/>
- Dolleman-van der Weel MJ, Lopes da Silva FH, Witter MP (2017) Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat. *Brain Struct Funct* 222:2421–2438 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00429-016-1350-6>
- Dolleman-van der Weel MJ, Morris RGM, Witter MP (2009) Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Struct Funct* 213:329–342 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00429-008-0200-6>
- Dolleman-van der Weel MJ, Witter MP (2020) The thalamic midline nucleus reuniens: potential relevance for schizophrenia and epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 119:422–439 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763420305911>
- Dolleman-Van Der Weel MJ, Wouterlood FG, Witter MP (1994) Multiple anterograde tracing, combining Phaseolus vulgaris leucoagglutinin with rhodamine- and biotin-conjugated dextran amine. *J Neurosci Methods* 51:9–21 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165027094900213>
- Duan AR, Varela C, Zhang Y, Shen Y, Xiong L, Wilson MA, Lisman J (2015) Delta Frequency Optogenetic Stimulation of the Thalamic Nucleus Reuniens Is Sufficient to Produce Working Memory Deficits: Relevance to Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 77:1098–1107 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322315001559>
- Dudai Y (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12:211–216 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438802003057>
- Dudai Y (2004) The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annu Rev Psychol* 55:51–86 Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Dudchenko PA (2001) How do animals actually solve the T maze? *Behav Neurosci* 115:850–860 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.115.4.850>
- Dudchenko PA (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 28:699–709 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763404000909>

- Dudchenko PA, Wood ER, Eichenbaum H (2000) Neurotoxic hippocampal lesions have no effect on odor span and little effect on odor recognition memory but produce significant impairments on spatial span, recognition, and alternation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20:2964–2977.
- Edeline J-M, Hars B, Hennevin E, Cotillon N (2002) Muscimol Diffusion after Intracerebral Microinjections: A Reevaluation Based on Electrophysiological and Autoradiographic Quantifications. *Neurobiol Learn Mem* 78:100–124 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742701940353>
- Eichenbaum H, Cohen NJ (2014) Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function? *Neuron* 83:764–770 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627314006436>
- Ekstrom AD, Kahana MJ, Caplan JB, Fields TA, Isham EA, Newman EL, Fried I (2003) Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature* 425:184–188 Available at: <https://www.nature.com/articles/nature01964>
- Ellenbogen JM, Payne JD, Stickgold R (2006) The role of sleep in declarative memory consolidation: passive, permissive, active or none? *Curr Opin Neurobiol* 16:716–722 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438806001474>
- Enna SJ, Gallagher JP (1983) Biochemical and Electrophysiological Characteristics of Mammalian Gaba Receptors. In: *International Review of Neurobiology*, pp 181–212. Elsevier. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074774208602226>
- Erben L, Weldon JP, Murphy R, Buonanno A (2022) Toxic and Phenotypic Effects of AAV_Cre Used to Transduce Mesencephalic Dopaminergic Neurons. *Int J Mol Sci* 23:9462 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9408874/>
- Farah MJ, Hammond KM, Levine DN, Calvanio R (1988) Visual and spatial mental imagery: Dissociable systems of representation. *Cognit Psychol* 20:439–462 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0010028588900126> [Accessed August 21, 2023].
- Ferraris M, Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A, Stephan A, Quilichini PP (2021) The nucleus reuniens, a thalamic relay for cortico-hippocampal interaction in recent and remote memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 125:339–354 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763421000798>
- Ferraris M, Ghestem A, Vicente AF, Nallet-Khosroffian L, Bernard C, Quilichini PP (2018) The Nucleus Reuniens Controls Long-Range Hippocampo–Prefrontal Gamma Synchronization during Slow Oscillations. *J Neurosci* 38:3026–3038 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3058-17.2018>
- Finger S (2001) *Origins of Neuroscience: A History of Explorations Into Brain Function*. Oxford University Press.
- Frank LM, Brown EN, Wilson M (2000) Trajectory encoding in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuron* 27:169–178.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130 Available at: <http://www.nature.com/articles/nrn1607>
- Fries P (2005) A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci* 9:474–480 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364661305002421>
- Funahashi S, Kubota K (1994) Working memory and prefrontal cortex. *Neurosci Res* 21:1–11 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168010294900639>

- Futter JE, Aggleton JP (2006) How rats perform spatial working memory tasks: Limitations in the use of egocentric and idiothetic working memory. *Q J Exp Psychol* 59:77–99 Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1080/02724990544000068>
- Gabbott P, Headlam A, Busby S (2002) Morphological evidence that CA1 hippocampal afferents monosynaptically innervate PV-containing neurons and NADPH-diaphorase reactive cells in the medial prefrontal cortex (Areas 25/32) of the rat. *Brain Res* 946:314–322 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899302024873>
- Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492:145–177 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.20738>
- Gais S, Lucas B, Born J (2006) Sleep after learning aids memory recall. *Learn Mem* 13:259–262 Available at: <http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.132106>
- Gasser J, Pereira de Vasconcelos A, Cosquer B, Boutillier A-L, Cassel J-C (2020) Shifting between response and place strategies in maze navigation: Effects of training, cue availability and functional inactivation of striatum or hippocampus in rats. *Neurobiol Learn Mem* 167:107131 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742719301984>
- Gengler S, Mallot HA, Hölscher C (2005) Inactivation of the rat dorsal striatum impairs performance in spatial tasks and alters hippocampal theta in the freely moving rat. *Behav Brain Res* 164:73–82 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432805002238>
- Genoux D, Haditsch U, Knobloch M, Michalon A, Storm D, Mansuy IM (2002) Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418:970–975 Available at: <https://www.nature.com/articles/nature00928>
- Giardino L, CalzÁ L, Zanni M, Velardo A, Pantaleoni M, Marrama P (1989) Daily Modifications of 3h-Naloxone Binding Sites in the Rat Brain: A Quantitative Autoradiographic Study. *Chronobiol Int* 6:203–216 Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07420528909056920>
- Gildenberg PL (2001) Spiegel and Wycis – The Early Years. *Stereotact Funct Neurosurg* 77:11–16 Available at: <https://www.karger.com/Article/FullText/64587>
- Gill KM, Mizumori SJY (2006) Context-dependent modulation by D₁ receptors: Differential effects in hippocampus and striatum. *Behav Neurosci* 120:377–392 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.120.2.377>
- Girardeau G, Benchenane K, Wiener SI, Buzsáki G, Zugaro MB (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci* 12:1222–1223 Available at: <https://www.nature.com/articles/nn.2384>
- Gisquet-Verrier P, Delatour B (2006) The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: Not involved in the short-term maintenance but in monitoring and processing functions. *Neuroscience* 141:585–596 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645220600491X>
- Giuditta A, Ambrosini MV, Montagnese P, Mandile P, Cotugno M, Zucconi GG, Vescia S (1995) The sequential hypothesis of the function of sleep. *Behav Brain Res* 69:157–166 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016643289500012I>
- Goldman-Rakic PS (1995) Architecture of the Prefrontal Cortex and the Central Executive. *Ann N Y Acad Sci* 769:71–84 Available at: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1995.tb38132.x>
- Gordon JA (2011) Oscillations and hippocampal–prefrontal synchrony. *Curr Opin Neurobiol*

