



HAL
open science

**Exploration du rôle du complexe répresseur
transcriptionnel SIN3A-HDAC dans la consolidation de
la mémoire et l'effet de l'âge sur la réponse de peur
innée chez la souris**

Célia Bak

► **To cite this version:**

Célia Bak. Exploration du rôle du complexe répresseur transcriptionnel SIN3A-HDAC dans la consolidation de la mémoire et l'effet de l'âge sur la réponse de peur innée chez la souris. Neurosciences. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES114 . tel-04747648

HAL Id: tel-04747648

<https://theses.hal.science/tel-04747648v1>

Submitted on 22 Oct 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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Exploration du rôle du complexe répresseur transcriptionnel
SIN3A-HDAC dans la consolidation de la mémoire et l'effet de
l'âge sur la réponse de peur innée chez la souris

Thèse présentée et soutenue, le 11 juillet 2024 par
Célia BAK

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

Neurosciences

Unité de recherche

CRCA - Centre de Recherches sur la Cognition Animale

Thèse dirigée par

Cédric FLORIAN et Claire RAMPON

Composition du jury

M. Guillaume ISABEL, Président, Université Toulouse III - Paul Sabatier

Mme Anne-Laurence BOUTILLIER, Rapporteur, CNRS Centre Est

M. Cyrille VAILLEND, Rapporteur, CNRS Paris-Centre

M. Jean-Louis GUILLOU, Rapporteur, Université de Bordeaux

Mme Shauna PARKES, Examinatrice, CNRS Aquitaine

M. Cédric FLORIAN, Directeur de thèse, Université Toulouse III - Paul Sabatier

Mme Claire RAMPON, Co-directrice de thèse, CNRS Occitanie Ouest

The most effective way to do it, is to just do it.

Amelia Earhart

Remerciements

“But at this point, looking back over the mountains you climbed and the valleys you crossed, you realise your motivation came from the people around you. That is why we have an acknowledgements section.”

Liam D. Bailey - Between the devil and the deep blue sea: consequences of extreme climatic events in the Eurasian oystercatcher (Haematopus ostralegus) (2016)

Depuis que j’ai commencé à travailler dans le domaine de la recherche, j’ai toujours eu beaucoup de mal à parler en disant « je », rapportant majoritairement l’ensemble des résultats obtenus à un « nous », même lors de la rédaction de ce manuscrit. Cela me semble naturel car il s’agit avant tout d’un travail d’équipe, et c’est en ce sens que j’aimerais remercier les personnes qui ont apporté leur pierre à l’édifice, qu’elle soit imposante ou presque imperceptible.

Je commencerai donc ces remerciements par celles et ceux qui ont évalué cet ouvrage et la présentation qui s’en est suivie. Je remercie donc **Anne-Laurence Boutillier**, **Jean-Louis Guillou** et **Cyrille Vaillend** pour le temps précieux qu’ils ont passé à lire ce manuscrit et à la rédaction de leur rapport. Je remercie également **Shauna Parkes** pour avoir accepté d’être examinatrice lors de ma soutenance mais aussi **Guillaume Isabel** pour avoir présidé mon jury. Je remercie l’ensemble de mon jury pour leur bienveillance et leur enthousiasme vis-à-vis de mes travaux, pour les discussions enrichissantes et pleines d’humanité qui ont suivi ma présentation.

En remerciant Guillaume Isabel, je remercie également **Jean-Marc Devaud**, pour la partie enseignement qui a constitué un grand nombre d’heure lors de mes années de thèse. Vous avez été là pour vous assurer que tout se passait bien, avec toujours un mot gentil au détour d’un couloir au laboratoire, suivant de loin mon projet notamment par l’intermédiaire de Cédric.

J’arrive donc à mon directeur de thèse, **Cédric Florian**, que je remercie bien évidemment pour avoir accepté ma demande de stage à la fin de mon année de M1, sans quoi je ne serai probablement pas là, à écrire ces mots. Je te remercie pour avoir cru en moi, avoir eu de la confiance pour deux dans ce projet quand les choses se sont compliquées. Je repense souvent à mon premier stage avec toi et à ta capacité à faire ressortir et mettre en lumière le positif dans une manip « non-réussie ». C’est une qualité qui m’avait impressionnée, et que j’ai toujours vu en toi au cours de ces dernières années. Lors de ta soutenance d’HDR, tu n’as pas vraiment su répondre à une question du jury te demandant de qualifier l’encadrant que tu es. Après plus de 4 années passées à travailler sous ta supervision, je pense être bien placée pour t’en parler et confirmer les quelques phrases que tu as élaborées pour répondre. Oui, tu as toujours été disponible et bienveillant, toujours ouvert à la discussion et avec le mot pour rire. Ça n’a pas été toujours simple pour le projet, mais tu m’as toujours encouragée et accompagnée dans chaque étape, en te rendant disponible dès que j’en avais besoin et notamment pour la rédaction de ce manuscrit. Ta pédagogie n’a pas d’égale et j’espère avoir pu m’en imprégner un peu au cours de ces années. Je pense que le côté humain de la thèse est plus important que le projet et je me considère chanceuse d’avoir eu l’opportunité de réaliser ces travaux avec toi, donc merci pour tout.

Je continuerai en remerciant **Claire Rampon**, d’abord directrice puis récemment co-directrice de ma thèse. Je te remercie pour ton soutien au cours de ces 4 années qui ont vu un premier, un deuxième mais aussi un troisième projet. Merci pour les chamallows lors de mon premier comité de suivi de thèse et suite à l’envoi de ce manuscrit. Merci pour tes encouragements et tes retours si positifs à chaque présentation ou rédaction. Je repense souvent à un discours que tu avais fait en réunion d’équipe lors de mon stage de M2 : tu as été si inspirante et tu m’as permis de prendre beaucoup de

recul par rapport à ce que l'on fait tous les jours au labo. On a tendance à placer toutes nos émotions et notre avenir dans des manips, dans un projet, mais il ne s'agit finalement que de notre vie professionnelle, cela ne nous définit pas. Chacun d'entre nous aurait pu avoir un parcours si différent de l'actuel. C'est quelque chose qui résonne en moi et qui m'a aidé à relativiser lors de ces dernières années. Alors merci à toi.

Of course, I would like to thank **Ana M. M. Oliveira** and **Janina Kupke**, our collaborators, for the viruses. I don't know what the SIN3A project would have become without your help. Our collaboration proves how important it is to present our non-significant results in international congress as the FENS one. Thank you for your support and for answering my questions. I hope I'll have the chance to meet you again one day.

Je remercie également **Alexia Zakaroff** et **Élodie Riant** de la plateforme Génotoul TRI ainsi que **Corinne Bernis** et **Alexandre Lucas** de la plateforme WeMet pour leurs conseils, leur aide et leur gentillesse.

Je tiens également à remercier celles qui ont constitué mon comité de suivi de thèse : **Elsa Suberbielle** et **Nicole Mons**. Merci à vous pour vos retours et vos conseils précieux sur les projets, merci d'avoir vu le potentiel et d'être restées optimistes face à mes résultats.

Bien entendu, faisant partie d'une équipe, je remercie l'ensemble des membres de REMEMBeR. Ainsi, merci à **Lionel Dahan** pour tes réponses à mes questions sur les stats, à **Lionel Moulédous** pour tes questions si pertinentes en réunion d'équipe, à **Bruno Guiard** pour ton humour à toute épreuve ainsi qu'à **Guillaume Gotti**, toujours dans la délicatesse. Je tiens aussi à remercier **Laure Verret**, pour ses conseils et sa pédagogie. Ça a été un réel plaisir de préparer les TP de NI avec toi Laure, j'espère avoir l'occasion de recroiser ton chemin à l'avenir. Je tiens aussi à remercier **Sébastien Gauzin** pour sa patience, son aide et son soutien dans les manips de comportement notamment. Et enfin, merci à **Camille Lejards** pour son aide, son écoute et sa gentillesse.

Je remercie aussi celles qui ont apporté leur aide au quotidien ou plus occasionnellement. **Virginie Bourlier**, merci de m'avoir donné l'accès au microscope pour les dernières manips de ma thèse et sans quoi nous n'aurions pas pu finir à temps. **Marlène Botella**, merci de m'avoir initiée aux Western Blots, merci pour ta gentillesse quotidienne et ton aide. **Isabelle Lafon**, merci pour la dernière discussion que nous avons eu avant ton départ, merci pour ta bonne humeur et ton sourire. **Erika Boissières**, merci de t'être occupée de toute la reproduction des souris, merci pour ta gentillesse. **Virginie Marty**, merci pour le matériel et le protocole de dissociation cellulaire qui m'aura donné du fil à retordre, merci pour tes conseils et ta sympathie.

Je tenais aussi à remercier toutes (désolée Alban, le féminin l'emporte ici) les stagiaires que j'ai pu encadrer. Les premières, **Loanne** et **Aurélia**, ainsi qu'**Alban** mais aussi celles des dernières années, **Chloé** et **Aroha**. Je remercie évidemment les stagiaires de ces derniers 6 mois, vous êtes la crème de la crème, ne changez rien : **Marie**, **Elsa**, **Fanny R.**, **Camille**, **Fanny T.** À toutes, je vous souhaite le meilleur pour la suite et j'espère qu'on aura l'occasion de se recroiser.

Je suis arrivée au labo en tant que stagiaire, sans doctorant « défini » pour m'encadrer au quotidien, mais c'est sans aucun regret puisqu'il y avait déjà 4 personnes formidables pour me prendre sous leurs ailes. Ainsi, j'aimerais remercier mes trois premiers piliers, anciens doctorants et maintenant docteurs : **Fares Sayegh**, **Basile Coutens** et **Sébastien Bullich**.

Fares, un des premiers souvenirs que j'ai de toi, c'est le mail de bienvenue que j'ai reçu quand tu m'as ajouté à la mailing list de l'équipe où tu finissais par « Welcome aboard ! ». Dans quelle aventure je m'embarquais ! Tu as toujours été chaleureux et bienveillant à l'égard de chaque personne de l'équipe. Je me remémore les « y'a pas de raison » que je te sortais souvent pas quand tu étais en

train de rédiger ta thèse, crois-moi je me le suis aussi répété quand j'y étais. Merci pour ta présence solaire.

Basile, tu étais un peu le papa des doctorants de l'équipe, après toutes les années que tu as passé au CRCA. Toujours attentionné et toujours avec de l'humour bien évidemment. Détendre l'atmosphère par des blagues inopportunes, tu étais le fils spirituel de Bruno. Saches que tes avocats et ton ficus se portent bien sur mon bureau. Ça a été un plaisir et une chance de travailler dans le même bureau que toi, merci pour tes conseils avisés et ta bonne humeur, tu as été un rayon de soleil dans le bureau.

Seb, tu es l'un des premiers à qui j'ai parlé lors de mon premier stage. Je me souviens d'une discussion assez longue où tu me racontais ta première année de thèse et tu préparais ton premier CST. Évidemment, c'est toi qui m'as épaulé lors de mes premières chir, heureusement que tu étais là. Je revois les vidéos avec Flora où, allongé sur une chaise à roulettes, tu passais devant la porte de biomol avec la posture de Superman en vol. Je tiens à te remercier pour tous ces moments, pour les discussions sur le chemin en partant du labo, pour tes conseils précieux, pour ta gentillesse, ton aide, ton soutien inébranlable.

Sachez que vous avez été et continuez d'être une source d'inspiration constante. Je vous admire pour les êtres exceptionnels que vous êtes, vous me manquez.

Évidemment, il faut 4 pieds à une chaise, une table ou tout autre meuble pour être stable, j'arrive donc à mon 4^{ème} pilier : **Flora D'Oliveira da Silva**. Je crois que tu es l'une des rencontres les plus importantes dans ma vie et je me sens extrêmement chanceuse de pouvoir te compter parmi mes amies. Beaucoup de souvenirs me reviennent en mémoire avec toi, les pauses café-clope, les nombreuses soirées à parler de tout et de rien, et la nuit blanche mémorable à se raconter l'intégralité de nos vies. Tu m'as soutenue dès mon stage de M2, en m'apportant une chocolatine et en m'épaulant quand je perdais espoir pour injecter mes souris via les canules. S'en est suivi des années d'entraide, de moments durs, surtout sur la fin mais pour la plupart joyeux malgré tout. On se revoit bientôt dans un autre pays, où je sais que certaines difficultés entravent encore ta route, mais sache que tu peux et pourras compter sur moi à tout moment. Merci d'être entrée dans ma vie.

Comment parler de Flora sans parler de Clémence Viguié ? Impossible. Je sais qu'on a fait un pacte ensemble les filles (même si je ne m'en souviens pas) et je compte bien le respecter.

Clémence, Seb parlait de toi avec tellement d'éloges, tu ne pouvais être qu'exceptionnelle et je ne peux que le confirmer, évidemment. Merci pour ces dernières années, pour ta joie de vivre et ton enthousiasme à sortir boire un verre après les journées compliquées au labo. Je me souviens de nos journées en chir pendant le mois d'août, seules dans l'animalerie à écouter en boucle les hits de l'été à la radio et à jouer au pendu en attendant que le ciment sèche. Les journées étaient longues mais tu les as rendues radieuses à ta façon. Merci aussi de t'être toujours occupé du bien-être des autres, d'être à l'écoute et toujours prête pour les potins. Saches que tu es parfaite telle que tu es, ne laisse personne te faire douter de toi. Tu es forte, compétente et capable de tout. Peu importe où la vie te mènera, tu pourras compter sur moi pour te le rappeler autant de fois qu'il le faudra. Merci d'être toi.

Je remercie aussi ceux, mais surtout celles, qui finiront après moi.

Julie Rivière, on se connaît depuis un certain temps maintenant, depuis ton premier stage. Je tiens à te remercier pour avoir été aussi adorable toutes ces années. Toujours là pour les potins évidemment, je te considère un peu comme la gazette du labo pour savoir ce qu'il s'est passé entre un tel et un tel. Je sais que la thèse n'a pas été simple comme expérience, les bas ont été très bas, et les hauts peu hauts, mais tu as tellement changé depuis le début de ta thèse. Je t'ai vu glow up en l'espace d'un mois pour devenir si rayonnante et vouloir croquer la vie à pleines dents. Tu es formidable, j'espère que la fin de cette période se déroulera pour le mieux.

Romain Hacquet, toi aussi tu me suis de près. Docteur en pharmacie le même jour que ma soutenance. Je crois que je te l'ai déjà dit mais j'ai l'impression que tu as déjà vécu mille vies avant celle-ci, tu as tant de sagesse en toi. Tu m'impressionnes par ton parcours et tes réflexions. Merci pour toutes ces discussions sur des sujets plus ou moins légers. J'espère que la fin de ta thèse de recherche se déroulera plus sereinement que pour ta thèse d'exercice. N'hésite pas si tu as besoin de quelques conseils d'organisation, et à très vite j'espère.

Lola, je ne t'ai pas trouvé ... Non, je plaisante, ça risque de te rappeler les mails que tu n'aimes pas forcément recevoir. Je te remercie pour les « remontages » de moral durant les dernières semaines de rédaction. Pour toi aussi les périodes difficiles se succèdent un peu, mais j'espère que cette dernière année ne te donnera pas trop de fil à retordre. Merci pour les discussions au bureau, avec ou sans larmes mais surtout avec beaucoup de rire. Je sais que tu redoute le moment où je ne serai plus là, mais sache que tu vas gérer tout ça, et que tu deviendras toi aussi le pilier des prochain.e.s doctorant.e.s un jour. Je fini de rédiger ce petit paragraphe avec toi à côté qui me demande ce que j'ai écrit, j'espère que c'est à la hauteur de tes espérances !

Cathaline, la fameuse, la seule et l'unique ! Merci pour ta présence solaire au bureau, pour nous avoir fourni du sucre tout au long de l'année, pour ces fous rires et ces « we need to talk in english ». En espérant te revoir quand tu auras ouvert ton bar à chats, juste de passage ou pour ouvrir ma librairie juste à côté. Je te souhaite le meilleur pour la suite !

Zahra, of course I'm thanking you in English even though you can understand what I'm writing in French. You are a true sunshine in this lab, you're so strong and so caring about everyone. I admire you for the wonderful person that you are. I hope that the rest of your thesis will go smoothly, now that you have your cells and I hope to see you again one day, maybe to eat some French fries at the Christmas Market or an Iranian meal ;)

Cécile Merveille, ah non pardon Merveillie ! C'est encore un peu le début de ta thèse, mais je te souhaite évidemment que tout se déroule pour le mieux. Merci pour ta présence durant les jours qui ont précédé ma soutenance, pour ton côté attentionné et pour ton rire qui, je l'espère, résonnera encore dans les couloirs du labo durant les prochaines années.

Évidemment, je remercie également mes amies les plus proches. **Julie, Mélodie**, merci d'avoir pu vous libérer pour venir assister à cet événement, merci pour votre soutien tout au long de ces années, pour ces journées passées à discuter, pour votre bonne humeur et vos encouragements. Vous savez à quel point je vous estime, ne changez surtout pas.

Je finirai ces remerciements avec une pensée pour ma famille. Je remercie **mes parents**, Mireille et Frédéric pour leur soutien indéfectible durant toutes ces années, pour leur amour infini, pour les valeurs qu'ils m'ont transmises, pour avoir contribué à faire de moi la personne que je suis actuellement. J'espère vous avoir rendu fières. Je remercie également ma sœur, **Gaëlle** : tu as été là dans les pires moments je crois, mais tu as toujours su trouver les mots. Merci pour tout, je n'aurai pas pu espérer une meilleure sœur que toi. Je remercie aussi le reste des membres de ma famille, encore une fois pour votre soutien. Je vous aime, vous me manquez beaucoup.

Enfin, à toi **Q.**, tu sais déjà tout mais encore merci. L'avenir s'ouvre devant nous, allons croquer la vie !

CÉLIA BAK

COMPÉTENCES

- Manipulation et comportement animal (mémoire, anxiété)
- Chirurgie stéréotaxique
- Biologie moléculaire (extractions ARN et protéines, RTqPCR, Western Blot)
- Immunohistochimie, microscopie à fluorescence et confocale
- Utilisation logiciel ImageJ et notions en R

ACTIVITÉS DE RECHERCHE

2020-2024 CENTRE DE RECHERCHES SUR LA COGNITION ANIMALE (CRCA-CBI, TOULOUSE, FRANCE) - THÈSE DE DOCTORAT

Rôle du complexe répresseur transcriptionnel SIN3A-HDAC dans la consolidation d'une mémoire à long terme & effets de l'âge sur la réponse de peur innée à un stimulus de looming, sur l'activité cellulaire et la connectivité fonctionnelle cérébrale

Superviseurs : Claire Rampon & Cédric Florian

2020 CENTRE DE RECHERCHES SUR LA COGNITION ANIMALE (CRCA-CBI, TOULOUSE, FRANCE) - STAGE MASTER 2

Mise en place d'un modèle murin déplété pour le co-répresseur transcriptionnel SIN3A lors de la consolidation d'une mémoire à long terme

Superviseur : Cédric Florian

2019 CENTRE DE RECHERCHES SUR LA COGNITION ANIMALE (CRCA-CBI, TOULOUSE, FRANCE) - STAGE MASTER 1

Étude du rôle du co-répresseur SIN3A dans les processus de mémoire chez la souris adulte et âgée

Superviseur : Cédric Florian

2019 UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER (TOULOUSE, FRANCE) - NIVEAU MASTER 1

Projet de recherches tutoré en neurosciences sur l'association d'un stress aigu et de la caféine sur le rappel d'un apprentissage massé ou distribué d'une mémoire spatiale chez la souris

Superviseurs : Cédric Florian & Pascal Rouillet

CURSUS UNIVERSITAIRE

2020-2024 DOCTORAT EN NEUROSCIENCES, *Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France*

2022 FORMATION CONCEPTEUR UTILISATION ET PROTECTION DE L'ANIMAL DE LABORATOIRE (UPAL), *École Nationale Vétérinaire Toulouse (ENVT), Toulouse, France*

2018-2020 MASTER EN NEUROSCIENCES COMPORTEMENT COGNITION, *Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France*

2016-2018 LICENCE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOLOGIE, *Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France*

2014-2016 PREMIÈRE ANNÉE COMMUNE AUX ÉTUDES DE SANTÉ (PACES), *Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France*

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATION PROJET DE THÈSE

2024 – SOUMIS POUR PUBLICATION

C. Bak, A. Boutin, S. Gauzin, C. Lejards, C. Rampon, C. Florian – « *Age-associated alteration of innate defensive response to a looming stimulus and brain functional connectivity pattern in mice* » dans le journal *Neurobiology of Aging*

PUBLICATION HORS PROJET DE THÈSE

2024 – EN PRÉPARATION

H. Hamelin, G. Poizat, N. Mirofle, C. Bak, J. Callebert, A. Hamed, C. Rampon, M. Taouis, C. Florian, S. Granon – « *Sweetened beverage consumption in adolescence shapes individual decision strategies and alters monoaminergic signaling* »

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

2023 – NEUROFRANCE 2023, LYON – *Présentation d'un poster* – « *A new mouse model to investigate the role of the transcriptional corepressor SIN3A in hippocampus-dependant memories* »

2022 – JOURNÉES DE L'ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ ET BIOTECHNOLOGIES (ED BSB), TOULOUSE – *Présentation d'un poster* – « *Deciphering the role of the transcriptional repressor complex SIN3A-HDAC in memory formation in mice* »

2022 – FEDERATION OF EUROPEAN NEUROSCIENCE SOCIETIES (FENS), PARIS – *Présentation d'un poster* – « *Deciphering the role of the transcriptional repressor complex SIN3A-HDAC in memory formation in mice* »

2022 – EUROPEAN NEUROSCIENCE CONFERENCE BY DOCTORAL STUDENTS (ENCODS), PARIS – *Présentation d'un poster* – « *Deciphering the role of the transcriptional repressor complex SIN3A-HDAC in memory formation in mice* »

ACTIVITÉS PÉDAGOGIQUES

ENSEIGNEMENT

2023-2024 – ATTACHÉE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE (ATER 96H)

2021-2023 – DOCTORANTE CONTRACTUELLE CHARGÉE D'ENSEIGNEMENT (DCCE 32H)

2020-2021 – VACATAIRE (24H)

- Introduction à la méthodologie expérimentale : statistiques et méthodologie
- Neurosciences intégrées : transmission du signal, relation neurone-glie, histologie des organes sensoriels et neuroanatomie de l'encéphale de souris
- Introduction à la biologie du comportement : performances cognitives chez l'humain et effet du stress
- Méthodes et modèles en neurosciences : neuroanatomie, immunohistochimie et microscopie
- Neurosciences comportementales : neuroanatomie de l'encéphale de porc, effet de l'attention sur la perception de la douleur et effet placebo

CO-SUPERVISION DE STAGIAIRES

Lucie Camp (double cursus ingénierie INSA et Sciences politiques) – 1 journée d'immersion

Loanne Courdeau (L2 Biologie Cellulaire et Physiologie) – 2 semaines

Aurélia Courtarel (L3 Biologie Cellulaire et Physiologie) – 3 semaines

Aroha Boutin (L3 Biologie Cellulaire et Physiologie, avec renforcement en mathématiques, informatique et physique) – 2 mois (rapport et présentation orale)

Alban Bertolissi (3ème année étude de Pharmacie) – 4 semaines (rapport et présentation orale)

Chloé Latte (M1 Neurosciences Cognitives et Intégrées) – 2 mois (rapport et présentation orale)

AUTRES IMPLICATIONS

2021 - 2024 : Représentante doctorant au Conseil d'École de l'École Doctorale Biologie Santé et Biotechnologie (ED BSB)

2023 : Co-organisatrice d'un workshop pour l'École Universitaire de Recherche (EUR) Cancer Aging and Rejuvenation (CARe) :

Numerical and technical tools to better investigate metabolism, inflammation and cancer

2022-2023 : Co-organisatrice de la Semaine du Cerveau à Toulouse 2022 et 2023

2021 - 2022 : Organisation des réunions de l'équipe REMEMBeR

Résumé

La mémoire à long terme se forme au cours d'un processus de consolidation nécessitant une transcription *de novo* de gènes, régulée par des mécanismes épigénétiques. Les modifications épigénétiques, incluant les acétylations des histones qui structurent la chromatine, sont ajoutées ou retirées respectivement par des histone acétyltransférases (HATs) et des histone deacétylases (HDACs). Ces dernières sont recrutées aux gènes cibles par des complexes répresseurs transcriptionnels. Bien qu'encore peu étudiés, la littérature montre l'engagement de ces complexes répresseurs dans la formation de différents types de mémoire, mettant ainsi en exergue la question d'une implication importante de ces derniers dans les processus mnésiques. Ainsi, nous avons choisi d'étudier l'un de ces complexes, SIN3A-HDACs, dans le cadre de la consolidation d'une mémoire dépendante de l'hippocampe. En outre, un grand nombre d'études ont examiné la fonction des HDACs, en particulier les HDACs 1 et 2, dans les processus de la mémoire en utilisant des modèles de souris génétiquement modifiés pour ces enzymes. Cependant, leur rôle dans la phase de consolidation de la mémoire ne peut être mis en évidence que par leur inhibition ponctuelle comme par l'administration d'inhibiteurs pharmacologiques des HDACs. Ainsi, pour tester notre hypothèse selon laquelle le complexe SIN3A-HDACs participe à la formation de la mémoire à long terme, nous avons ciblé spécifiquement les deux entités de ce complexe en tentant d'établir un modèle murin déplété en SIN3A ou en inhibant spécifiquement les HDACs 1 et 2 par l'administration du composé 60 (Cpd-60) dans l'hippocampe dorsal. Les premiers résultats de ce travail de thèse ont montré un rôle de la protéine SIN3A, mais aucun effet du Cpd-60 sur la consolidation de la mémoire contextuelle générée en soumettant des souris adultes à un conditionnement de peur. La première partie de ce manuscrit présente les différentes approches que nous avons utilisées pour cibler SIN3A et les effets d'une injection de Cpd-60 au niveau moléculaire et comportemental.

La seconde partie de ce travail de thèse concerne l'effet de l'âge sur la réponse comportementale et cérébrale des souris face à un stimulus de looming, mimant l'approche rapide d'un prédateur volant. Des comportements défensifs adaptés sont essentiels à la survie des espèces. Alors que ces comportements commencent à se développer tôt dans la vie d'un individu, les connaissances sur la façon dont ils évoluent chez les individus plus âgés sont encore peu nombreuses. Considérant que le vieillissement s'accompagne d'un déclin des fonctions cognitives et physiques, nous émettons l'hypothèse que les comportements de peur innée et les mécanismes cérébraux sous-jacents pourraient subir des modifications avec l'âge. Ce travail examine donc cette hypothèse en observant la réaction des souris âgées à un stimulus visuel menaçant, comparativement à des souris jeunes adultes. Nos résultats montrent que les souris âgées manifestent une réponse de peur différente de celle des souris jeunes lorsqu'elles sont confrontées au stimulus de looming. Contrairement aux souris jeunes, les souris âgées ont tendance à adopter un comportement de freezing, sans chercher à fuir vers un abri. Il est intéressant de noter que cette réponse comportementale altérée chez les souris âgées est liée à un profil de connectivité fonctionnelle cérébrale distinct de celui des jeunes souris, avec un déficit d'activation cellulaire dans certaines structures cérébrales clés qui régulent les comportements de peur innée.

Mot clés : hippocampe ; consolidation mnésique ; épigénétique ; vieillissement ; peur innée ; comportement

Abstract

The long term memory is formed through a consolidation process requiring *de novo* gene transcription, regulated by epigenetic mechanisms. Epigenetic modifications, including histone acetylations that structure chromatin, are added or removed respectively by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). The latter are recruited to targeted genes by transcriptional repressor complexes. Although still understudied, the literature shows the involvement of these repressor complexes in the formation of different types of memory, thus highlighting the question of their significant implication in mnemonic processes. Therefore, we chose to study one of these complexes, SIN3A-HDACs, in the context of hippocampus-dependent memory consolidation. Furthermore, numerous studies have investigated the function of HDACs, especially HDACs 1 and 2, in memory processes using genetically modified mice models for these enzymes. However, their role in the memory consolidation phase can only be demonstrated by their punctual inhibition, such as through acute administration of pharmacological HDAC inhibitors. Thus, to test our hypothesis that the SIN3A-HDACs complex participates in long term memory formation, we specifically targeted the two entities of this complex by attempting to establish a SIN3A-depleted mouse model or by specifically inhibiting HDACs 1 and 2 through the administration of Compound 60 (Cpd-60) in the dorsal hippocampus. The first results of this thesis work showed a role for SIN3A, but no effect of the Cpd-60 on the consolidation of contextual memory generated by subjecting adult mice to fear conditioning. The first part of this manuscript therefore presents the different approaches we used to target SIN3A and the effects of Cpd-60 injection at the molecular and behavioral levels.

The second part of this thesis work addresses the effect of age on the behavioral and brain response of mice to a looming stimulus, mimicking the rapid approach of a flying predator. Adaptive defensive behaviors are essential for species survival. While these behaviors begin to develop early in an individual's life, there is still little knowledge about how they evolve in older individuals. Considering that aging is accompanied by a decline in cognitive and physical functions, we hypothesize that innate fear behaviors and underlying brain mechanisms may undergo modifications with age. This work thus examines this hypothesis by observing the reaction of old mice to a threatening visual stimulus compared to young ones. Our results show that aged mice exhibit a different fear response than younger mice when confronted with the looming stimulus. Unlike young mice, old mice tend to adopt a freezing behavior without seeking for a refuge. Interestingly, this altered behavioral response in aged mice is associated with a distinct pattern of brain functional connectivity compared to young mice, with a deficit in cellular activation in key brain structures that regulate innate fear behaviors.

Key words : hippocampus ; memory consolidation ; epigenetics ; aging ; innate fear ; behavior

Table des matières

Remerciements.....	
.....5	
Curriculum vitae	
.....6	
Résumé	-
Abstract.....	
.....8	
Table des matières.....	
.....10	
Liste des figures.....	
.....14	
Liste des tableaux.....	
.....16	
Liste des abréviations.....	
.....17	
Préambule.....	
.....21	
Avant-propos.....	
.....22	

PARTIE I – Exploration du rôle du complexe répresseur transcriptionnel SIN3A-HDAC dans la consolidation de la mémoire contextuelle

I. INTRODUCTION.....	29
a. Généralités.....	29
<i>Les systèmes de mémoire.....</i>	<i>29</i>
<i>L'hippocampe et ses connexions.....</i>	<i>33</i>
<i>Dynamique de la mémoire.....</i>	<i>35</i>
<i>Notion d'engramme mnésique.....</i>	<i>36</i>

b. Consolidation de la mémoire et transcription génique.....	37
<i>Consolidation synaptique ou cellulaire.....</i>	<i>37</i>
<i>Consolidation systémique.....</i>	<i>41</i>
c. Régulations épigénétiques de la transcription : rôle des complexes activateurs et répresseurs transcriptionnels dans la mémoire.....	44
<i>miRNA (microARN).....</i>	<i>45</i>
<i>Méthylations de l'ADN.....</i>	<i>46</i>
<i>Modifications des histones.....</i>	<i>47</i>
<i>Phosphorylations des histones.....</i>	<i>48</i>
<i>Méthylations des histones.....</i>	<i>49</i>
<i>Acétylations des histones.....</i>	<i>49</i>
<i>Complexes activateurs et leur implication dans la mémoire.....</i>	<i>52</i>
<i>Complexes répresseurs et leur rôle dans la mémoire.....</i>	<i>53</i>
d. Le complexe répresseur de la transcription SIN3A-HDACs et son rôle dans la mémoire.....	55
<i>SIN3A (Switch Insensitive 3A).....</i>	<i>55</i>
<i>HDACs 1 et 2 (Histone Deacetylases 1 et 2).....</i>	<i>60</i>
e. Vieillessement, mémoire et transcription génique.....	63
<i>Altérations des processus cognitifs dues à l'âge.....</i>	<i>64</i>
<i>Altérations cellulaires et moléculaires dues à l'âge.....</i>	<i>65</i>
<i>Expression des gènes et mécanismes épigénétiques lors du vieillissement.....</i>	<i>66</i>
<i>Altération de l'expression des gènes avec l'âge.....</i>	<i>66</i>
<i>Altération des marques épigénétiques avec l'âge.....</i>	<i>67</i>
<i>Altération de la répression médiée par les HDACs avec l'âge.....</i>	<i>68</i>
<i>Cibler les modifications épigénétiques liées au vieillissement.....</i>	<i>68</i>
<i>Le complexe répresseur SIN3A-HDACs dans le vieillissement.....</i>	<i>69</i>
II. PROBLÉMATIQUES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	73
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	79
a. Autorisations à expérimenter.....	79
b. Animaux.....	79
c. Approches pharmacologiques et virales.....	79
<i>Small interfering RNA (siRNA)</i>	<i>79</i>
<i>Lentivirus</i>	<i>80</i>
<i>Virus adénoassociés recombinant (rAAV).....</i>	<i>81</i>
<i>Composé-60 (Compound-60 ou Cpd-60 ou BRD6929).....</i>	<i>81</i>

d. Implantation des guides canules et injections intra-hippocampiques des siRNA ou du Cpd-60.....	82
e. Injections intra-hippocampiques des lentivirus et rAAV.....	82
f. Prélèvement des structures cérébrales.....	83
g. Perfusion intra-cardiaque.....	83
h. Dissociation cellulaire pour le tric cellulaire par cytométrie en flux.....	83
i. Immunohistochimie anti-tGFP.....	84
j. Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	85
<i>Extraction des ARN totaux.....</i>	<i>85</i>
<i>RT-qPCR.....</i>	<i>85</i>
k. Extraction de protéines et Western Blots.....	86
<i>Extraction des protéines totales.....</i>	<i>86</i>
<i>Western Blots.....</i>	<i>87</i>
l. Tests comportementaux.....	88
<i>Labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze, EPM)</i>	<i>89</i>
<i>Test de champ ouvert (Open Field, OF)</i>	<i>89</i>
<i>Conditionnement de peur (Fear Conditioning, FC)</i>	<i>90</i>
<i>Test de localisation d'objet (Object Location task, OL).....</i>	<i>92</i>
m. Analyses statistiques.....	93
IV. RÉSULTATS.....	97
a. Cibler SIN3A au moment de la consolidation de la mémoire.....	97
<i>Utilisation des siRNA.....</i>	<i>97</i>
<i>Utilisation des lentivirus exprimant un shRNA.....</i>	<i>102</i>
<i>Utilisation des rAAV exprimant un shRNA.....</i>	<i>104</i>
b. Cibler les HDACs 1 et 2 au moment de la consolidation de la mémoire contextuelle.....	111
<i>Utilisation du Cpd-60 par voie intrapéritonéale.....</i>	<i>112</i>
<i>Utilisation du Cpd-60 par voie intra-hippocampique.....</i>	<i>115</i>
V. DISCUSSION & CONCLUSION.....	121
a. Retours sur les outils utilisés et autres approches possibles pour étudier le rôle de SIN3A dans la consolidation de la mémoire.....	121
b. Retours sur l'utilisation du Cpd-60 pour inhiber spécifiquement les HDACs 1 et 2.....	124
c. Reconsidérer le fait de cibler le complexe SIN3A-HDACs.....	127
d. Perspectives concernant le rôle de SIN3A-HDACs dans le vieillissement cognitif....	129

PARTIE II – Effet de l'âge sur la réponse comportementale et cérébrale des souris à un stimulus de looming

I. INTRODUCTION.....	137
a. Émotions, peurs et comportements défensifs.....	137
<i>Théories des émotions.....</i>	<i>137</i>
<i>Peurs et comportements défensifs.....</i>	<i>138</i>
b. Dispositifs et stimuli générant les réponses de peur.....	141
c. Les stimuli de looming et de sweeping.....	143
d. Structures cérébrales et réseaux neuronaux impliqués dans les comportements de peur innée suite à un stimulus de looming.....	145
e. Vieillesse et peur.....	148
II. PROBLÉMATIQUES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	153
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	157
a. Autorisations à expérimenter.....	157
b. Animaux.....	157
c. Tests comportementaux.....	157
<i>Looming.....</i>	<i>157</i>
<i>Conditionnement de peur au contexte (Contextual Fear Conditioning, CFC)...</i>	<i>159</i>
d. Perfusion intra-cardiaque.....	160
e. Immunohistochimie anti c-Fos.....	160
f. Acquisition et analyse d'images pour le marquage c-Fos.....	161
g. Analyses statistiques.....	161
<i>Analyse du comportement et de la densité de cellules c-Fos⁺.....</i>	<i>161</i>
<i>Corrélations inter-régionales.....</i>	<i>162</i>
<i>Analyse des corrélations et connectivité fonctionnelle.....</i>	<i>162</i>
IV. RÉSULTATS.....	165
a. La réponse comportementale induite par le looming est modifiée avec l'âge.....	165
b. L'activité cellulaire déclenchée en réponse au stimulus de looming est modifiée par l'âge.....	167
c. Le stimulus de looming recrute des circuits cérébraux différents selon l'âge.....	171
V. DISCUSSION & CONCLUSION.....	177
a. Le comportement de peur innée est altéré chez les souris âgées.....	177
b. Les réseaux de connectivité fonctionnelle et l'activation cellulaire sont altérés chez les souris âgées.....	180
c. Limites de l'approche immunohistochimique contre c-Fos.....	182
d. Le looming : une nouvelle façon de conditionner les souris par la peur ?.....	183

Bibliographie.....						
.....	187					
Annexes.....						
.....	227					
Annexe	1	–	Article	soumis	pour	
publication.....						231
Annexe	2	–	Tableaux	des	analyses	
statistiques.....						257