- 21:486–491 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959438811000390>
- Griffin AL (2015) Role of the thalamic nucleus reuniens in mediating interactions between the hippocampus and medial prefrontal cortex during spatial working memory. *Front Syst Neurosci* 9 Available at:
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnsys.2015.00029/abstract>
- Groenewegen HJ, Berendse HW (1994) The specificity of the ‘nonspecific’ midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci* 17:52–57 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166223694900744>
- Guitar NA, Roberts WA (2015) The interaction between working and reference spatial memories in rats on a radial maze. *Behav Processes* 112:100–107 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376635714002484>
- Gursky ZH, Klintsova AY (2021) Changes in Representation of Thalamic Projection Neurons within Prefrontal-Thalamic-Hippocampal Circuitry in a Rat Model of Third Trimester Binge Drinking. *Brain Sci* 11:323 Available at: <https://www.mdpi.com/2076-3425/11/3/323>
- Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE (2015) NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 7:42–47 Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4463411/>
- Guskjolen A, Cembrowski MS (2023) Engram neurons: Encoding, consolidation, retrieval, and forgetting of memory. *Mol Psychiatry* Available at:
<https://www.nature.com/articles/s41380-023-02137-5>
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M-B, Moser EI (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801–806 Available at:
<https://www.nature.com/articles/nature03721>
- Halassa MM, Acsády L (2016) Thalamic Inhibition: Diverse Sources, Diverse Scales. *Trends Neurosci* 39:680–693 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223616300765>
- Hallock HL, Wang A, Shaw CL, Griffin AL (2013) Transient inactivation of the thalamic nucleus reuniens and rhomboid nucleus produces deficits of a working-memory dependent tactile-visual conditional discrimination task. *Behav Neurosci* 127:860–866 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/a0034653>
- Hauer BE, Pagliardini S, Dickson CT (2019) The Reuniens Nucleus of the Thalamus Has an Essential Role in Coordinating Slow-Wave Activity between Neocortex and Hippocampus. *eneuro* 6:ENEURO.0365-19.2019 Available at:
<https://www.eneuro.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0365-19.2019>
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27:555–579 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763403001027>
- Hembrook JR, Mair RG (2011) Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus* 21:815–826 Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2974946/>
- Hembrook JR, Onos KD, Mair RG (2012) Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus* 22:853–860 Available at:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.20945>

- Henke K (2010) A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat Rev Neurosci* 11:523–532 Available at: <https://www.nature.com/articles/nrn2850>
- Herkenham M (1978) The connections of the nucleus reuniens thalami: Evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol* 177:589–609 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.901770405>
- Hoesley SV (n.d.) THE STRUCTURE AND FUNCTIONS OF THE CEREBELLUM EXAMINED BY A NEW METHOD.
- Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212:149–179 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00429-007-0150-4>
- Hoover WB, Vertes RP (2012) Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study. *Brain Struct Funct* 217:191–209 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00429-011-0345-6>
- Hu P, Stylos-Allan M, Walker MP (2006) Sleep Facilitates Consolidation of Emotional Declarative Memory. *Psychol Sci* 17:891–898 Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1111/j.1467-9280.2006.01799.x>
- Hylin MJ, Kerr AL, Holden R (2017) Understanding the Mechanisms of Recovery and/or Compensation following Injury. *Neural Plast* 2017:1–12 Available at: <https://www.hindawi.com/journals/np/2017/7125057/>
- Isomura Y, Sirota A, Özen S, Montgomery S, Mizuseki K, Henze DA, Buzsáki G (2006) Integration and Segregation of Activity in Entorhinal-Hippocampal Subregions by Neocortical Slow Oscillations. *Neuron* 52:871–882 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627306008221>
- Ito HT, Zhang S-J, Witter MP, Moser EI, Moser M-B (2015) A prefrontal–thalamo–hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature* 522:50–55 Available at: <http://www.nature.com/articles/nature14396>
- Iwasaki H, Jodo E, Kawachi A, Miki T, Kayama Y, Koyama Y (2010) Role of the lateral preoptic area and the bed nucleus of stria terminalis in the regulation of penile erection. *Brain Res* 1357:70–78 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899310017531>
- Jacobs J, Weidemann CT, Miller JF, Solway A, Burke JF, Wei X-X, Suthana N, Sperling MR, Sharan AD, Fried I, Kahana MJ (2013) Direct recordings of grid-like neuronal activity in human spatial navigation. *Nat Neurosci* 16:1188–1190 Available at: <https://www.nature.com/articles/nn.3466>
- Janeway C ed. (2001) *Immunobiology: the immune system in health and disease* ; [animated CD-ROM inside], 5. ed. New York, NY: Garland Publ. [u.a.].
- Jarrard LE (1983) Selective hippocampal lesions and behavior: Effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behav Neurosci* 97:873–889 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.97.6.873>
- Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* -leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313:574–586 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.903130404>
- Jin J, Maren S (2015) Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. *Front Syst Neurosci* 9 Available at:

- <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnsys.2015.00170/abstract>
- Josselyn SA, Tonegawa S (2020) Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science* 367:eaaw4325 Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaw4325>
- Joyce MKP, Marshall LG, Banik SL, Wang J, Xiao D, Bunce JG, Barbas H (2022) Pathways for Memory, Cognition and Emotional Context: Hippocampal, Subgenual Area 25, and Amygdalar Axons Show Unique Interactions in the Primate Thalamic Reuniens Nucleus. *J Neurosci* 42:1068–1089 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1724-21.2021>
- Jozet-Alves C, Bertin M, Clayton NS (2013) Evidence of episodic-like memory in cuttlefish. *Curr Biol* 23:R1033–R1035 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982213012621>
- Kafetzopoulos V, Kokras N, Sotiropoulos I, Oliveira JF, Leite-Almeida H, Vasalou A, Sardinha VM, Papadopoulou-Daifoti Z, Almeida OFX, Antoniou K, Sousa N, Dalla C (2018) The nucleus reuniens: a key node in the neurocircuitry of stress and depression. *Mol Psychiatry* 23:579–586 Available at: <http://www.nature.com/articles/mp201755>
- Kesner RP (2000) Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat. *Psychobiology* 28:219–228 Available at: <https://link.springer.com/10.3758/BF03331980>
- Kesner RP, Churchwell JC (2011) An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem* 96:417–431 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742711001420>
- Kirch RD, Pinnell RC, Hofmann UG, Cassel J-C (2015) The Double-H Maze: A Robust Behavioral Test for Learning and Memory in Rodents. *J Vis Exp*:52667 Available at: <https://www.jove.com/t/52667/the-double-h-maze-robust-behavioral-test-for-learning-memory>
- Klein MM, Cholvin T, Cosquer B, Salvadori A, Le Mero J, Kourouma L, Boutillier A-L, Pereira De Vasconcelos A, Cassel J-C (2019) Ventral midline thalamus lesion prevents persistence of new (learning-triggered) hippocampal spines, delayed neocortical spinogenesis, and spatial memory durability. *Brain Struct Funct* 224:1659–1676 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00429-019-01865-1>
- Klingberg T (2000) Limitations in information processing in the human brain: neuroimaging of dual task performance and working memory tasks. In: *Progress in Brain Research*, pp 95–102. Elsevier. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612300260093>
- Kohli S, Andrianova L, Margetts-Smith G, Brady ES, Craig MT (2021) Chemogenetic activation of midline thalamic nuclei fails to ameliorate memory deficits in two mouse models of Alzheimer’s disease. *Neuroscience*. Available at: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.06.30.450500>
- Kolb B (1990) Prefrontal cortex. In: *The cerebral cortex of the rat*, pp 437–458. Cambridge, MA, US: The MIT Press.
- Kolmac CI, Mitrofanis J (1997) Organisation of the reticular thalamic projection to the intralaminar and midline nuclei in rats. *J Comp Neurol* 377:165–178 Available at: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970113\)377:2<165::AID-CNE2>3.0.CO;2-1](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9861(19970113)377:2<165::AID-CNE2>3.0.CO;2-1)
- Korman M, Doyon J, Doljansky J, Carrier J, Dagan Y, Karni A (2007) Daytime sleep condenses the time course of motor memory consolidation. *Nat Neurosci* 10:1206–1213 Available

- at: <https://www.nature.com/articles/nn1959> [Accessed October 24, 2023].
- Korte M, Schmitz D (2016) Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. *Physiol Rev* 96:647–693 Available at: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00010.2015>
- Kotterman MA, Schaffer DV (2014) Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* 15:445–451 Available at: <https://www.nature.com/articles/nrg3742>
- Kraemer PJ, Golding JM (1997) Adaptive forgetting in animals. *Psychon Bull Rev* 4:480–491 Available at: <http://link.springer.com/10.3758/BF03214337>
- Krogsgaard-Larsen P, Johnston GAR (1978) STRUCTURE-ACTIVITY STUDIES ON THE INHIBITION OF GABA BINDING TO RAT BRAIN MEMBRANES BY MUSCIMOL AND RELATED COMPOUNDS. *J Neurochem* 30:1377–1382 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.1978.tb10469.x>
- LaLumiere RT, McGaugh JL, McIntyre CK (2017) Emotional Modulation of Learning and Memory: Pharmacological Implications Dantzer R, ed. *Pharmacol Rev* 69:236–255 Available at: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.116.013474>
- Langella M, Colarieti L, Ambrosini M, Giuditta A (1992) The sequential hypothesis of sleep function. IV. A correlative analysis of sleep variables in learning and nonlearning rats. *Physiol Behav* 51:227–238 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031938492901350>
- Laubach M, Amarante LM, Swanson K, White SR (2018) What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eneuro* 5:ENEURO.0315-18.2018 Available at: <https://www.eneuro.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0315-18.2018>
- Laurent V, Wong FL, Balleine BW (2017) The Lateral Habenula and Its Input to the Rostromedial Tegmental Nucleus Mediates Outcome-Specific Conditioned Inhibition. *J Neurosci* 37:10932–10942 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3415-16.2017>
- Lee I, Kesner RP (2003) Time-Dependent Relationship between the Dorsal Hippocampus and the Prefrontal Cortex in Spatial Memory. *J Neurosci* 23:1517–1523 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.23-04-01517.2003>
- Lee J, Kim N, Jeong H, Jun JY, Yoo SY, Lee SH, Lee J, Lee YJ, Kim SJ (2022) Gray Matter Volume of Thalamic Nuclei in Traumatized North Korean Refugees. *Front Psychiatry* 13 Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2022.756202>
- Lesburgueres E, Gobbo OL, Alaux-Cantin S, Hambucken A, Trifilieff P, Bontempi B (2011) Early Tagging of Cortical Networks Is Required for the Formation of Enduring Associative Memory. *Science* 331:924–928 Available at: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1196164>
- Lewis S (2019) Fake memories. *Nat Rev Neurosci* 20:379–379 Available at: <https://www.nature.com/articles/s41583-019-0186-5>
- Linley SB, Gallo MM, Vertes RP (2016) Lesions of the ventral midline thalamus produce deficits in reversal learning and attention on an odor texture set shifting task. *Brain Res* 1649:110–122 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899316305753>
- Lisman JE, Pi HJ, Zhang Y, Otmakhova NA (2010) A Thalamo-Hippocampal-Ventral Tegmental Area Loop May Produce the Positive Feedback that Underlies the Psychotic Break in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 68:17–24 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322310003525>