Liste des figures

Figure 1. Classification des mémoires à long terme et structures associées (<i>d'après Squire 2004</i>).....	30
Figure 2. Représentation schématique de l'hippocampe.....	34
Figure 3. Dynamique des phases de la mémoire à long terme.....	35
Figure 4. Cascade moléculaire de la plasticité synaptique.....	38
Figure 5. Modèle standard de la consolidation systémique (<i>d'après Frankland & Bontempi 2005</i>).....	42
Figure 6. Modèle standard et théorie des traces multiples de la consolidation systémique (<i>d'après Frankland & Bontempi 2005</i>).....	43
Figure 7. Représentation schématique d'un nucléosome.....	44
Figure 8. Méthylation des cytosines au niveau de l'ADN.....	46
Figure 9. Représentation schématique des modifications d'histones régulant l'état de la chromatine.....	48
Figure 10. Représentation schématique des protéines SIN3 chez la souris (<i>d'après Chaubal & Pile 2018</i>)	56
Figure 11. Représentation schématique de SIN3A et de ses partenaires protéiques.....	56
Figure 12. Construction utilisée dans les vecteurs lentiviraux (<i>OriGene Technologies GmbH</i>).....	80
Figure 13. Construction utilisée dans les rAAV (Ana M.M. Oliveira & Janina Kupke).....	81
Figure 14. Dispositif du labyrinthe en croix surélevé.....	89
Figure 15. Dispositif du test de champ ouvert.....	90
Figure 16. Dispositif et déroulement du protocole de conditionnement de peur.....	90
Figure 17. Dispositif et déroulement du test de localisation d'objet.....	92
Figure 18. Cinétique d'action des siRNA Sin3a (lot#1 : ASO2F1RI) sur les transcrits de <i>Sin3a</i> et sur la protéine SIN3A.....	98
Figure 19. Effet des siRNA Sin3a (lot#1 : ASO2F1RI) sur le comportement anxieux et les performances de mémoire des souris.....	99
Figure 20. Cinétique d'action du deuxième lot de siRNA Sin3a (lot#2 : ASO2HRWU) sur les transcrits de <i>Sin3a</i> et sur SIN3A.....	101
Figure 21. Effet du troisième lot de siRNA Sin3a (lot#3 : ASO2HTSQ) sur les transcrits de <i>Sin3a</i>	102
Figure 22. Cinétique d'action du lentivirus shRNA Sin3a sur les transcrits de <i>Sin3a</i>	103
Figure 23. Validation <i>in vitro</i> de l'efficacité des rAAV shRNA Sin3a 1, 2 et 3 à diminuer l'expression de Sin3a (données de Ana M.M. Oliveira et Janina Kupke).....	105
Figure 24. Effet des rAAV shRNA Sin3a sur l'expression de <i>Sin3a</i> et les taux protéiques de SIN3A dans l'hippocampe dorsal.....	105
Figure 25. Effet de l'injection du shRNA Sin3a 1 sur les performances de mémoire à long terme en conditionnement par la peur.....	107
Figure 26. Effet de l'injection du shRNA Sin3a 1 sur les performances de mémoire à long terme en test de localisation d'objet.....	109
Figure 27. Effet des shRNA sur la quantité de SIN3A dans les cellules infectées par les rAAV.....	111
Figure 28. Effet d'une injection aigue intrapéritonéale (<i>ip.</i>) de différentes doses de Cpd-60 sur l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe dorsal des souris.....	112

Figure 29. Effet d'une injection aigue intrapéritonéale (<i>ip.</i>) de Cpd-60 (45 mg/kg) sur la mémoire à long terme, le comportement anxieux, l'activité locomotrice et l'expression des gènes de plasticité dans l'hippocampe dorsal des souris.....	113
Figure 30. Effet d'une injection aigue intra-hippocampique (<i>i-HPC</i>) de Cpd-60 sur l'acétylation des histones H3 dans l'hippocampe dorsal des souris.....	115
Figure 31. Effet d'une injection aigue intra-hippocampique (<i>i-HPC</i>) de Cpd-60 sur la mémoire à long terme des souris.....	116
Figure 32. Effet de l'âge sur l'expression de <i>Sin3a</i> et les taux protéiques de SIN3A dans l'hippocampe des souris.....	129
Figure 33. Réponses comportementales défensives selon la présence ou l'absence d'un échappatoire et selon la distance séparant l'individu menacé du prédateur (<i>adapté de Carli & Farabollini 2022</i>).....	139
Figure 34. Schéma récapitulatif des structures et voies cérébrales impliquées dans (A) l'encodage et (B) le rappel des mémoires de peur (<i>adapté de Gross & Canteras 2012</i>).....	141
Figure 35. Représentation schématique des stimuli de sweeping et de looming.....	143
Figure 36. Schéma récapitulatif des structures et voies cérébrales impliquées dans la réponse de peur innée.....	146
Figure 37. Dispositif et déroulement du test de looming.....	158
Figure 38. Représentation schématique du stimulus de looming utilisé.....	158
Figure 39. Dispositif et déroulement du conditionnement de peur au contexte.....	159
Figure 40. Mesures des comportements de type anxieux et de l'activité locomotrice pendant la session d'habituation.....	165
Figure 41. Effet de l'âge sur le comportement de peur innée en réponse au stimulus de looming chez les souris.....	166
Figure 42. Quantification du marquage c-Fos dans plusieurs régions cérébrales en réponse au looming chez les jeunes souris.....	168
Figure 43. Quantification du marquage c-Fos dans plusieurs régions cérébrales en réponse au looming chez les souris âgées.....	170
Figure 44. Matrices de corrélation et réseaux de connectivité fonctionnelle cérébrale recrutés par le stimulus de looming chez les jeunes souris.....	172
Figure 45. Matrices de corrélation et réseaux de connectivité fonctionnelle cérébrale recrutés par le stimulus de looming chez les souris âgées.....	173
Figure 46. Conditionnement de peur au contexte chez les souris jeunes et âgées.....	178

Liste des tableaux

Tableau 1. Implication des HDACs dans les processus cognitifs et de mémoire.....	52
Tableau 2. Récapitulatif des agents pharmacologiques inhibiteurs de l'activité des HDACs impliquées dans les processus cognitifs.....	62
Tableau 3. Concentrations inhibitrices 50 (IC ₅₀) du Cpd-60 sur les HDACs de classe I et II (<i>Schroeder et al., 2013</i>).....	63
Tableau 4. Séquences des siRNA Sin3a (5'-3').....	79
Tableau 5. Séquences des shRNA Sin3a ou Scr (5'-3').....	80
Tableau 6. Séquences des shRNA Sin3a (5'-3') exprimés par les rAAV.....	81
Tableau 7. Amorces (forward et reverse, orientation 5'-3') utilisées pour quantifier l'expression des gènes d'intérêt en RT-qPCR.....	86
Tableau 8. Anticorps utilisés dans les expériences de Western Blot.....	88
Tableau 9. Récapitulatif des altérations comportementales observées chez les souris C57Bl/6J âgées.....	149
Annexe 2. Tableaux des analyses statistiques.....	257

Liste des abréviations

aa	acides aminés
ACC	cortex cingulaire antérieur
Ach	acétylcholine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AHN	noyau antérieur de l'hypothalamus
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BF	basal forebrain
BLA	noyau basolatéral de l'amygdale
BSA	bovine serum albumin
c-Fos ⁺	cellules immunopositives pour c-Fos
c.r.	collatérales récurrentes
c.S.	collatérales de Schaffer
CA	Corne d'Ammon
CA1	Corne d'Ammon 1
CA2	Corne d'Ammon 2
CA3	Corne d'Ammon 3
CaM	calmoduline
CaMKII	protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante
CBA	Chicken β Actin
CBI	Centre de Biologie Intégrative
CBP	CREB-binding protein
CeA	noyau central de l'amygdale
CEBP	CCAAT/enhancer binding protein
CMV	Cytomégalo virus
CoREST	RE1-element silencing transcription factor co-repressor
Cpd-60	composé 60 (inhibiteur des HDACs 1 et 2)
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
Ctrl	contrôle
DG	gyrus denté
DIV	days in vitro
dIPAG	substance grise périaqueducule dorsolatérale
DMSO	diméthyle sulfoxyde
dmVMH	partie dorsomédiale du noyau ventromédial de l'hypothalamus
DNMT	DNA méthyltransférase
DNMT3A2	DNA méthyltransférase 3A2
dNTP	desoxynucléotide triphosphate
Dopa	dopamine
DRN	noyau du raphé dorsal

e.g.	<i>exempli gratia</i> (par exemple)
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
EPM	elevated plus maze, labyrinthe en croix surélevé
ERK	extracellular-regulated kinase
F.	<i>fimbria</i>
f.m.	fibres moussues
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FC	fear conditioning, conditionnement de peur
GABA	acide γ-aminobutyrique
GNAT	Gcn5-related N-acetyltransferase
gra.	couche granulaire
H3K14ac	acétylation de la lysine 14 de l'histone H3
H3K27	lysine 27 de l'histone H3
H3K4	lysine 4 de l'histone H3
H3K4me3	triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3
H3K9	lysine 9 de l'histone H3
H3K9ac	acétylation de la lysine 9 de l'histone H3
H3K9me2	diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3
H3S10p	phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3
H4K12ac	acétylation de la lysine 12 de l'histone H4
H4K5ac	acétylation de la lysine 5 de l'histone H4
HAT	histone acétyltransférase
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCR	highly conserved region
HDAC	histone deacétylase
HDACi	inhibiteur des HDACs
HDM	histone déméthylase
HID	HDAC interaction domain
HMT	histone méthyltransférase
HPC	hippocampe
Hprt	hypoxanthine phosphoribosyltransférase
hrGFP	humanized Renilla reniformis green fluorescent protein
i.e.	<i>id est</i> (c'est-à-dire)
I2MC	Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires
IC ₅₀	concentration inhibitrice 50
IEGs	gènes immédiats précoces
ILNs	noyaux intralaminaires du thalamus
IRM	imagerie par résonance magnétique
KO	knock out
l.m.	<i>stratum lacunosum moleculare</i>
LA	noyau latérale de l'amygdale
LC	locus coeruleus
LHA	aire hypothalamique latérale
LPTN	noyau latéral postérieur du thalamus
LS	septum latéral
LTD	dépression à long terme
LTP	potentialisation à long terme

m.t.	machinerie de transcription
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBD	methyl CpG-binding domain protein
mGluR	récepteur métabotropique au glutamate
miR	miRNA ou microARN
MLNs	noyaux médians du thalamus
mPFC	cortex préfrontal médial
NaB	sodium butyrate
NCOA1	nuclear receptor co-activator 1
NCOR	nuclear receptor co-repressor
NDS	normal donkey serum
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
Nor	noradrénaline
NRSF	neuron-restrictive silencer factor
NuRD	nucleosome remodeling and deacetylase
OF	open field, test de champ ouvert
OL	object location task, test de localisation d'objet
OR	object recognition task, test de reconnaissance d'objet
PAG	substance grise périaqueducule
PAH	paired amphipathic alpha-Helix
PAH1	paired amphipathic alpha-Helix 1
PAH2	paired amphipathic alpha-Helix 2
PAH3	paired amphipathic alpha-Helix 3
PAH4	paired amphipathic alpha-Helix 4
PB	phosphate buffered
PBGN	noyau parabigéminale
pBMA	amygdale basomédiale postérieure
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS + Triton
PCAF	p300/CBP-associated factor
PEG 400	polyéthylène glycol 400
PFA	paraformaldéhyde
PKA	protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	protéine kinase C
POR	cortex postérieur
PP1	protéine phosphatase 1
PSD	densité post-synaptique
PSD95	postsynaptic density protein 95
PV	parvalbumine
pVMEA	partie postéroventrale de l'amygdale médiale
pyr.	couche pyramidale
rAAV	virus adénoassociés recombinant
RBBP4/7	retinoblastoma binding proteins 4 & 7
REST	RE1-element silencing transcription factor
Reu	noyau reuniens
RGCs	cellules ganglionnaires de la rétine
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer

ROS	espèces réactives de l'oxygène
RSP	cortex rétroplénial
RT	reverse transcriptase
RT-qPCR	reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction
s.l.	<i>stratum lucidum</i>
s.o.	<i>stratum oriens</i>
s.r.	<i>stratum radiatum</i>
SAM	S-adenosyl methionine
SC	colliculi supérieurs
Scr	scrambled
SEM	standard error of the mean
Ser	sérotonine
shRNA	small hairpin RNA
SIN3A	switch insensitive 3A (protéine)
<i>Sin3a</i>	switch insensitive 3A (gène)
Sin3aNH	modèle murin avec une délétion dans le gène Sin3a
SIN3B	switch insensitive 3B (protéine)
<i>Sin3b</i>	switch insensitive 3B (gène)
SIN3B _{sf}	switch insensitive 3B short form
siRNA	small interfering RNA
SRC-1	steroid receptor co-activator 1
TBS	tris buffered saline
TBST	TBS + Tween 20
Tet	ten-eleven-translocation
Tet1	ten-eleven-translocation 1
TFs	facteurs de transcriptions
tGFP	turbo green fluorescent protein
TH	tyrosine hydroxylase
TSA	trichostatine A
uSC	couches superficielles des colliculi supérieurs
vAMT	partie ventrale du noyau antéro-médial du thalamus
Véh	véhicule
vHPC	hippocampe ventral
vIPAG	substance grise périaqueducule ventrolatérale
vIPMD	partie ventrolatérale du noyau prémamillaire dorsal
vMT	noyaux ventro-médians du thalamus
vs	<i>versus</i>
VTA	aire tegmentale ventrale
WK	Witteveen-Kolk syndrome
Xi	noyau xiphoid

Préambule

Mes travaux de thèse comportent deux parties assez éloignées l'une de l'autre. La première partie constitue mon projet de thèse initial. Il s'agit d'un sujet sur lequel j'ai commencé à travailler durant mon stage de deuxième année de master, mais le contexte sanitaire de l'année 2020 a quelque peu retardé l'avancement de ce projet. Par ailleurs, nous avons rencontré de nombreuses difficultés associées à l'élaboration du modèle que nous avons tenté de mettre en place. Malgré les collaborations, les demandes de conseils et les nombreuses tentatives et mises au point, les résultats de cette première partie n'ont pas été assez convaincants pour poursuivre ce projet. La détermination est un facteur important et je pense que nous avons fait preuve d'une certaine dose d'acharnement. Ainsi, j'ose espérer que vous ne ressentirez pas de frustration à la lecture de ces premiers résultats. Un projet de thèse est soumis à des contraintes temporelles et de publication, qu'il nous fallait respecter.

La seconde partie est donc un projet qui a commencé au début de ma 3^{ème} année de thèse afin de respecter les contraintes précédemment mentionnées. De façon honnête, je me permettrai de vous dire que je ne souhaitais plus intervenir directement sur l'animal et ses mécanismes intrinsèques, comme cela a été le cas dans la première partie, mais aborder uniquement des méthodes observationnelles. Nous avons donc observé un comportement de plus en plus étudié dans un dispositif encore assez peu utilisé. La nouveauté de ce projet et le travail accompli lors d'une quatrième année de thèse, nous a permis de soumettre les résultats obtenus pour publication.

Avant-propos

En 1848 dans la région de Manchester, en Angleterre, le lépidoptériste R.L Edleston observe et capture un nouveau variant du phalène du bouleau : *Biston betularia carbonaria*. Cette forme de phalène est au cœur de la recherche de preuves supportant les propos de Darwin quant à la théorie de l'évolution par la sélection naturelle. Bien que moins célèbre que l'histoire des pinçons des Galápagos et certainement plus controversée, les principes qui en ressortent restent les mêmes.

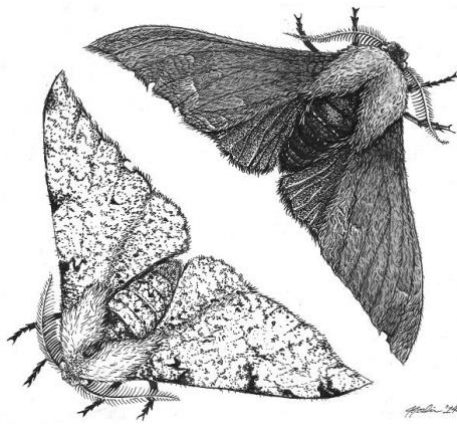


Illustration par Jennifer Joslin ©

Au début de l'ère industrielle, la population de *B. betularia* était principalement constituée d'individus clairs aux marques sombres dite *typica*, et se camouflant parfaitement sur les troncs clairs des bouleaux, leur habitat naturel. Progressivement, lors de la révolution industrielle, la pollution atmosphérique engendrée par la combustion du charbon, a conduit à l'assombrissement des troncs et des branches des arbres à proximité des villes. C'est à ce moment que les *B. betularia carbonaria*, jusque-là plutôt rares, sont devenus une forme plus fréquente voire prédominante dans ces régions. Ce changement a été largement attribué au phénomène de sélection naturelle : les *B. betularia carbonaria* pouvant se dissimuler au regard des prédateurs sur les troncs sombres, avaient plus de chances de survivre et de se reproduire, transmettant ainsi leur couleur à leur descendance. Au contraire, les *B. betularia typica*, dont la couleur contrastait avec celle des arbres, étaient davantage soumis à la prédation par les oiseaux. L'apparition d'un nouvel allèle conférant leur couleur sombre aux *B. betularia carbonaria* est due à une

mutation dans le gène *cortex* par insertion d'un élément transposable (Hof et al., 2016). La sélection naturelle ayant pour principe de favoriser les traits avantageux pour la survie et la reproduction dans un environnement donné, comme pour *B. betularia carbonaria*, ce sont donc les individus les plus chanceux et possédant ce nouvel allèle, qui se sont les mieux adaptés.

Sans revenir sur les critiques de l'expérience de B. Kettlewell, tentant de mettre en lumière la sélection naturelle en tant que principale force de ce changement, cette histoire me permet simplement d'illustrer comment l'adaptation d'un individu à son environnement est cruciale pour faire perdurer son espèce. Il s'agit, dans l'exemple des phalènes, du mécanisme bien connu de crypticité, mais plusieurs processus permettent à l'individu de s'adapter et de faire face aux multiples défis qu'il expérimente au cours de sa vie. Parmi ceux-ci, il existe la plasticité phénotypique (i.e. la capacité du génotype d'un individu à produire différents phénotypes lorsqu'il est exposé à différentes conditions environnementales (Pigliucci et al., 2006)) ou encore la communication sociale permettant d'organiser des groupes sociaux et coordonner les activités des individus pour maximiser leurs succès (e.g. « waggle dance » chez les abeilles). Les processus de mémoire et les capacités d'apprentissage font également partie des mécanismes d'adaptation des animaux. Ils permettent d'acquérir de nouvelles compétences et de s'adapter à des changements de l'environnement en fonction des expériences passées. Enfin, la survie étant indéniablement liée aux prédateurs qui entourent les individus, la variété des réponses comportementales innées face à une menace extérieure permet à l'animal d'adapter sa réaction selon cette menace, afin de préserver sa vie.

L'ensemble de ces mécanismes adaptatifs, qui s'allient les uns aux autres, montrent finalement la complexité et la diversité qui qualifient les êtres vivants.

Dans ce travail de thèse, j'aborderai les deux derniers aspects mentionnés ci-dessus : la mémoire et les comportement défensifs, exploré au travers de différentes échelles, allant du comportement de l'individu aux mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents.

PARTIE I – Exploration du rôle
du complexe répresseur
transcriptionnel SIN3A-HDACs
dans la consolidation de la
mémoire contextuelle

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

a. Généralités

Les systèmes de mémoire

En psychologie, la mémoire est communément définie comme la capacité à encoder, stocker et retrouver une information. Il s'agit d'un des processus contribuant à l'adaptation constante du comportement d'un individu à son environnement en lui permettant notamment d'ajuster ses décisions futures à partir de ses expériences passées (*pour revue, Biderman et al., 2020*). De façon générale, la mémoire est définie comme étant à court terme ou à long terme. En effet, les souvenirs ne perdurent pas tous, certains sont perdus rapidement après avoir été utilisés (i.e. ceux de la mémoire à court terme) tandis que d'autres deviennent pérennes (i.e. ceux de la mémoire à long terme).

La mémoire à court terme est caractérisée par une capacité de stockage limitée sur un temps restreint. Elle permet de retenir un nombre réduit d'informations de façon temporaire afin que ces dernières puissent être immédiatement utilisées ou transférées pour un stockage en mémoire à long terme. La mémoire de travail est une forme de mémoire à court terme qui permet d'utiliser rapidement ces informations par d'autres capacités cognitives (e.g. le calcul mental). Elle est fortement dépendante de l'attention de l'individu (*Awh et al., 2006*). Une fois utilisées, ces informations peuvent ne plus être pertinentes et sont oubliées afin de ne pas interférer avec des décisions futures (e.g. se souvenir de la localisation d'une place de parking n'est utile et pertinent que pour retrouver sa voiture à un certain moment, cette localisation pouvant changer les fois suivantes) (*Baddeley, 1992*).

La mémoire à long terme, quant à elle, est divisée en deux grandes catégories, la mémoire déclarative et la mémoire non-déclarative, chacune incluant différentes formes de mémoire associées à différentes régions cérébrales (*Squire, 2004*).

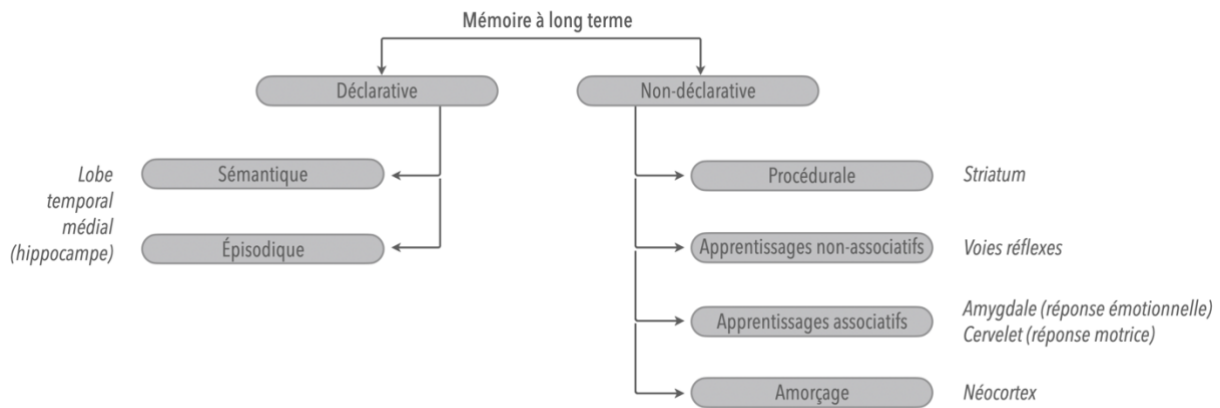


Figure 1. Classification des mémoires à long terme et structures cérébrales associées (d'après Squire 2004).

Le terme « déclarative » ou « explicite » fait référence à un rappel conscient des souvenirs. Autrement dit, pour solliciter ce type de mémoire, l'individu doit faire l'effort de se remémorer l'information qui pourra alors être explicitée, dite, racontée. Il peut aussi utiliser cette information, afin de la comparer à son environnement actuel et adapter son comportement en conséquence. Il s'agit principalement de la mémoire sémantique (i.e. les connaissances que nous avons sur notre environnement, les faits que nous apprenons) et de la mémoire épisodique (i.e. les événements que nous vivons, notre mémoire autobiographique). Cette dernière présente des caractéristiques spécifiques qui la différencient de la mémoire sémantique. En effet, chaque souvenir épisodique intègre une temporalité, un lieu et un événement précis. En d'autres termes, un souvenir épisodique répond aux questions « Quand ? » pour le moment où l'évènement s'est produit, « Où ? » pour la localisation spatiale de cet évènement et enfin « Quoi ? » pour le contenu de l'évènement en lui-même. Selon Tulving, la mémoire épisodique serait la faculté de nous rappeler des événements de notre vie, en nous projetant mentalement dans un état de conscience spécifique appelé « auto-noétique ». Il s'agirait donc d'un état de conscience nous permettant de revivre mentalement les événements de notre passé, avec une représentation du temps nous permettant de distinguer notre « nous » du passé, celui du présent et celui du futur (Tulving, 2002, 2001).

À l'inverse, le terme « non-déclarative » ou « implicite » ne demande pas de rappel conscient et fait référence à plusieurs types de mémoire. Par exemple, elle inclut la mémoire procédurale (e.g. faire du vélo, jouer d'un instrument de musique), l'amorçage ou encore les apprentissages associatifs et non-associatifs. Ces derniers correspondent principalement aux phénomènes d'habituation (i.e. une diminution de la réponse comportementale à un stimulus qui se répète)

et de sensibilisation (i.e. une augmentation de la réponse comportementale à des stimuli après un stimulus intense et/ou douloureux) où il s'agit d'apprendre les propriétés d'un seul stimulus. Les apprentissages associatifs, quant à eux, mettent en relation deux stimuli (conditionnement classique) ou un stimulus et un comportement (conditionnement opérant) permettant à l'individu de prédire les conséquences d'un stimulus ou d'un comportement, sur un autre stimulus. Enfin, l'amorçage désigne l'amélioration ou le changement dans l'identification, la production ou la classification d'un stimulus, suite à la rencontre antérieure avec ce même stimulus ou avec un autre stimulus qui lui est associé (*Tulving & Schacter, 1990*). Autrement dit, il s'agit de l'impact d'une exposition préalable à un stimulus, sur la capacité d'un individu à effectuer une tâche sur ce même stimulus (amorçage direct) ou sur un autre stimulus qui lui est associé de façon perceptuelle ou sémantique (amorçage indirect). De façon plus concrète chez l'humain, la présentation préalable de l'image d'un visage permet de retrouver plus facilement un cercle noir sur un écran, lorsqu'il est proche de l'image du visage précédemment présentée (*Salvato et al., 2017*).

Ces systèmes de mémoire ont été bien décrit chez l'humain suite à des études de cas cliniques impliquant des lésions au niveau de différentes structures cérébrales. Plusieurs catégories de mémoire sont aussi présentes chez l'animal et peuvent être évaluées par des tests comportementaux spécifiques. Bien entendu, certaines de ces mémoires sont communes à l'humain et à d'autres espèces animales.

Chez le rat, la mémoire de travail a été mise en évidence par Olton et Samuelson (*1976*) dans un labyrinthe radial à 8 bras (*Eight-Arm Radial Maze*). Ces auteurs se sont aperçus qu'un individu ne revisitait pas les bras qu'il avait déjà visités lors de la séance et, dans lesquels, il avait déjà collecté la récompense alimentaire (*Olton & Samuelson, 1976*). Aujourd'hui, plusieurs dispositifs comportementaux, autres que le labyrinthe radial à 8 bras, sont utilisés pour évaluer ce type de mémoire tels que : le labyrinthe en T (*T-maze*), la piscine de Morris (*Morris Water Maze*) ou encore les protocoles de « *delayed non-matching to sample* » (*pour revue Dudchenko, 2004*).

Les apprentissages non-associatifs ont été étudiés en premier lieu chez l'aplysie, un mollusque marin aussi appelé « lièvre de mer ». Le phénomène d'habituation a été observé par une expérience assez simple consistant à multiplier les stimuli tactiles au niveau du siphon de

l'aplysie. Ce stimulus engendre initialement un réflexe de retrait de la branchie et du siphon. Cependant, la répétition de ce stimulus conduit à l'interruption de ce réflexe de retrait. Autrement dit, lorsqu'un phénomène d'habituation est mis en place, le stimulus ne génère plus le comportement observé initialement (*Bailey & Chen, 1988; Castellucci & Kandel, 1974*). Ce phénomène est aussi observé chez le rongeur lors d'un test simple de champ ouvert (*Open Field*): l'animal qui est placé pour la première fois dans une arène, va exprimer un comportement exploratoire assez important qui aura tendance à s'estomper après plusieurs séances dans cette même arène. À l'inverse, la sensibilisation correspond à une réponse plus importante à un stimulus douloureux. Elle a aussi été mise en évidence chez l'aplysie en appliquant plusieurs stimuli douloureux au niveau de la queue et en observant une réponse exacerbée du retrait de la branchie (*Kandel & Schwartz, 1982*).

Les apprentissages associatifs ont été largement décrits dans le monde animal. Le plus célèbre d'entre eux étant probablement le conditionnement pavlovien mis au point par Ivan Pavlov dans les années 1890. Alors qu'il étudiait initialement la digestion chez les chiens, Pavlov a observé que ces derniers salivaient non seulement à la présentation de nourriture, mais aussi suite à la présence de certaines personnes. Formulant l'hypothèse qu'il y avait un lien entre les stimuli et la réponse de salivation des chiens, Pavlov a mis en place plusieurs expériences afin d'associer un stimulus neutre (e.g. le son d'une cloche), à la présentation de nourriture. Après plusieurs répétitions du son suivi de la présentation de la nourriture, les chiens ont montré une réponse de salivation induite seulement par le son de la cloche. Les principes du conditionnement classique découlent de cette expérience : un stimulus neutre (stimulus conditionné) (e.g. un son, un expérimentateur en particulier) n'induisant initialement aucune réponse comportementale est associé à un stimulus qui engendre une réponse (stimulus inconditionné) (e.g. de la nourriture dans le cas du chien de Pavlov). Au fur et à mesure que la co-occurrence de ces deux stimuli est répétée, l'individu apprend leur association et le stimulus conditionné fini par engendrer la réponse attendue suite au stimulus inconditionné.

Ce conditionnement a été adapté et utilisé chez différents modèles animaux comme l'aplysie, la drosophile ou encore *C. Elegans* (*pour revue Pribadi & Chalasani, 2022*) et consiste principalement à associer un choc électrique à un stimulus visuel, odorant ou sonore. Chez les rongeurs, nous distinguons le conditionnement de peur au contexte (*contextual fear conditioning*) où un contexte (i.e. un environnement aux caractéristiques nouvelles terme

d'odeurs, de textures, de luminosité, de forme) est associé à un choc électrique au niveau des pattes, du conditionnement de peur indicé (*cued fear conditioning*) où un élément pertinent du contexte, un son par exemple est associé au choc électrique, et peut être considéré comme un élément prédictif de l'évènement aversif.

En terme de mémoire déclarative, la mémoire épisodique est difficile à évaluer chez les animaux non-verbaux. En effet, elle présente plusieurs aspects (temporel et spatial) qu'il convient d'évaluer par l'observation du comportement de l'animal, au sein d'un même test afin de confirmer qu'il s'agit de mémoire épisodique. Une première évidence de cette mémoire chez les animaux a été rapportée chez une espèce de geai par Clayton et Dickinson en 1998. Ils ont observé que ces oiseaux sont capables de se souvenir de l'endroit et du moment où ils ont caché de leur nourriture (*Clayton & Dickinson, 1998*). Même si plusieurs études tendent à mettre en place des tests comportementaux chez les rongeurs permettant la mesure de ces aspects spatio-temporels (*Dere et al., 2005; Kart-Teke et al., 2006 ; pour revue Huston & Chao, 2023*), nous parlerons ici de « mémoire de type épisodique » (*episodic-like memory*). Effectivement, différents protocoles permettent de mettre en évidence certaines caractéristiques de la mémoire épisodique, sans pour autant pouvoir démontrer que l'animal se souvient de chaque composante. Par exemple, le test de localisation ou de reconnaissance d'objet montre l'aspect temporel d'une mémoire en se basant sur la néophilie des rongeurs pour un objet déplacé par rapport à une précédente configuration, ou pour un nouvel objet. Le conditionnement de peur montre davantage l'aspect contextuel, le lieu où s'est produit l'évènement aversif. Cependant, il s'agit d'un test en un seul essai, engendrant un souvenir marquant lié à un élément contextuel, ce qui ressemble à une mémoire de type épisodique et que nous qualifierons de mémoire contextuelle. Les conditionnements de peur au contexte et au son sont les tests de mémoire principalement utilisés dans ces travaux de thèse. Les mémoires générées sont dépendantes de l'amygdale mais seule la mémoire contextuelle résultant du conditionnement de peur au contexte dépend également de l'hippocampe (*Phillips & LeDoux, 1992*).

L'hippocampe et ses connexions

L'hippocampe est une structure cérébrale faisant partie du système limbique, le réseau cérébral majeur pour la mémoire, les émotions et l'élaboration des comportements. Nommé

« hippocampe » d'après sa forme ressemblant à celle de l'animal marin, il se compose de deux « feuillets » imbriqués l'un dans l'autre. Ces derniers correspondent au gyrus denté (DG) et à la Corne d'Ammon (CA), chacun présentant plusieurs couches ou *strata*.

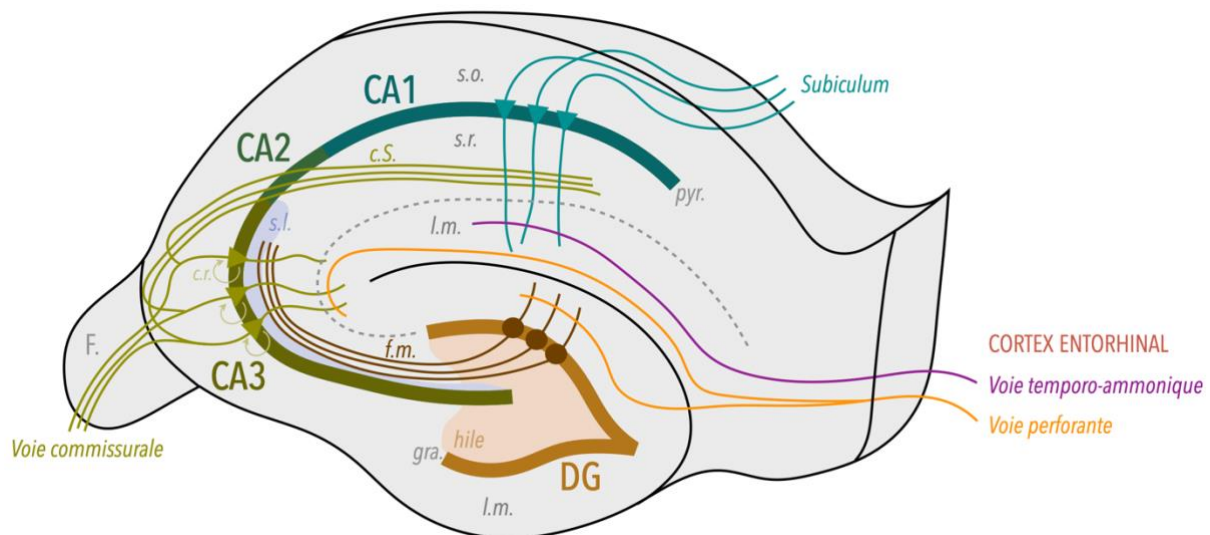


Figure 2. Représentation schématique de l'hippocampe. *Stratum oriens*, s.o. ; *stratum radiatum*, s.r. ; couche pyramidale, pyr. ; collatérales de Schaffer, c.S. ; *stratum lucidum*, s.l. ; *stratum lacunosum-moleculare*, l.m. ; collatérales récurrentes, c.r. ; fimbria, F. ; fibres moussues, f.m. ; couche granulaire, gra. ; Corne d'Ammon 1/2/3, CA1/2/3 ; gyrus denté, DG.

En effet, le DG présente une couche de neurones granulaires formant deux lames. Les dendrites apicales de ces neurones sont présentes au niveau de la *stratum lacunosum-moleculare* tandis que les dendrites basales/axones forment les fibres moussues en traversant le hile (*hilus*).

La CA est, quant à elle, divisée en plusieurs régions : la région CA3 recevant les projections directes du DG, la région CA2 et la région CA1 se succédant. La CA se compose d'une couche de neurones pyramidaux avec des dendrites apicales au niveau de la *stratum lucidum* (CA3 seulement), *stratum radiatum* et *stratum lacunosum-moleculare*, tandis que leurs dendrites basales/axones s'étendent au niveau de la *stratum oriens*.

L'hippocampe reçoit des afférences corticales depuis le cortex entorhinal qui projette, par la voie perforante, aux dendrites apicales des neurones granulaires du DG mais aussi aux neurones pyramidaux de la région CA3. Les afférences en provenance du cortex entorhinal forment une seconde voie, la voie temporo-ammonique projetant au niveau de la région CA1. Les cellules granulaires du DG projettent les fibres moussues aux neurones pyramidaux de la région CA3 qui elle-même est connectée aux neurones pyramidaux de la région CA1 par les

collatérales de Schaffer (au niveau des *stratum radiatum* et *oriens*). Les neurones pyramidaux de la région CA3 forment aussi des connexions entre eux par les collatérales récurrentes, et projettent également au niveau des régions CA3 et CA1 de l'hippocampe controlatéral par la voie commissurale. La région CA1 renvoie finalement les efférences au subiculum qui projette dans les couches profondes du cortex entorhinal, lui-même renvoyant des connexions aux aires corticales.

En plus d'être connecté à diverses aires corticales, l'hippocampe est lié à d'autres structures notamment par le fornix au thalamus, à l'hypothalamus avec les corps mamillaires et à l'aire septale ainsi qu'à l'amygdale (*Bird & Burgess, 2008*).

Dynamique de la mémoire

L'ensemble des mémoires décrites précédemment sont des mémoires à long terme, voire à très long terme. Leur mise en place implique plusieurs phases successives : l'acquisition, la consolidation et le rappel. En effet, un individu commence par apprendre une nouvelle information lors de l'acquisition que l'on pourra aussi nommer apprentissage, il s'agit de l'expérience initiale de perception de l'information. L'information est alors préservée à court terme durant quelques heures mais reste instable, labile et sensible aux interférences. La phase de consolidation permet la stabilisation de cette nouvelle information et crée une mémoire à long terme qui perdurera pendant plusieurs jours ou semaines (*Lechner et al., 1999; McGaugh, 2000; Müller & Pilzecker, 1900*). L'information pourra être retrouvée lors du rappel qui, pour des mémoires déclaratives, est réalisé de manière consciente, afin d'adapter le comportement de l'individu à son environnement. Le rappel a pour objectif principal d'utiliser l'information précédemment mémorisée. Il va permettre une réactivation du souvenir qui pourra alors avoir différents effets : elle peut engendrer un renforcement du souvenir ou générer une période d'instabilité lors de laquelle des mises à jour de l'information mémorisée pourront être réalisées (*Nadel & Hardt, 2011*).



Figure 3. Dynamique des phases de la mémoire à long terme.

Généralement, chez la souris, la mémoire à long terme est testée 24 heures après l'apprentissage, tandis que la mémoire à très long terme perdure au moins jusqu'à 28 jours après l'acquisition.

Notion d'engramme mnésique

Au début des années 1900, Richard Semon introduit le terme d'« engramme » pour parler des « [...] modifications durables, bien que principalement latentes, de la substance irritable produites par un stimulus [...] » (« [...] *the enduring though primarily latent modification in the irritable substance produced by a stimulus [...]* », Semon, 1921). Cette théorie de l'engramme est construite par Semon selon deux lois : la loi de l'engraphie faisant référence au stockage de la mémoire et la loi de l'ecphorie faisant référence au rappel de cette dernière. Un engramme correspondrait donc aux « changements physiques et/ou chimiques durables induits par un apprentissage et qui sous-tendent les associations de mémoire nouvellement formées » (Tonegawa et al., 2015a). Ainsi, l'engramme serait constitué de cellules, à savoir des neurones qui ont été activés par l'apprentissage, qui ont subi des changements cellulaires suite à cet apprentissage et dont la réactivation par le stimulus (ou une partie du stimulus) délivré lors de l'apprentissage permet le rappel de la mémoire.

L'existence de ces engrammes a depuis été mise en évidence par différentes expériences observationnelles au niveau de l'hippocampe (Denny et al., 2014; Kitamura et al., 2017; Tayler et al., 2013; Trouche et al., 2013), de l'amygdale (Kitamura et al., 2017; Reijmers et al., 2007; Tayler et al., 2013; Trouche et al., 2013) et du cortex (DeNardo et al., 2019; Trouche et al., 2013) mais aussi par des expériences de gain (Abdou et al., 2018; DeNardo et al., 2019; Lacagnina et al., 2019) ou de perte de fonction (Denny et al., 2014; Lacagnina et al., 2019; Tanaka et al., 2014) ainsi que par l'implantation de mémoires artificielles (i.e. la mémoire d'expériences non vécues par l'animal) (Vetere et al., 2019) dans le cerveau des animaux. Encore aujourd'hui, d'autres travaux tentent d'identifier les changements cellulaires et moléculaires se produisant dans ces cellules de l'engramme, et qui caractérisent certains aspects de la phase de consolidation de la mémoire (Gulmez Karaca et al., 2020; Rao-Ruiz et al., 2019; Ryan et al., 2015; Tomé et al., 2024).

b. Consolidation de la mémoire et transcription génique

Le terme de consolidation a été proposé pour la première fois par Müller et Pilzecker en 1900 suite à leur étude montrant que chez l'humain, la mémorisation d'une information était perturbée par l'apprentissage d'une seconde information survenant peu de temps après l'apprentissage de la première. Ainsi, le processus de consolidation permettrait à une mémoire de résister aux interférences et d'être stabilisée dans le temps.

La consolidation de la mémoire est communément décrite sous deux formes : la consolidation synaptique et la consolidation systémique. La première, relativement rapide survient immédiatement après l'apprentissage, pour stabiliser la mémoire via des modifications au sein des cellules recrutées et la faire perdurer sur le long terme. La seconde, plus lente et se produisant sur une durée plus longue, permet d'ancrer l'information à plus long terme - nous parlerons alors de mémoire à très long terme - par une réorganisation des circuits neuronaux impliquant plusieurs régions du cerveau.

Consolidation synaptique ou cellulaire

La consolidation synaptique se produit localement suite à l'activation de neurones par l'intégration d'une information qui engendre toute une cascade de signaux intracellulaires conduisant à la plasticité synaptique. La plasticité synaptique correspond à la modification de la force ou de l'efficacité de la transmission synaptique au niveau des synapses déjà existantes entre les neurones. Ce terme inclut aussi la formation de nouvelles synapses, le retrait de certaines ainsi que les processus de neurogenèse (i.e. la génération de nouveaux neurones au sein des zones neurogéniques). Plusieurs types de plasticité synaptique ont été décrits (*pour revue, Citri & Malenka, 2008*) et parmi eux, la potentialisation à long terme (Long Term Potentiation – LTP) et la dépression à long terme (Long Term Depression – LTD) ont un rôle très important dans l'apprentissage et la mémoire (*pour revue, Lynch, 2004*). La LTP correspond à une augmentation stable de la transmission synaptique induite par l'activité simultanée des deux neurones, pré- et post-synaptique (*Nowak et al., 1984*). La cascade moléculaire permettant la LTP a été bien décrite (*Lynch, 2004*) au niveau des synapses glutamatergiques.

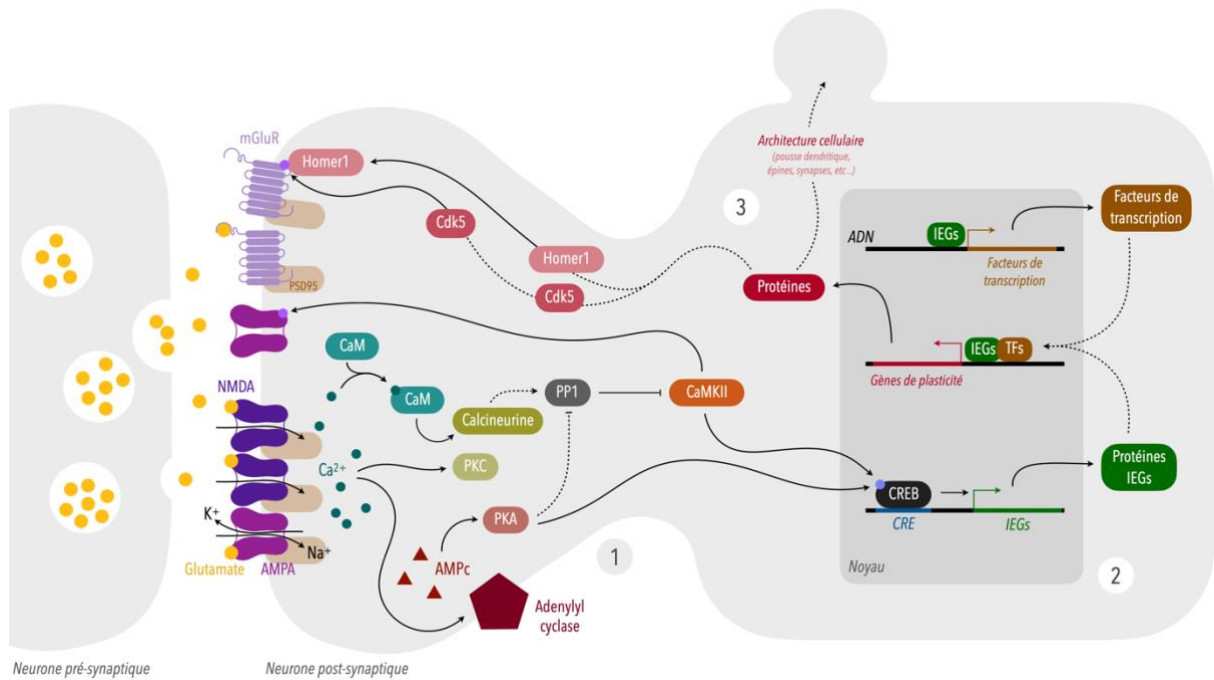


Figure 4. Cascade moléculaire de la plasticité synaptique. (1) L'apprentissage induit une cascade moléculaire impliquant des kinases et (2) générant l'expression de gènes immédiats précoces (IEGs) qui a leur tour vont permettre l'expression d'autres gènes notamment des facteurs de transcription, mais aussi des gènes de plasticité engendrant la production de (3) protéines permettant d'augmenter la transmission synaptique (LTP) mais aussi de modifier l'architecture cellulaire par la création de nouvelles épines et synapses mais aussi la pousse des dendrites. L'ensemble de ces processus permet la plasticité synaptique. AMPA, récepteur ionotrope au glutamate (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) ; NMDA, récepteur ionotrope au glutamate (N-méthyl-D-aspartate) ; mGluR, récepteur métabotrope au glutamate ; PSD95, postsynaptic density protein 95 ; CaM, calmoduline ; PKC, protéine kinase C ; PKA, protéine kinase A ; PP1, protéine phosphatase 1 ; CaMKII, protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante ; CRE, cAMP response element ; CREB, CRE binding protein ; IEGs, immediate early genes ; TFs, facteurs de transcription ; Cdk5, kinase dépendante des cyclines 5 ; Homer1, protéine échafaudage.

Le glutamate, neurotransmetteur excitateur principal du cerveau, est libéré par le neurone pré-synaptique, dans la fente synaptique avant de se lier à deux types de récepteur ionotrope : les AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate) et les NMDA (N-méthyl-D-aspartate). Ces récepteurs membranaires constituent une partie de la densité post-synaptique (Post-Synaptic Density – PSD) qui correspond à un réseau dense de protéines créant un complexe macromoléculaire (*pour revue, Okabe, 2007*). La PSD est composée de protéines ayant diverses fonctions telles que des protéines d'adhésion, des protéines échafaudages (e.g. PSD95), mais aussi des kinases (e.g. CaMKII) et des phosphatases. Elle concentre notamment des récepteurs (e.g. mGluR) et des canaux (e.g. AMPA, NMDA) à une localisation préférentielle pour la transmission synaptique.

La fixation du glutamate sur les récepteur AMPA induit une entrée d'ions Na^+ permettant une dépolarisation de la membrane. Cette dernière est essentielle à l'ouverture du canal du récepteur NMDA. En effet, celui-ci, en plus de fixer le glutamate, possède aussi un ion Mg^{2+} qui limite les échanges ioniques entre le milieu extracellulaire et intracellulaire (*Ruppersberg et al., 1994; pour revue, Cull-Candy et al., 2001*). Cet ion est repoussé par force électrostatique lorsque le potentiel de membrane est positif, donc lorsque le récepteur AMPA engendre sa dépolarisation. Ainsi, des ions Ca^{2+} et Na^+ peuvent entrer par le récepteur NMDA (*Ruppersberg et al., 1994; pour revue, Cull-Candy et al., 2001*). Le calcium entré peut se coupler à la calmoduline (CaM) pour former le complexe Ca^{2+} /calmoduline et ainsi activer des protéines kinases dont la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CaMKII) qui phosphoryle notamment certaines sous-unités des récepteurs AMPA augmentant ainsi leur conductance et leur adressage à la synapse (*Lisman et al., 2012*). La CaMKII peut aussi activer la calcineurine (*Stemmer & Klee, 1994*) et son activité est notamment régulée par la protéine phosphatase 1 (PP1) (*Strack et al., 1997*). L'influx de calcium active aussi la protéine kinase C (PKC) (*Huang, 1989*) et va permettre l'activation de l'adenylyl cyclase produisant de l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) qui engendrera l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Les kinases, notamment par la phosphorylation de CREB (cAMP Response Element binding protein), permettent l'expression de gènes immédiats précoces (Immediate Early Genes, IEGs) (e.g. *Arc, Zif268, c-Fos*) qui à leur tour déclenchent la synthèse de facteurs de transcription et de protéines impliquées dans la transmission synaptique et l'architecture cellulaire, à partir de gènes regroupés sous le nom de « gènes de plasticité » (*pour revue, Leslie & Nedivi, 2011*). Les protéines produites à partir de ces gènes sont notamment responsables des modifications morphologiques (e.g. augmentation du nombre d'épines dendritiques), mais aussi moléculaires (e.g. régulation de la localisation des récepteurs aux neurotransmetteurs au niveau post-synaptique). En effet, les protéines Homer1 et Cdk5 agissent dans une même voie moléculaire pour réguler le trafic (*trafficking*) des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs) et ainsi la plasticité synaptique (*Orlando et al., 2009*). Le blocage des étapes de cette cascade moléculaire, par des outils génétiques ou pharmacologiques, induit des déficits de plasticité structurelle, d'apprentissage et de mémoire (*Lynch, 2004*).

À l'opposé de la LTP, la LTD engendre une réduction de la transmission synaptique entre deux neurones. Elle implique notamment l'activation de protéines phosphatases (e.g. PP1) qui vont réguler l'activité des kinases impliquées dans la LTP et déphosphoryler les récepteurs au glutamate. Une déphosphorylation de CREB est aussi engendrée conduisant à une modification d'expression des gènes et de la synthèse de protéines (*pour revue, Collingridge et al., 2010*).

La consolidation synaptique passe donc par deux importants processus : l'expression de certains gènes par la synthèse d'ARN et la synthèse de certaines protéines. L'inhibition de l'un ou l'autre engendre une perturbation de la mémoire à long terme. En effet, inhiber l'activité des ARN-polymérase, les enzymes impliquées dans la transcription, immédiatement après l'apprentissage par de l'actinomycine-D ou de l' α -amanitine engendre des déficits de mémoire à long terme chez le poisson rouge (*Agranoff et al., 1967*), la souris (*Squire & Barondes, 1970; Thut & Lindell, 1973*) ou encore le rat (*Igaz et al., 2002*). De la même manière, une inhibition pharmacologique de la synthèse protéique par des injections d'anisomycine ou de cycloheximide induit une altération de la mémoire à long terme chez la souris (*Bourtchouladze et al., 1998; Squire & Barondes, 1973*) et le rat (*Quevedo et al., 1999; Schafe & LeDoux, 2000*). Dans une étude plus récente, Ryan et collaborateurs ont également montré que cette synthèse de protéines était nécessaire à la plasticité synaptique induite par un apprentissage au niveau des cellules de l'engramme et que l'inhibition de cette synthèse rendait les cellules de l'engramme « indistinguables » de celles ne constituant pas l'engramme (*Ryan et al., 2015*). Autrement dit, en inhibant la synthèse protéique, les cellules de l'engramme ne subissent pas les phénomènes de plasticité synaptique induits par l'apprentissage (e.g. absence d'augmentation de la densité des épines dendritiques).

Par ailleurs, plusieurs « vagues » de transcription et de synthèse protéique sont nécessaires à la consolidation de la mémoire. La première survient autour de l'apprentissage et la seconde entre 3 et 6h après l'apprentissage (*Bourtchouladze et al., 1998; Igaz et al., 2002; Quevedo et al., 1999*). La transcription génique serait nécessaire jusqu'à 12h (*Bekinschtein et al., 2007*) et même 24h après l'apprentissage, mais serait finie à 48h (*Taubenfeld et al., 2001*).

Ces deux processus de synthèse font l'objet de régulations et celle de l'expression des gènes implique notamment des mécanismes épigénétiques.

Consolidation systémique

La consolidation systémique est décrite comme le processus par lequel la mémoire est réorganisée au cours du temps au sein d'un réseau de structures cérébrales. Les informations principalement encodées dans l'hippocampe, seraient progressivement transférées au cortex lors de co-activations de ces structures (dialogue hippocampo-cortical) (*pour revue, Frankland & Bontempi, 2005*). L'hippocampe deviendrait alors moins important pour le stockage et le rappel de ces informations, qui seraient ainsi établis de façon plus permanente dans des régions distribuées du néocortex.

À l'origine, le concept de consolidation systémique provient d'études neuropsychologiques observant que les souvenirs les plus récents étaient plus susceptibles d'être perdus suite à une lésion cérébrale que les souvenirs plus lointains dans le temps. Ces observations forment la base de la loi de l'amnésie rétrograde par Ribot (1882) qui affirme qu'avec le temps, les souvenirs deviennent résistants au déclin, qu'ils ont besoin de temps pour devenir stables. L'amnésie rétrograde a d'abord été observée chez des patients présentant des lésions des lobes temporaux-médians (incluant l'hippocampe) associées à des amnésies antérogrades spécifiques de la mémoire épisodique et une forme d'amnésie rétrograde restreinte aux souvenirs récents épargnant les souvenirs plus anciens (*Milner & Penfield, 1955; Scoville & Milner, 1957*). D'autres investigations chez l'humain (*Beatty et al., 1987; Salmon et al., 1988*) et des travaux expérimentaux chez le primate (*Zola-Morgan et al., 1989a, 1989b*) ont montré que des lésions limitées à l'hippocampe étaient suffisantes pour induire une amnésie. Ces études apportent l'idée que cette structure est essentielle pour la formation et le rappel précoce de la mémoire épisodique mais qu'il existe une limite temporelle dans la nécessité de l'hippocampe lors du rappel de ces mémoires.

La consolidation systémique a toujours été un sujet controversé avec plusieurs théories attribuant à l'hippocampe différents rôles dans la mémoire à très long terme. Les plus populaires de ces théories semblent s'accorder sur l'idée que l'encodage aurait lieu au niveau hippocampique. Il s'agit de la théorie de l'indexage (*Teyler & DiScenna, 1986*) qui affirme que l'hippocampe forme un index de l'activité corticale survenant lors du déroulé de l'évènement à mémoriser. Les caractéristiques, notamment sensorielles, de cet évènement sont stockées dans des réseaux corticaux distribués qui ont été activés lors de

l'évènement. Selon ce concept, la trace de mémoire dans l'hippocampe est une représentation des patrons d'activité du néocortex qui encode le contenu et les caractéristiques de l'évènement. Ainsi, le rappel de cette mémoire implique la réactivation des cellules hippocampiques qui projettent au néocortex, pour activer le patron néocortical représentant l'évènement dans son entièreté. Cependant, les théories diffèrent sur le fait que l'hippocampe reste requis ou non pour réactiver les réseaux corticaux et permettre le rappel de la mémoire à très long terme.



Figure 5. Modèle standard de la consolidation systémique (d'après Frankland & Bontempi 2005).

Une de ces théories propose que les connexions entre les régions corticales dans lesquelles les caractéristiques du souvenir sont censées résider, sont renforcées au cours du temps, diminuant la contribution de l'hippocampe dans l'initiation du rappel du souvenir. Il s'agit du modèle standard de la consolidation (Figure 5) (Alvarez & Squire, 1994; McClelland et al., 1995; Squire, 1986; Squire & Alvarez, 1995).

Cependant des études chez l'humain et l'animal ont pointé des incohérences dans ce modèle, dans certains cas de perte ou de conservation de la mémoire à très long terme, suite aux lésions des lobes temporo-médians et de l'hippocampe. Ces conflits ont donc donné lieu à une explication alternative : la théorie des traces multiples (Moscovitch et al., 2006).

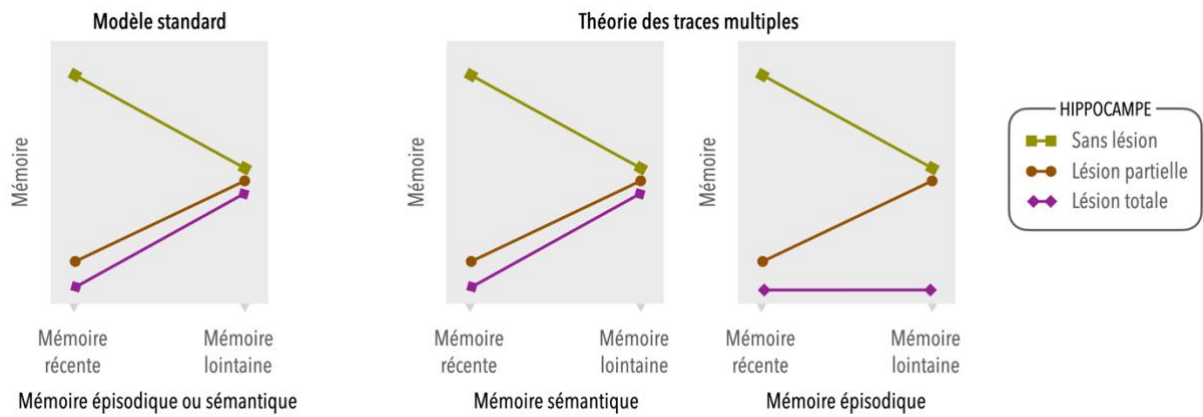


Figure 6. Modèle standard et théorie des traces multiples de la consolidation systémique (d'après Frankland & Bontempi 2005).

Contrairement au modèle standard de la consolidation, la théorie des traces multiples propose que l'hippocampe est toujours requis pour le rappel d'une mémoire épisodique qui requiert l'hippocampe lors de sa formation (Figure 6). Selon cette théorie, chaque réactivation de la mémoire implique la ré-expérience de l'évènement originel et crée des traces additionnelles dans l'hippocampe. Ainsi, plus il y a de traces d'une mémoire dans l'hippocampe, plus la probabilité pour que l'une de ces traces persiste suite à une perturbation de l'hippocampe, est grande. Ces traces multiples contiennent l'information contextuelle d'un épisode et favorisent la récupération néocorticale des caractéristiques d'une manière indépendante du contexte. Selon cette théorie, les informations sémantiques, initialement acquises dans le contexte d'un épisode particulier sont séparées et stockées indépendamment de ce contexte permettant ainsi leur rappel sans l'activation de l'hippocampe. En revanche, les informations riches contextuellement ou autobiographiques, requièrent toujours l'hippocampe pour leur rappel.

Cette théorie des traces multiples a plus tard évolué pour devenir la théorie ou l'hypothèse de la transformation (Winocur & Moscovitch, 2011) qui propose que la mémoire corticale et la mémoire hippocampique contextuelle interagissent de façon dynamique selon la force de la mémoire et les circonstances du rappel. En d'autres termes, les traces mnésiques pourraient changer lors de la consolidation. La mémoire épisodique serait ainsi transformée en mémoire sémantique en perdant ses caractéristiques contextuelles lors de sa consolidation au niveau cortical et du désengagement de l'hippocampe.

Le concept de consolidation systémique a été étudié au niveau de l'engramme notamment par Kitamura et collaborateurs en 2017. Les auteurs ont mis en évidence la formation d'un engramme immature au cortex préfrontal par les projections et l'activité du réseau hippocampe-cortex entorhinal et de l'amygdale lors du conditionnement de peur. Cet engramme cortical maturerait ensuite grâce aux afférences de l'engramme hippocampique, pour finalement soutenir le rappel de la mémoire à très long terme tandis que l'engramme hippocampique deviendrait silencieux (Kitamura et al., 2017).

c. Régulations épigénétiques de la transcription : rôle des complexes activateurs et répresseurs transcriptionnels dans la mémoire

La consolidation d'une mémoire à long terme nécessite l'expression de gènes et la synthèse de protéines conduisant à des changements moléculaires, structuraux et fonctionnels des synapses, et ainsi à la plasticité synaptique. Ces deux processus reposent sur la régulation fine de l'expression génique, notamment grâce aux mécanismes épigénétiques.

Le terme épigénétique provient du grec *epi* (έπι) signifiant « sur, au-dessus » et de *genêtikós* (γενητικός) « qui engendre, produit ». Il fait référence à des modifications survenant sur la molécule d'ADN, sur sa structure, sans modifier la séquence en elle-même. Les mécanismes épigénétiques permettent de réguler l'expression des gènes et engendrent un possible changement phénotypique sans altérer directement le matériel génétique.

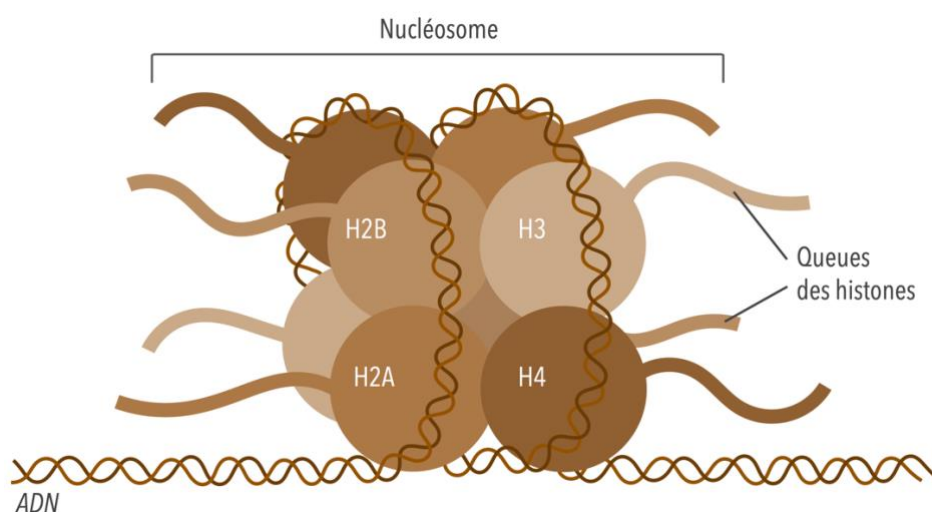


Figure 7. Représentation schématique d'un nucléosome.

La molécule d'ADN est organisée dans le noyau sous forme de chromatine. La chromatine est l'association de l'ADN à un core protéique composé d'histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4). Une boucle d'ADN composée de 147 paires de bases s'enroule autour d'un octamère d'histones composé d'une paire de chaque histone H2A, H2B, H3 et H4 : il s'agit d'une unité nommée nucléosome (Figure 7) (Cutter & Hayes, 2015). L'histone H1 quant à lui, est présent en un seul exemplaire et permet de stabiliser cette structure (Cutter & Hayes, 2015). Ainsi, plusieurs nucléosomes composent la chromatine et celle-ci existe sous deux formes dans le noyau selon son état de condensation (Babu & Verma, 1987). L'euchromatine est l'état décondensé, permettant une activité transcriptionnelle. L'hétérochromatine est la forme condensée du matériel génétique, le rendant inaccessible pour la machinerie de transcription. Cet état de condensation est influencé par les modifications épigénétiques appliquées sur l'ADN et les histones, mais aussi directement au niveau post-transcriptionnel par l'intermédiaire des microARN (miRNA).

miRNA (microARN)

Les miRNA ou miR sont une classe de petits ARN non-codants régulateurs qui permettent la répression de l'expression des gènes en ciblant spécifiquement la séquence des ARNm produits par transcription (pour revue, Krol et al., 2010). Les miRNA sont présents en grande quantité dans le cerveau des souris, en particulier dans l'hippocampe (Bak et al., 2008) et plusieurs études ont montré l'importance de ces petits ARN dans la régulation des processus mnésiques. En effet, le miR-34c est présent de façon abondante dans l'hippocampe (Zovoilis et al., 2011) et sa surexpression est associée à une diminution de la densité des épines dendritiques ainsi qu'à des déficits d'apprentissage dans un test en piscine de Morris (Kao et al., 2018). De plus, le miR-134 régule l'expression de CREB et sa surexpression au niveau de la région CA1 engendre des faibles performances mnésiques suite à un conditionnement de peur au contexte (Gao et al., 2010). Enfin, CREB permet aussi d'exprimer les miR-132/212, dont l'inhibition par ARN interférant engendre des déficits de mémoire dans le test de reconnaissance d'objet, le labyrinthe de Barnes ainsi qu'en conditionnement de peur au contexte et au son (Hansen et al., 2016; Wang et al., 2013).

Méthylations de l'ADN

L'ADN peut être méthylé au niveau des cytosines des îlots CpG (cytosine-guanine) suite à l'ajout d'un groupement méthyle par la DNA méthyltransférase (DNMT) (*pour revue, Moore et al., 2013*). Ces modifications sont réversibles et les méthylations peuvent être retirées par l'action des enzymes Tet (Ten-eleven-translocation) (Figure 8) (*pour revue, Moore et al., 2013*). De façon générale, la méthylation de l'ADN engendre une répression d'expression des gènes en empêchant la machinerie transcriptionnelle de se lier mais elle peut aussi générer une compaction de la chromatine en permettant le recrutement de protéines pouvant modifier les histones et présentant un domaine de liaison au groupement méthyle d'îlots CpG (methyl CpG-binding domain protein – MBD protein). Les protéines MBD, telles que MeCP2, recrutent des co-répresseurs transcriptionnels comme les HDACs (*voir plus loin*) qui augmentent la charge positive du nucléosome conduisant à une plus grande condensation de la chromatine et donc à la répression transcriptionnelle des gènes.

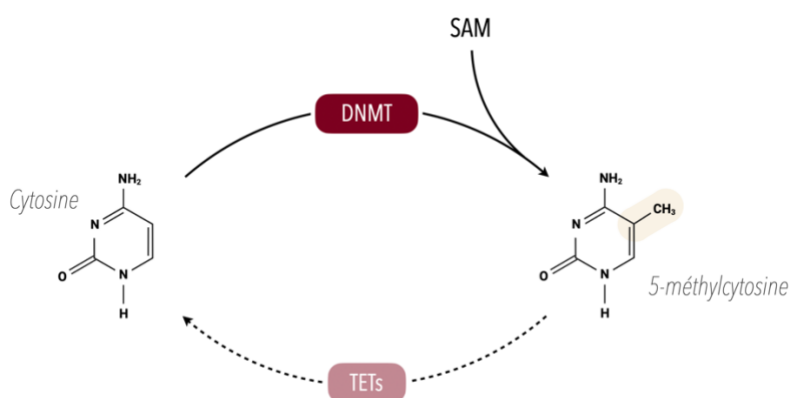


Figure 8. Méthylation des cytosines au niveau de l'ADN. DNMT, DNA méthyltransférase ; TET, ten-eleven translocation ; SAM, S-adenosyl methionine

Les méthylations de l'ADN ont été étudiées pour leur contribution à la formation de la mémoire. En effet, il a été montré qu'un conditionnement de peur au contexte induit une méthylation rapide du gène de la protéine PP1, un gène suppresseur de mémoire. Cette méthylation induit une répression la transcription de *PP1* ainsi que la déméthylation de gènes de plasticité (e.g. reelin, BDNF - brain derived neurotrophic factor) conduisant à la synthèse d'ARN de ces derniers dans l'hippocampe (*Lubin et al., 2008; Miller & Sweatt, 2007*). De plus, ce conditionnement induit une augmentation d'expression du gène de la DNMT et une inhibition de cette enzyme bloque la formation de la mémoire (*Miller & Sweatt, 2007*). De la même façon,

les souris mutantes pour la DNMT au niveau des neurones excitateurs du cerveau antérieur présentent une plasticité à long terme anormale au niveau de l'hippocampe ainsi que des déficits d'apprentissage et de mémoire (Feng et al., 2010). Une inhibition de la DNMT diminue la méthylation des promoteurs de gènes de plasticité (reelin, BDNF) sur des coupes d'hippocampe (Levenson et al., 2006). Le rôle de la DNMT3A2, ajoutant les méthylations *de novo*, dans les cellules de l'engramme a été étudié au niveau du DG après un conditionnement de peur (Gulmez Karaca et al., 2020). Une surexpression de cette enzyme améliore la mémoire suite au conditionnement et est associée à des modifications de la méthylation de l'ADN au niveau de gènes impliqués dans la plasticité synaptique (Gulmez Karaca et al., 2020). Enfin, il a été montré que des souris mutantes pour l'enzyme Tet1 présentent des déficits d'extinction de la mémoire ainsi qu'une expression génique altérée (Rudenko et al., 2013). Les méthylations de l'ADN sont donc dynamiquement régulées au cours des processus de mémoire (Day & Sweatt, 2010).

Modifications des histones

Les histones non-modifiées portent des charges positives promouvant une forte interaction avec la molécule d'ADN chargée négativement et conduisant à un état condensé de la chromatine. Les modifications apportées sur les histones sont principalement des phosphorylations, des méthylations et/ou des acétylations (Figure 9). Elles peuvent modifier la charge des histones et induire un changement dans l'interaction de ces derniers avec l'ADN. L'ensemble des modifications forme un « code histones », qui leur permet d'être intégrées ensemble pour contrôler l'expression des gènes de façon combinée en remodelant la structure de la chromatine et/ou en recrutant des complexes protéiques (Jenuwein & Allis, 2001).

Ces modifications sont largement impliquées dans les processus de mémoire. En effet, la PP1 interagit avec les enzymes modifiant les histones (HDAC et HDM, voir plus loin) et une inhibition de PP1 induit des modifications d'histones incluant des phosphorylations, des acétylations et des méthylations au niveau de promoteurs de gènes importants dans la formation de la mémoire tels que CREB et NF- κ B. Ces modifications d'histones entraînent des changements de transcription génique et sont associées à une amélioration de la mémoire à long terme (Koshibu et al., 2009). Par ailleurs, suite à un apprentissage, les modifications des histones surviennent de façon rapide et transitoire dans l'hippocampe (Gräff et al., 2012). Elles sont aussi induites au niveau cortical mais avec un certain délai et persistent dans le temps. Augmenter ces

modifications à l'aide d'outils transgéniques ou par un apprentissage intense, induit une facilitation de la consolidation de la mémoire. À l'inverse, leur blocage pharmacologique engendre un déficit de mémoire (Gräff *et al.*, 2012). Enfin, plusieurs de ces modifications sont altérées dans des maladies neurologiques telles que le syndrome de Rubinstein-Taybi, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore les troubles du spectre autistique (De Jager *et al.*, 2014; Ladd-Acosta *et al.*, 2014; Lopez-Atalaya *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2016).

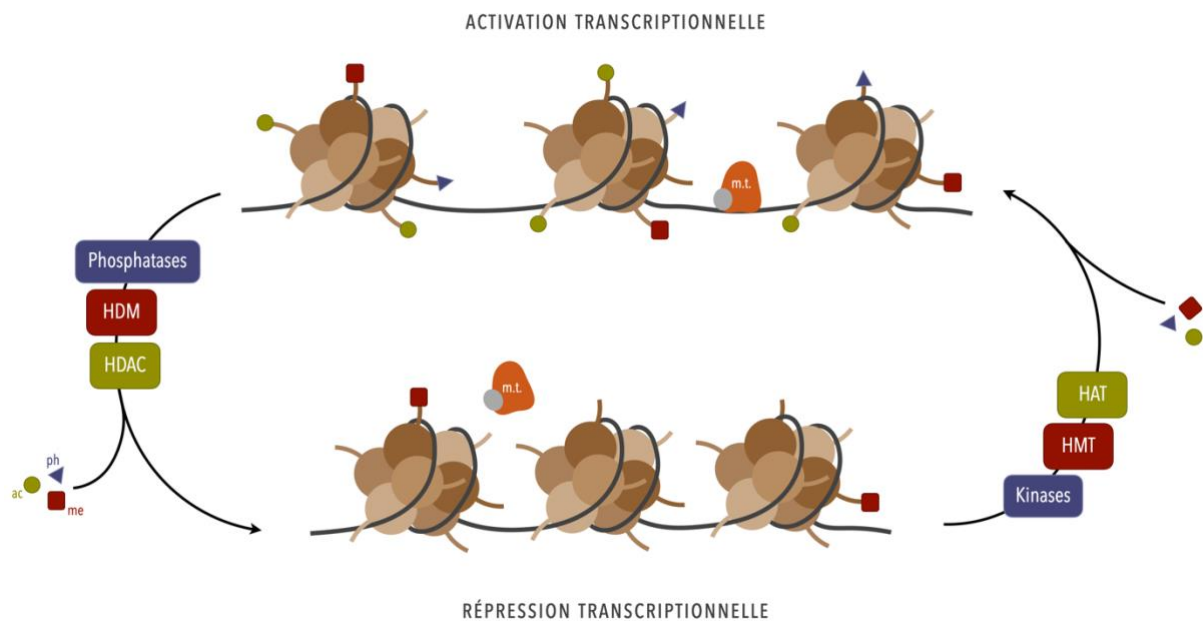


Figure 9. Représentation schématique des modifications d'histones régulant l'état de la chromatine. HDAC, Histone déacétylases; HDM, Histone deméthylases; HAT; Histone acétyltransférases; HMT, Histone méthyltransferase; ac/me/ph, groupements acétylés/méthylés/phosphorylés; m.t., machinerie de transcription.

Phosphorylations des histones

Les phosphorylations sont ajoutées sur les résidus sérines, thréonines et tyrosines des histones et sont associées à une activation transcriptionnelle des gènes, par ajout d'une charge négative portée par le groupement phosphorylé.

La phosphorylation de l'histone H3 est particulièrement importante car essentielle pour la transcription de gènes impliqués dans les processus de mémoire. Dans les neurones, les voies de signalisation impliquent des protéines kinases et phosphatases favorisant la plasticité synaptique et les mécanismes de mémoire. La stimulation des neurones par des agonistes des récepteurs glutamatergiques, dopaminergiques ou acétylcholinergiques dans un cerveau adulte induit une activation rapide de la voie MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein

Kinase/Extracellular-Regulated Kinase) associée à une augmentation rapide et transitoire de phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10p) dans le DG chez la souris (*Crosio et al., 2003*). Cette augmentation est aussi retrouvée *in vitro*, où une stimulation par le glutamate augmente H3S10p au niveau du promoteur du gène *c-Fos*, un IEG (*Brami-Cherrier et al., 2007; Li et al., 2004*). L'activation de la protéine kinase ERK *in vitro* ou *in vivo* lors d'un conditionnement de peur au contexte est associée à une augmentation temporaire de H3S10p dans la région CA1 de l'hippocampe chez le rat (*Chwang et al., 2006*).

Méthylations des histones

Si la méthylation est souvent associée à une marque de répression transcriptionnelle, la méthylation des histones peut aussi induire une activation selon les résidus modifiés (*Kouzarides, 2007*). Les méthylations s'effectuent sur les lysines qui peuvent recevoir 1, 2 ou 3 groupements méthylés (mono, di, triméthylation) et sur les arginines. La méthylation des lysines des histones H3 et H4 sont les plus étudiées. L'ajout et le retrait des groupements méthylés sont respectivement contrôlés par les histone méthyltransférases (HMT) et histone deméthylases (HDM). Il existe 3 familles de HMT : PRMT1 arginine méthyltransférases, SET-domain histone méthyltransférases et non-SET-domain DOT1/DOT1L méthyltransférases (*Martin & Zhang, 2005*).