- Lopez J, de Vasconcelos AP, Cassel J-C (2008) Environmental cue saliency influences the vividness of a remote spatial memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90:285–289 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742708000294>
- Lopez J, Herbeaux K, Cosquer B, Engeln M, Muller C, Lazarus C, Kelche C, Bontempi B, Cassel J-C, de Vasconcelos AP (2012) Context-dependent modulation of hippocampal and cortical recruitment during remote spatial memory retrieval. *Hippocampus* 22:827–841 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/hipo.20943>
- Lorente De Nó R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Für Psychol Neurol* 46:113–177.
- Lorente de No R (1938) Cerebral cortex: architecture, intracortical connections, motor projections. *Physiol Nerv Syst*:288–313 Available at: <https://scholar.google.com/scholar?cluster=7229078664759502282&hl=en&oi=scholar>
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A (2012) The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *J Neurosci* 32:9947–9959 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.0410-12.2012>
- Macchi G, Bentivoglio M (1999) Is the “nonspecific” thalamus still “nonspecific”? *Arch Ital Biol* 137:201–226.
- Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RSJ, Frith CD (2000) Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci* 97:4398–4403 Available at: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.070039597>
- Maingret N, Girardeau G, Todorova R, Goutier M, Zugaro M (2016) Hippocampo-cortical coupling mediates memory consolidation during sleep. *Nat Neurosci* 19:959–964 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn.4304>
- Maisson DJ-N, Gemzik ZM, Griffin AL (2018) Optogenetic suppression of the nucleus reuniens selectively impairs encoding during spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem* 155:78–85 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742718301473>
- Manns JR, Hopkins RO, Reed JM, Kitchener EG, Squire LR (2003) Recognition Memory and the Human Hippocampus. *Neuron* 37:171–180 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627302011479>
- Marcianti AB, Wang LA, Little JT, Cunningham JT (2020) Caspase lesions of PVN-projecting MnPO neurons block the sustained component of CIH-induced hypertension in adult male rats. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 318:H34–H48 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6985804/>
- Martin JH, Ghez C (1999) Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. *J Neurosci Methods* 86:145–159 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027098001630>
- Martin-Ordas G, Haun D, Colmenares F, Call J (2010) Keeping track of time: evidence for episodic-like memory in great apes. *Anim Cogn* 13:331–340 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10071-009-0282-4>
- Masachs N, Charrier V, Farrugia F, Lemaire V, Blin N, Mazier W, Tronel S, Montaron M-F, Ge S, Marsicano G, Cota D, Deroche-Gamonet V, Herry C, Abrous DN (2021) The temporal origin of dentate granule neurons dictates their role in spatial memory. *Mol Psychiatry* 26:7130–7140 Available at: <https://www.nature.com/articles/s41380-021-01276-x>

- McDowell S, Whyte J, D'Esposito M (1997) Working memory impairments in traumatic brain injury: evidence from a dual-task paradigm. *Neuropsychologia* 35:1341–1353 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028393297000821>
- McIntyre CK, McGaugh JL, Williams CL (2012) Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1750–1762 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763411001989>
- McKenna JT, Vertes RP (2004) Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol* 480:115–142 Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.20342>
- Mei H, Logothetis NK, Eschenko O (2018) The activity of thalamic nucleus reuniens is critical for memory retrieval, but not essential for the early phase of “off-line” consolidation. *Learn Mem* 25:129–137 Available at: <http://learnmem.cshlp.org/content/25/3/129>
- Meredith GE, Wouterlood FG (1990) Hippocampal and midline thalamic fibers and terminals in relation to the choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in nucleus accumbens of the rat: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 296:204–221 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.902960203>
- Miller EK, Cohen JD (2001) An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202 Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.24.1.167>
- Miller EK, Freedman DJ, Wallis JD (2002) The prefrontal cortex: categories, concepts and cognition Parker A, Derrington A, Blakemore C, eds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1123–1136 Available at: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2002.1099>
- Milstein AD, Tran S, Ng G, Soltesz I (2023) Offline memory replay in recurrent neuronal networks emerges from constraints on online dynamics. *J Physiol* 601:3241–3264 Available at: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/JP283216>
- Morgan CW, Julien O, Unger EK, Shah NM, Wells JA (2014) Turning ON Caspases with Genetics and Small Molecules. In: *Methods in Enzymology*, pp 179–213. Elsevier. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012417158900008X>
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681–683 Available at: <https://www.nature.com/articles/297681a0>
- Morris RGM, Hagan JJ, Rawlins JNP (1986) Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: A further test of the “spatial mapping” and “working memory” theories of hippocampal function.
- Morvan T, Boch L, Mikhina E, Cosquer B, Stéphan A, de Vasconcelos AP, Cassel J-C (2022) Ventral midline thalamus activation is correlated with memory performance in a delayed spatial matching-to-sample task: A c-Fos imaging approach in the rat. *Behav Brain Res* 418:113670 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432821005581>
- Moser EI, Roudi Y, Witter MP, Kentros C, Bonhoeffer T, Moser M-B (2014) Grid cells and cortical representation. *Nat Rev Neurosci* 15:466–481 Available at: <https://www.nature.com/articles/nrn3766>
- Nadel JA, Pawelko SS, Copes-Finke D, Neidhart M, Howard CD (2020) Lesion of striatal patches disrupts habitual behaviors and increases behavioral variability Beeler JA, ed. *PLOS ONE* 15:e0224715 Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0224715>
- Nadel L, Moscovitch M (1997) Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex.

- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722–726 Available at: <https://www.nature.com/articles/35021052>
- Nagai Y et al. (2020) Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. *Nat Neurosci* 23:1157–1167 Available at: <https://www.nature.com/articles/s41593-020-0661-3>
- Nagy A (2000) Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *genesis* 26:99–109 Available at: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1526-968X\(200002\)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B)
- Negrón-Oyarzo I, Espinosa N, Aguilar-Rivera M, Fuenzalida M, Aboitiz F, Fuentealba P (2018) Coordinated prefrontal–hippocampal activity and navigation strategy-related prefrontal firing during spatial memory formation. *Proc Natl Acad Sci* 115:7123–7128 Available at: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1720117115>
- Nørby S (2015) Why Forget? On the Adaptive Value of Memory Loss. *Perspect Psychol Sci* 10:551–578 Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1745691615596787>
- Ogundele OM, Lee CC, Francis J (2017) Thalamic dopaminergic neurons project to the paraventricular nucleus-rostral ventrolateral medulla/C1 neural circuit: Brainstem Projections of thalamic DA neurons. *Anat Rec* 300:1307–1314 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.23528>
- O’Keefe J (1976) Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 51:78–109 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014488676900558>
- O’Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171–175 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899371903581>
- O’Keefe J, Nadel L (1978) *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford, UK: Oxford University Press. Available at: <http://www.cognitivemap.net/>
- Olive T (2004) Working Memory in Writing: Empirical Evidence From the Dual-Task Technique. *Eur Psychol* 9:32–42 Available at: <https://econtent.hogrefe.com/doi/10.1027/1016-9040.9.1.32>
- Olton DS, Becker JT, Handelmann GE (1979) Hippocampus, space, and memory. *Behav Brain Sci* 2:313–322 Available at: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0140525X00062713/type/journal_article
- Olton DS, Paras BC (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia* 17:669–682 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0028393279900423>
- Olton DS, Samuelson RJ (1976) Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 2:97–116 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0097-7403.2.2.97>
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1984) Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* 229:374–392 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.902290308>
- Packard MG, McGaugh JL (1992) Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: Further evidence for multiple memory systems.

- Behav Neurosci 106:439–446 Available at:
<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.106.3.439>
- Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of Hippocampus or Caudate Nucleus with Lidocaine Differentially Affects Expression of Place and Response Learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65–72 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742796900076>
- Paul C-M, Magda G, Abel S (2009) Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 203:151–164 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432809003362>
- Payne JD, Chambers AM, Kensinger EA (2012) Sleep promotes lasting changes in selective memory for emotional scenes. *Front Integr Neurosci* 6 Available at:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnint.2012.00108/abstract>
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149–167 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165027085900317>
- Pereira de Vasconcelos A, Cassel J-C (2015) The nonspecific thalamus: A place in a wedding bed for making memories last? *Neurosci Biobehav Rev* 54:175–196 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763414002747>
- Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW (2001) Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Rev* 38:247–289 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017301000807>
- Pickens CL, Golden SA, Adams-Deutsch T, Nair SG, Shaham Y (2009) Long-Lasting Incubation of Conditioned Fear in Rats. *Biol Psychiatry* 65:881–886 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322308015928>
- Pitkänen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A (2000) Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation, Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat: A Review. *Ann N Y Acad Sci* 911:369–391 Available at:
<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06738.x>
- Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, Geiger K, Cassel J-C (2011) The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: Acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav Brain Res* 218:138–151 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432810007680>
- Poucet B, Benhamou S (1997) The Neuropsychology of Spatial Cognition in the Rat. *Crit Rev Neurobiol* 11:101–120 Available at:
<http://www.dl.begellhouse.com/journals/7b004699754c9fe6,0af6f0a055729f1f,6f99e5ed1954138d.html>
- Poucet B, Hok V (2017) Remembering goal locations. *Curr Opin Behav Sci* 17:51–56 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352154616302832>
- Prasad JA, Macgregor EM, Chudasama Y (2013) Lesions of the thalamic reuniens cause impulsive but not compulsive responses. *Brain Struct Funct* 218:85–96 Available at:
<http://link.springer.com/10.1007/s00429-012-0378-5>
- Quet E, Cassel J-C, Cosquer B, Galloux M, Pereira De Vasconcelos A, Stéphan A (2020a) Ventral midline thalamus is not necessary for systemic consolidation of a social memory in the rat. *Brain Neurosci Adv* 4:239821282093973 Available at:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2398212820939738>
- Quet E, Majchrzak M, Cosquer B, Morvan T, Wolff M, Cassel J-C, Pereira de Vasconcelos A,

- Stéphan A (2020b) The reuniens and rhomboid nuclei are necessary for contextual fear memory persistence in rats. *Brain Struct Funct* 225:955–968 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00429-020-02048-z>
- Quirk GJ, Muller RU, Kubie JL, Ranck JB (1992) The positional firing properties of medial entorhinal neurons: description and comparison with hippocampal place cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 12:1945–1963.
- Ragozzino ME, Kim J, Hassert D, Minniti N, Kiang C (2003) The contribution of the rat prelimbic-infralimbic areas to different forms of task switching. *Behav Neurosci* 117:1054–1065 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.117.5.1054>
- Rahman F, Nanu R, Schneider NA, Katz D, Lisman J, Pi H-J (2021) Optogenetic perturbation of projections from thalamic nucleus reuniens to hippocampus disrupts spatial working memory retrieval more than encoding. *Neurobiol Learn Mem* 179:107396 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742721000186>
- Ramanathan KR, Jin J, Giustino TF, Payne MR, Maren S (2018) Prefrontal projections to the thalamic nucleus reuniens mediate fear extinction. *Nat Commun* 9:4527 Available at: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-06970-z>
- Rasch B, Born J (2013) About Sleep's Role in Memory. *Physiol Rev* 93:681–766 Available at: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00032.2012>
- Reeders PC, Rivera N. MV, Vertes RP, Mattfeld AT, Allen TA (2022) Identifying the midline thalamus in humans *in vivo*. *Neuroscience*. Available at: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.02.20.481099>
- Remondes M, Schuman EM (2004) Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature* 431:699–703 Available at: <https://www.nature.com/articles/nature02965>
- Renier N, Adams EL, Kirst C, Wu Z, Azevedo R, Kohl J, Autry AE, Kadiri L, Umadevi Venkataraju K, Zhou Y, Wang VX, Tang CY, Olsen O, Dulac C, Osten P, Tessier-Lavigne M (2016) Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* 165:1789–1802 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416305554>
- Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M (2014) iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* 159:896–910 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414012975>
- Rezai Amin S, Gruszczynski C, Guiard BP, Callebert J, Launay J, Louis F, Betancur C, Vialou V, Gautron S (2019) Viral vector-mediated Cre recombinase expression in substantia nigra induces lesions of the nigrostriatal pathway associated with perturbations of dopamine-related behaviors and hallmarks of programmed cell death. *J Neurochem* 150:330–340 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jnc.14684>
- Ribot TA (1882) *Diseases of memory: an essay in the positive psychology*. New York: D. Appleton and company.
- Rigney N, Whylings J, Mieda M, De Vries GJ, Petrulis A (2019) Sexually Dimorphic Vasopressin Cells Modulate Social Investigation and Communication in Sex-Specific Ways. *eneuro* 6:ENEURO.0415-18.2019 Available at: <https://www.eneuro.org/lookup/doi/10.1523/ENEURO.0415-18.2019>
- Rinvik E, Ottersen OP, Storm-Mathisen J (1987) Gamma-aminobutyrate-like immunoreactivity in the thalamus of the cat. *Neuroscience* 21:781–805 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306452287900376>
- Roberts WA, Kraemer PJ (1982) Some observations of the effects of intertrial interval and