Il est possible que ces marques méthylées apparaissent aux mêmes sites que les acétylations. Il existe par ailleurs, un lien fonctionnel entre la méthylation et l'acétylation des histones. Gupta et collaborateurs ont montré une augmentation de H3K4 triméthylé (H3K4me3) correspondant à une marque d'activité transcriptionnelle, après un conditionnement de peur, notamment aux promoteurs des gènes *Zif268* et *Bdnf*. De plus, un traitement inhibant les deacétylations des histones (i.e. sodium butyrate) augmente les méthylations de H3K4 et diminue celles de H3K9 au dans l'hippocampe (*Gupta et al., 2010*). Enfin, des souris déficientes pour la HMT spécifique de H3K4 présentent des déficits de mémoire contextuelle (*Gupta et al., 2010*).

Acétylations des histones

L'acétylation des histones est associée à une activation de la transcription. L'ajout de groupements acétylés neutralise la charge positive de l'histone, diminuant l'attractivité de l'ADN pour le core protéique et conduisant à la décondensation de la chromatine. Cet ajout permet aussi de recruter directement des protéines présentant un bromodomaine (i.e. motif

de reconnaissance spécifique des résidus acétylés au niveau des histones) (*Bottomley, 2004*). Les acétylations s'effectuent au niveau des lysines de façon rapide et réversible. Elles sont ajoutées par les histones acétyltransférases (HATs) qui sont donc souvent co-activatrices de la transcription. Les HATs sont divisées en 3 sous-familles : les GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferases), les MYST et les p300/CBP (CREB-binding protein) (*Berndsen & Denu, 2008*). À l'inverse, les groupements acétylés peuvent être retirés par les histones deacétylases (HDACs) qui sont co-répressives de la transcription génique. Il existe différentes classes d'HDACs basées sur leur similarité de séquence avec celles de la levure. La classe I correspond à RPD3 chez la levure et les HDACs de cette classe dépendent de d'ions Zn^{2+} pour leur activité enzymatique. La classe II est liée à HDA1 chez la levure et est divisée en 2 sous-classes IIa et IIb. La classe III correspond à des sirtuines nécessitant le co-facteur NAD^+ pour leur activité enzymatique et enfin la classe IV ne présente que HDAC11 (*pour revue, Delcuve et al., 2012*).

L'implication des acétylations des histones dans les processus associés à la mémoire a été particulièrement bien étudiée et des changements d'acétylation des histones ont été observés suite à un apprentissage ou à une tâche de mémoire comme le conditionnement de peur ou la piscine de Morris (*Bousiges et al., 2010; Castellano et al., 2012; Levenson et al., 2004; Peleg et al., 2010; Vecsey et al., 2007*). En effet, chez la souris, un conditionnement de peur induit 1h après, une augmentation d'acétylation des histones dans l'hippocampe et plus spécifiquement de H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac et H4K12ac (*Peleg et al., 2010*). De plus, il a été montré que ce même conditionnement induit une augmentation d'acétylation de l'histone H3 de la même façon qu'une activation de la voie PKC/PKA/ERK (*Levenson et al., 2004*). Aussi, l'augmentation artificielle de l'acétylation des histones *in vitro* améliore l'induction de la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe et une inhibition des HDACs améliore la formation de mémoire à long terme (*Levenson et al., 2004*). Par ailleurs, la facilitation à long terme (i.e. un équivalent de la LTP des mammifères mais chez l'invertébré) dans les neurones sensori-moteurs de l'aplysie s'accompagne d'une augmentation de liaison de CBP et favorise l'acétylation des histones au promoteur de CEBP (CCAAT/enhancer binding protein), un co-activateur transcriptionnel de CREB (*Guan et al., 2002*). D'autre part, l'induction de la LTP engendre une augmentation de l'acétylation de H3 et H4, et est facilitée par l'application d'inhibiteurs des HDACs tels que la trichostatine A (TSA, *Levenson et al., 2004; Miller & Sweatt, 2007; Vecsey et al., 2007*) ou le sodium butyrate (NaB, *Levenson et al., 2004; Sui et al., 2012*). Ces changements d'acétylation

des histones se produisent spécifiquement au niveau de gènes impliqués dans la transmission synaptique (e.g. reelin, BDNF) (Sui et al., 2012). L'importance de l'acétylation des histones dans la formation de la mémoire a aussi été mise en évidence par Levenson et collaborateurs en 2004. En effet, ces auteurs ont montré une augmentation de l'acétylation de H3 sans changement d'acétylation de H4 suite à un conditionnement de peur, et une augmentation d'acétylation de H4, sans changement de celle de H3 suite à un test de latence à l'inhibition (*latent inhibition*) (Levenson et al., 2004). Cela met en évidence que la consolidation de la mémoire induit des changements d'acétylation spécifiques de la tâche d'apprentissage à laquelle l'animal est soumis. De nombreuses autres études ont par la suite montré une augmentation d'acétylation des histones associée au conditionnement de peur (Chwang et al., 2007, 2006; Lubin et al., 2008; Maddox & Schafe, 2011; Monsey et al., 2011) mais aussi à différents types de mémoire (Gräff et al., 2012 avec un test de reconnaissance d'objets ; Lesburgueres et al., 2011 avec un test de préférence alimentaire par transmission sociale ; Bousiges et al., 2010 avec un test de mémoire spatiale en piscine de Morris). Ces changements d'acétylation se font spécifiquement au niveau de certains gènes tels que *Zif268*, *Creb* ou *Bdnf* (Bredy et al., 2007; Koshibu et al., 2009; Lubin et al., 2008; Lubin & Sweatt, 2007). Aussi, de très nombreuses études ont montré que l'inhibition des HDACs par des inhibiteurs (HDACi) améliore la mémoire à long terme (Bredy et al., 2007; Fischer et al., 2007; Fontán-Lozano et al., 2008; Guan et al., 2009; Hawk et al., 2011; Lesburgueres et al., 2011; McQuown et al., 2011; Monsey et al., 2011; Stefanko et al., 2009; Vecsey et al., 2007; Villain et al., 2016; Yeh et al., 2004) tandis qu'une inhibition des HATs l'altère (Alarcón et al., 2004; Barrett et al., 2011; Korzus et al., 2004; Oliveira et al., 2007; Wood et al., 2006, 2005).

Pour résumer, la formation de la mémoire à long terme implique une augmentation d'acétylation des histones qui assure la régulation de l'expression des gènes de plasticité. L'inhibition des HDACs permet une facilitation et une amélioration de mémoire à long terme tandis que l'inhibition des HATs engendre des déficits mnésiques.

Classe	Implication dans les processus cognitifs	Références	
I	HDAC1	Facilite l'extinction de la mémoire	Bahari-Javan et al. 2012
		Augmente après un conditionnement de peur au contexte	Gupta-Argawal et al. 2012
		Diminue après l'extinction d'une mémoire de peur	Siddiqui et al. 2019
	HDAC2	Limite la LTP, les mémoires spatiales et associatives dans les cerveaux de souris sains ou avec une neurodégénérescence	Guan et al. 2009 ; Gräff et al. 2012
		Limite les courants post-synaptiques excitateurs	Nelson et al. 2011
		Diminue après un conditionnement de peur au contexte	Gupta-Argawal et al. 2012
	HDAC3	Limite la mémoire en test de localisation et de reconnaissance d'objet	McQuown et al. 2011 ; Pulya et al. 2021
		Diminue après un conditionnement de peur au contexte	Gupta-Argawal et al. 2012
	HDAC8	Limite l'apprentissage spatial, en évitement passif, en test de reconnaissance d'objet	Yang et al. 2013
	IIa	HDAC4	La fraction cytoplasmique limite la mémoire thermotaxique chez <i>C. Elegans</i>
Réprime des gènes essentiels à la fonction synaptique et régule la transmission synaptique ainsi que la mémoire sans deacétyler des histones			Sando et al. 2012
Limite la mémoire à long terme chez <i>D. Melanogaster</i>			Main et al. 2021
Sa perte altère la LTP ainsi que les mémoires spatiale et associative			Kim et al. 2012
HDAC5		Inhibe la facilitation à la long terme chez l'aplysie (<i>A. Californica</i>)	Guan et al. 2002
		Augmente chez la souris modèle de schizophrénie avec des déficits de mémoire	Koseki et al. 2012
		Maintien la mémoire de peur après un conditionnement	Hashikawa-Hobara et al. 2021
		Diminue après un conditionnement de peur au contexte	Gupta-Argawal et al. 2012
HDAC7		Diminue après un conditionnement de peur au contexte	Gupta-Argawal et al. 2012 ; Jing et al. 2017
		Limite la consolidation de la mémoire contextuelle	Jing et al. 2017
HDAC9	Une variation dans le nombre de copies du gène est associée aux altérations cognitives de la schizophrénie	Tam et al. 2010	
IIb	HDAC6	Limite la mémoire à court terme dans un modèle de sclérose en plaque	LoPresti 2019
		Sa perte induit un déficit de mémoire chez <i>D. Melanogaster</i>	Perry et al. 2017
	HDAC10	-	-
IV	HDAC11	Augmente après un conditionnement de peur au contexte	Gupta-Argawal et al. 2012

Tableau 1. Implication des HDACs dans les processus cognitifs et de mémoire.

Ces enzymes qui modifient les histones et notamment les HATs et les HDACs, sont recrutées au niveau de la chromatine par différentes protéines et s'associent à d'autres pour former des complexes activateurs ou répresseurs de la transcription. Le rôle de chacun d'entre eux dans les processus de mémoire a été étudié ces dernières années.

Complexes activateurs et leur implication dans la mémoire

Les complexes activateurs portent l'activité HAT permettant de décondenser la chromatine et la rendre accessible à la machinerie de transcription. Ces complexes comportent notamment des facteurs de transcription tel que CREB recrutant les enzymes HATs et dont l'implication dans la mémoire a été bien étudiée.

La protéine CREB peut être phosphorylée au niveau de la sérine 133 ce qui permet à CBP de se lier et d'activer la transcription génique médiée par CREB (Chrivia et al., 1993). Plusieurs études ont utilisé des souris génétiquement modifiées au niveau du gène de CBP. Korzus et

collaborateurs (Korzus et al., 2004) ont induit des mutations de CBP et ont observé un déficit de mémoire à long terme en piscine de Morris et en test de reconnaissance d'objet. Ils ont, par ailleurs, montré que l'administration d'un inhibiteur des HDACs (TSA) chez ces souris permet de restaurer les pertes de mémoire (Korzus et al., 2004). La même année, Alarcón et ses collègues ont montré une altération d'acétylation d'histones, de mauvaises performances mnésiques suite à un conditionnement de peur ainsi que des déficits de LTP hippocampique chez des souris mutées pour CBP. En cohérence avec les résultats de Korzus, ils ont pu restaurer ces déficits par l'administration d'inhibiteurs des HDACs (SAHA) mais aussi en augmentant l'expression des gènes CREB-dépendants (e.g. *Bdnf*, *Arc*, *c-Fos*, *Egr1*) (Alarcón et al., 2004). Ces altérations de la mémoire ont été retrouvées dans plusieurs autres études ciblant CBP mais aussi p300, un homologue de CBP et PCAF (p300/CBP-associated factor) (Maurice et al., 2008; Oliveira et al., 2011, 2007; Wood et al., 2005). À l'inverse, l'activation pharmacologique de CBP et de son homologue p300 induit une acétylation des histones dans l'hippocampe et augmente l'expression de NeuroD1 et du BDNF (Chatterjee et al., 2013). De plus, ce traitement activateur stimule le processus de neurogenèse adulte et permet un maintien prolongé de la mémoire spatiale (Chatterjee et al., 2013).

NCOA1 (Nuclear receptor co-activator 1) aussi connu sous le nom de SRC-1 (Steroid Receptor Co-activator 1) peut aussi recruter CBP (Sheppard et al., 2001). Des souris présentant une diminution de NCOA1 dans l'hippocampe par une approche lentivirale, montrent des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale en piscine de Morris ainsi que de LTP accompagnés par une diminution du nombre d'épines dendritiques au niveau de la région CA1 (Bian et al., 2018). De plus, les auteurs ont observé une diminution des taux protéiques de GluR1 et PSD95 *in vivo* et *in vitro* suite à l'exposition respective des souris et des cellules aux lentivirus exprimant les shRNA (small hairpin RNA) dirigés contre NCOA1 (Bian et al., 2018).

Ainsi, le fait d'altérer négativement les complexes activateurs de la transcription engendrerait des déficits de mémoire associés à des altérations de la plasticité synaptique.

Complexes répresseurs et leur rôle dans la mémoire

Les complexes répresseurs, quant à eux, portent l'activité HDAC permettant une condensation de la chromatine la rendant inaccessible à la machinerie transcriptionnelle.

Le complexe NCOR (Nuclear receptor CO-Repressor) interagit avec des récepteurs nucléaires tels que ceux de la famille NR4A (Codina et al., 2004) et forme un complexe avec HDAC3 et une

HDM (JMJD2A) (*Ishizuka & Lazar, 2005; Zhang et al., 2005*). Une mutation génétique empêchant l'interaction de NCOR avec HDAC3 induit une amélioration de mémoire à long terme hippocampo-dépendante (*McQuown et al., 2011*) montrant ainsi l'implication de NCOR-HDAC3 dans la répression génique au moment de la consolidation mnésique. Par ailleurs, son implication dans la régulation de la balance excitation/inhibition a aussi été étudiée et une perte de fonction de ce complexe empêche la formation de la LTP au niveau de l'hippocampe (*Zhou et al., 2019*).

Le complexe NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase), en plus de recruter les HDACs 1 et 2, permet aussi un repositionnement du nucléosome afin de réguler l'accessibilité à l'ADN (*Allen et al., 2013*). Ce complexe serait notamment impliqué dans les processus neurodéveloppementaux en régulant l'expression de gènes dans les cellules souches et progénitrices neurales (*Hoffmann & Spengler, 2019*). NuRD joue également un rôle dans la différenciation et le développement de synapses au niveau du cervelet (*Yamada et al., 2014*). À notre connaissance, aucune étude à ce jour ne rapporte son implication dans les processus de mémoire, toutefois nous pouvons penser que NuRD agirait par l'intermédiaire des HDACs 1 et 2 lors de la consolidation mnésique.

Le complexe CoREST (RE1-Element Silencing Transcription factor Co-repressor) interagit lui aussi avec les HDACs 1 et 2 mais aussi avec la déméthylase LSD1 (*Hakimi et al., 2002; Lee et al., 2005; You et al., 2001*). Il présente un rôle dans le développement des neurones pyramidaux corticaux (*Fuentes et al., 2012*) et dans la régulation d'expression des gènes neuronaux (*Andrés et al., 1999; Lee et al., 2005*). Son rôle dans la mémoire et la consolidation a récemment été mis en évidence chez la drosophile par Takakura et collaborateurs (*2021*) qui ont montré que l'un des isoformes de CoREST présentant la totalité de la séquence limitait la flexibilité comportementale tandis qu'un autre isoforme, tronqué au niveau de N-terminal était requis lors de la consolidation de la mémoire. Par ailleurs, comme son nom l'indique, CoREST est recruté au niveau de l'ADN par la protéine REST (*Andrés et al., 1999*) tout comme le complexe SIN3A.

d. Le complexe répresseur de la transcription SIN3A-HDACs et son rôle dans la mémoire

SIN3A (Switch INsensitive 3A)

La protéine SIN3 a été découverte en 1987 lors d'études réalisées sur le changement du type de reproduction chez la levure bourgeonnante (*Nasmyth et al., 1987; Sternberg et al., 1987*).

Il s'agit d'une protéine échafaudage structurant un complexe protéique par l'intermédiaire de nombreux sites de liaison. Elle possède 4 domaines PAH (Paired Amphipathic alpha-Helix) correspondant chacun à 2 hélices séparées par 20 acides aminés. Elle comporte aussi un domaine de liaison aux HDACs (HID – HDAC Interaction Domain) et une région très conservée en C-terminal (HCR – Highly Conserved Region) (Figure 10 & 11) (*Grzenda et al., 2009*). SIN3 apporte un soutien structurel important pour un complexe très conservé de la levure à l'humain et comprenant notamment les HDACs 1 et 2. D'autres fonctions enzymatiques peuvent être ajoutées au complexe en interagissant avec SIN3 telles que des enzymes de remodelage du nucléosome, des N-acetylglucosamine transférases, des HMT ou encore des DNMT (*Silverstein & Ekwall, 2005*). Sa liaison à l'ADN repose sur son recrutement par d'autres protéines reconnaissant des séquences spécifiques ou des modifications de l'ADN. Chez la levure, seule SIN3 a été identifiée, contrairement aux vertébrés chez qui, une duplication du gène *Sin3* a donné les gènes *Sin3a* et *Sin3b* codant respectivement pour les protéines SIN3A et SIN3B. Chez la souris, SIN3A et SIN3B sont très similaires avec une grande homologie pour les domaines PAH et HID. Comparée à SIN3A, SIN3B présente un raccourcissement de séquence en N-terminal (*Chaubal & Pile, 2018*). Lors de sa transcription, *Sin3a* peut subir un épissage donnant finalement SIN3A9 qui possède un insert de 9 acides aminés entre les acides aminés 1205 et 1206 (*Ayer et al., 1995*). *Sin3b* peut aussi donner une autre protéine : SIN3B_{sf} (short form) aussi appelé SIN3B(293) qui ne comporte que les domaines PAH1 et PAH2, sans le domaine HID (Figure 10).

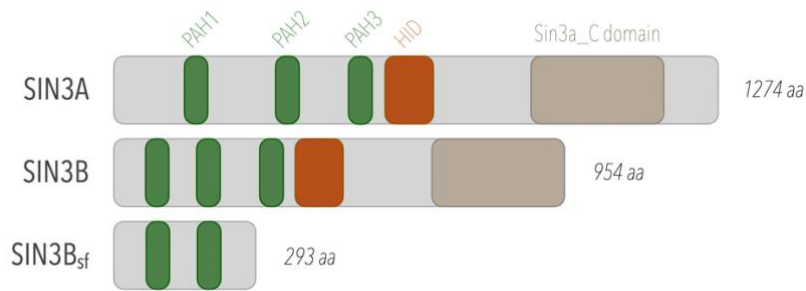


Figure 10. Représentation schématique des protéines SIN3 chez la souris (d'après Chaubal & Pile 2018). Le domaine Sin3a_C regroupe les domaines PAH4 et HCR. PAH1/2/3/4, Paired Amphipathic alpha-Helices 1/2/3/4; HID, HDAC Interaction Domain; HCR, Highly Conserved Region; aa, acides aminés.

Les protéines SIN3A et SIN3B ne semblent pas redondantes dans leurs fonctions. En effet, un KO (knock out) de *Sin3a* chez la souris entraîne une léthalité au niveau embryonnaire précoce (à environ E3.5) (Cowley et al., 2005; Dannenberg et al., 2005). Dans ce modèle KO, la présence de SIN3B ne compense pas la perte de SIN3A. Un KO de *Sin3b* engendre, quant à lui, une léthalité plus tardive dans le développement embryonnaire (autour de E15) (David et al., 2008). D'autres études ont pu montrer les différents rôles portés par SIN3A et SIN3B au niveau des cellules musculaires (Van Oevelen et al., 2010), hématopoïétiques (Cantor & David, 2017; Heideman et al., 2014) ou encore cancéreuses (Lewis et al., 2016).

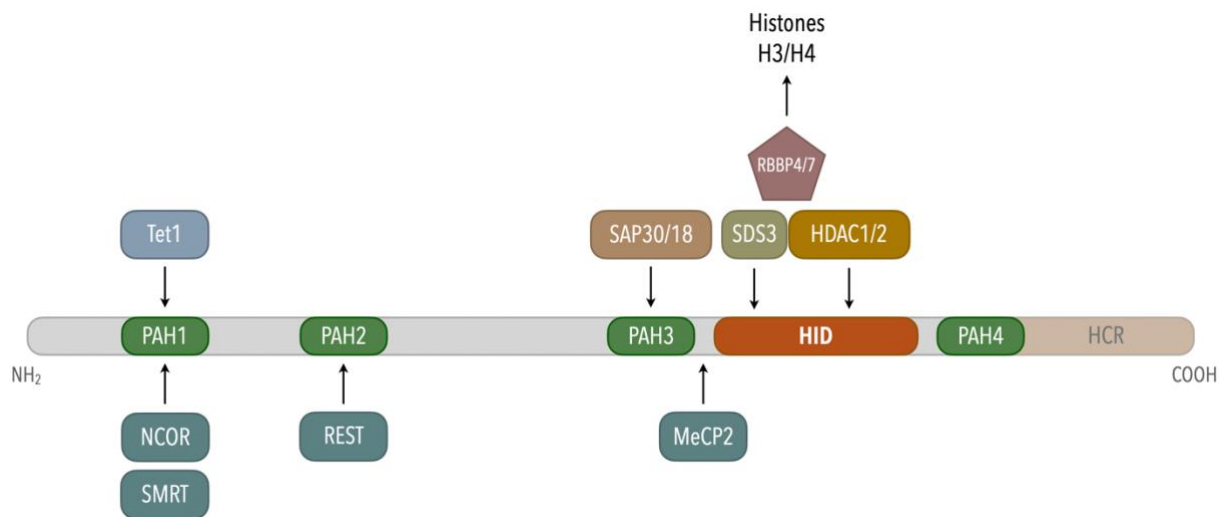


Figure 11. Représentation schématique de SIN3A et de ses partenaires protéiques. PAH1/2/3/4, Paired Amphipathic alpha-Helices 1/2/3/4; HID, HDAC Interaction Domain; HCR, Highly Conserved Region; NCOR, Nuclear receptor co-repressor; SMRT, Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors; REST, RE1-Element Silencing Transcription factor; MeCP2, Methyl CpG binding protein; HDAC1/2, Histone Deacetylases 1/2; RBBP4/7, Retinoblastoma binding protein 4/7; Tet1, Ten-eleven translocation 1.

Sin3a est présent sur le chromosome 9 chez la souris et permet la production d'une protéine de 1274 acides aminés. La protéine SIN3A se situe au niveau nucléaire dans les cellules et est constitutivement exprimée dans l'ensemble de l'organisme. Elle assure une fonction de régulateur transcriptionnel par le biais d'autres protéines, avec lesquelles elle forme un complexe. Comme mentionné précédemment, SIN3A peut être recrutée au niveau de l'ADN par d'autres protéines telles que REST (*Grimes et al., 2000; Roopra et al., 2000*), MeCP2 (*Nan et al., 1998*), SMRT (*Nagy et al., 1997*) ou encore NCOR (*Alland et al., 1997*), et l'activité enzymatique du complexe qu'elle structure est apportée par les HDACs 1 et 2. D'autres protéines vont aussi interagir avec SIN3A et/ou ses partenaires pour se lier aux histones (e.g. RBBP4/7 – Retinoblastoma binding proteins 4 & 7 qui se lient directement aux queues des histones H3 et H4), pour l'activité catalytique du complexe (e.g. SDS3, *Alland et al., 2002*) ou encore pour le stabiliser (e.g. SAP30/18). Enfin, une étude récente a montré que SIN3A pouvait interagir avec l'enzyme Tet1, notamment impliquée dans les processus de déméthylation de l'ADN, au niveau de son domaine PAH1 (*Chandru et al., 2018*).

SIN3A a fait l'objet de plusieurs études chez l'humain dans le cadre du syndrome de Witteveen-Kolk (WK) décrit pour la première fois en 2016 chez des patients atteints de déficience intellectuelle et de troubles du spectre autistique (*Witteveen et al., 2016*). Ce syndrome neurodéveloppemental est causé par une haploinsuffisance de SIN3A due à des délétions de la région chromosomique portant *Sin3a* (15q24) ou engendrant une perte de fonction de SIN3A suite à des mutations (changement de cadre de lecture, mutations non-sens ou faux-sens) sur l'ensemble de la séquence (*Balasubramanian et al., 2021*). Le syndrome WK est accompagné de traits distinctifs au niveau du visage, d'une microcéphalie, d'une déficience intellectuelle moyenne avec un retard du développement cognitif et moteur ainsi que quelques anomalies observées en IRM (e.g. hypoplasie du corps calleux et ventriculomégalie). D'autres caractéristiques ont été mises en évidence comme une hypotonie ainsi que des crises d'épilepsie (*Balasubramanian et al., 2021*). Plusieurs études ont observé des mutations ou des délétions relativement étendues au niveau de *Sin3a*, associées aux troubles décrits précédemment (*Ercoskun & Yuce Kahraman, 2021; Ferrer et al., 2019; Latypova et al., 2021; Narumi-Kishimoto et al., 2019; Van Dongen et al., 2020*).

Afin de tenter d'expliquer le phénotype humain associé à ces altérations dans le gène *Sin3a*, l'équipe de Witteveen et Kolk a étudié l'expression de *Sin3a* dans le cerveau de souris par hybridation *in situ*. Ils ont ainsi montré que *Sin3a* est exprimé de façon modérée et ubiquitaire dans l'ensemble du cerveau, mais augmente dans les zones neurogéniques (i.e. zone sous-ventriculaire, bulbes olfactifs et gyrus denté) (Witteveen et al., 2016). D'autre part, ces auteurs ont induit une diminution d'expression de *Sin3a* lors du développement embryonnaire par électroporation d'une construction exprimant des shRNA ciblant les exons 13 et 16 de *Sin3a*, dans le cortex des souris en développement. Cette diminution de SIN3A engendre une diminution de prolifération des progéniteurs neuraux corticaux ainsi qu'une altération de la différenciation de ces derniers et de leur élongation axonale. De ce fait, les observations cliniques du syndrome WK ainsi que les résultats chez la souris suggèrent que la protéine SIN3A est un régulateur important impliqué dans le développement du cortex cérébral (Witteveen et al., 2016). Une seconde étude a aussi mis en évidence le rôle de SIN3A dans la différenciation de cellules pluripotentes en neurones notamment par l'activité de répression transcriptionnelle médiée par REST (Halder et al., 2017). La déplétion de SIN3A dans des cellules pluripotentes améliore la différenciation de ces dernières en neurones et augmente le niveau de marqueurs neuronaux (Halder et al., 2017).

En plus des rôles importants joués par SIN3A dans le développement, la contribution de cette protéine dans des fonctions présentes chez l'animal adulte a également été étudiée notamment dans les processus de mémoire.

Une première étude publiée en 2018 étudie l'impact d'une déplétion de SIN3A dans le cerveau de souris modèle d'amnésie induite par la scopolamine (Srivivas & Thakur, 2018). La scopolamine est un antagoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques bien connu pour induire des déficits de mémoire (Flood & Cherkin, 1986). Suite à l'injection intrapéritonéale de scopolamine durant 7 jours, Srivivas et Thakur ont observé que les souris présentaient des déficits de mémoire à long terme suite à une tâche de reconnaissance d'objet (Object Recognition test – OR, i.e. ce test se base sur la néophilie des souris pour les nouvelles caractéristiques d'un environnement connu, les poussant à explorer plus longtemps ce qu'elles ne connaissent pas). Cette perte de mémoire est accompagnée d'une diminution d'acétylation de H3K9 et H3K14 au niveau de promoteurs d'IEGs (e.g. *Arc*, *Egr1*, *Homer1* et *Narp*) et d'une diminution de leur expression. Aussi, de façon intéressante, ils ont mis en évidence une augmentation d'expression de *Sin3a*

ainsi que des taux de SIN3A dans l'hippocampe des souris injectées avec la scopolamine, associée à une augmentation de liaison de SIN3A aux promoteurs des gènes précédemment cités. Suite à ces observations, ils ont choisi de réduire les taux de SIN3A par injection intra-hippocampique de siRNA dirigés contre les transcrits de *Sin3a*, chez les souris traitées à la scopolamine et ont observé que le traitement aux siRNA inversait l'ensemble des résultats observés précédemment. Autrement dit, la déplétion de SIN3A chez des souris amnésiques améliore leur mémoire à long terme, engendre une augmentation d'acétylation de H3K9 et H3K14 aux promoteurs des gènes ainsi qu'une augmentation de leur expression. La protéine SIN3A serait donc impliquée dans les processus de mise en place de la mémoire à long terme.

Une seconde étude utilisant le même modèle d'amnésie induit par la scopolamine a montré que les rats traités présentaient un déficit de mémoire à long terme associé à une diminution d'expression des miR-210 et miR-183 ainsi qu'une augmentation d'expression de *Sin3a* (Ye et al., 2020). Les miR ou miRNA (micro ARN), de petits ARN non-codants pouvant moduler l'expression des gènes en agissant par le phénomène d'interférence à l'ARN, ont déjà été montré comme impliqués dans les processus de mémoire (pour revue, Wang et al., 2022). Ces travaux, en accord avec l'étude de Srivas et Thakur (2018) précédemment décrite, font ainsi l'hypothèse que ces miR réguleraient le niveau d'expression de *Sin3a*.

Une autre étude publiée la même année, utilise un autre modèle murin présentant une délétion dans le gène *Sin3a* (*Sin3aNH*) (Bridi et al., 2020). Ce modèle provient du croisement de 2 lignées de souris : l'une dont l'exon 4 du gène *Sin3a* est flanqué de deux séquences loxP et l'autre exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la CaMKII α . Ainsi, la délétion dans *Sin3a* s'exprime quelques jours après la naissance de l'individu dans le cerveau antérieur (comprenant le cortex, l'hippocampe, le striatum, l'amygdale, le thalamus et l'hypothalamus) (Dragatsis & Zeitlin, 2000) engendrant la production d'une protéine tronquée au niveau N-terminal. Les souris *Sin3aNH* présentent une amélioration de la LTP suite à un stimulus téτανique faible, semblable à celle induite par un inhibiteur des HDACs (TSA). De plus, ces souris montrent une amélioration de mémoire à long terme contextuelle ainsi qu'une augmentation d'expression des gènes de plasticité *Homer1* et *Cdk5*. Les produits de ces gènes agissent ensemble dans la consolidation de la mémoire en régulant la localisation et la fonction des récepteurs au glutamate métabotropiques mGluR de type I (mGluR1/5) (Figure 4) (Mahan et al., 2012; Orlando et al., 2009). Cette étude suggère donc que SIN3A est impliquée dans la

régulation de la plasticité synaptique et la mise en place de la mémoire à long terme contextuelle (Bridi et al., 2020).

Pour résumer, une diminution de l'expression de *Sin3a* serait associée à de meilleures performances mnésiques tandis qu'une augmentation de son expression accompagnerait des déficits de mémoire à long terme. Néanmoins, les approches et techniques employées dans ces études ne nous permettent pas de précisément définir le rôle de SIN3A dans la consolidation d'une mémoire contextuelle dépendante de l'hippocampe.

En effet, le modèle murin utilisé par Bridi et collaborateurs en 2020 porte une délétion dans *Sin3a* qui apparaît dans le cerveau antérieur quelques jours après la naissance des individus. Ainsi, ces souris présentent une perte de fonction de SIN3A pendant la période post-natale de maturation du cerveau (Hammelrath et al., 2016) et qui persiste le reste de leur vie adulte au sein de plusieurs structures cérébrales incluant l'hippocampe mais aussi le cortex, l'amygdale ou encore le striatum. De ce fait, l'amélioration de mémoire à long terme observée chez ces souris est le résultat d'une perte de fonction de SIN3A à long terme, et qui peut impliquer des mécanismes de compensation visant à contrer les effets de cette délétion. Bien que l'outil utilisé par Srivas et Thakur (siRNA) permet un meilleur contrôle spatial et temporel de la diminution de SIN3A par rapport aux souris mutées, ces auteurs ont testé une mémoire qui, d'après la littérature, ne serait pas vraiment hippocampo-dépendante mais qui s'appuierait davantage sur les cortex péri- et post-rhinal ou insulaire (Haettig et al., 2011; Winters et al., 2004). Par ailleurs, compte tenu du volume important d'injection de solution de siRNA (5 μ L par hippocampe), il n'est pas possible d'exclure que les effets observés dans leur étude soient dus à une diminution de SIN3A affectant des structures adjacentes de l'hippocampe.

HDACs 1 et 2 (Histone Deacetylases 1 et 2)

Les HDACs 1 et 2 sont recrutées par plusieurs complexes répresseurs tels que NCOR, NuRD, CoREST ou encore SIN3A et les études explorant leurs rôles ont mis en évidence des fonctions différentes pour chacune d'entre elles. Premièrement, leurs expressions dans certaines structures cérébrales diffèrent suite à un conditionnement de peur ou lors d'un protocole d'extinction (Siddiqui et al., 2019).

Une étude publiée en 2009 par Guan et collaborateurs, montre l'effet d'une surexpression de HDAC1 ou HDAC2 dans les neurones des souris sur la formation de la mémoire à long terme. Une surexpression de HDAC2 induit des déficits de mémoire ainsi qu'une diminution de la densité d'épines dendritiques et une altération de la LTP au niveau de la région CA1 et du DG de l'hippocampe. La surexpression de HDAC1, quant à elle, n'affecte pas les performances de mémoire des souris. Par ailleurs, les auteurs ont aussi induit un KO de HDAC2 conduisant à l'inverse des effets précédemment décrits pour l'approche par surexpression. En effet, les souris KO HDAC2 montrent une amélioration de mémoire contextuelle ainsi qu'une augmentation de densité d'épines dendritiques aux neurones de CA1 et du DG accompagnée d'une amélioration de plasticité synaptique mesurée par induction d'une LTP dans l'hippocampe. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces effets comportementaux et cellulaires médiés par HDAC2 ont été analysés. La HDAC2 se situerait au niveau de promoteurs de gènes impliqués dans les fonctions synaptiques et cognitives (e.g. *Bdnf*, *Egr1*, *Camk2a*, *Creb*, *Gria1*, *Fos*). Or, un KO de HDAC2 engendre une augmentation d'acétylation des histones au niveau des promoteurs de ces gènes accompagnée d'une augmentation de leurs taux protéiques (Guan et al., 2009). Ces résultats concordent avec ceux de Morris et collaborateurs (2013) montrant une amélioration d'un apprentissage associatif ainsi que de la LTP hippocampique chez un modèle KO pour HDAC2. De plus, toujours en accord avec les résultats précédemment mentionnés, il a été montré que la scopolamine, en plus d'altérer la mémoire à long terme des individus, induit aussi une augmentation de HDAC2 dans l'hippocampe des animaux ainsi qu'une augmentation de sa liaison au niveau des promoteurs de *Arc*, *Egr1* ou encore *Homer1* (Srivastava & Thakur, 2018).

En revanche, HDAC1 ne semble pas être impliquée dans les processus mnésiques de la même façon que HDAC2 (Bahari-Javan et al., 2012; Guan et al., 2009; Morris et al., 2013) bien que ces enzymes soient recrutées par les mêmes complexes répresseurs. En effet, les résultats observés par Guan et al. (2009) coïncident avec les résultats observés par Morris et al. (2013) montrant que la surexpression ou le KO de HDAC1 n'induisent aucun changement en termes de plasticité synaptique ou de performances mnésiques à long terme. Cependant, HDAC1 régulerait le processus d'extinction de la mémoire notamment par la deacétylation de H3K9 (Bahari-Javan et al., 2012). Par ailleurs, elle serait impliquée dans la maintenance de l'intégrité du génome par son rôle dans la réparation des lésions à l'ADN (voir plus loin).

Les études précédemment citées utilisent des approches génétiques pour étudier le rôle de ces HDACs dans les processus de mémoire. Cependant, une des limitations de ces approches est qu'elles ne permettent pas de cibler spécifiquement une des phases de la mémoire (e.g. l'apprentissage, la consolidation, le rappel) puisqu'elles engendrent des modifications durables de l'expression des HDACs. Si les approches pharmacologiques permettent une inhibition temporaire et réversible de ces enzymes, beaucoup d'entre elles visent des classes d'HDACs sans une grande spécificité (Tableau 2). Il est donc difficile de savoir si les effets observés suite à l'utilisation de ces inhibiteurs pharmacologiques sont dus à l'inhibition d'une HDAC en particulier.

	Classe I				Classe IIa				Classe IIb		Classe IV	Implication dans les processus cognitifs	Références
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC7	HDAC9	HDAC6	HDAC10	HDAC11		
AR-42	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Oui	Benjamin et al. 2017
SAHA (vorinostat)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Oui	Guan et al. 2009
TSA (trichostatine A)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	Oui	Hawk et al. 2011 ; Lesburgueres et al. 2011 ; Fontan-Lozano et al. 2008 ; Monsey et al. 2011 ; Yeh et al. 2004 ; Levenson et al. 2004 ; Vecsey et al. 2007
Oxamflatin	X	X	X	X	X	X	X	X	X			Possible	Ganai et al. 2016
Acide valproïque	X	X	X	X	X	X	X	X				Oui	Bredy et al. 2007
Sodium butyrate (NaB)	X	X	X	X	X	X	X	X				Oui	Villain et al. 2016 ; Fischer et al. 2007 ; Lesburgueres et al. 2011 ; Fontan-Lozano et al. 2008 ; Levenson et al. 2004 ; Stefanko et al. 2009
Quisinostat (JNJ-26481585)	X											Possible	Bagheri et al. 2019 ; Wang et al. 2016
Romidepsine	X	X										Possible	Zhang et al. 2021
Etinostat (MS-275)	X		X									Oui	Hawk et al. 2011 ; Whittle et al. 2016
Mocetinostat (MGCD0103)	X	X	X									Oui	Huang et al. 2019
Tacedinaline (CI994)	X	X	X									Oui	Burns et al. 2022
RGFP136			X									Oui	McQuown et al. 2011
RGFP966			X									Oui	Phan et al. 2017 ; Bieszczad et al. 2015
MJM-1	X	X	X	X					X			Oui	Belayet et al. 2022
TMP269					X	X	X	X				Oui	Zhang et al. 2024
Ricolinostat (ACY-1215)	X	X	X	X				X	X			Oui	Zhang et al. 2014 ; Wang et al. 2019
Tubastatine A									X			Oui	Zhang et al. 2014
SW-100									X			Oui	Kozikowski et al. 2018

Tableau 2. Récapitulatif des agents pharmacologiques inhibiteurs de l'activité des HDACs impliquées dans les processus cognitifs .

Le Cpd-60 (composé 60 ou BRD6929) inhibe de façon sélective les HDACs 1 et 2 (Tableau 3), passe la barrière hémato-encéphalique après une injection intrapéritonéale chez la souris et sa demi-vie est d'environ 6.4h dans le cerveau de souris (Schroeder et al., 2013).

HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC9
0.001 μ M	0.008 μ M	0.458 μ M	>30 μ M	>30 μ M	>30 μ M	>30 μ M	>30 μ M	>30 μ M

Tableau 3. Concentrations inhibitrices 50 (IC₅₀) du Cpd-60 sur les HDACs de classe I et II (Schroeder et al., 2013).

Les effets de ce composé sur certaines marques des histones, l'expression de certains gènes ainsi que sur le comportement d'animaux dans des tests mettant en évidence leur état de résignation ont été étudiés (Schroeder et al., 2013). L'administration chronique intrapéritonéale de Cpd-60 sur 7 jours entraîne une augmentation d'acétylation de H3K9 et H4K12 dans le cortex, le striatum et l'hippocampe des souris traitées. Cette augmentation est présente au niveau des promoteurs de certains gènes dont l'expression est aussi augmentée (e.g. *Sgk1*, *Agxt2l1*, *Tsc22d3*). Ces effets moléculaires sont accompagnés d'une amélioration des comportements liés à l'humeur (*mood-related behaviors*). En effet, le traitement au Cpd-60 montrerait des effets de types antidépresseurs dans le test de nage forcée et dans le test d'hyper-locomotion induite par les amphétamines.

Dans une étude très récente, le Cpd-60 a été utilisé dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer et conduirait à des changements dans la transcription de gènes (e.g. *Pla22g6*, *Cx3cr*, *Ncam1*, *Cyfp1*) dans le cerveau avec un effet protecteur contre le vieillissement cérébral (Tammaro et al., 2024).

Pour résumer les HDACs recrutées par le complexe SIN3A, et particulièrement HDAC2, seraient impliquées dans les processus de mémoire via leur activité de deacétylation des histones entraînant la répression de l'expression de certains gènes de plasticité.

e. Vieillesse, mémoire et transcription génique

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus a dépassé le nombre d'enfants âgés de moins de 5 ans, en 2020. Aussi, d'ici à 2030, un sixième de la population mondiale aura 60 ans ou plus. Le vieillissement de la population correspondant à l'augmentation de la part des personnes âgées dans la population, est devenu un enjeu

majeur sur le plan économique, sociétal mais aussi scientifique avec de plus en plus d'études s'intéressant au « bien-vieillir » (i.e. le vieillissement en bonne santé) et à la prévention des déficits liés à l'âge.

Le vieillissement s'accompagne d'une multitude d'altérations et de changements comportementaux, cellulaires et moléculaires pouvant être associés à des pathologies. Néanmoins ces travaux de thèse n'auront pour objet que le vieillissement dit « sain » ou « normal ».

Altérations des processus cognitifs dues à l'âge

Un certain nombre de changements physiologiques survenant avec l'âge sont communs entre l'humain et les rongeurs, notamment au niveau musculaire (*Ballak et al., 2014*) ou du sommeil (*Campos-Beltrán & Marshall, 2021*). Les souris âgées présentent notamment une altération de la coordination motrice dans le test du Rotarod ainsi qu'une diminution de la force musculaire et de l'activité locomotrice (*Shoji & Miyakawa, 2019*).

Les fonctions sensorielles sont elles aussi affectées par l'âge chez les souris. En effet, des déficits auditifs ont été détectés entre 10 et 12 mois dans la lignée C57Bl/6J (*Ison et al., 2007; Li & Borg, 1991*). Il existe aussi un déclin de l'acuité visuelle, comme chez les humains (*Pitts, 1982*), dès 21 mois chez la souris C57Bl/6 (*Lehmann et al., 2012*). Enfin, des perturbations de l'olfaction ont été mises en évidence chez des souris C57Bl/6J âgées de 24 mois (*Patel & Larson, 2009*).

Les processus cognitifs sont également affectés par l'âge chez les rongeurs dans plusieurs tests comportementaux. En effet, de façon générale, les individus âgés ont une exacerbation des comportements de type anxieux et dépressifs (*Li et al., 2020*). Une altération de flexibilité comportementale (*Yang et al., 2019*) ainsi que de l'attention (*Gargano et al., 2023*) est aussi à noter chez les souris âgées, de même que des déficits des fonctions exécutives (*Hamieh et al., 2021*).

D'autre part, des déficits de mémoire ont été montrés. Dans le test d'évitement passif, permettant d'évaluer une mémoire contextuelle et émotionnelle (dépendante de l'hippocampe et de l'amygdale) (*Gold, 1986*), les souris âgées montrent des déficits lors du rappel (*Bartus et al., 1980; Dean et al., 1981; Samorajski et al., 1985*). Dans le test bien connu de la piscine de Morris, évaluant l'apprentissage et la mémoire spatiale, les souris âgées présentent de faibles performances pour localiser la plateforme immergée (*Fordyce & Whner,*

1993; Yanai & Endo, 2021). Ces altérations sont aussi retrouvées dans le labyrinthe de Barnes (*Barnes maze*) (Bach et al., 1999; Yanai & Endo, 2021). Des performances altérées de la mémoire de type épisodique ont été montrées dans un test de localisation d'objet et un test de reconnaissance d'objet (Belblidia et al., 2018; Fahlström et al., 2011; Wimmer et al., 2012) ainsi qu'en conditionnement de peur au son (Gould & Feiro, 2005; Moyer & Brown, 2006; Shoji & Miyakawa, 2019).

Ainsi, la mémoire de ces animaux, notamment celle dépendante de l'hippocampe, est altérée avec l'âge.

Altérations cellulaires et moléculaires dues à l'âge

Au niveau neurobiologique, les déficits mnésiques liés à l'âge décrits précédemment sont accompagnés par des altérations cellulaires et moléculaires (pour revue, Dahan et al., 2020).

Le vieillissement conduit à des changements de la microglie ce qui génère un environnement inflammatoire, avec une augmentation de production de cytokines inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS – Reactive Oxygen Species) associée à un stress oxydatif. Ces changements ont été associés à des déficits cognitifs (pour revue, Von Bernhardt et al., 2015). Par ailleurs, de la senescence neuronale mais aussi gliale a été mise en évidence et pourrait contribuer aux altérations cognitives liées au vieillissement (pour revue, Sikora et al., 2021).

Contrairement à ce que nous pourrions penser, les déficits cognitifs ne seraient pas dus à une perte de neurones mais plutôt à une perte de fonctionnalité de la structure cérébrale. En effet, le nombre de neurones pyramidaux ne diminue pas dans l'hippocampe des rats âgés (Rasmussen et al., 1996; Von Bohlen Und Halbach & Unsicker, 2002). Cependant, la plasticité synaptique est altérée chez les individus âgés, avec un déficit de LTP ainsi qu'une facilité à déclencher des phénomènes de LTD (Rosenzweig & Barnes, 2003). Ces changements seraient dus à des altérations dans la transmission glutamatergique par les récepteurs NMDA (Kumar & Foster, 2019) ainsi qu'à un déséquilibre entre les kinases et les phosphatases impliquées (Norris et al., 1998). Une dérégulation de l'homéostasie calcique participerait aussi aux perturbations des phénomènes de LTP et LTD (Foster & Kumar, 2002). D'autre part, un déficit d'apprentissage spatial a été associé à une diminution du nombre et de la longueur des épines dendritiques des neurones de CA1 et du DG chez la souris âgée (Von Bohlen Und Halbach et al., 2006).

Par ailleurs, les processus de neurogenèse hippocampique adulte sont également affectés par le vieillissement. Les nouveaux neurones qui naissent dans le cerveau adulte sont impliqués dans les processus de mémoire (Koehl & Abrous, 2011; Trouche et al., 2009). Les souris âgées présentent moins de prolifération des progéniteurs neuraux et un changement dans la destinée des cellules produites, qui deviennent préférentiellement des astrocytes plutôt que des neurones (Encinas et al., 2011). Il y aurait donc un changement dans l'abondance des différentes populations cellulaires produites, avec une diminution des cellules souches neurales et des progéniteurs neuraux, contrebalancée par une augmentation des cellules microgliales et des progéniteurs oligodendrocytaires (Artegiani et al., 2017). Considérant l'implication des nouveaux neurones dans les processus mnésiques, ces modifications de la neurogenèse hippocampique adulte lors du vieillissement pourraient contribuer aux déficits mnésiques liés à l'âge. Ces altérations de neurogenèse adulte hippocampique pourraient être en lien avec les déficits mnésiques dus à l'âge puisque son altération chez la souris adulte engendre des déficits de mémoire à long terme (Ben Abdallah et al., 2013). Chez l'humain, la neurogenèse diminue aussi avec l'âge, mais semble persister à un niveau plus faible (Moreno-Jiménez et al., 2019). Par ailleurs, une stimulation de la neurogenèse adulte par un environnement enrichi est associée à une amélioration des capacités mnésiques à long terme (Bruehl-Jungerman et al., 2005) et ce, malgré l'âge et la pathologie (Verret et al., 2013).

Expression des gènes et mécanismes épigénétiques lors du vieillissement

Altération de l'expression des gènes avec l'âge

Chez l'humain, le vieillissement affecte l'expression des gènes dans le cerveau. En effet, Lu et collaborateurs (Lu et al., 2004), ont réalisé une analyse transcriptomique du profil d'expression des gènes dans le cortex frontal d'humains âgés de 26 à 106 ans. Ils ont alors mis en évidence une diminution d'expression des gènes impliqués dans la transmission synaptique (e.g. GluR1, Grin2a), le transport vésiculaire, l'homéostasie et les signaux calciques (e.g. CaM, CaMKII α), le fonctionnement mitochondrial et certaines familles de kinase (e.g. MAP et PKC) ainsi qu'une augmentation d'expression de ceux impliqués dans la réponse au stress, la réparation de l'ADN, l'inflammation et le métabolisme des lipides avec la myélinisation (Lu et al., 2004). Ces modifications du profil d'expression des gènes ont aussi été observées dans l'hippocampe chez les rats âgés (Blalock et al., 2003) et associées à des déficits cognitifs (Rowe et al., 2007).

Altération des marques épigénétiques avec l'âge

Il est très probable que ces modifications transcriptionnelles soient dues à des modifications du paysage épigénétique chez les individus âgés. De nombreuses études ont mis en évidence des altérations des marques épigénétiques avec le vieillissement chez le rongeur (*Harman & Martín, 2020; Penner et al., 2010; Spiegel et al., 2014*) mais aussi chez l'humain (*Gilbert et al., 2019*).

Des changements d'expression des gènes ont été associés à des modifications de méthylation de l'ADN dans le cerveau âgé. En effet, Penner et al. (*2016*) ont montré une diminution d'expression de *Egr1* (i.e. un facteur de transcription rapidement exprimé après une stimulation neuronale et requis pour la formation de la mémoire) associée à une augmentation de méthylation de son promoteur au niveau du DG de l'hippocampe de rats âgées. Ils ont montré des résultats similaires pour le gène *Arc*, un autre IEG (*Penner et al., 2011*). Ces altérations étant associées à des déficits cognitifs (*Penner et al., 2016, 2011*).

Par ailleurs, une diminution d'expression de la DNMT3A2 a été observée dans l'hippocampe de souris âgées, accompagnée d'un déclin cognitif qui a pu être restauré par une approche virale permettant de réaugmenter les niveaux de DNMT3A2 (*Oliveira et al., 2012*).

Les modifications post-traductionnelles des histones sont aussi dérégulées au cours du vieillissement. En effet, les méthylation des histones changent avec l'âge. Une altération des niveaux de H3K4 triméthylés (H3K4me3) dans l'hippocampe de rats âgés a déjà été observée (*Morse et al., 2015*). De plus, chez les rats âgés, une tâche d'apprentissage n'engendre pas d'augmentation de H3K4me3 et de H3K9me2 dans l'hippocampe et, un traitement inhibiteur de HDM chez les jeunes rats induit les mêmes déficits mnésiques que ceux liés à l'âge (*Morse et al., 2015*). Enfin, l'exposition à un environnement enrichi permet de rétablir l'augmentation de H3K4me3 dans l'hippocampe des rats âgés, notamment autour du gène *Bdnf*, et restaure les déficits de mémoire (*Morse et al., 2015*).

D'autre part, les acétylations des histones sont aussi modifiées et ont été associées à des modifications d'expression des gènes avec l'âge. En effet, Peleg et collaborateurs (*2010*) ont observé une altération de l'expression de certains gènes impliqués dans l'apprentissage pendant la consolidation de la mémoire. De même, Singh et Thakur (*2018*) montrent une diminution d'expression d'IEGs neuronaux chez les individus âgés. Ces changements

d'expression génique ont été associés à des modifications au niveau des marques épigénétiques. En effet, le vieillissement est accompagné d'une dérégulation de l'acétylation des histones après un conditionnement de peur (Peleg et al., 2010), et plus particulièrement d'une diminution d'acétylation des histones au niveau du promoteur des gènes montrant une expression altérée (Singh & Thakur, 2018). Une diminution d'acétylation de l'histone H4 dans la région CA1 et le DG est notamment associée à des déficits de mémoire spatiale chez des souris âgées (Dagnas & Mons, 2013). Cette diminution a également été observée dans le striatum dorsal suite à une tâche d'apprentissage indicé (Dagnas & Mons, 2013).

Altération de la répression médiée par les HDACs avec l'âge

Les niveaux d'acétylation des histones étant régulés par les HATs et les HDACs, ces dernières ont également montré une implication dans les déficits liés à l'âge. En effet, une augmentation d'expression et des taux protéiques de HDAC2 a été mise en évidence dans l'hippocampe des souris âgées, notamment avec une augmentation de liaison au niveau des promoteurs des gènes dont l'expression est affectée (Chouliaras et al., 2013; Singh & Thakur, 2018, 2014). Une accumulation de HDAC2 et HDAC4 a été observée dans les neurones hippocampiques des souris âgées, et associée à une diminution d'acétylation de H3K27 au promoteur de *Bdnf* (Palomer et al., 2016). Cela suggèrerait donc que l'âge induit une augmentation des enzymes modifiant les histones, changeant ainsi la structure de la chromatine et induisant des modifications d'expression des gènes, associées à des déficits cognitifs. Les déficits de mémoire liés à l'âge seraient probablement dus à une incapacité à induire l'acétylation des histones, empêchant l'expression de gènes nécessaires à l'apprentissage (Peleg et al., 2010). En accord avec cette idée, Kwapis et collaborateurs (2019) ont récemment montré que la transcription du gène *Nr4a2*, un facteur de transcription et un IEG impliqué dans la formation de la mémoire à long terme et la plasticité synaptique de l'hippocampe, n'était pas induite par l'apprentissage chez des rats âgés présentant des déficits cognitifs. Les auteurs ont identifié que cette répression génique était médiée par HDAC3 dans l'hippocampe des souris âgées (Kwapis et al., 2019).

Cibler les modifications épigénétiques liées au vieillissement

Ces déficits de mémoire à long terme peuvent être restaurés par l'administration d'inhibiteurs des HDACs comme le sodium butyrate ou le SAHA (Benito et al., 2015; Peleg et al., 2010; Reolon

et al., 2011; Singh & Thakur, 2018), par l'utilisation d'oligonucléotides antisens ciblant le gène *Hdac2* (*Singh & Thakur, 2018*) ou par la surexpression de certains gènes (e.g. *Nr4a2, Kwapis et al., 2019*). Une étude récente administrant le Cpd-60 de façon chronique par voie intrapéritonéale à des souris âgées, a montré une augmentation d'acétylation de H4K8 au niveau de leur cerveau (*Tammaro et al., 2024*). Les auteurs de cette étude ont réalisé une analyse par RNAseq du transcriptome cérébral, ce qui a permis d'identifier une diminution des processus de phosphorylation oxydative ainsi que des voies impliquées dans la maladie d'Alzheimer et dans la neurodégénérescence chez les souris traitées au Cpd-60 (*Tammaro et al., 2024*).

Le complexe répresseur SIN3A-HDACs dans le vieillissement

L'ensemble des études précédemment citées suggère que HDAC2 est fortement impliquée dans les processus de consolidation de la mémoire chez la souris adulte ainsi que dans le déclin cognitif lié à l'âge (*Guan et al., 2009; Palomer et al., 2016; Peleg et al., 2010; Singh & Thakur, 2018*). En ce qui concerne HDAC1, il semblerait qu'elle soit davantage impliquée dans le contexte du vieillissement. En effet, des souris KO pour HDAC1 au niveau des neurones et des astrocytes montrent un déclin cognitif lié à l'âge plus important que des souris contrôles du même âge (*Pao et al., 2020*). Cette délétion de HDAC1 est associée à une astrogliose et des déficits d'induction de la LTP hippocampique (*Pao et al., 2020*). Les auteurs de cette étude ont aussi montré chez ces souris, une diminution d'expression de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la transmission synaptique et les réponses antioxydantes. Ces altérations sont accompagnées d'une accumulation de lésions 8-oxoguanine à l'ADN, et notamment au niveau des promoteurs des gènes dont l'expression est affectée (*Pao et al., 2020*). Ces lésions à l'ADN ont aussi été retrouvées dans le cortex de l'humain âgé (*Lu et al., 2004*) et sont induites par les ROS (*Cadet et al., 2003*). D'après Pao et collaborateurs (2020), HDAC1 modulerait positivement l'activité de OGG1 (8-oxoG DNA glycosylase) engendrant ainsi un retrait des lésions 8-oxoguanine à l'ADN. HDAC1 aurait donc un rôle important dans la maintenance de l'intégrité du génome.

Bien que de nombreuses études se soient intéressées à l'acétylation des histones et aux HDACs au cours du vieillissement, assez peu se sont penchées sur SIN3A dans ce contexte. En effet, une seule publication rapporte l'absence de changement d'expression et de niveau protéique

de SIN3A dans l'hippocampe et le cortex frontal de rats âgés (Kyrylenko et al., 2000). D'autre part, la diminution de SIN3A chez la drosophile favorise leur sensibilité au stress oxydatif et diminue la longévité des individus (Barnes et al., 2014).

Néanmoins, REST, un autre partenaire du complexe SIN3A-HDACs, joue un rôle important dans les processus de neuroprotection lors du vieillissement. Comme mentionné précédemment (voir partie I.d. SIN3A), REST aussi appelé NRSF (Neuron-Restrictive Silencer Factor) permet de recruter le complexe SIN3A-HDACs au niveau de l'ADN, en ciblant les domaines RE1 aux régions régulatrices de gènes neuronaux (Schoenherr et al., 1996). Cette protéine agit notamment lors de la neurogenèse adulte en réprimant l'expression de gènes neuronaux et en maintenant le pool de cellules souches neurales, tout en régulant les étapes de différenciation (Gao et al., 2011). De plus, une perte de REST dans ces cellules engendrerait une perte de leur capacité neurogénique (Gao et al., 2011). Au cours du vieillissement, l'expression et les taux protéiques de REST augmentent dans les neurones du cortex préfrontal chez l'humain (Lu et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'augmentation de REST chez les individus âgés est associée à une augmentation de sa liaison au niveau des gènes impliqués dans la mort cellulaire et la maladie d'Alzheimer, suggérant qu'il permet une diminution de leur expression. REST promeut également l'expression de gènes impliqués dans la résistance au stress (e.g. catalase antioxydante et superoxyde dismutase). Par ailleurs, son taux protéique est négativement corrélé aux taux de H3K9ac, une marque épigénétique réduite par l'activité du complexe associé à REST. Enfin, REST présente une action neuroprotectrice. En effet, des neurones déplétés en REST soumis à un stress oxydatif montrent une augmentation d'expression de gènes pro-apoptotiques (Lu et al., 2014). Dans la même étude, des souris KO pour REST présentent une neurodégénérescence liée à l'âge, caractérisée par de l'apoptose et une perte neuronale corticale et hippocampique, plus importante que chez des souris sauvages du même âge. En lien avec le rôle de HDAC1, Lu et collaborateurs ont montré qu'une diminution de REST *in vitro* augmente les niveaux de ROS et les lésions 8-oxoguanine à l'ADN (Lu et al., 2014). Finalement, les taux de REST dans les neurones du cortex préfrontal et les neurones pyramidaux de la région CA1, sont positivement corrélés aux capacités cognitives et mnésiques des individus, de même qu'à leur longévité (Lu et al., 2014).

PROBLÉMATIQUES, HYPOTHÈSES & OBJECTIFS

II. PROBLÉMATIQUES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La plasticité synaptique et la mémoire à long terme nécessitent une transcription génique *de novo* lors du processus de consolidation. Les modifications épigénétiques et le remodelage de la chromatine sont des mécanismes moléculaires importants dans le changement d'expression des gènes. Les HDACs sont des enzymes clés pour réguler l'état de condensation de la chromatine et la transcription des gènes lors de la formation de la mémoire à long terme puisque leur inhibition engendre une amélioration de cette dernière en activant les gènes immédiats précoces et les gènes de plasticité. Ces HDACs sont recrutées par plusieurs complexes répresseurs et notamment par SIN3A. Le rôle de SIN3A dans la formation de la mémoire à long terme a été récemment étudié mais nous pouvons nous interroger sur son implication dans certains processus particuliers. Ainsi, nous avons choisi d'examiner son engagement dans la consolidation d'une mémoire contextuelle dépendante de l'hippocampe chez la souris adulte. Par ailleurs, le rôle des HDACs 1 et 2 a lui aussi été mis évidence dans les processus de mémoire, mais l'effet du Cpd-60 et de l'inhibition pharmacologique spécifique de ces enzymes n'a pas encore été étudié.

Dans ce contexte, notre objectif était de mettre au point et de valider un nouveau modèle murin permettant d'adresser le rôle de SIN3A dans la consolidation de la mémoire à long terme dépendante de l'hippocampe et d'étudier l'implication des HDACs 1 et 2, notamment recrutées par SIN3A, dans ce même processus de mémoire.

Notre hypothèse de travail est qu'une diminution de SIN3A ou une inhibition des HDACs 1 et 2, dans l'hippocampe dorsal au moment de la consolidation d'une mémoire contextuelle favoriserait l'acétylation des histones, conduisant à une augmentation d'expression des gènes immédiats précoces et de plasticité, ce qui aurait pour conséquence d'améliorer la consolidation et les performances mnésiques à long terme des souris.

Afin de tester l'hypothèse impliquant une diminution de SIN3A, nos objectifs étaient les suivants :

- i. **Développer le nouveau modèle murin déplété pour SIN3A et le valider au niveau transcriptionnel, protéique et comportemental.**

Il s'agit de vérifier que l'outil utilisé permet de diminuer l'expression de *Sin3a* ainsi que les taux de SIN3A dans les hippocampes dorsaux de souris adultes et que ces diminutions sont associées à des effets comportementaux dans un test de mémoire contextuelle.

- ii. Étudier les modifications des marques épigénétiques, notamment les changements d'acétylation des histones, ainsi que l'expression des gènes de plasticité au sein de l'hippocampe des souris déplétées pour SIN3A.
- iii. Étudier l'impact de la diminution de SIN3A sur les processus de plasticité synaptique (LTP et densité d'épines dendritiques dans la région CA1).

Malgré nos efforts, nous avons rencontré des difficultés techniques nous empêchant de valider totalement le modèle murin déplété pour SIN3A. Ces deux objectifs n'ont donc pas pu être réalisés lors de ce travail de thèse, mais ils nous auraient permis d'explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents aux effets comportementaux attendus dans le premier objectif.

Afin de vérifier notre hypothèse concernant l'inhibition des HDACs 1 et 2, nos objectifs étaient les suivants :

- i. Vérifier l'efficacité du Cpd-60 pour inhiber les HDACs 1 et 2 au niveau moléculaire et comportemental.

Il s'agit d'observer les changements d'acétylation des histones, induits suite à l'inhibition des HDACs 1 et 2, par le Cpd-60. L'impact de ces modifications sur l'expression des gènes de plasticité et les performances mnésiques des souris est également évalué.

- ii. Étudier l'impact de l'inhibition des HDACs 1 et 2 par le Cpd-60 sur les processus de plasticité synaptique (LTP et densité d'épines dendritiques dans la région CA1).

Cet objectif n'a pas pu être réalisé lors de ces travaux de thèse, mais il nous aurait permis d'investiguer les mécanismes cellulaires sous-jacents aux effets comportementaux attendus dans le premier objectif.

Notre objectif ultime était d'utiliser le modèle déplété pour SIN3A et le Cpd-60 afin d'étudier le rôle du complexe SIN3A-HDACs dans le déclin cognitif lié à l'âge dans le cadre d'un vieillissement sain.

Le vieillissement induit une augmentation de REST dans le cerveau des individus âgés. Notre hypothèse propose qu'avec l'âge, le complexe SIN3A-HDACs est davantage recrutés au niveau des gènes de plasticité, engendrant une répression transcriptionnelle plus importante par diminution de l'acétylation des histones et condensation de la chromatine, des gènes impliqués dans les mécanismes de plasticité synaptique induits par l'apprentissage. De ce fait, une diminution de SIN3A ou une inhibition des HDACs 1 et 2 devrait permettre de contrer, au moins partiellement, les altérations mnésiques liées au vieillissement. Afin de tester cette hypothèse, nous envisagions de conduire, chez des souris âgées, les mêmes objectifs que ceux précédemment énoncés. Cependant, ces objectifs n'ont pas pu être réalisés au cours de ces travaux de thèse notamment à cause des difficultés rencontrées pour la mise en place des modèles et outils utilisés.

MATÉRIELS & MÉTHODES

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

a. Autorisations à expérimenter

L'ensemble des protocoles expérimentaux utilisant des animaux de laboratoire est conforme aux directives européennes (2010/63/EU) et a été approuvé par le comité d'éthique local ainsi que le Ministère français de l'Éducation et de la Recherche (APAFIS #33345-2021071216003473 v5 ; #12342-2017082111489451 v6 et #12343-2017111516096417 v9).

b. Animaux

Les souris utilisées proviennent d'une reproduction maintenue dans l'animalerie du Centre de Biologie Intégrative (CBI, Toulouse). L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur des souris mâles et femelles C57Bl/6Jrj (JanvierLabs, France) âgées de 3-4 mois, hébergées en groupe de 5 individus maximum avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Les conditions d'hébergement sont constantes avec un cycle jour/nuit de 12h (7:30 – 19:30) et une température de 23°C.

c. Approches pharmacologiques et virales

Small interfering RNA (siRNA)

Les siRNA utilisés contre les transcrits de *Sin3a* (Ambion® by Life Technologies TM Silencer® Select, Cat#4390771, ID#s73783) présentent des séquences sens et antisens ciblant une portion de l'exon 16 (Tableau 4). Ils sont dilués dans de l'eau Nuclease-Free à une concentration de 50 µM. Les siRNA contrôles (Ambion® by Life TechnologiesTM Silencer® Select Negative Control No.1 siRNA, Cat# 4390843) sont dilués de la même manière.

siRNA Sin3a	UAGGUUCCUUGAGACGUAGtt CUACGUCUCAAGGAACCUAtt
-------------	--

Tableau 4. Séquences des siRNA Sin3a (5'-3').

Les siRNA ont été administrés par une infusion bilatérale intra-hippocampique via l'implantation de guides canules.

Lentivirus

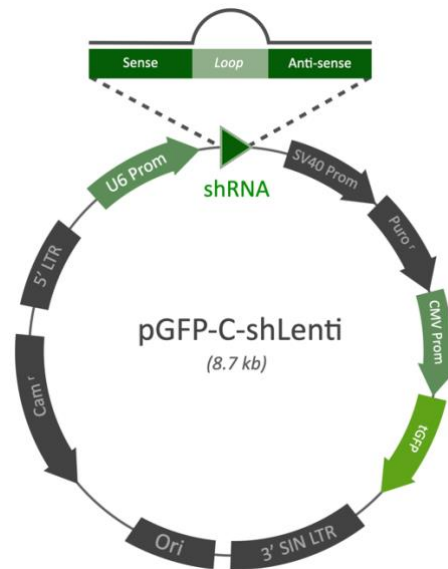


Figure 12. Construction utilisée dans les vecteurs lentiviraux (OriGene Technologies GmbH). Les shRNA (Sin3a ou Scr) sont exprimés sous contrôle du promoteur U6. La tGFP est exprimée sous contrôle du promoteur CMV.

Les lentivirus utilisés pour exprimer les shRNA (small hairpin RNA) (OriGene Technologies GmbH, Allemagne) sont dilués dans de l'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) à une concentration de 10^8 TU/mL. Ils expriment un shRNA dirigé contre les transcrits de *Sin3a* avec une séquence ciblant une portion de l'exon 17 ou un shRNA contrôle (Scrambled ou Scr) (Tableau 5). Les lentivirus permettent aussi l'expression de la turbo-GFP (tGFP) dans les cellules infectées.

shRNA Sin3a	TGGCAACATAGACTCATCACAGTATGAAG
shRNA Scr	GCACTACCAGAGCTAACTCAGATAGTACT

Tableau 5. Séquences des shRNA Sin3a ou Scr (5'-3').

Les lentivirus ont été administrés par une injection bilatérale intra-hippocampique.

Virus adénoassociés recombinant (rAAV)

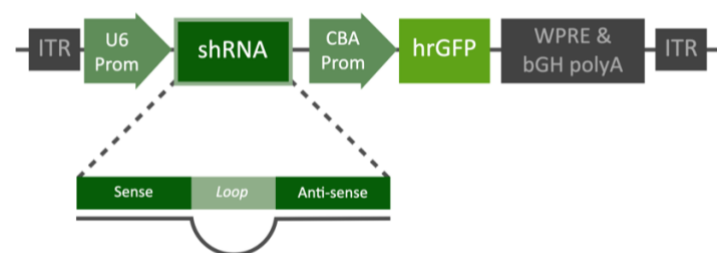


Figure 13. Construction utilisée dans les rAAV (Ana M.M. Oliveira & Janina Kupke). Les shRNA (Sin3a ou Scr) sont exprimés sous contrôle du promoteur U6. La hrGFP est exprimée sous contrôle du promoteur CBA.

Les 4 rAAV exprimant les shRNA ont été produits par l'équipe de notre collaboratrice Dr. Ana M. M. Oliveira au sein du Département de Neurobiologie du Centre Interdisciplinaire pour les Neurosciences (IZN, Université d'Heidelberg, Allemagne). Parmi ces 4 rAAV, 3 expriment un shRNA dirigé contre les transcrits de *Sin3a* (Tableau 6) et le dernier exprime une séquence contrôle. Ils sont dilués dans du PBS (Phosphate-Buffered Saline) pour obtenir une concentration de 10^9 p/μL.

shRNA Sin3a 1	TGGCAACATAGACTCATCACAGTATGAAG	Exon 17
shRNA Sin3a 2	GCTAAGATCTCTGTTAGATT	3'UTR
shRNA Sin3a 3	GACCAGGAATCACCAGTGTAT	Exon 3

Tableau 6. Séquences des shRNA Sin3a (5'-3') exprimés par les rAAV. Le shRNA Sin3a 1 présente la même séquence que le shRNA exprimé dans le vecteur lentiviral (voir partie précédente). La position des séquences sur le gène *Sin3a* est indiquée dans la colonne de droite.

Les rAAV ont été administrés par une injection bilatérale intra-hippocampique.

Composé-60 (Compound-60 ou Cpd-60 ou BRD6929)

Le composé-60 (Cpd-60 ou BRD6929) (Sigma-Aldrich, SML2521), un inhibiteur spécifique des HDACs 1 et 2 (*Schroeder et al., 2013*), a été administré dans une solution composée de 10% DMSO, 45% PEG 400 et 45% NaCl 0.9%, à une concentration de 45, 65, 85 mg/kg par voie intrapéritonéale ou 4.5 μg/μL par voie intra-hippocampique.

La solution véhicule, administrée aussi par voie intrapéritonéale ou intra-hippocampique, se compose de 10% DMSO, 45% PEG 400 et 45% NaCl 0.9%.

d. Implantation des guides canules et injections intra-hippocampiques des siRNA ou du Cpd-60

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane (Vetflurane, 1000 mg/g, Virbac Vnr137317) puis placées dans un appareil stéréotaxique où un anesthésique local (Laocaïne®, lidocaïne 0.32 mg/mL) leur est injecté par voie sous-cutanée au niveau de l'incision.

L'implantation de 2 guides canules (24 gauges, 7 mm de long) se fait au niveau des hippocampes dorsaux aux coordonnées suivantes : -1.8 mm antéro-postérieur ; ± 1.5 mm médio-latéral ; -1.3 mm dorso-ventral. Un casque en ciment dentaire (Duralay) est ensuite façonné en contact du crâne de la souris afin de maintenir les guides canules aux coordonnées souhaitées. À la fin de la chirurgie, chaque souris est injectée par voie intrapéritonéale avec un anti-inflammatoire non-stéroïdien (Métacam®, méloxicam 2 mg/mL). Cette injection est répétée le lendemain de la chirurgie. Une semaine après, les injections intra-hippocampiques peuvent être effectuées en plaçant les injecteurs dans les canules. Les solutions de siRNA ou de Cpd-60 (ou de son véhicule) sont délivrées à -2.5 mm en dorso-ventral à un débit de 0.5 μ L/min pendant 2 minutes où l'animal reste éveillé et libre de ses mouvements. L'injecteur est laissé en place pendant 1 minute après la fin de l'injection afin que la solution injectée puisse diffuser sans ressortir par les guides canules, avant d'être délicatement retiré.

e. Injections intra-hippocampiques des lentivirus et rAAV

Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane (Vetflurane, 1000 mg/g, Virbac Vnr137317) puis placées dans un appareil stéréotaxique où un anesthésique local (Laocaïne®, lidocaïne 0.32 mg/mL) leur est injecté par voie sous-cutanée au niveau de l'incision.

L'injection des lentivirus est réalisée avec une seringue Hamilton 1 μ L (Hamilton company, 76-3301) à un débit de 0.1 μ L/min aux coordonnées suivantes : -1.8 mm antéro-postérieur ; ± 1.5 mm médio-latéral ; -2 mm dorso-ventral. Chaque hippocampe reçoit 1 μ L de solution. À la fin de l'injection, la seringue est laissée en place 1 minute puis retirée délicatement.

Les injections des rAAV sont réalisées avec une seringue Hamilton 1 μ L (Hamilton company, 76-3301) à un débit de 0.2 μ L/min aux coordonnées suivantes : -1.85 mm antéro-postérieur ; ± 1.5 mm médio-latéral ; -2.3/-2 mm dorso-ventral. Chaque hippocampe reçoit 1 μ L de solution en 2 points d'injection de 0.5 μ L selon les 2 coordonnées dorso-ventrales.

Après la première injection à -2.3 mm en dorso-ventral, la seringue est laissée en place 3 minutes avant de remonter lentement au second point d'injection à -2 mm en dorso-ventral et de rester en place 5 minutes après la fin de cette deuxième injection.

À la fin de la chirurgie, chaque souris est injectée par voie intrapéritonéale avec un anti-inflammatoire non-stéroïdien (Métacam®, méloxicam 2 mg/mL). Cette injection est répétée le lendemain de la chirurgie.

f. Prélèvement des structures cérébrales

Afin de collecter les tissus cérébraux frais (hippocampes), les animaux sont mis à mort par dislocation cervicale puis décapitation. La dissection est effectuée sur la glace et les échantillons de tissus sont collectés dans des tubes secs puis congelés de façon rapide dans de l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

g. Perfusion intra-cardiaque

Afin de récupérer les cerveaux des souris pour les expériences d'immunohistochimie, les souris sont mises à mort par injection intrapéritonéale de 0.1 mL d'euthanasiant (Euthasol vet, Dechra) puis perfusées de façon intra-cardiaque à un débit de 20 mL/min avec du NaCl 0.9% à 4°C pendant 60 secondes puis avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du tampon phosphate (PB) 0.1M à 4°C pendant 7 minutes. Le cerveau est ensuite collecté et plongé dans une solution de PFA 4% pendant 24 heures avant d'être transféré dans une solution de sucrose 30% contenant de l'azide de sodium 0.1% pendant 48 heures minimum.

h. Dissociation cellulaire pour le tri cellulaire par cytométrie en flux

Ce protocole a été mis en place avec l'aide et les conseils de Virginie Marty, ingénieure de recherche dans l'équipe de Jérôme Cavaillé (MCD, CBI, Toulouse).

Suite aux dissections sur tissus frais, les hippocampes dorsaux ou ventraux sont placés à 4°C dans du PBS complété en glucose jusqu'au début de la dissociation cellulaire s'effectuant dans les 2 heures suivantes. Les tissus sont alors transférés dans du PBS auquel est ajouté de la papaïne (10 U/mL) puis ils sont laissés à incuber 20 minutes à 37°C. La solution de PBS-papaïne est ensuite retirée et remplacée par une solution d'inactivation de la papaïne (PBS-glucose ; 2% B27 ; DNase I à 125 U/ μ L) dans laquelle les tissus incubent

pendant 5 minutes à température ambiante. Les tissus cérébraux sont ensuite dissociés de façon mécanique par des allers-retours en utilisant des pipettes pasteurs. La solution résultante est ensuite filtrée sur tamis cellulaire de 40 µm puis sur coussin de BSA. Il s'agit de tampon FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) constitué de PBS, EDTA 0.5mM, BSA 5% et d'eau distillée, à laquelle est ajouté de la BSA (Bovine Serum Albumin) à une concentration de 80 mg/mL. La solution précédemment filtrée au tamis est ainsi déposée délicatement sur le coussin de BSA puis centrifugée 6 minutes à 120g. Les deux phases (la phase supérieure contenant la solution d'inactivation de la papaïne ainsi que des débris et la phase inférieure contenant le coussin de BSA et des débris) sont retirées et les cellules se situant dans le culot sont resuspendues dans du tampon FACS.