- delay on delayed matching to sample in pigeons. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 8:342–353.
- Rodríguez F, López JC, Vargas JP, Broglio C, Gómez Y, Salas C (2002) Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain Res Bull* 57:499–503 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923001006827>
- Rogerson T, Cai DJ, Frank A, Sano Y, Shobe J, Lopez-Aranda MF, Silva AJ (2014) Synaptic tagging during memory allocation. *Nat Rev Neurosci* 15:157–169 Available at: <https://www.nature.com/articles/nrn3667>
- Romeo A, Issa Roach AT, Toth E, Chaitanya G, Ilyas A, Riley KO, Pati S (2019) Early ictal recruitment of midline thalamus in mesial temporal lobe epilepsy. *Ann Clin Transl Neurol* 6:1552–1558 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acn3.50835>
- Roy DS, Park Y-G, Kim ME, Zhang Y, Ogawa SK, DiNapoli N, Gu X, Cho JH, Choi H, Kamensky L, Martin J, Mosto O, Aida T, Chung K, Tonegawa S (2022) Brain-wide mapping reveals that engrams for a single memory are distributed across multiple brain regions. *Nat Commun* 13:1799 Available at: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29384-4>
- Ruediger S, Scanziani M (2020) Learning speed and detection sensitivity controlled by distinct cortico-fugal neurons in visual cortex. *eLife* 9:e59247 Available at: <https://elifesciences.org/articles/59247>
- Sara SJ (2000) Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learn Mem* 7:73–84 Available at: <http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.7.2.73>
- Sargolini F, Fyhn M, Hafting T, McNaughton BL, Witter MP, Moser M-B, Moser EI (2006) Conjunctive Representation of Position, Direction, and Velocity in Entorhinal Cortex. *Science* 312:758–762 Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1125572>
- Schacter DL, Addis DR, Buckner RL (2007) Remembering the past to imagine the future: the prospective brain. *Nat Rev Neurosci* 8:657–661 Available at: <https://www.nature.com/articles/nrn2213>
- Schacter DL, Eich JE, Tulving E (1978) Richard Semon's theory of memory. *J Verbal Learn Verbal Behav* 17:721–743 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022537178904437>
- Schlecht M, Jayachandran M, Rasch GE, Allen TA (2022) Dual projecting cells linking thalamic and cortical communication routes between the medial prefrontal cortex and hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 188:107586 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742722000107> [Accessed June 5, 2022].
- Schmitt WB, Deacon RMJ, Seeburg PH, Rawlins JNP, Bannerman DM (2003) A Within-Subjects, Within-Task Demonstration of Intact Spatial Reference Memory and Impaired Spatial Working Memory in Glutamate Receptor-A-Deficient Mice. *J Neurosci* 23:3953–3959 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03953.2003> [Accessed August 17, 2023].
- Schmitzer-Torbert N, Redish AD (2004) Neuronal Activity in the Rodent Dorsal Striatum in Sequential Navigation: Separation of Spatial and Reward Responses on the Multiple T Task. *J Neurophysiol* 91:2259–2272 Available at: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00687.2003>

- Schneeberger M, Parolari L, Das Banerjee T, Bhawe V, Wang P, Patel B, Topilko T, Wu Z, Choi CHJ, Yu X, Pellegrino K, Engel EA, Cohen P, Renier N, Friedman JM, Nectow AR (2019) Regulation of Energy Expenditure by Brainstem GABA Neurons. *Cell* 178:672–685.e12 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867419306191>
- Scoville WB, Milner B (1957) LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11–21 Available at: <https://jnnp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jnnp.20.1.11>
- Sharp P, Green C (1994) Spatial correlates of firing patterns of single cells in the subiculum of the freely moving rat. *J Neurosci* 14:2339–2356 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.14-04-02339.1994>
- Sherman SM, Guillery RW (2002) The role of the thalamus in the flow of information to the cortex Adams P, Guillery RW, Sherman SM, Sillito AM, eds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1695–1708 Available at: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2002.1161>
- Shine JP, Valdés-Herrera JP, Hegarty M, Wolbers T (2016) The Human Retrosplenial Cortex and Thalamus Code Head Direction in a Global Reference Frame. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 36:6371–6381.
- Silva BA, Astori S, Burns AM, Heiser H, Van Den Heuvel L, Santoni G, Martinez-Reza MF, Sandi C, Gräff J (2021) A thalamo-amygdalar circuit underlying the extinction of remote fear memories. *Nat Neurosci* 24:964–974 Available at: <https://www.nature.com/articles/s41593-021-00856-y>
- Silva BA, Burns AM, Gräff J (2019) A cFos activation map of remote fear memory attenuation. *Psychopharmacology (Berl)* 236:369–381 Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-018-5000-y>
- Smith C (2001) Sleep states and memory processes in humans: procedural versus declarative memory systems. *Sleep Med Rev* 5:491–506 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087079201901649>
- Solstad T, Boccara CN, Kropff E, Moser M-B, Moser EI (2008) Representation of Geometric Borders in the Entorhinal Cortex. *Science* 322:1865–1868 Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1166466>
- Spetch ML, Honig WK (1988) Characteristics of pigeons' spatial working memory in an open-field task. *Anim Learn Behav* 16:123–131 Available at: <http://link.springer.com/10.3758/BF03209054>
- Spiegel EA, Wycis HT, Marks M, Lee AJ (1947) Stereotaxic Apparatus for Operations on the Human Brain. *Science* 106:349–350 Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.106.2754.349>
- Squire LR, Alvarez P (1995) Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol* 5:169–177 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0959438895800239>
- Squire LR, Zola SM (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci* 93:13515–13522 Available at: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.93.24.13515>
- Stella F, Cerasti E, Si B, Jezek K, Treves A (2012) Self-organization of multiple spatial and context memories in the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1609–1625 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763411002090>
- Sternberg N, Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150:467–486.