Les cellules dissociées ont ensuite été utilisées au sein de la plateforme technique Génotoul TRI Cytométrie et Tri cellulaire (I2MC, Toulouse) afin d'être triées par cytométrie en flux et de ne collecter que les cellules exprimant la GFP suite à l'injection des rAAV shRNA (*voir partie Résultats – Utilisation des rAAV exprimant un shRNA*). Le tri cellulaire a été réalisé par le Dr Alexia Zakaroff-Girard et le Dr Élodie Riant, respectivement responsable opérationnel et ingénieure de la plateforme.

Suite à ce tri, les cellules collectées ont été utilisées au sein de la plateforme technique We-Met (Inserm, Toulouse) pour réaliser un Western Blot capillaire et quantifier la protéine SIN3A. Ces expériences ont été supervisées par le Dr Alexandre Lucas et avec Corinne Bernis, respectivement responsable et assistante ingénieure de la plateforme.

i. Immunohistochimie anti-tGFP

Des coupes frontales de 50 µm d'épaisseur, sont réalisées à l'aide d'un microtome à congélation (Leica SM2010R Leica Biosystems, Nanterre, France) à partir des cerveaux précédemment collectés sur toute l'étendue rostro-caudale de l'hippocampe. Les coupes sériées sont placées dans des séries de 8 tubes contenant du cryoprotectant (Tris HCl ; Tris Base ; NaCl ; éthylène glycol ; glycérol) avant d'être conservées à -20°C.

Les coupes flottantes sériées (50 µm d'épaisseur ; espacées de 400 µm) sont lavées 3 fois dans du PBST pendant 10 minutes avant d'être incubées dans une solution de PBST contenant l'anticorps primaire de souris anti-tGFP (1/250, Origene TA150041S) toute la nuit sous agitation. Le lendemain, elles sont rincées 3 fois dans du PBST pendant 10 minutes puis incubées 2 heures dans une solution de PBST contenant l'anticorps

secondaire d'âne anti-souris (1/500, Alexa 488, Invitrogen A21202). Après un rinçage et une coloration au Hoechst (1/10000), les coupes sont montées sur lame et sous lamelle avec du Mowiol.

j. Extraction d'ARN et RT-qPCR

Extraction des ARN totaux

Les ARNs totaux sont extraits des tissus cérébraux précédemment collectés (*voir partie III.f Dissections*) en suivant les instructions du fabricant du RNeasy® Mini Kit (Qiagen, cat#74104). Brièvement, les tissus sont lysés dans un tampon de lyse et homogénéisés à l'aide d'un potter électrique (Argos Technologies A0001). La solution récupérée après centrifugation est transvasée dans des micro-colonnes permettant l'élimination des contaminants (ADN et protéines associées) grâce à plusieurs solutions d'éluion et pour ne collecter que les ARN totaux. Une purification à la DNase I est réalisée (DNA-free™ Kit DNase Treatment & Removal, Invitrogen Thermo Fisher Scientific, cat#AM1906) puis la quantité et la qualité des ARNs sont mesurées à l'aide du Nanodrop One (Thermo Scientific).

RT-qPCR

Les expériences de RT-qPCR sont réalisées dans l'objectif de quantifier l'expression de gènes d'intérêt avec l'utilisation d'amorces spécifiques.

La rétrotranscription des ARN en ADN complémentaire (ADNc) est effectuée à l'aide du Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, cat#K1652) selon les instructions du fabricant. Brièvement, des oligo(dT) sont ajoutés à 250 ng d'ARN totaux ainsi qu'un mix de dNTP puis la solution est chauffée 5 minutes à 65°C. La reverse transcriptase (RT) est ensuite ajoutée et les échantillons sont placés dans le thermocycleur (MyCycler, Bio-Rad) pour être chauffés 30 minutes à 50°C puis 5 minutes à 85°C.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative (qPCR) est réalisée en utilisant les amorces répertoriées (Sigma-Aldrich) (Tableau 7).

<i>Sin3a</i>	CACACATACCAGAAAGAACAG	<i>Grin2a</i>	AGTGACAAGAAGTTCCAGAG
	CAGGAAGTGTCCAAATTCAG		GTCATGTACTGGTGCATATAG
<i>Homer1</i>	CTCATGTCTTCCAGATTGAC	<i>Grin2b</i>	GTGGGATCACTAACTATCAATG
	ATTATTGCCTTTGAGCCATC		CACTGAATGGCTCTAAGAAG
<i>Cdk5</i>	GGGAGATCTGTCTACTCAAAG	<i>Hprt</i>	AGGGATTGAATCACGTTTG
	GAAGAGGAATGACTTCACAATC		TTTACTGGCAACATCAACAG
<i>Gria1</i>	GACAAGCTGAAAAGCAAATG		
	ACTGGTCTTGCCTTACTTC		

Tableau 7. Amorces (forward et reverse, orientation 5'-3') utilisées pour quantifier l'expression des gènes d'intérêt en RT-qPCR. *Sin3a*, co-répresseur transcriptionnel ; *Homer1*, protéine de densité post-synaptique ; *Cdk5*, kinase cycline-dépendante 5 ; *Gria1*, récepteur glutamatergique AMPA ; *Grin2a/b*, récepteur glutamatergique NMDA ; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransférase utilisé comme gène de référence

Dans une plaque 96 puits, 5 μ L soit 12.5 ng d'échantillons d'ADNc sont chargés accompagnés de 5 μ L d'un mix SYBR Green/amorces. Dans ce mix, les amorces forward et reverse du gène d'intérêt ont été mélangées à une concentration de 5 μ M puis avec le SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, cat#1725271) à raison de 4 μ L de SYBR par puit et 1 μ L de mélange d'amorces par puit. La plaque est ensuite placée dans le thermocycleur (CFX Connect™ Real-Time System, Bio-Rad) afin de subir 40 cycles d'amplification selon le protocole suivant : 30 secondes à 95°C suivi de 30 secondes à 60°C. Les données collectées par le Bio-Rad CFX Manager ont été analysées avec la méthode couramment utilisée du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Brièvement, le ΔCt représente la différence des cycles seuils entre le gène d'intérêt et le gène de référence (i.e. gène de ménage). Le $\Delta\Delta Ct$ est calculé en soustrayant le ΔCt du groupe contrôle à celui du groupe testé. Enfin, le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donne le fold change.

k. Extraction de protéines et Western Blots

Extraction des protéines totales

Les protéines observées sur les figures 18 et 20 (partie Résultats – Utilisation des siRNA) sont extraites avec du RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer) auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs des protéases. Après homogénéisation des tissus dans ce tampon et

une centrifugation de 30 minutes à 16000 rpm, le surnageant est collecté et conservé à -80°C.

Les protéines observées sur les figures 24, 28 et 30 (*partie Résultats – Utilisation des rAAV exprimant un shRNA ; Utilisation du Cpd-60 par voie intrapéritonéale/par voie intra-hippocampique*) sont extraites avec une solution de Laemmli (4X Laemmli Sample Buffer cat#161-0747 Bio-Rad) à laquelle est ajouté 2.5% de β -mercaptoethanol. Après homogénéisation des tissus dans ce tampon, les échantillons sont chauffés 5 minutes à 70°C. Ils subissent ensuite une sonication de 10 secondes à 40 d'amplitude. Après un chauffage à 90°C pendant 5 minutes, ils sont centrifugés 5 minutes à 13100 rpm et le surnageant est collecté pour être conservé à -80°C.

Avant d'être utilisées pour les Western Blots, les protéines sont quantifiées soit par la méthode de Bradford (*Bradford, 1976*) si extraites avec la solution de RIPA, soit grâce au kit RC DC (Bio-Rad, RC DC™ Protein Assay, cat#500-0119) selon les instructions du fabricant si extraites avec la solution de Laemmli.

Western Blots

Les expériences de Western Blot sont réalisées dans l'objectif de quantifier une protéine d'intérêt par l'utilisation d'anticorps spécifiques et en normalisant par rapport à une protéine contrôle produite de manière constitutive.

Les échantillons sont préparés de telle sorte que 20 μ L contiennent 15 μ g de protéines. Chaque échantillon est chargé dans un gel NuPAGE™ 10% Bis-Tris (1mmx12well Invitrogen Thermo Fisher Scientific, cat#NP0302BOX) pour une migration de 150 minutes à 100V dans un tampon de migration MES SDS (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, cat#NP0002). Les protéines sont ainsi séparées selon leur poids moléculaire.

Le transfert est effectué sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare Life Science, cat#10600002) et à l'aide du Transblot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) dans un tampon de transfert (10% Towbin Buffer 10X, 20% éthanol absolu, 70% eau distillée) à 4°C. Deux protocoles de transfert ont été utilisés : pour les protéines à haut poids moléculaire (e.g. SIN3A), le transfert dure 40 minutes à 15V tandis que pour les protéines de bas poids moléculaire (e.g. histones), le transfert dure 20 minutes à 15V.

La membrane est ensuite incubée dans une solution de blocage composé de TBS 1X (Tris Buffered Saline 10X, Bio-Rad #1706435), de 0.1% Tween 20 (TBST) et de 5% Bovine Serum

Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, #A7906) pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation.

Suite au blocage, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C sous agitation dans la solution d'anticorps primaires (TBST, 5% BSA) (Tableau 8). Le lendemain, 3 lavages de 10 minutes dans du TBST sont réalisés, suivi de 2 heures d'incubation à température ambiante et sous agitation dans la solution d'anticorps secondaires (TBST, 5% BSA) (Tableau 8) à l'abri de la lumière. Finalement, les membranes sont à nouveau rincées 3 fois pendant 10 minutes dans du TBST.

La révélation des bandes est effectuée à l'aide du ChemiDoc™MP Imaging system (Bio-Rad) et la quantification de celles-ci grâce au logiciel ImageJ où la valeur moyenne d'intensité de gris est mesurée pour chaque bande. Une normalisation avec la protéine de référence est ensuite faite pour chaque échantillon.

Anticorps primaires	SIN3A (lapin Millipore 06-913-l)	145 kDa	1 : 1000
	H3K9ac (lapin Sigma-Aldrich 07-352)	17 kDa	1 : 10000
	H4K12ac (lapin Active Motif 39928)	8 kDa	1 : 2000
	Lamine B1 (lapin Elabscience E-AB-40257)	67 kDa	1 : 1000
	H3 total (lapin Abcam ab1791)	17 kDa	1 : 10000
	H4 total (lapin Millipore 07-108)	8 kDa	1 : 1000
Anticorps secondaires	Anticorps de chèvre anti-lapin (IRDye 800CW, Li-Cor 926-32211)		1 : 10000

Tableau 8. Anticorps utilisés dans les expériences de Western Blot. Les facteurs de dilution pour chaque anticorps sont référencés dans la colonne de droite

I. Tests comportementaux

Chaque test comportemental est réalisé en début de journée (entre 8h et 14h). Les souris sont placées dans la salle du dispositif une heure avant le début de l'expérimentation afin de réduire l'impact du déplacement depuis la stabulation sur leur comportement. De plus, afin de limiter l'effet de la manipulation de l'expérimentateur sur le comportement des souris, chaque animal est manipulé et habitué aux mains, à la contention (si nécessaire) et à la prise par la queue, durant 4 minutes environ lors des 2 jours précédant les tests comportementaux.

Labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze, EPM)

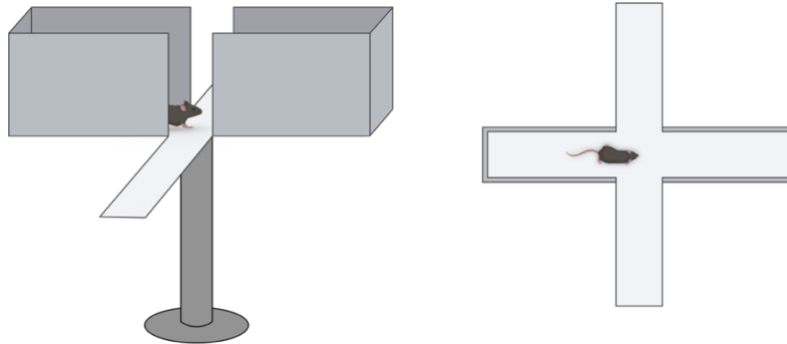


Figure 14. Dispositif du labyrinthe en croix surélevé. Vue de face à gauche, vue de dessus à droite.

Ce test permet d'évaluer le niveau d'anxiété des animaux en se basant sur leur préférence naturelle pour les espaces fermés et ombrés, qui sont considérés comme plus rassurants et moins anxiogènes que les espaces ouverts.

Le dispositif comportemental est constitué de 4 bras en croix, 2 ouverts (6x35 cm) et 2 fermés (5x35 cm) par des parois de 14.5 cm de haut, reliés par un carré central (5x5 cm). L'ensemble s'élève à 51 cm de hauteur. La luminosité de la pièce est maintenue à 25 lux pendant la durée du test. Le dispositif est nettoyé à l'eau distillée après chaque animal.

Lors du test, la souris est placée au centre du labyrinthe et laissée libre d'explorer le dispositif durant 5 minutes. Le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans chaque bras sont mesurés à l'aide du logiciel Ethoc (développé par Maud Combe, CRCA). Une souris qui passe plus de temps dans les bras fermés que sa congénère, sera considérée comme plus anxieuse.

Test de champ ouvert (Open Field, OF)

Ce test permet d'évaluer le niveau d'anxiété de l'individu ainsi que son activité locomotrice.

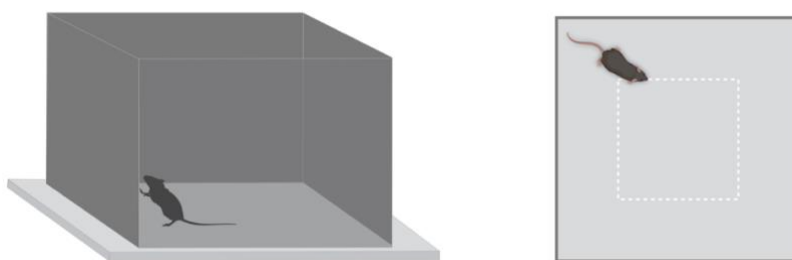


Figure 15. Dispositif du test de champ ouvert. Vue de face à gauche, vue de dessus à droite présentant la zone centrale virtuelle (zone en pointillés blancs) et la périphérie.

Le dispositif comportemental consiste en une arène carrée (46x46x40 cm) vide et exposée à une luminosité de 25 lux. Lors du test, la souris est placée au centre de l'arène et laissée libre d'explorer son environnement durant 10 minutes. L'arène est divisée en deux parties fictives : le centre (23x23 cm) et la périphérie (46x46 cm). Le dispositif est nettoyé à l'eau distillée après chaque animal.

Le temps passé au centre de l'arène et en périphérie ainsi que la distance parcourue et la vitesse de déplacement sont mesurés à l'aide du logiciel Ethovision (Noldus Tech, Pays-Bas). Une souris sera considérée comme plus anxieuse qu'une de ses congénères si elle passe davantage de temps en périphérie par rapport à l'autre.

Conditionnement de peur (Fear Conditioning, FC)

Ce test est utilisé afin de créer une mémoire chez les individus et d'évaluer leurs performances mnésiques à long terme.

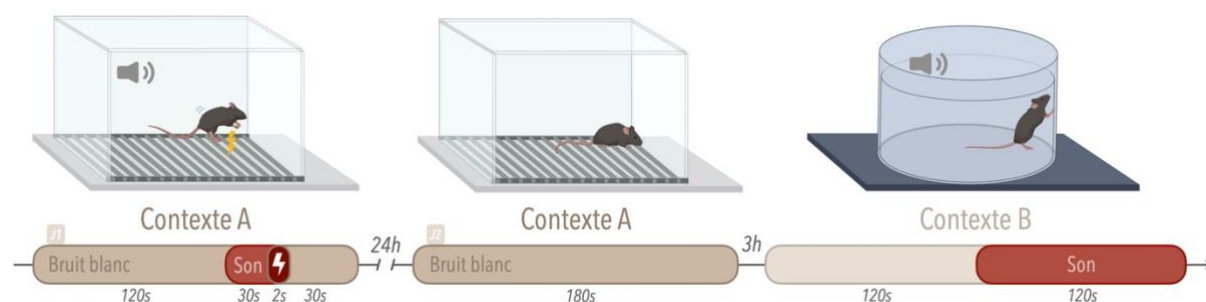


Figure 16. Dispositif et déroulement du protocole de conditionnement de peur.

Le dispositif comportemental se compose de 2 boîtes insérées dans une armoire insonorisée et constituant deux contextes différents (IMETRONIC, France).

Le contexte A correspond au contexte de conditionnement. Il s'agit d'une arène carrée (25x25x35 cm) en plexiglas transparent insérée dans une boîte aux parois blanches. Un pattern (21x29.7 cm) représentant des lignes noires verticales est affiché sur une des parois latérales de la boîte. Le plancher de l'arène est formé de barreaux métalliques afin que le choc électrique puisse être délivré aux pattes de la souris. La luminosité du dispositif est fixée à 43 lux. Un bruit blanc à 70 dB est émis dans ce contexte dès que la souris y est placée. Le dispositif est nettoyé à l'eau distillée après chaque animal.

Le contexte B est différent du contexte A. Il s'agit d'une arène ronde (24Øx35 cm) en plexiglas transparent insérée dans une boîte aux parois gris foncé, dont le plancher est constitué d'une plaque en plastique gris foncé mat. La luminosité est de 36 lux et aucun bruit blanc n'est émis dans ce contexte. Le dispositif est nettoyé à l'éthanol 30% après chaque animal.

Le premier jour correspond au conditionnement des souris. Les souris sont placées individuellement dans le contexte A qu'elles peuvent explorer librement durant 120 secondes. Un son (7 kHz, 70 dB) est alors émis durant 30 secondes et un choc électrique (2 secondes à 0.7 mA) est délivré aux pattes de l'animal après 148 secondes d'exploration. Le conditionnement se termine par 30 secondes d'exploration.

Le second jour ont lieu les tests de mémoire des souris. Afin d'évaluer la mémoire contextuelle dépendante de l'hippocampe, le premier test consiste à replacer la souris dans le contexte A (contexte de conditionnement mais sans l'émission du son) durant 3 minutes. Pour évaluer la mémoire dépendante de l'amygdale, un second test est réalisé 3h après le premier et consiste à placer la souris dans un nouveau contexte (contexte B) pendant 4 minutes avec l'émission du son lors des 2 dernières minutes.

À chaque fois que la souris est placée dans une arène du dispositif, un comportement de peur est mesuré : le freezing. Ce comportement, dont la durée est interprétée comme le niveau de mémoire de l'individu, correspond à une immobilisation de l'animal à l'exception des mouvements respiratoires.

L'émission du choc électrique, du son et du bruit blanc est programmée avec le logiciel Poly Fear (IMETRONIC, France) qui collecte aussi les données du temps de freezing de l'animal. Ce temps est mesuré grâce à des faisceaux infrarouges quadrillant les arènes et qui sont coupés par l'animal en mouvement. Un comportement de freezing est défini par l'absence de coupure des faisceaux durant plus de 1000 ms.

Notre protocole de conditionnement est dit « infra-liminaire » car il induit la formation d'une mémoire moins robuste qu'un protocole « classique » (i.e. application de 2 chocs électriques).

Test de localisation d'objet (Object Location task, OL)

Ce test est utilisé afin d'évaluer les performances de mémoire spatiale à long terme des souris.

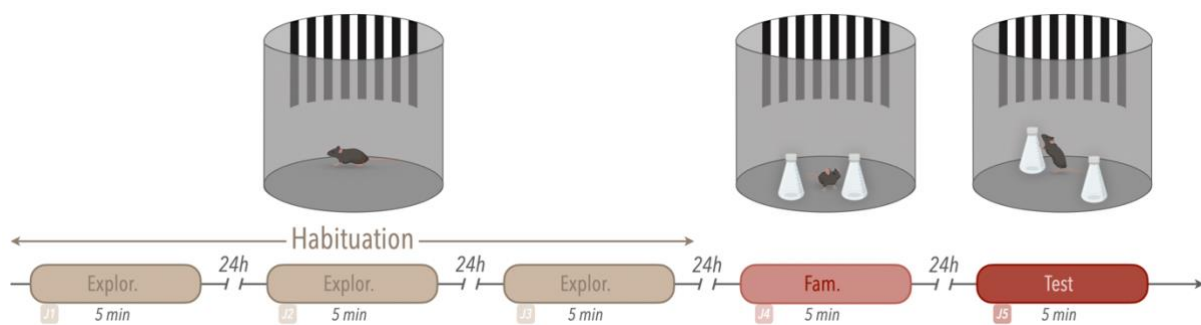


Figure 17. Dispositif et déroulement du test de localisation d'objet. *Explor*, phase d'exploration ; *Fam*, phase de familiarisation

Le dispositif comportemental se compose d'une arène ronde (39.5Øx29.5 cm) dans une pièce éclairée à 25 lux et contenant un pattern à rayures verticales blanches et noires sur la paroi. Le dispositif est nettoyé avec de l'éthanol 30% entre chaque animal. Ce test se déroule sur 5 jours consécutifs.

Lors des trois premiers jours correspondent à la phase d'habituation où l'animal est placé 5 minutes dans l'arène vide de tout objet et ses déplacements sont détectés à l'aide du logiciel Ethovision (Noldus Tech, Pays-Bas).

Le 4^{ème} jour a lieu la phase de familiarisation où deux objets identiques (erlenmeyers de 125 mL 6,5Øx13 cm Pyrex n°4980 Stopper n°5) sont positionnés, en face du pattern rayé et l'animal est remis dans l'arène pendant 5 minutes. Le temps d'exploration pour chaque objet est mesuré manuellement grâce au logiciel Ethoc. Suite à cela, un pourcentage de temps d'exploration pour chaque objet est calculé de la façon suivante :

$$\frac{\text{temps exploration objet 1}}{\text{temps exploration objet 1} + \text{objet 2}} \times 100$$

Cela nous permet de vérifier qu'il n'y a pas de préférence naturelle pour l'un des deux objets et que chaque animal explore de façon équivalente chaque objet.

Enfin, le 5^{ème} jour est la phase de test où l'un des deux objets est déplacé et la souris est à nouveau replacée dans l'arène pendant 5 minutes. Il s'agit alors de la phase de test. De la même façon que pour la phase de familiarisation, le temps d'exploration pour chaque objet est mesuré manuellement et le pourcentage de temps d'exploration pour chaque objet est calculé.

En se basant sur la néophilie naturelle des souris, le pourcentage de temps passé à explorer l'objet déplacé lors de la phase de test, est considéré comme un reflet de la mémoire à long terme des individus. Autrement dit, si une souris se souvient de l'agencement des objets lors de la familiarisation, elle explorera davantage l'objet déplacé que l'autre objet. On considère que la souris a mémorisé l'emplacement de l'objet si le pourcentage de temps d'exploration pour l'objet déplacé est supérieur et significativement différent de 50%.

Notre protocole est dit « infra-liminaire » car il induit la formation d'une mémoire moins robuste que pour un protocole « classique » (i.e. une phase d'habituation et une phase de familiarisation durant 10 minutes chacune).

m. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé en utilisant le logiciel GraphPad Prism (v10.1.1). Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. La normalité des données a été vérifiée en utilisant le test de Shapiro-Wilk influençant le choix des tests statistiques réalisés par la suite. Les comparaisons entre deux groupes ont été effectuées à l'aide du test de Student ou du test de Mann-Whitney. Les comparaisons entre 3 groupes ou plus ont été réalisées à l'aide de l'ANOVA à un facteur. L'effet de deux facteurs ainsi que de leur interaction a été testé par une ANOVA à deux facteurs ou une ANOVA à deux facteurs à mesures répétées. Les tests de comparaisons multiples (tests post-hoc) ont été réalisés seulement lorsque l'ANOVA était significative. Le seuil de significativité est fixé à 0.05. L'ensemble des résultats pour chaque test est résumé dans les tableaux en **Annexe 2**.

RÉSULTATS

IV. RÉSULTATS

a. Cibler SIN3A au moment de la consolidation de la mémoire

Dans le but d'examiner l'implication de SIN3A dans la consolidation d'une mémoire contextuelle, notre premier objectif était de développer un modèle de souris présentant une déplétion contrôlée dans le temps de la protéine SIN3A dans l'hippocampe dorsal. Pour ce faire, nous avons testé deux approches : l'injection intra-hippocampique de siRNA (small interfering RNA) ou de vecteurs viraux (lentivirus et rAAV) exprimant un shRNA (small hairpin RNA). Les siRNA et shRNA présentent soit des séquences contrôles (i.e. dirigé contre aucun des gènes exprimés chez la souris), soit des séquences dirigées contre les transcrits de *Sin3a*.

Utilisation des siRNA

Les siRNA (small interfering RNA ou petits ARN interférant) permettent de réguler l'expression des gènes par le phénomène d'interférence à l'ARN (*Dana et al., 2017*). Plus précisément, les siRNA forment un brin complémentaire sur une partie de l'ARN messager (ARNm) du gène ciblé. La formation d'un double brin d'ARN conduit à la dégradation de cet ARNm par le recrutement de différentes protéines et à l'impossibilité de synthétiser de nouvelles protéines codées par le gène ciblé. Les siRNA permettent donc de diminuer l'expression du gène d'intérêt (*Dana et al., 2017*). Dans notre cas, nous avons ciblé les transcrits de *Sin3a* afin de diminuer son expression et ainsi le niveau de protéine SIN3A.

Étudiant la consolidation d'une mémoire contextuelle, nous avons ciblé l'hippocampe dorsal des souris, requis pour la formation de ce type de mémoire (*Anagnostaras et al., 1999; Kim & Fanselow, 1992; Maren & Fanselow, 1997*). Pour cela, nous avons implanté des guides canules au niveau des hippocampes dorsaux des souris. Ceci nous permet d'injecter les siRNA au moment souhaité, à savoir lors de la consolidation mnésique juste après l'apprentissage, sans anesthésier l'animal. L'action temporaire et réversible des siRNA (*Han, 2018; Rao et al., 2009*) nous a paru comme un bon choix pour cette expérience. En effet, une seule dose étant injectée dans le cerveau des souris, la diminution d'expression devrait être transitoire puisque la transcription n'est pas inhibée et, une fois que le pool de siRNA couplé aux ARNm de *Sin3a* est dégradé, la traduction des nouveaux ARNm en protéine est à nouveau possible. Ainsi, les siRNA devaient nous permettre un contrôle spatial (restreint à l'hippocampe dorsal) et temporel (au moment de la consolidation mnésique) de la déplétion en SIN3A.

Nous avons commencé par étudier la cinétique d'action des siRNA afin de déterminer le moment post-injection où les taux de SIN3A seraient au plus bas et d'ajuster en fonction, le moment de l'apprentissage de la tâche de mémoire. Pour cela, des souris C57Bl/6Jrj âgées de 3 mois ont été implantées avec des guides canules. Sept jours plus tard, elles ont été injectées avec la solution de siRNA contrôle (siRNA Ctrl) ou de siRNA dirigés contre les transcrits de *Sin3a* (siRNA Sin3a) et sacrifiées à différents temps post-injection (24h, 48h, 96h, 7 jours, 15 jours et 30 jours) (Figure 18A). Les hippocampes bilatéraux dorsaux et ventraux ont été collectés puis les extractions d'ARN et de protéines ont été réalisées afin de quantifier les ARNm de *Sin3a* par RT-qPCR ainsi que la protéine SIN3A par Western Blot.

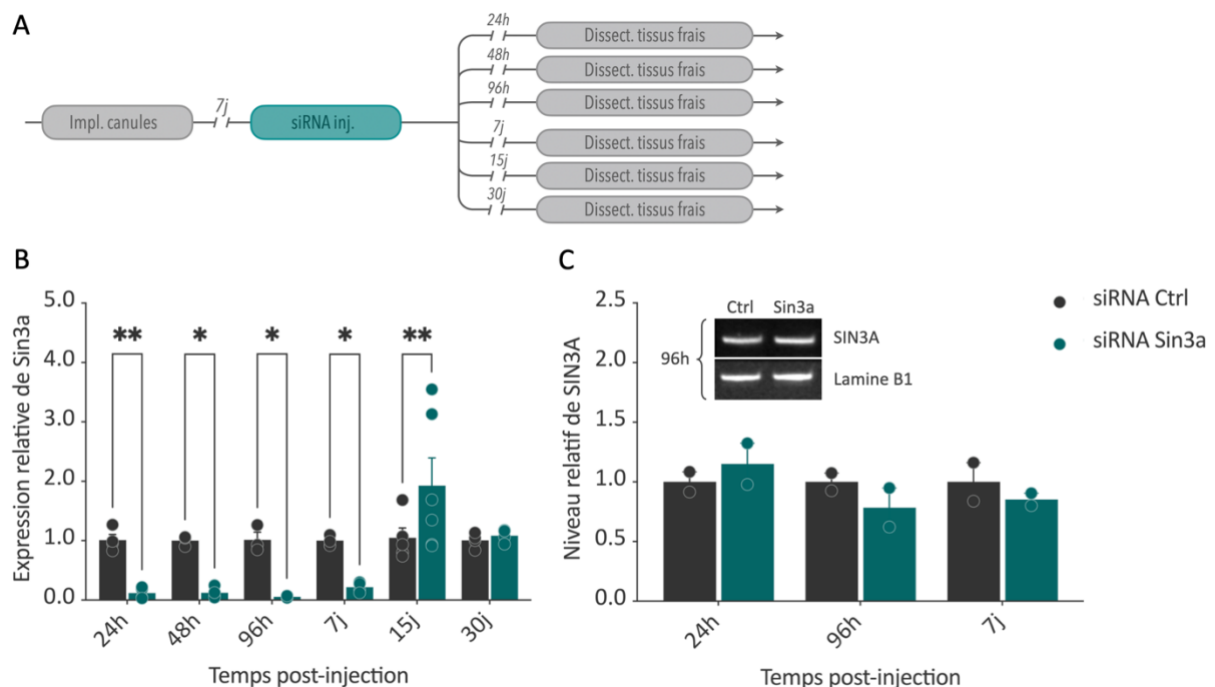


Figure 18. Cinétique d'action des siRNA Sin3a (lot#1 : ASO2F1RI) sur les transcrits de *Sin3a* et sur la protéine SIN3A. (A) Déroulement des expérimentations : implantation des canules suivi de l'injection des siRNA et de la dissection des tissus hippocampiques frais. (B) Expression relative de *Sin3a* dans les hippocampes dorsaux des souris injectées avec les siRNA Ctrl (n=3-4) ou Sin3a (n=3-6) à 24h, 48h, 96h, 7 jours, 15 jours ou 30 jours post-injection. (C) Niveau de relatif de SIN3A dans les hippocampes dorsaux des souris injectées avec les siRNA Ctrl (n=2) ou Sin3a (n=2) à 24h, 96h ou 7 jours post-injection.

Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Nous avons observé une diminution substantielle de la quantité d'ARNm de *Sin3a* dès 24h et jusqu'à 7 jours après l'injection des siRNA Sin3a par rapport aux siRNA Ctrl (Figure 18B : ANOVA à deux facteurs, effet traitement $F(1, 35)=9,601$, $p=0.0038$, effet temps $F(5, 35)=6.525$, $p=0.0002$, effet temps x traitement $F(5, 35)=6.058$, $p=0.0004$; comparaisons multiples 24h siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a, $p=0.0096$, 48h siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a, $p=0.0172$, 96h siRNA Ctrl

vs siRNA Sin3a, $p=0.0153$, 7j siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a, $p=0.0324$, 15j siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a, $p=0.0033$, 30j siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a, $p=0.8043$). Cependant, suite à des difficultés dans la mise en place des Westerns Blots et notamment la perte d'échantillons suite à une extraction défailante des protéines nucléaires et cytoplasmiques, nous n'avons pu observer la quantité de SIN3A que pour 2 individus seulement à 3 temps post-injection différents (Figure 18C). L'effectif trop faible obtenu pour chaque groupe ne nous a pas permis de conclure sur l'efficacité des siRNA à diminuer la quantité de SIN3A dans l'hippocampe dorsal *in vivo*.

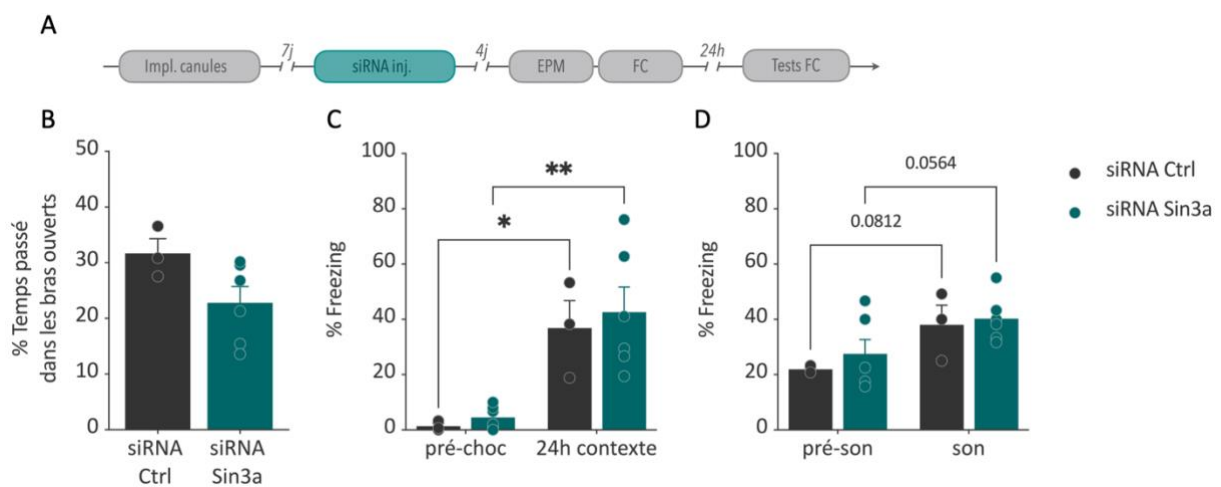


Figure 19. Effet des siRNA Sin3a (lot#1 : ASO2F1RI) sur le comportement anxieux et les performances de mémoire des souris. (A) Déroulement des expérimentations : implantation des canules suivi de l'injection des siRNA puis passage des souris dans le dispositif de labyrinthe en croix surélevé (EPM) et conditionnement de peur (FC) avant d'être testées le lendemain dans le contexte de conditionnement et dans le contexte modifié. (B) Pourcentage de temps passé dans les bras ouverts en EPM par les souris siRNA Ctrl (n=3) ou Sin3a (n=6). (C) Pourcentage de freezing exprimé par les souris lors du conditionnement avant le choc électrique (*pré-choc*) et le lendemain dans le contexte de conditionnement (*24h contexte*). (D) Pourcentage de freezing exprimé par les souris dans le contexte modifié avant (*pré-son*) et pendant (*son*) l'émission du son du conditionnement. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

En parallèle de la mise en place des Westerns Blots et suite aux résultats encourageants obtenus au niveau des transcrits de *Sin3a*, nous avons injecté un petit lot de souris avec les siRNA Ctrl (n=3) ou Sin3a (n=6), afin d'évaluer l'impact de l'injection des siRNA Sin3a sur le comportement basal et les performances mnésiques des animaux (Figure 19A). Le protocole de conditionnement utilisé est un protocole « infra-liminaire » ayant pour objectif de générer un faible niveau de mémoire chez les individus. Cela nous permet d'être sûrs de ne pas atteindre un plafond en terme de réponse comportementale (i.e. freezing) et d'être en mesure d'observer une amélioration de mémoire, selon nos hypothèses. Sur la base de l'étude de Srivas

et Thakur (2018), montrant une diminution de la protéine SIN3A à 96h post-injection, nous avons injecté les animaux et les avons testés 4 jours après.

L'injection des siRNA Sin3a ne semble pas affecter l'état d'anxiété des animaux puisque nous n'avons observé aucune différence entre les deux groupes pour le temps passé dans les bras ouverts en EPM (Figure 19B : test de Student non-apparié, $p=0.0969$). De plus, nous n'avons observé aucune différence entre le groupe contrôle et le groupe traité lors du conditionnement et des tests de mémoire. En effet, les souris siRNA Ctrl et siRNA Sin3a montrent un faible taux de freezing avant les chocs, qui augmente 24h après, lorsqu'elles sont replacées dans le contexte de conditionnement (Figure 19C : ANOVA à deux facteurs, effet traitement $F(1,7)=0.2892$, $p=0.6074$, effet temps $F(1,7)=30.49$, $p=0.0009$, effet temps x traitement $F(1,7)=0.03574$, $p=0.8554$). Cela montre que les deux groupes ont mémorisé l'association du choc électrique au contexte. D'autre part, en testant la mémoire des souris dans un contexte modifié, nous observons aussi une augmentation du pourcentage de freezing, similaire entre les deux groupes, lorsque le son du conditionnement est émis (Figure 10D : ANOVA à deux facteurs, effet traitement $F(1, 7)=0.5258$, $p=0.4919$, effet temps $F(1, 7)=8.883$, $p=0.0205$, effet temps x traitement $F(1, 7)=0.1183$, $p=0.741$). Ainsi, nos données indiquent que l'injection des siRNA n'altère pas les capacités de mémoire des souris et que l'injection des siRNA Sin3a, ne permet pas de faciliter la mise en place d'une mémoire à long terme.

Malheureusement, les résultats obtenus en Western Blot ne nous permettant pas de conclure sur l'efficacité des siRNA à diminuer les taux protéiques de SIN3A, et ayant épuisé le premier lot de siRNA Sin3a (lot#1 : ASO2F1RI) nous avons commandé et utilisé un second lot de siRNA (lot#2 : ASO2HRWU) dans l'objectif de répliquer l'expérience sur un second lot de souris (Figure 20A). En faisant cela, nous avons pour objectif d'expliquer l'absence d'effet du siRNA Sin3a dans le test de mémoire contextuelle. Autrement dit, nous avons émis l'hypothèse que nous n'observions pas d'amélioration de mémoire contextuelle car SIN3A n'est pas impliquée dans la consolidation de cette mémoire, ou car les taux de SIN3A dans les hippocampes dorsaux n'étaient pas affectés par les siRNA.

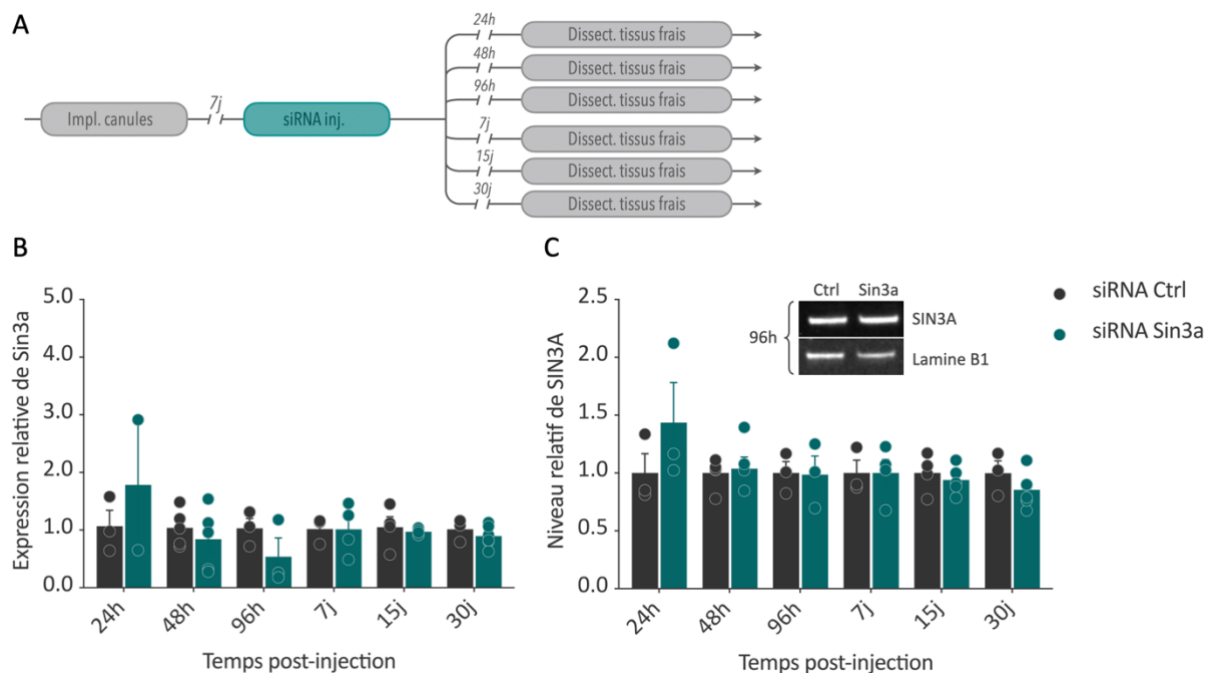


Figure 20. Cinétique d'action du deuxième lot de siRNA Sin3a (lot#2 : ASO2HRWU) sur les transcrits de *Sin3a* et sur SIN3A. (A) Déroulement des expérimentations : implantation des canules suivi de l'injection des siRNA et de la dissection des tissus hippocampiques frais. (B) Expression relative de *Sin3a* dans les hippocampes dorsaux des souris injectées avec les siRNA Ctrl (n=3-5) ou Sin3a (n=2-6) à 24h, 48h, 96h, 7 jours, 15 jours ou 30 jours post-injection. (C) Niveau de relatif de SIN3A dans les hippocampes dorsaux des souris injectées avec les siRNA Ctrl (n=3-5) ou Sin3a (n=3-6) à 24h, 96h ou 7 jours post-injection. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM.

Néanmoins, avec ce second lot de siRNA, nous n'avons pas répliqué les résultats obtenus avec le premier lot. En effet, nous n'avons observé aucune différence entre les quantités d'ARNm de *Sin3a* des souris traitées aux siRNA Ctrl et de celles traitées aux siRNA Sin3a (Figure 20B : ANOVA à deux facteurs, effet traitement $F(1, 34)=0.04342$, $p=0.8362$, effet temps $F(5, 34)=1.221$, $p=0.3208$, effet temps x traitement $F(5, 34)=1.069$, $p=0.3946$). Ceci est cohérent avec l'absence de différence des taux protéiques observée (Figure 20C : ANOVA à deux facteurs, effet traitement $F(1, 35)=0.3745$, $p=0.5445$, effet temps $F(5, 35)=1.208$, $p=0.3260$, effet temps x traitement $F(5, 35)=1.206$, $p=0.3268$). Finalement, dans l'objectif de vérifier qu'il ne s'agissait tout simplement pas d'un problème associé au second lot de siRNA par rapport au premier, nous avons réitéré l'expérience avec un troisième lot de siRNA (lot#3 : ASO2HTSQ) que nous avons injecté à un troisième lot de souris, et nous avons quantifié les ARNm de *Sin3a* à 96h post-injection (Figure 21A).

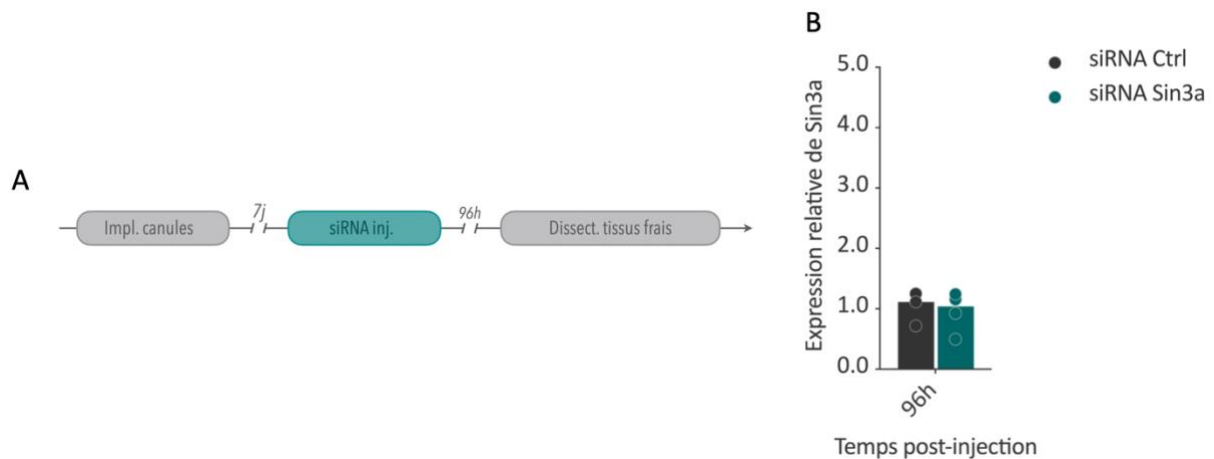


Figure 21. Effet du troisième lot de siRNA Sin3a (lot#3 : ASO2HTSQ) sur les transcrits de *Sin3a*. **(A)** Déroulement des expérimentations : implantation des canules suivi de l'injection des siRNA et de la dissection des tissus hippocampiques frais. **(B)** Expression relative de *Sin3a* dans les hippocampes dorsaux des souris injectées avec les siRNA Ctrl (n=3) ou Sin3a (n=4) à 96h post-injection. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM.

Cependant, avec ce troisième lot, nous n'avons observé aucune différence entre les quantités d'ARNm de *Sin3a* des souris siRNA Ctrl et des souris siRNA Sin3a (Figure 21B : test de Mann-Whitney, siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a, $p=0.4286$). Au vu de ces résultats, nous n'avons pas poursuivi les expériences et nous avons choisi de tester une autre approche pour diminuer l'expression de *Sin3a* : les virus exprimant des shRNA.

Utilisation des lentivirus exprimant un shRNA

Des discussions lors de mon comité de suivi de thèse ont orienté notre choix vers l'utilisation des lentivirus comme vecteur viral pour exprimer un shRNA d'intérêt dans les neurones. Les lentivirus ont une grande affinité pour les cellules neuronales et ont la capacité d'intégrer la séquence qu'ils transportent dans le génome de la cellule hôte, permettant ainsi une expression stable et durable de la séquence (Xu et al., 2020). De plus, grâce aux vecteurs viraux, il est possible d'exprimer une protéine rapportrice, ici la tGFP (turbo Green Fluorescent Protein) sous contrôle du promoteur CMV (CytoMégalo Virus), dans les cellules infectées, nous permettant d'observer la présence du virus dans la région d'intérêt.

Pour vérifier l'efficacité des lentivirus et leur cinétique d'action, nous avons injecté les lentivirus exprimant : soit un shRNA contrôle (shRNA Scrambled ou shRNA Scr), soit un shRNA dirigé contre les transcrits de *Sin3a* (shRNA Sin3a), directement dans les hippocampes dorsaux de souris C57Bl/6JRj de 3-4 mois. Ces souris ont ensuite été sacrifiées à différents temps post-

injection (2, 3 ou 4 semaines) et les transcrits de *Sin3a* ont été quantifiés par RT-qPCR dans leurs hippocampes dorsaux. Une partie des souris injectées a été perfusée pour collecter leurs cerveaux destinés à une immunohistochimie anti-tGFP ; ceci afin de déterminer la localisation et le nombre de cellules infectées dans les hippocampes dorsaux (Figure 22A).



Figure 22. Cinétique d'action du lentivirus shRNA *Sin3a* sur les transcrits de *Sin3a*. (A) Déroulement des expérimentations : injection des lentivirus shRNA puis dissection des tissus hippocampiques frais à différents temps post-injection. (B) Expression relative de *Sin3a* dans les hippocampes dorsaux des souris injectées avec les shRNA Scrambled (Scr) (n=4) ou *Sin3a* (n=4-5) à 2, 3 ou 4 semaines post-injection. (C) Images acquises au microscope à fluorescence de la diffusion du lentivirus au sein de l'hippocampe dorsal. À gauche, observation de la diffusion au niveau de la région CA1 de l'hippocampe dorsal (barre d'échelle : 100 μm). À droite, agrandissement de la zone délimitée en pointillés sur l'image de gauche. *Stratum oriens* (s.o.), *couche pyramidale* (pyr.), *stratum radiatum* (s.r.), *stratum lacunosum moleculare* (l.m.)
Les données sont représentées par la moyenne ± SEM.

Nous n'avons pas observé de diminution de la quantité de transcrits de *Sin3a* entre le groupe injecté avec les shRNA Scr et les groupes shRNA *Sin3a* quel que soit le temps post-injection (Figure 22B : ANOVA à un facteur, $F(3, 14)=1.121$, $p=0.3741$; test de Student Scr vs 2s, $p=0.1064$). Nos observations des coupes cérébrales après l'immunohistochimie anti-tGFP, suggèrent que les lentivirus diffusent très peu dans l'hippocampe des souris et infectent un nombre très limité de neurones (Figure 22C).

Au vu de ces résultats et de la diffusion limitée du lentivirus dans les hippocampes des souris, nous avons décidé d'utiliser une autre approche virale : les virus adénoassociés recombinant (rAAV).

Utilisation des rAAV exprimant un shRNA

Sur les conseils et grâce à une collaboration avec le Dr Ana M. M. Oliveira (Institut de Neurobiologie du Centre Interdisciplinaire pour les Neurosciences, IZN, Hiedelberg, Allemagne) et le Dr Janina Kupke (actuellement au Centre de Neurobiologie Moléculaire et Cellulaire, Université d'Amsterdam, Pays-Bas), nous avons choisi de tester les rAAV pour développer notre modèle.

Les rAAV sont des vecteurs viraux beaucoup plus petits que les lentivirus (20-25 nm vs 130-145 nm de diamètre) et qui, de ce fait, peuvent diffuser beaucoup plus largement dans des structures cérébrales où la densité cellulaire est élevée. Contrairement aux lentivirus, ils n'intègrent que très rarement la séquence qu'ils transportent dans le génome de la cellule hôte. Cela peut être considéré comme un avantage car, en fonction de la position d'insertion de la séquence, elle pourrait provoquer des dysfonctionnements au niveau cellulaire.

Nos collaboratrices nous ont fourni 4 rAAV : l'un d'eux exprimant un shRNA contrôle (shRNA Scrambled ou shRNA Scr) et les trois autres exprimant des shRNA différents mais ciblant les transcrits de *Sin3a* (shRNA Sin3a) sous le contrôle d'un promoteur U6. Les 4 rAAV expriment aussi la hrGFP (humanized Renilla reniformis Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur CBA (Chicken β Actin).

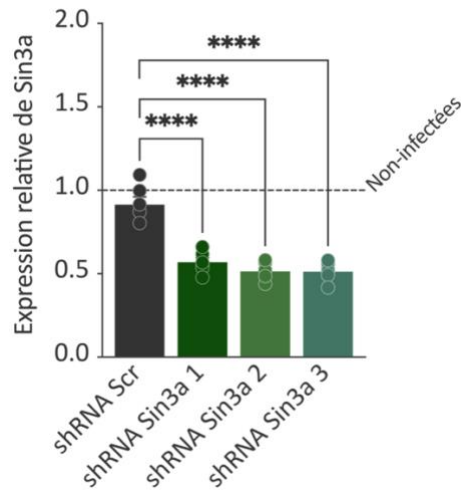


Figure 23. Validation *in vitro* de l'efficacité des rAAV shRNA Sin3a 1,2 et 3 à diminuer l'expression de *Sin3a* (données de Ana M.M. Oliveira et Janina Kupke). Les rAAV Scrambled (Scr) ou Sin3a 1, 2 et 3 ont été appliqués sur des cultures primaires d'hippocampe à DIV3 (days in vitro 3) puis les cellules ont été collectées à DIV10 pour quantifier l'expression de *Sin3a* par RT-qPCR. L'expression de *Sin3a* dans les cellules infectées par les rAAV a été normalisée par rapport à son expression dans des cellules non-infectées (trait pointillé). Les données sont représentées par la moyenne ± SEM, **** $p < 0.0001$.

Les 3 rAAV shRNA Sin3a ont été validés *in vitro* par nos collaboratrices qui ont montré une diminution allant jusqu'à 50% de la quantité de transcrits *Sin3a* par rapport au rAAV shRNA Scr (Figure 23 : ANOVA à un facteur, $F(3, 20) = 38.32$, $p < 0.0001$; comparaisons multiples shRNA Scr vs shRNA Sin3a 1, $p < 0.0001$, shRNA Scr vs shRNA Sin3a 2, $p < 0.0001$, shRNA Scr vs shRNA Sin3a 3, $p < 0.0001$).

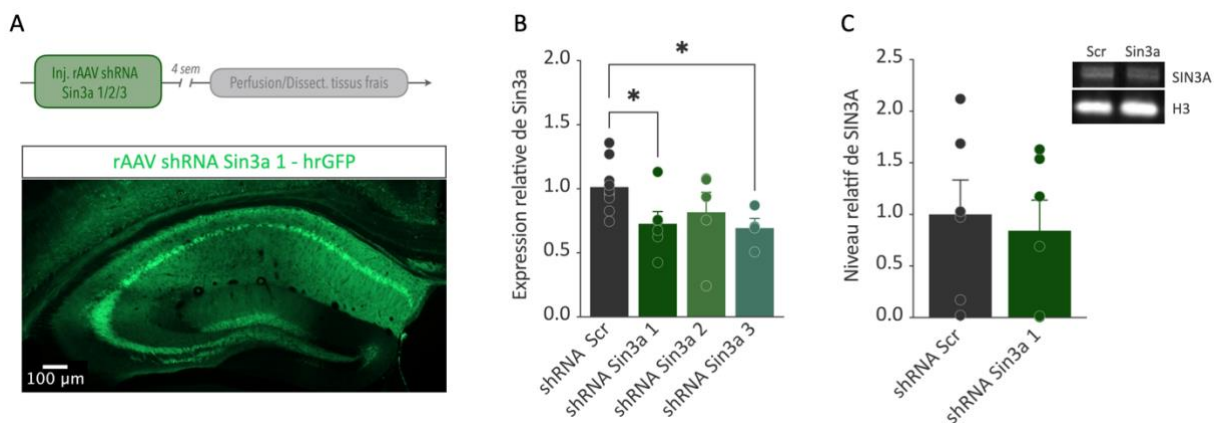


Figure 24. Effet des rAAV shRNA Sin3a sur l'expression de *Sin3a* et les taux protéiques de SIN3A dans l'hippocampe dorsal. (A) Déroulement des expérimentations : injection des rAAV shRNA puis perfusion intracardiacque ou dissection des tissus frais. Image acquise au microscope à fluorescence au niveau de l'hippocampe dorsal. (B) Expression relative de *Sin3a* dans l'hippocampe dorsal des souris injectées avec les rAAV shRNA Scrambled (Scr) ($n = 10$) ou Sin3a ($n = 4-6$) 1, 2 et 3. (C) Niveau relatif de SIN3A dans l'hippocampe dorsal des souris injectée avec les shRNA Scr ($n = 6$) ou Sin3a 1 ($n = 6$). Les données sont représentées par la moyenne ± SEM, * $p < 0.05$

Nous avons testé l'efficacité des 3 shRNA Sin3a *in vivo* (concentration 10^9 p/μL) en les injectant dans les hippocampes de souris C57Bl/6JRj de 3-4 mois. Ces souris ont été sacrifiées 4 semaines après afin de collecter les structures cérébrales et de mesurer la quantité d'ARNm *Sin3a* par RT-qPCR (Figure 24A). Nous avons observé une bonne diffusion du virus au sein de la formation hippocampique avec un nombre important de cellules infectées (Figure 24A) en comparaison avec l'approche lentivirale précédente (Figure 22C – Utilisation des lentivirus exprimant un shRNA). De plus, nous avons observé une diminution significative, bien que faible (~30%) de la quantité de transcrite *Sin3a* pour les shRNA Sin3a 1 et 3 (Figure 24B : ANOVA à un facteur, $F(2, 17)=6.003$, $p=0.0107$; comparaisons multiples shRNA Scr vs shRNA Sin3a 1, $p=0.0207$, shRNA Scr vs shRNA Sin3a 3, $p=0.0245$).

Les Western Blots réalisés sur les hippocampes des souris injectées avec le shRNA Sin3a 1 ne nous ont pas permis d'observer un changement de quantité de la protéine SIN3A (Figure 24C : test de Student non-apparié, $p=0.7316$).

Néanmoins, suite aux résultats encourageants observés sur les transcrits de *Sin3a*, nous avons testé les performances mnésiques de souris injectées, dans deux tests de mémoire : le conditionnement de peur et le test de localisation d'objet. Pour ces expériences, nous avons choisi d'utiliser le shRNA Sin3a 1 qui comporte la même séquence que le shRNA utilisé dans le vecteur lentiviral. Par ailleurs, à cause d'une certaine toxicité sur les cultures cellulaires *in vitro*, rapportée par nos collaboratrices et observée *in vivo* (diminution de l'épaisseur de la couche pyramidale du CA1) du virus employé à une concentration de 10^9 p/μL, les expériences suivantes ont été réalisées avec une concentration virale de 10^8 p/μL.

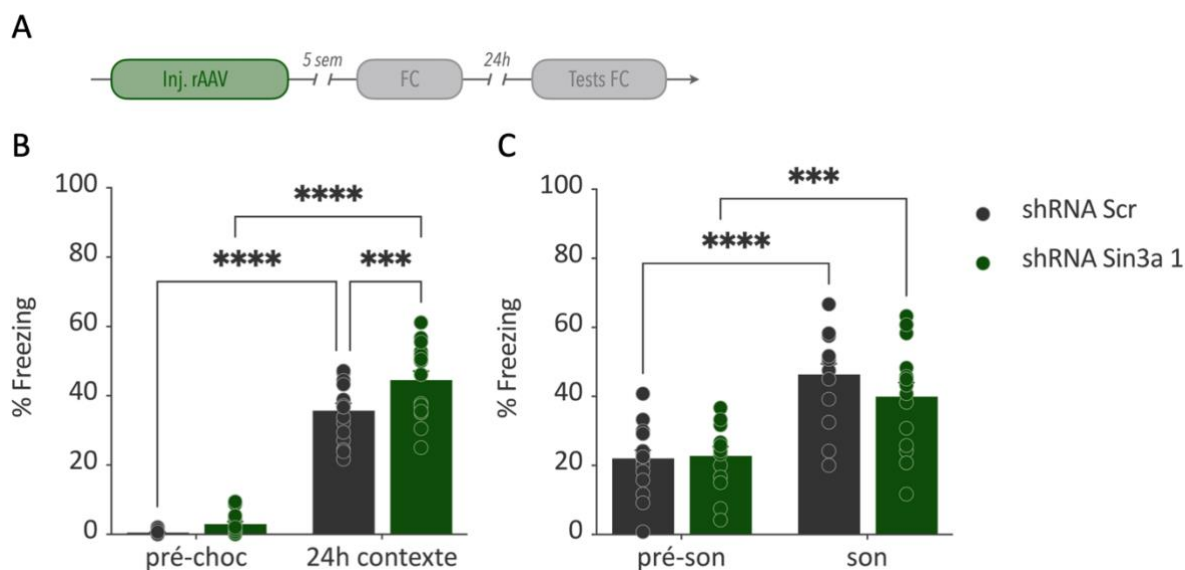


Figure 25. Effet de l'injection du shRNA Sin3a 1 sur les performances de mémoire à long terme en conditionnement de peur. (A) Déroulement des expérimentations : injection des rAAV shRNA puis conditionnement de peur et tests dans le contexte de conditionnement et dans un contexte modifié. (B) Pourcentage de freezing exprimé par les souris injectées avec les shRNA Scr (n=16) ou Sin3a (n=16) lors du conditionnement avant le choc électrique (*pré-choc*) et le lendemain dans le contexte de conditionnement (*24h contexte*). (C) Pourcentage de freezing exprimé par les souris dans le contexte modifié avant (*pré-son*) et pendant (*son*) l'émission du son du conditionnement.

Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

Les deux premiers lots d'animaux ont été testés dans le conditionnement de peur, 5 semaines après l'injection (Figure 25A). Tout d'abord, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de freezing entre la phase précédant le choc électrique et le test dans le contexte de conditionnement 24h après (Figure 25B : ANOVA à deux facteurs, effet temps $F(1, 30) = 514.9$, $p < 0.0001$; comparaisons multiples shRNA Scr pré-choc vs 24h contexte, $p < 0.0001$, shRNA Sin3a pré-choc vs 24h contexte, $p < 0.0001$). Ainsi, les deux groupes de souris ont appris l'association du contexte de conditionnement au choc électrique. De plus, nous avons observé un pourcentage de freezing à 24h plus élevé pour les souris ayant reçu le shRNA Sin3a par rapport aux animaux contrôles (Figure 25B : ANOVA à deux facteurs, effet traitement $F(1, 30) = 9.837$, $p = 0.0038$; comparaisons multiples pré-choc shRNA Scr vs shRNA Sin3a, $p = 0.3248$, 24h contexte shRNA Scr vs shRNA Sin3a, $p = 0.0007$). Ainsi, les souris shRNA Sin3a semblent avoir une meilleure mémoire contextuelle à long terme. La mémoire associative des animaux, dans un autre contexte que celui du conditionnement mais avec l'émission du son du conditionnement a aussi été testée, 3h après la mémoire contextuelle. Nous avons alors observé une augmentation du pourcentage de freezing pour les deux groupes lors de l'émission du son du conditionnement (Figure 25C : ANOVA à deux facteurs, effet temps $F(1, 30) = 58.68$,

$p < 0.0001$; comparaisons multiples shRNA Scr pré-son vs son, $p < 0.0001$, shRNA Sin3a pré-son vs son, $p = 0.0001$). Cela signifie que les souris ont appris l'association du choc électrique avec le son émis au même moment. Cependant, aucune différence entre les deux traitements n'a été observée (Figure 25C : ANOVA à deux facteurs, effet traitement $F(1,30) = 0.6717$, $p = 0.4189$) signifiant que le shRNA Sin3a n'améliore pas cette mémoire amygdalo-dépendante.

Le troisième lot de souris a été soumis au test de localisation d'objet (Figure 26A) selon un protocole « infra-liminaire » permettant d'observer une amélioration de la mémoire comme attendue selon nos hypothèses.

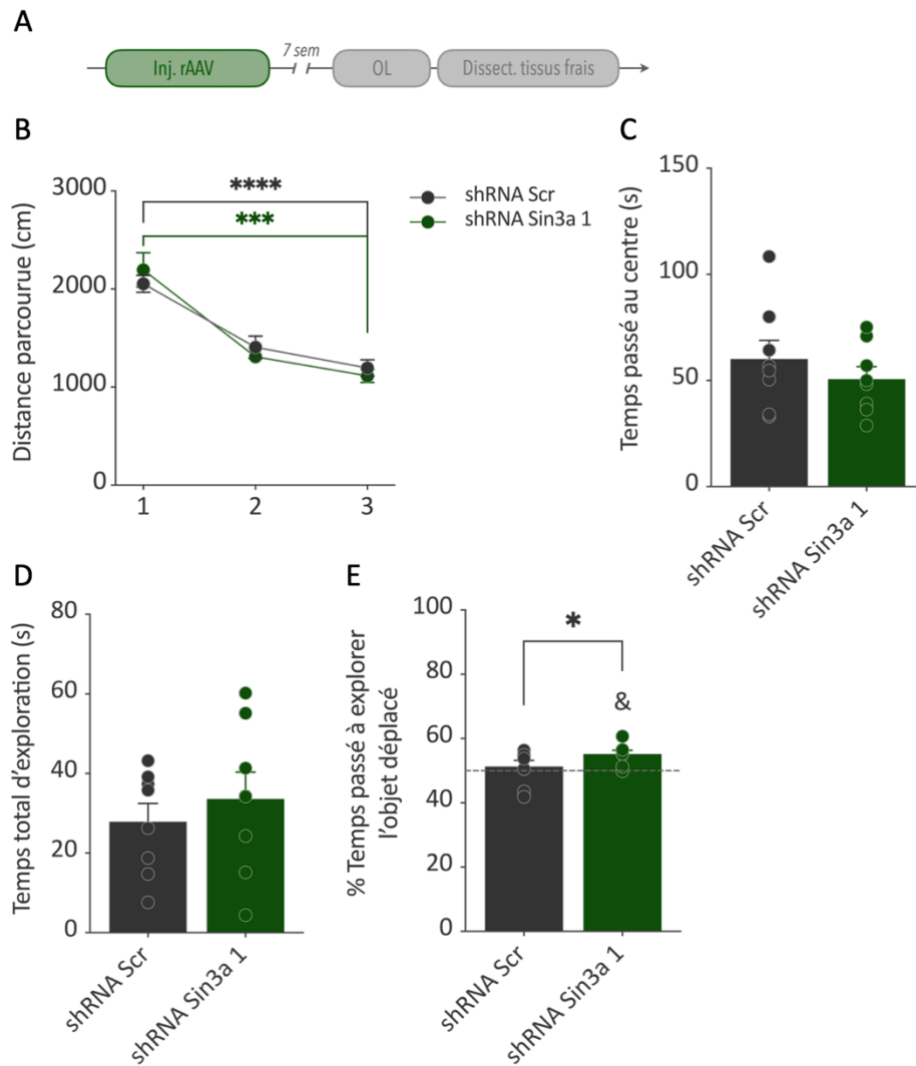


Figure 26. Effet de l'injection du shRNA Sin3a 1 sur les performances de mémoire à long terme en test de localisation d'objet. (A) Déroulement des expérimentations : injection des rAAV shRNA puis test de localisation d'objet sur 5 jours et enfin dissection des tissus hippocampiques frais. (B) Distance parcourue par les souris injectées avec les shRNA Scr (n=8) ou Sin3a (n=8) lors des 3 sessions d'habituation. ***p<0.001, ****p<0.0001. (C) Temps passé par les souris au centre de l'arène lors de la première session d'habituation. (D) Temps total d'exploration des objets lors de la phase de familiarisation. (E) Pourcentage de temps passé à explorer l'objet déplacé lors du test de mémoire à long terme. *p<0.05 shRNA Scr vs shRNA Sin3a 1, & p<0.05 shRNA Sin3a 1 vs 50%.

Les données sont représentées par la moyenne ± SEM.

Lors de la phase d'habituation, nous avons observé une diminution de la distance parcourue par les deux groupes d'animaux au cours des sessions, sans effet du traitement (Figure 26B : ANOVA à deux facteurs, effet session $F(1.459,20.42)=79.46$, $p<0.0001$, effet traitement $F(1,14)=0.0111$, $p=0.9176$, effet session x traitement $F(2,28)=1.340$, $p=0.2781$; comparaisons multiples shRNA Scr session 1 vs session 2, $p=0.0006$, shRNA Sin3a session 1 vs session 2, $p=0.0006$, shRNA Scr session 1 vs session 3, $p<0.0001$, shRNA Sin3a session 1 vs session 3, $p=0.0004$, shRNA Scr session 2 vs session 3, $p=0.0176$, shRNA Sin3a session 2 vs session 3,

p=0.0362). Cette diminution d'activité locomotrice au cours des sessions montre que les souris explorent de moins en moins et donc s'habituent à l'arène. De plus, le temps passé au centre de l'arène lors de la première session d'habituation, ne diffère pas entre les shRNA Scr et les shRNA Sin3a (**Figure 26C** : test de Student non-apparié, p=0.3807). Ainsi, l'injection des siRNA Sin3a n'affecte pas l'activité locomotrice ni les comportements de type anxieux des souris. Par ailleurs, les souris ont exploré de façon équivalente les objets lors de la phase de familiarisation (**Figure 26D** : test de Student non-apparié, p=0.4886). Enfin, lors de la phase de test, nous avons observé que les souris shRNA Sin3a exploraient davantage l'objet déplacé que les souris shRNA Scr, et que ce pourcentage d'exploration était différent du niveau de chance (50%) (**Figure 26E** : test de Mann-Whitney, shRNA Scr vs shRNA Sin3a, p=0.0499 ; test de Wilcoxon, shRNA Scr vs 50%, p=0.7422, shRNA Sin3a vs 50%, p=0.0156). Ainsi, nos données indiquent que les souris shRNA Sin3a ont mémorisé l'emplacement de l'objet contrairement aux souris contrôles.

Pour résumer, nos résultats suggèrent que l'injection de rAAV exprimant le shRNA Sin3a permet une facilitation de la mémoire contextuelle et spatiale à long terme, dépendante de l'hippocampe.

Les souris du troisième lot ont finalement été sacrifiées afin de rechercher l'effet du vecteur viral sur les taux protéiques de SIN3A pouvant expliquer les effets comportementaux observés chez les souris shRNA Sin3a. Dans l'objectif d'examiner les taux de SIN3A uniquement dans les cellules infectées marquées avec la GFP, nous avons fait appel à la plateforme technique Génotoul TRI Cytométrie et Tri cellulaire (I2MC, Toulouse). Après dissociation des cellules hippocampiques des souris injectées avec les rAAV, un tri cellulaire a été réalisé par cytométrie en flux pour collecter les cellules GFP⁺. Nous avons alors observé que la quantité de cellules GFP⁺ dans l'hippocampe dorsal est doublée par rapport à l'hippocampe pour les shRNA Scr ou Sin3a (**Figure 27A** : ANOVA à deux facteurs, effet région de l'hippocampe F(1,20)=29.52, p<0.0001, effet traitement F(1,20)=3.181, p=0.0897, effet régions de l'hippocampe x traitement F(1,20)=0.7022, p=0.4119 ; comparaisons multiples shRNA Scr dorsal vs ventral, p=0.0003, shRNA Sin3a dorsal vs ventral, p=0.004) confirmant la bonne position de l'injection.

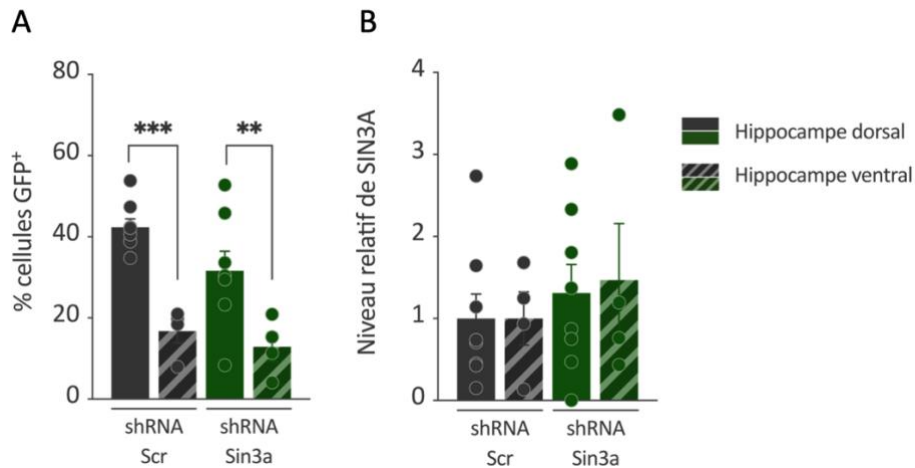


Figure 27. Effet des shRNA sur la quantité de SIN3A dans les cellules infectées par les rAAV. (A) Pourcentage de cellules triées par cytométrie en flux exprimant la GFP dans les hippocampes dorsaux (n=8) et ventraux (n=4) des souris injectées avec les shRNA Scr ou Sin3a. (B) Niveau relatif de SIN3A dans les cellules des hippocampes dorsaux et ventraux, précédemment triées par cytométrie et exprimant la GFP. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, **p<0.01, ***p<0.001.

Les cellules GFP⁺ collectées suite au tri ont ensuite été utilisées pour un Western Blot capillaire au sein de la plateforme We-Met (Inserm, Toulouse). Cette technique permet d'utiliser des échantillons possédant une très faible concentration en protéine, ce qui était le cas de nos échantillons contenant les cellules collectées. Cependant, nos données n'ont montré aucune diminution de la quantité de SIN3A dans les cellules infectées par le rAAV shRNA Sin3a (Figure 27B : ANOVA à deux facteurs, effet région de l'hippocampe $F(1,20)=0.03557$, $p=0.8523$, effet traitement $F(1,20)=0.8707$, $p=0.3619$, effet traitement x région de l'hippocampe $F(1,20)=0.03557$, $p=0.8523$).

Suite aux difficultés rencontrées pour valider le modèle murin déplété en SIN3A sur le plan protéique et au vu du temps restant, nous avons décidé de cesser les essais sur ce projet.

b. Cibler les HDACs 1 et 2 au moment de la consolidation de la mémoire contextuelle

En parallèle des expérimentations sur SIN3A, nous avons ciblé la deuxième entité du complexe répresseur d'intérêt : les HDACs 1 et 2. Toujours dans l'objectif d'étudier le rôle de ce complexe dans la consolidation d'une mémoire à long terme hippocampo-dépendante, nous avons cherché à inhiber de façon spécifique les HDACs 1 et 2, recrutées par SIN3A. Pour cela nous

avons utilisé le composé 60 (Cpd-60), un inhibiteur spécifique des HDACs 1 et 2 (*Schroeder et al., 2013*), administré en traitement aigu immédiatement après un conditionnement de peur.

Utilisation du Cpd-60 par voie intrapéritonéale

Dans un premier temps, nous avons administré le Cpd-60 par voie intra-péritonéale. Dans l'objectif de vérifier l'efficacité de ce composé, nous avons injecté différentes doses (45, 65 ou 85 mg/kg) aux souris, puis les avons sacrifiées 1h après afin de collecter les hippocampes et observer les modifications d'acétylation des histones H3 et H4 dues au Cpd-60 (**Figure 28A**). En effet, l'inhibition des HDACs 1 et 2 devait engendrer une augmentation des taux d'acétylation des lysines 9 et 12 pour les histones H3 (H3K9ac) et H4 (H4K12ac) respectivement (*Schroeder et al., 2013*).

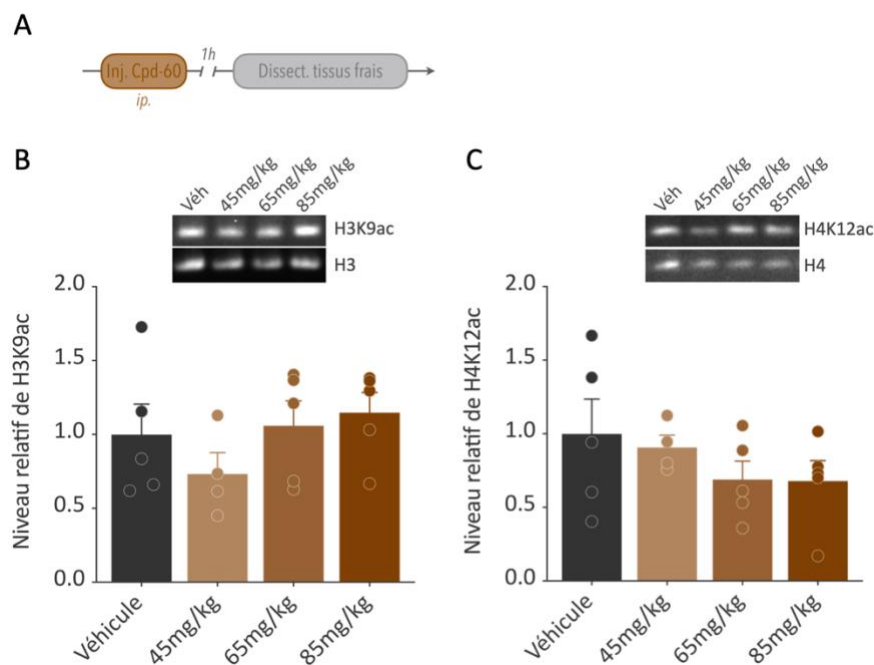


Figure 28. Effet d'une injection aiguë intrapéritonéale (*ip.*) de différentes doses de Cpd-60 sur l'acétylation des histones H3 et H4 dans l'hippocampe dorsal des souris. (A) Déroulement des expérimentations : injection de Cpd-60 à 45, 65 ou 85 mg/kg et dissection des tissus hippocampiques frais. (B) Niveau relatif de H3K9ac dans l'hippocampe dorsal des souris injectées avec le véhicule (Véh) (n=5) ou différentes doses de Cpd-60 (45, 65 ou 85 mg/kg) (n=4-5). (C) Niveau relatif de H4K12ac dans l'hippocampe dorsal des souris injectées avec le véhicule (Véh) ou différentes doses de Cpd-60 (45, 65 ou 85 mg/kg). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM.