- Surdin T, Grömmke M, Böke H, Barcik M, Azimi Z, Jancke D, Herlitze S, Mark M, Siveke I (2022) Optogenetic control of mGluR1 signaling modulates synaptic plasticity and cerebellum driven learning. In Review. Available at: <https://www.researchsquare.com/article/rs-1344254/v1>
- Sutherland RJ, Weisend MP, Mumby D, Astur RS, Hanlon FM, Koerner A, Thomas MJ, Wu Y, Moses SN, Cole C, Hamilton DA, Hoising JM (2001) Retrograde amnesia after hippocampal damage: Recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus* 11:27–42 Available at: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<27::AID-HIPO1017>3.0.CO;2-4](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1098-1063(2001)11:1<27::AID-HIPO1017>3.0.CO;2-4)
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *J Neurosci* 24:4787–4795 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
- Swanson LW (2004) *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*. Gulf Professional Publishing.
- Talamini LM, Nieuwenhuis ILC, Takashima A, Jensen O (2008) Sleep directly following learning benefits consolidation of spatial associative memory. *Learn Mem* 15:233–237 Available at: <http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.771608>
- Tamminen J, Payne JD, Stickgold R, Wamsley EJ, Gaskell MG (2010) Sleep Spindle Activity is Associated with the Integration of New Memories and Existing Knowledge. *J Neurosci* 30:14356–14360 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3028-10.2010>
- Tassin J-P, Stinus L, Simon H, Blanc G, Thierry A-M, Le Moal M, Cardo B, Glowinski J (1978) Relationship between the locomotor hyperactivity induced by A10 lesions and the destruction of the frontocortical dopaminergic innervation in the rat. *Brain Res* 141:267–281 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000689937890197X>
- Taube J (1995) Head direction cells recorded in the anterior thalamic nuclei of freely moving rats. *J Neurosci* 15:70–86 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00070.1995>
- Taube J, Muller R, Ranck J (1990) Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations. *J Neurosci* 10:436–447 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.10-02-00436.1990>
- Taube JS (2007) The Head Direction Signal: Origins and Sensory-Motor Integration. *Annu Rev Neurosci* 30:181–207 Available at: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112854>
- Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, Velu T, Brotchi J, Levivier M (2004) Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J Gene Med* 6:S212–S222 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgm.506>
- Thielen J-W, Takashima A, Rutters F, Tendolkar I, Fernández G (2015) Transient relay function of midline thalamic nuclei during long-term memory consolidation in humans. *Learn Mem* 22:527–531 Available at: <http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.038372.115>
- Tolman EC (1925) Purpose and cognition: the determiners of animal learning. *Psychol Rev* 32:285–297 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/h0072784>
- Tolman EC (1948) Cognitive maps in rats and men.
- Tonegawa S, Liu X, Ramirez S, Redondo R (2015) Memory Engram Cells Have Come of Age.

- Neuron 87:918–931 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627315006777>
- Treit D, Fundytus M (1988) Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31:959–962 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0091305788904133>
- Tulving E (1985) How many memory systems are there? *Am Psychol* 40:385–398 Available at:
<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0003-066X.40.4.385>
- Tulving E, Markowitsch HJ (1998) Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. *Hippocampus* 8:198–204 Available at:
[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:3<198::AID-HIPO2>3.0.CO;2-G](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<198::AID-HIPO2>3.0.CO;2-G)
- Van Der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res Rev* 39:107–140 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017302001819>
- Van Der Werf YD, Witter MP, Uylings HBM, Jolles J (2000) Neuropsychology of infarctions in the thalamus: a review. *Neuropsychologia* 38:613–627 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028393299001049>
- Varela C, Kumar S, Yang JY, Wilson MA (2014) Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens. *Brain Struct Funct* 219:911–929 Available at:
<http://link.springer.com/10.1007/s00429-013-0543-5>
- Venkataraman A, Hunter SC, Dhinojwala M, Ghebrezadik D, Guo J, Inoue K, Young LJ, Dias BG (2021) Incerto-thalamic modulation of fear via GABA and dopamine. *Neuropsychopharmacology* 46:1658–1668 Available at:
<http://www.nature.com/articles/s41386-021-01006-5>
- Vertes RP (2002) Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J Comp Neurol* 442:163–187 Available at:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.10083> [Accessed October 24, 2023].
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58 Available at:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/syn.10279>
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645220600858X>
- Vertes RP, Hoover WB, Szigeti-Buck K, Leranth C (2007) Nucleus reuniens of the midline thalamus: Link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res Bull* 71:601–609 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923006003649>
- Vetere G, Kenney JW, Tran LM, Xia F, Steadman PE, Parkinson J, Josselyn SA, Frankland PW (2017) Chemogenetic Interrogation of a Brain-wide Fear Memory Network in Mice. *Neuron* 94:363–374.e4 Available at:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627317302593>
- Vetere G, Tran LM, Moberg S, Steadman PE, Restivo L, Morrison FG, Ressler KJ, Josselyn SA, Frankland PW (2019) Memory formation in the absence of experience. *Nat Neurosci* 22:933–940 Available at: <http://www.nature.com/articles/s41593-019-0389-0>
- Viena TD, Rasch GE, Silva D, Allen TA (2021) Calretinin and calbindin architecture of the midline

- thalamus associated with prefrontal–hippocampal circuitry. *Hippocampus* 31:770–789 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.23271> [Accessed July 1, 2021].
- Vu T, Gugustea R, Leung LS (2020) Long-term potentiation of the nucleus reuniens and entorhinal cortex to CA1 distal dendritic synapses in mice. *Brain Struct Funct* 225:1817–1838 Available at: <https://link.springer.com/10.1007/s00429-020-02095-6>
- Wagner IC, van Buuren M, Fernández G (2019) Thalamo-cortical coupling during encoding and consolidation is linked to durable memory formation. *NeuroImage* 197:80–92 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1053811919303416>
- Wagner U, Hallschmid M, Rasch B, Born J (2006) Brief Sleep After Learning Keeps Emotional Memories Alive for Years. *Biol Psychiatry* 60:788–790 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322306005427>
- Walker MP, Brakefield T, Seidman J, Morgan A, Hobson JA, Stickgold R (2003) Sleep and the Time Course of Motor Skill Learning. *Learn Mem* 10:275–284 Available at: <http://learnmem.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/lm.58503>
- Walsh DA, Brown JT, Randall AD (2017) *In vitro* characterization of cell-level neurophysiological diversity in the rostral nucleus reuniens of adult mice. *J Physiol* 595:3549–3572 Available at: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/JP273915>
- Wang C, Yue H, Hu Z, Shen Y, Ma J, Li J, Wang X-D, Wang L, Sun B, Shi P, Wang L, Gu Y (2020) Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. *Science* 367:688–694 Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaz2288>
- Watson SJ, Aslanides S (2011) *Avant d’aller dormir*. Paris: Éd. France loisirs.
- Whissell PD, Tohyama S, Martin LJ (2016) The Use of DREADDs to Deconstruct Behavior. *Front Genet* 7 Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fgene.2016.00070/abstract>
- Wilhelm I, Diekelmann S, Molzow I, Ayoub A, Mölle M, Born J (2011) Sleep Selectively Enhances Memory Expected to Be of Future Relevance. *J Neurosci* 31:1563–1569 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3575-10.2011>
- Wilmot CA, Sullivan AC, Levin BE (1988) Effects of diet and obesity on brain α 1- and α 2-noradrenergic receptors in the rat. *Brain Res* 453:157–166 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006899388901540>
- Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B (2010) Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48:2339–2356 Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028393210001624>
- Witter MP, Doan TP, Jacobsen B, Nilssen ES, Ohara S (2017) Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front Syst Neurosci* 11:46 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnsys.2017.00046/full>
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP (1990) Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: Light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* -leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 296:179–203 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.902960202>
- Xu W, Südhof TC (2013) A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science* 339:1290–1295 Available at: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1229534>

- Yang CF, Chiang M, Gray DC, Prabhakaran M, Alvarado M, Juntti SA, Unger EK, Wells JA, Shah NM (2013) Sexually dimorphic neurons in the ventromedial hypothalamus govern mating in both sexes and aggression in males. *Cell* 153:896–909 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3767768/>
- Yang G, Pan F, Gan W-B (2009) Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462:920–924 Available at: <https://www.nature.com/articles/nature08577>
- Yang Y et al. (2021) Wireless multilateral devices for optogenetic studies of individual and social behaviors. *Nat Neurosci* 24:1035–1045 Available at: <https://www.nature.com/articles/s41593-021-00849-x>
- Yeshenko O, Guazzelli A, Mizumori SJY (2004) Context-Dependent Reorganization of Spatial and Movement Representations by Simultaneously Recorded Hippocampal and Striatal Neurons During Performance of Allocentric and Egocentric Tasks. *Behav Neurosci* 118:751–769 Available at: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.118.4.751>
- Yip KYT, Gräff J (2023) Tissue clearing applications in memory engram research. *Front Behav Neurosci* 17:1181818 Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2023.1181818/full>
- Yoshida A, Dostrovsky JO, Chiang CY (1992) The afferent and efferent connections of the nucleus submedius in the rat. *J Comp Neurol* 324:115–133 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.903240109>
- Zhang DX, Bertram EH (2002) Midline Thalamic Region: Widespread Excitatory Input to the Entorhinal Cortex and Amygdala. *J Neurosci* 22:3277–3284 Available at: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03277.2002>
- Zimmerman EC, Grace AA (2018) Prefrontal cortex modulates firing pattern in the nucleus reuniens of the midline thalamus via distinct corticothalamic pathways. *Eur J Neurosci* 48:3255–3272 Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ejn.14111>

Dynamique temporelle de la persistance d'un souvenir spatial

Étude de l'implication des noyaux Reuniens et Rhomboïde du thalamus dans différents systèmes de mémoire : mémoire de travail et mémoire à long terme.

Résumé Cette thèse aborde la dynamique temporelle de la persistance des souvenirs spatiaux, en se concentrant sur les noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) dans la mémoire de travail (MT) et la mémoire à long terme (MLT). Les souvenirs nécessitent une consolidation progressive pour devenir résistants aux interférences, impliquant des modifications synaptiques et des réorganisations cérébrales, particulièrement entre l'hippocampe (HIP) et le cortex préfrontal médian (CPFm). Les ReRh appartiennent à la ligne médiane du thalamus, et constituent un relai essentiel ces deux structures. Le premier projet explore le rôle des ReRh dans la mémoire de travail spatiale, et indique que l'inactivation de ces noyaux n'a pas d'effet significatif sur les performances, quel que soit le processus ciblé (encodage, maintien ou rappel de l'information). Le second projet se concentre sur le rôle de la voie de projection du CPFm aux ReRh dans la consolidation à long terme, et indique que la lésion spécifique de cette voie ne semble pas interférer avec la consolidation du souvenir. Des recherches futures exploreront d'autres voies du circuit pour mieux comprendre les troubles de la mémoire.

Mots-clés: noyaux Reuniens et Rhomboïde du thalamus, mémoire, mémoire de travail, consolidation systémique.

Summary This thesis addresses the temporal dynamics of spatial memory persistence, focusing on the reunions and rhomboid nuclei (ReRh) in working memory (WM) and long-term memory (LTM). Memories require progressive consolidation to become resistant to interference, involving synaptic modifications and brain reorganizations, particularly between the hippocampus (HIP) and the medial prefrontal cortex (CPFm). ReRh nuclei belong to the midline thalamus and serve as a crucial relay between these two structures. The first project explores the role of ReRh in spatial working memory, indicating that inactivation of these nuclei has no significant effect on performance, regardless of the targeted process (encoding, maintenance, or recall of information). The second project focuses on the role of the CPFm-ReRh projection pathway in long-term consolidation, indicating that specific lesioning of this pathway does not seem to interfere with memory consolidation. Future research will explore other circuit pathways to better understand memory disorders.

Keywords : Reuniens and Rhomboid thalamic nuclei, memory, working memory, systems consolidation