Or, nous avons observé que l'injection intrapéritonéale de Cpd-60 en dose unique, ne modifiait pas les niveaux de H3K9ac et de H4K12ac dans l'hippocampe dorsal et ce, indépendamment de la dose injectée (**Figure 28B** : ANOVA à un facteur $F(3,15)=1.019$, $p=0.4121$; **Figure 28C** ANOVA à un facteur $F(3,15)=0.9955$, $p=0.4218$)

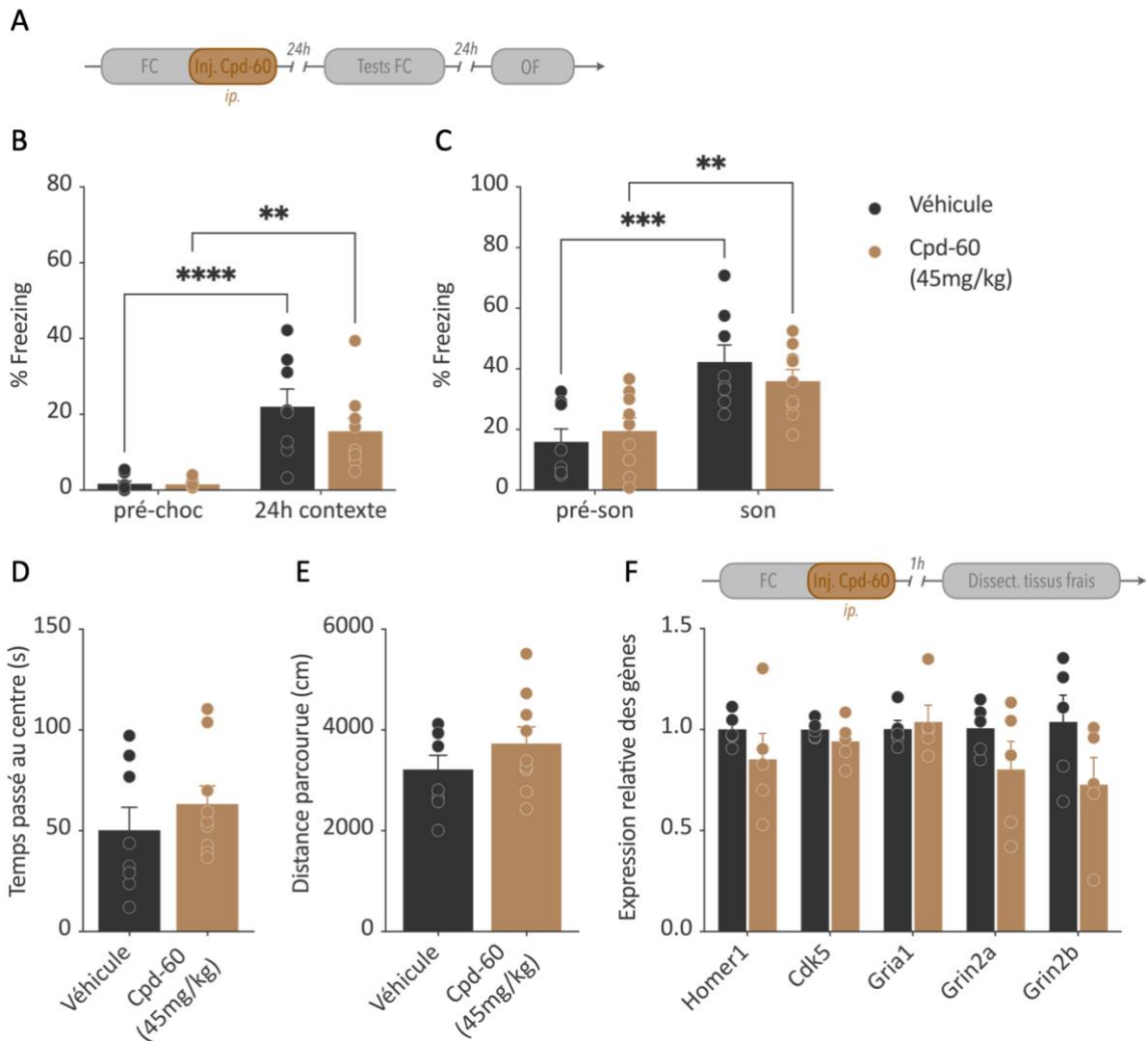


Figure 29. Effet d'une injection aigue intrapéritonéale (*ip.*) de Cpd-60 (45 mg/kg) sur la mémoire à long terme, le comportement anxieux, l'activité locomotrice et l'expression des gènes de plasticité dans l'hippocampe dorsal des souris. (A) Déroulement des expérimentations : conditionnement par la peur suivi immédiatement de l'injection de Cpd-60 à 45 mg/kg puis tests de mémoire à long terme et test en champ ouvert avant dissection des tissus hippocampiques frais. (B) Pourcentage de freezing exprimé par les souris injectées avec le véhicule (n=8) ou les Cpd-60 (n=9) lors du conditionnement avant le choc électrique (*pré-choc*) et le lendemain dans le contexte de conditionnement (*24h contexte*). (C) Pourcentage de freezing exprimé par les souris dans le contexte modifié avant (*pré-son*) et pendant (*son*) l'émission du son du conditionnement. (D) Temps passé au centre de l'arène lors du test en champ ouvert (OF). (E) Distance parcourue pendant le test en champ ouvert (OF). (F) Expression relative des gènes de plasticité suite à un conditionnement par la peur et à l'injection aigue intrapéritonéale de véhicule (n=5) ou de Cpd-60 à 45 mg/kg (n=5). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

En parallèle de ces vérifications, nous avons testé l'effet d'une injection intrapéritonéale de Cpd-60 sur la consolidation d'une mémoire à long terme. Nous avons choisi d'utiliser la concentration en Cpd-60 utilisée par Schroeder et collaborateurs (2013), soit 45 mg/kg, puisque celle-ci ne semble pas être toxique pour les animaux, même en condition d'administration chronique (Schroeder et al., 2013). Ainsi, nous avons conditionné les souris

puis nous les avons immédiatement injectées avec le Cpd-60 avant de les replacer dans leur cage d'élevage. Le lendemain, nous les avons replacées dans le contexte de conditionnement ainsi que dans un contexte modifié, 3h après, où le son du conditionnement a été réémis (**Figure 29A**). En observant leur pourcentage de freezing, nous avons pu voir une augmentation du freezing entre la phase de pré-choc et la réexposition au contexte de conditionnement pour les deux groupes, de façon similaire (**Figure 29B** : ANOVA à deux facteurs, effet temps $F(1,15)=41.56$, $p<0.0001$, effet traitement $F(1,15)=1.097$, $p=0.3115$, effet temps x traitement $F(1,15)=1.422$, $p=0.2516$; comparaisons multiples Véhicule pré-choc vs 24h contexte, $p<0.0001$, Cpd-60 pré-choc vs 24h contexte, $p=0.0016$). Ainsi, les souris traitées au véhicule et au Cpd-60 ont mémorisé de la même façon l'association entre le contexte et le choc électrique. Il en est de même pour l'exposition au contexte modifié avec l'émission du son du conditionnement (**Figure 29C** : ANOVA à deux facteurs, effet temps $F(1,15)=34.03$, $p<0.0001$, effet traitement $F(1,15)=0.07106$, $p=0.7934$, effet temps x traitement $F(1,15)=1.85$, $p=0.1939$; comparaisons multiples Véhicule pré-son vs son, $p=0.0002$, Cpd-60 pré-son vs son, $p=0.0053$). L'injection intrapéritonéale de Cpd-60 n'améliore donc pas la consolidation de la mémoire des souris.

Par ailleurs, les souris traitées avec le Cpd-60 passaient un pourcentage de temps similaire au centre de l'arène dans un test de champ ouvert (**Figure 29D** : test de Student non-apparié, $p=0.3805$) et parcouraient une distance similaire (**Figure 29E** : test de Student non-apparié, $p=0.2567$). Ainsi, l'injection du Cpd-60 n'engendre pas de modification de l'activité locomotrice ou des comportements de type anxieux des souris.

Les résultats comportementaux obtenus sont en accord avec l'absence de modification des acétylations d'histone que nous avons observée en Western Blot (**Figures 28B et C**). Afin de confirmer l'absence d'effet du Cpd-60 sur la mémoire des souris traitées, nous avons injecté un dernier lot de souris avec le composé suite au conditionnement. Ces souris ont été sacrifiées 1h après, afin de mesurer l'expression de certains gènes de plasticité : *Homer1*, *Cdk5*, *Gria1*, *Grin2a* et *Grin2b* (**Figure 29F**). *Homer1* et *Cdk5* sont impliqués dans la consolidation de la mémoire en régulant la localisation et la fonction de récepteurs glutamatergiques métabotropiques tandis que *Gria1*, *Grin2a* et *Grin2b* codent pour des récepteurs glutamatergiques ionotropiques. De façon générale, nous avons observé une absence de modification de leur expression liée au traitement, bien qu'il semblerait y avoir une tendance à la diminution de *Homer1*, *Grin2a* et *Grin2b* (**Figure 29F** : ANOVA à deux facteurs, effet

traitement $F(1,40)=5.396$, $p=0.0254$, effet gène $F(4,40)=0.6975$, $p=0.5982$, effet traitement x gène $F(4,40)=1.002$, $p=0.4178$; comparaisons multiples *Homer1* Véhicule vs Cpd-60, $p=0.7854$, *Cdk5* Véhicule vs Cpd-60, $p=0.9953$, *Gria1* Véhicule vs Cpd-60, $p=0.9996$, *Grin2a* Véhicule vs Cpd-60, $p=0.5058$, *Grin2b* Véhicule vs Cpd-60, $p=0.1155$).

Utilisation du Cpd-60 par voie intra-hippocampique

Face à l'absence d'effet d'une injection aigue du Cpd-60 par voie intrapéritonéale, nous avons décidé d'injecter le Cpd-60 directement dans l'hippocampe dorsal des souris, afin d'avoir une action plus directe. Nous avons implanté des guides canules pour ces injections, pour les mêmes raisons que les siRNA Sin3a dans la partie précédente. Dans une expérience pilote, nous avons injecté un petit nombre de souris, puis collecté leurs hippocampes 1h après afin de quantifier les modifications d'acétylation des histones (Figure 30A).

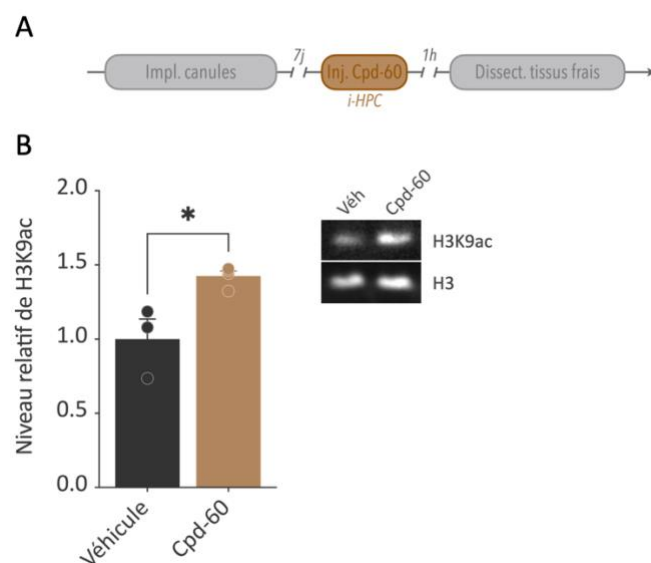


Figure 30. Effet d'une injection aigue intra-hippocampique (*i-HPC*) de Cpd-60 sur l'acétylation des histones H3 dans l'hippocampe dorsal des souris. (A) Déroulement des expérimentations : implantation des canules suivie de l'injection de Cpd-60 en intra-hippocampique et dissection des tissus hippocampiques frais. (B) Niveau relatif de H3K9ac dans l'hippocampe dorsal des souris injectées avec le véhicule (Véh) (n=3) ou le Cpd-60 (n=4). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM. * $p<0.05$

Nous avons alors observé une augmentation significative du taux de H3K9ac pour les souris injectées avec le Cpd-60, par rapport aux souris injectées avec la solution véhicule (Figure 30B : test de Student non-apparié, $p=0.0166$).

Pour consolider ces données préliminaires, un autre lot de souris a été implanté avec des guides canules avant d'être soumis, 7 jours plus tard, au conditionnement de peur. Immédiatement

après le conditionnement, nous leur avons injecté le Cpd-60 ou la solution véhicule. Elles ont été testées le lendemain dans le contexte de conditionnement et dans le contexte modifié avec émission du son, puis sacrifiées afin de pouvoir vérifier le site d'injection de chacune d'entre elles (Figure 31A).

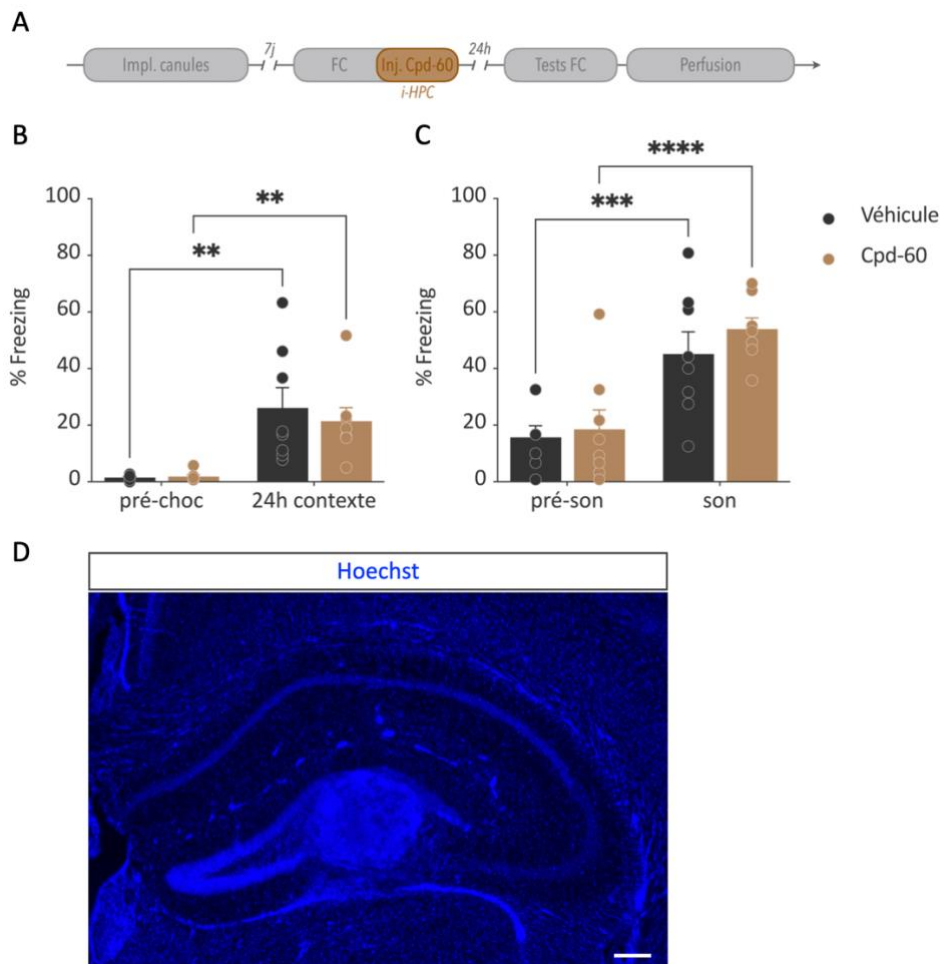


Figure 31. Effet d'une injection aigue intra-hippocampique (*i-HPC*) de Cpd-60 sur la mémoire à long terme des souris. **(A)** Déroulement des expérimentations : implantation des canules puis conditionnement par la peur suivi immédiatement de l'injection de Cpd-60 puis tests dans le contexte de conditionnement et un autre contexte finissant par une perfusion intracardiaque. **(B)** Pourcentage de freezing exprimé par les souris injectées avec le véhicule ($n=8$) ou le Cpd-60 ($n=8$) lors du conditionnement avant le choc électrique (*pré-choc*) et le lendemain dans le contexte de conditionnement (*24h contexte*). **(C)** Pourcentage de freezing exprimé par les souris dans le contexte modifié avant (*pré-son*) et pendant (*son*) l'émission du son du conditionnement. **(D)** Image acquise au microscope à fluorescence de l'hippocampe dorsale après coloration au Hoechst (barre d'échelle : 200 μm). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

Nous avons observé que les animaux des deux groupes ont bien associé le choc électrique au contexte et au son comme le montrent les augmentations significatives du pourcentage de freezing entre les différentes phases, mais aucune différence entre les groupes n'a pu être mise en évidence (Figure 31B : ANOVA à deux facteurs, effet temps $F(1,14)=25.15$, $p=0.0002$, effet

traitement $F(1,14)=0.2363$, $p=0.6344$, effet temps x traitement $F(1,14)=0.3455$, $p=0.566$; comparaisons multiples Véhicule pré-choc vs 24h contexte, $p=0.0014$, Cpd-60 pré-choc vs 24h contexte, $p=0.0074$; **Figure 31C** : ANOVA à deux facteurs, effet temps $F(1,14)=48.49$, $p<0.0001$, effet traitement $F(1,14)=0.7014$, $p=0.4164$, effet temps x traitement $F(1,14)=0.4217$, $p=0.5266$; comparaisons multiples Véhicule pré-son vs son, $p=0.0005$, Cpd-60 pré-son vs son, $p<0.0001$). Ainsi, l'administration aiguë intra-hippocampique du Cpd-60 ne permet pas de faciliter la consolidation de la mémoire à long terme. Par ailleurs, lors de la vérification histologique des sites d'injection de la solution véhicule ou du composé, nous avons remarqué que les injections créaient une altération tissulaire principalement au niveau du gyrus denté (**Figure 31D**).

Pour résumer, nos données indiquent que le Cpd-60 n'engendre pas de facilitation de la mémoire à long terme contextuelle malgré la légère augmentation d'acétylation des histones qu'il génère au niveau de l'hippocampe dorsal.

DISCUSSION & CONCLUSION



V. DISCUSSION & CONCLUSION

Nous avons pour projet d'étudier le rôle du complexe répresseur transcriptionnel SIN3A-HDACs dans la formation de la mémoire à long terme chez la souris. Pour cela, le premier objectif de cette thèse était la mise en place d'un modèle murin déplété en SIN3A ou l'inhibition spécifique des HDACs 1 et 2, au moment de la consolidation d'une mémoire contextuelle dans l'hippocampe dorsal de souris adultes.

a. Retours sur les outils utilisés et autres approches possibles pour étudier le rôle de SIN3A dans la consolidation de la mémoire

Comme développé dans la partie précédente, nous avons utilisé trois approches différentes pour cibler SIN3A et tenter d'induire une diminution de ses taux protéiques : les siRNA, les lentivirus et les rAAV exprimant des shRNA. Nous vous proposons de revenir sur chacun d'entre eux afin d'établir les raisons possibles de l'absence d'effet observée.

L'utilisation des siRNA nous semblait, aux premiers abords, la meilleure solution en terme de contrôle de la temporalité de l'effet (i.e. transitoire, au moment de la consolidation) et de sa localisation (i.e. dans l'hippocampe dorsal). Nous avons donc choisi d'utiliser les mêmes siRNA que ceux utilisés dans l'étude de Srivas & Thakur (2018) montrant une diminution des taux protéiques de SIN3A à 96h post-injection intra-hippocampique. Néanmoins, les auteurs injectaient 5 μ L de solution de siRNA (concentration à 0.6 μ g/ μ L) dans chaque hippocampe des souris et montraient une diffusion de la solution bien au-delà de l'hippocampe. Souhaitant restreindre la diminution de SIN3A au niveau de l'hippocampe dorsal uniquement, nous avons décidé d'injecter 1 μ L de solution seulement (concentration à 0.67 μ g/ μ L) dans les hippocampes des souris. Au vu des résultats que nous avons obtenus avec le premier lot de siRNA (lot#1 : ASO2F1RI), ce volume bien que plus faible semblait engendrer l'effet recherché au niveau des transcrits de *Sin3a*. À ce jour, nous ne savons pas expliquer de façon certaine l'absence d'effet suite à l'utilisation des lots 2 et 3 (lot#2 : ASO2HRWU ; lot#3 : ASO2HTSQ). Bien que peu probable, nous ne pouvons pas exclure une injection de la solution de siRNA à une coordonnée trop profonde, en dehors de l'hippocampe, dans le cerveau des souris, malgré les mises au point de l'implantation des guides canules et la vérification des points d'injections par des expériences préliminaires. Les siRNA n'induisant la production d'aucune protéine

rapportrice et en absence de coloration de la solution injectée, nous n'avions pas la possibilité de vérifier la localisation du point d'injection lors de la dissection des souris utilisées.

Par la suite, nous avons décidé d'utiliser des approches virales pour tenter de diminuer SIN3A dans l'hippocampe des souris. Nous avons tout d'abord utilisé des lentivirus exprimant des shRNA dirigés contre les transcrits de *Sin3a*. Contrairement aux siRNA, les lentivirus expriment la tGFP, nous permettant d'avoir un aperçu du nombre de cellules infectées suite à l'injection. De façon étonnante à première vue, très peu de neurones exprimaient la protéine rapportrice GFP. Suite à cette observation, nous avons testé différents volumes d'injection et tenté d'injecter la solution à plusieurs localisations dans l'hippocampe afin d'infecter davantage de cellules (données non montrées) mais sans amélioration notable. Comme précisé précédemment, les lentivirus sont des particules virales de grande taille et l'espace extracellulaire intracérébral a été estimé entre 20 et 40 nm laissant peu de place aux lentivirus pour diffuser dans le cerveau (*Osten et al., 2006*). Ainsi, il se pourrait que la faible diffusion observée limite l'intégration et l'intériorisation des particules virales aux cellules localisées à proximité du site d'injection.

L'absence de diminution d'expression de *Sin3a* suite à l'injection des lentivirus pourrait notamment être expliquée par le nombre limité de neurones infectés. En effet, ces neurones pourraient présenter une déplétion de SIN3A que nous n'observons pas puisque les RT-qPCR ont été réalisées sur des extraits d'ARN totaux provenant de toutes les cellules qui composent l'hippocampe dorsal incluant les neurones, mais aussi les cellules gliales. Ainsi, même en considérant que notre approche fonctionne, l'effet serait « noyé » et occulté par l'expression normale de *Sin3a* dans ces autres cellules non-infectées. Bien que non-quantitatives, des approches par immunohistochimie contre la protéine SIN3A ou bien par hybridation *in situ* contre les ARNm de *Sin3a* auraient pu nous permettre d'observer une diminution de SIN3A ou d'expression de son gène directement au niveau des neurones infectés. Nous avons par ailleurs tenté de mettre en place un protocole d'immunohistochimie afin de marquer SIN3A sur coupes de cerveau de souris, mais sans succès. D'autre part, une utilisation du lentivirus sur culture cellulaire de neurones hippocampiques *in vitro* nous aurait permis de valider l'efficacité de ce dernier mais aussi d'aller plus loin dans l'étude du rôle de SIN3A. En effet, il est possible d'induire une LTP et de la plasticité synaptique *in vitro* par différents moyens (*pour revue,*

Molnár, 2011). De ce fait, nous aurions pu, selon notre hypothèse, mettre en évidence une facilitation de cette LTP dans les neurones infectés par le lentivirus shRNA Sin3a.

Finalement, grâce à notre collaboration avec le Dr. Ana M.M. Oliveira et le Dr. Janina Kupke, nous avons pu explorer une nouvelle stratégie qui s'est révélée être la plus prometteuse : les rAAV exprimant des shRNA. En effet, après validation de ces outils *in vitro* par nos collaboratrices, nous avons observé que ces virus entraînaient également une diminution d'expression de *Sin3a*, *in vivo* dans l'hippocampe dorsal des souris injectées. Nous avons aussi pu mettre en évidence une amélioration de la mémoire à long terme contextuelle et spatiale chez ces souris, suggérant que ces effets comportementaux sont dus à la diminution de SIN3A dans les neurones de l'hippocampe. Cependant, les difficultés que nous avons rencontrées dans la réalisation des Western Blots classique ou capillaire ne nous permettent pas de l'affirmer. En effet, la démonstration d'une diminution de la protéine au sein de la structure est essentielle pour confirmer l'effet comportemental observé puisque l'entité active ici n'est pas l'ARN mais la protéine au sein de la cellule. Des mises au point seraient nécessaires pour améliorer le protocole de Western Blot et ainsi pouvoir quantifier de façon fiable la protéine SIN3A afin de poursuivre ce projet. Considérant également l'absence de succès à mettre en place une immunohistochimie marquant SIN3A sur coupes cérébrales, il est probable que le problème provienne de l'anticorps utilisé. Nous avons testé plusieurs d'entre eux issus de différentes compagnies (Active Motif, Abcam, Millipore) et modifié les paramètres du protocole (concentration, durée d'incubation, étape de blocage, etc ...) dans chaque expérience, mais les résultats restent peu concluants. Cela nous a amené à considérer la production de notre propre anticorps anti-SIN3A, mais il s'agit d'un processus long qui n'aurait pas pu être achevé dans le temps imparti. Enfin, en plus de pouvoir marquer cette protéine, il aurait été utile de connaître la demi-vie de SIN3A *in vivo* afin d'établir plus précisément le délai nécessaire entre l'injection du virus et la diminution protéique attendue. Étant étudiée majoritairement dans le domaine du développement et du cancer, la demi-vie de SIN3A est connue dans des cellules *in vitro* (e.g. 6.9h dans des cellules NCI-H460, 3.8h dans de cellules A549 (*Chen et al., 2020*)). Cependant, il s'agit de cellules cancéreuses humaines et il serait préférable d'étudier son turn-over dans des cellules neuronales de souris, ce qui, à notre connaissance, n'a pas encore été fait.

Nous avons conscience que d'autres stratégies auraient pu être employées pour tenter de diminuer SIN3A, mais le manque de temps et la nécessité de mises au point pouvant s'avérer longues et délicates, ne nous ont pas permis de les mettre en œuvre. Par exemple, nous possédions au laboratoire, les lignées de souris à l'origine du modèle murin muté utilisé dans l'étude de Bridi et collaborateurs (2020), à savoir des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la CaMKII α mais surtout, celles présentant des séquences loxP autour de l'exon 4 de *Sin3a*. Par ailleurs, il existe des virus adénoassociés exprimant la Cre-recombinase (AAV-Cre) de façon efficace *in vivo* (Ahmed et al., 2004). Ainsi, en injectant les AAV-Cre dans l'hippocampe dorsal des souris présentant les séquences loxP autour de l'exon 4 de *Sin3a*, nous aurions pu induire la délétion de ce dernier et engendrer la production d'une protéine SIN3A tronquée de façon localisée et à l'âge adulte.

Par ailleurs, une approche par gain de fonction aurait aussi pu être envisagée. En effet, nous aurions pu générer une surexpression de *Sin3a* par vecteur viral. Les effets attendus au niveau moléculaire, cellulaire et comportemental auraient été à l'inverse de notre hypothèse initiale. Autrement dit, une augmentation de SIN3A aurait pu engendrer une augmentation de deacétylation des histones par le recrutement massif des HDACs, conduisant à une répression transcriptionnelle exacerbée lors de la consolidation et induisant des déficits de mémoire à long terme. Cependant, il s'agit d'une stratégie qu'il aurait été intéressant d'explorer notamment dans le contexte du vieillissement, comme nous le verrons par la suite.

b. Retours sur l'utilisation du Cpd-60 pour inhiber spécifiquement les HDACs 1 et 2

Dans l'objectif de cibler spécifiquement les HDACs 1 et 2 lors de la consolidation de la mémoire contextuelle, nous avons administré le Cpd-60 à des souris adultes soumises au préalable à un conditionnement de peur.

La première approche employée consistait à administrer une injection aigue intrapéritonéale de Cpd-60 à 45 mg/kg. Cependant, nous n'avons observé aucun effet de l'injection au niveau comportemental ou moléculaire. Plusieurs arguments sont plausibles pour expliquer ces résultats. En effet, bien qu'une unique injection intrapéritonéale à 45 mg/kg de Cpd-60 chez la souris permet de détecter cet HDACi dans le cerveau de l'animal dès 4 minutes post-injection (Schroeder et al., 2013), rien n'affirme qu'il est efficace en traitement aigue. Dans cette même étude, l'équipe de Schroeder a traité les souris de façon chronique durant 10 jours (45 mg/kg) et mis en évidence une augmentation de l'acétylation de H3K9 et H4K12 au niveau de

l'hippocampe. Ainsi, il est probable que l'injection aigue de Cpd-60 que nous avons réalisée ne soit pas suffisante pour augmenter l'acétylation des histones et faciliter la formation de la mémoire à long terme des souris. Néanmoins, nous ne souhaitons pas administrer le traitement de façon chronique, puisque cela nous aurait empêché de voir l'effet de l'inhibition des HDACs 1/2 sur la phase de consolidation seule.

Par ailleurs, nous avons observé que les souris injectées avec le véhicule ou le Cpd-60 présentaient les signes caractéristiques de douleur (i.e. dos vouté, oreilles en arrière, yeux mi-clos, attitude prostrée, locomotion diminuée dans la cage d'élevage) jusqu'à environ 3h-4h post-injection. Le Cpd-60 est dilué dans une solution véhicule comprenant 45% de NaCl, 45% de PEG 400 et 10% de DMSO. Une diminution de la locomotion dans les 6h suivant l'injection intrapéritonéale de DMSO à 64% chez des souris CD2F1 a déjà été montrée (*Castro et al., 1995*). Par ailleurs, l'administration intraveineuse de PEG 400 associé à du DMSO chez la souris CD1 entraînerait des tremblements, une ataxie et une hypoactivité durant quelques minutes (*Thackaberry et al., 2014*). Cependant, à notre connaissance et malgré nos observations, aucune étude ne mentionne des signes de douleur chez la souris après une injection intrapéritonéale d'une solution de PEG 400 et de DMSO. L'étude de Schroeder et collaborateurs (*2013*) n'en fait pas mention mais précise que les tests comportementaux sont réalisés entre 18 et 24h après le dernier traitement afin d'éviter des « effets transitoires ».

Nous pensons néanmoins, d'après nos observations, que les souris auraient ressenti une certaine douleur suite au conditionnement de peur et à l'injection. Or, Lazzarim et collaborateurs (*2020*) ont montré que la douleur altérerait la consolidation de la mémoire. En effet, l'injection de formalin chez le rat après l'acquisition seulement, engendre des déficits mnésique au moment du rappel dans un test de reconnaissance d'objet (*Lazzarim et al., 2020*). D'après nos résultats, nous ne pouvons pas affirmer que les souris injectées avec le véhicule ou le Cpd-60 présentent des déficits de mémoire, mais les taux de freezing observés dans le test de mémoire contextuelle (environ 20%) sont plus bas que ceux exprimés par d'autres souris de la même lignée ayant été soumises au même protocole de conditionnement (environ 40% pour les souris injectées avec les siRNA contrôles ou les rAAV shRNA Scrambled). Ainsi, il est envisageable que l'effet du Cpd-60 par voie intrapéritonéale soit masqué par la douleur que la solution injectée aurait pu engendrer lors de la consolidation mnésique.

Considérant que l'injection aigue intrapéritonéale de Cpd-60 n'induit aucun effet visible et pour éviter une potentielle douleur interférant avec la consolidation de la mémoire, nous avons

administré le composé inhibiteur des HDACs 1/2 directement au niveau de l'hippocampe dorsal des souris. Suite à cette injection, nous avons observé une augmentation d'acétylation de H3K9 sans modification du niveau de mémoire des souris. En effet, de la même façon que pour les animaux injectés de façon intrapéritonéale, les taux de freezing lors du test de mémoire contextuelle des souris ayant reçu le Cpd-60 ou la solution véhicule dans l'hippocampe, sont environ à 20%. Ces pourcentages considérés comme « diminués » en comparaison à d'autres expérimentations, pourraient s'expliquer par l'altération tissulaire observée à l'endroit de l'injection dans l'hippocampe des souris. La déformation de l'hippocampe, principalement au niveau du DG, pourrait être à l'origine de ces faibles pourcentages et d'une mémoire moins robuste que celle évaluée lors du test dans le contexte modifié. Il est possible que l'injection des solutions engendre une inflammation au niveau de la structure hippocampique et altère ses fonctions. Effectivement, il a été montré qu'une expression de cytokines pro-inflammatoires dans l'hippocampe est associée à de faibles performances mnésiques dans un test de mémoire hippocampo-dépendant (*Boitard et al., 2014*). Afin de vérifier la présence de cellules, notamment microgliales, impliquées dans l'inflammation, nous pourrions quantifier la présence de marqueurs (e.g. Iba1, CD11b, Cox2) (*Chiu et al., 2016*) par immunohistochimie sur les coupes de cerveau.

Néanmoins, nous avons tout de même montré une augmentation d'acétylation des histones, mais qui semble insuffisante pour améliorer la mémoire des souris, bien qu'elle soit similaire à celle observée par Schroeder et ses collègues (*2013*). Une autre interprétation consisterait à penser que cette augmentation d'acétylation n'est pas suffisante pour améliorer la mémoire de souris sans déficits, mais elle pourrait permettre de restaurer des déficits chez d'autres individus. Par exemple, l'administration du Cpd-60 chez des souris modèles d'amnésie induite par injection de scopolamine (un antagoniste des récepteurs cholinergiques muscariniques), serait susceptible d'engendrer une amélioration de leur mémoire de la même façon que Singh et collaborateurs (*2015*) par une diminution de l'expression de HDAC2 chez des souris traitées à la scopolamine. Enfin, comme décrit dans les objectifs de ces travaux, le traitement au Cpd-60 chez des souris âgées présentant des déficits mnésiques aurait pu être un moyen de restaurer ces derniers. L'étude de Tamaro et collaborateurs (*2024*) soutiendrait ce point de vue puisque ces auteurs ont montré que l'administration de Cpd-60 chez des souris âgées changerait le transcriptome cérébrale pouvant conduire à une amélioration des fonctions cognitives et de neuroprotection.

c. Reconsidérer le fait de cibler le complexe SIN3A-HDACs

Au vu des résultats que nous avons obtenus et de la difficulté apparente à diminuer les taux protéiques de SIN3A, nous pouvons nous questionner sur la pertinence de vouloir mettre en place ce modèle murin. Assez peu d'études se sont concentrées sur le rôle de SIN3A dans le cerveau, privilégiant les autres protéines du complexe comme REST, MeCP2 ou encore les HDACs. En effet, bien que SIN3A soit une plateforme de recrutement, un lien qui permet à certaines protéines de liaison à l'ADN de s'associer aux enzymes effectrices, elle ne porte pas elle-même l'activité répressive. Néanmoins, REST permet de recruter d'autres complexes co-répresseurs comme CoREST (*Andrés et al., 1999*) et les HDACs 1/2 peuvent, elles aussi, être recrutées par d'autres protéines comme NuRD (*Tong et al., 1998*) ou CoREST (*You et al., 2001*). Ainsi, le fait de cibler REST aurait des conséquences non seulement sur le complexe SIN3A mais aussi sur CoREST. De même, cibler les HDACs 1/2 affecterait l'activité répressive de plusieurs complexes incluant SIN3A. De ce fait, en prenant en compte l'important dynamisme de ces assemblages de protéines, il serait probablement intéressant d'étudier leurs contextes de recrutement. De façon plus précise, nous pourrions émettre l'hypothèse que SIN3A est recrutée par REST suite à certaines stimulations tandis que MeCP2 la recruterait selon d'autres conditions. De la même façon, SIN3A pourrait se lier de façon préférentielle à HDAC2 dans un contexte mais médierait l'activité de HDAC1 ou celle de Tet1 dans un autre et il se pourrait que cela soit dépendant de la protéine recrutant SIN3A au départ. Autrement dit, nous pourrions nous questionner sur la composition de ce complexe répresseur dans des contextes particuliers sains comme le vieillissement ou pathologiques, tel que la maladie d'Alzheimer.

Il s'agit là d'un projet venant de débiter, nommé TCORAD, qui vise notamment l'identification des partenaires protéiques de REST dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, les souris Tg2576, à différents stades de la pathologie. Pour cela, des expériences de co-immunoprécipitation ciblant REST associées à de la spectrométrie de masse pour identifier les partenaires liés, sont en cours.

Par ailleurs, en considérant les résultats des études précédentes montrant SIN3A comme une protéine limitant le processus de consolidation (*Bridi et al., 2020; Srivas & Thakur, 2018*), nous pourrions nous questionner sur les raisons pour lesquelles les complexes répresseurs empêchent la formation d'une mémoire robuste. Une hypothèse a été avancée par McQuown et Wood en 2011, nommée « l'hypothèse des freins moléculaires » (*the molecular brake pads*

hypothesis). Dans celle-ci, les auteurs proposent que, initialement, les complexes répresseurs (HDACs et leurs co-répresseurs associés) appelés les « freins moléculaires », maintiennent sous silence certains gènes et qu'une signalisation dépendante d'une activité suffisamment forte est requise pour le retrait temporaire de ces complexes, afin d'activer l'expression génique nécessaire à la formation de la mémoire à long terme (McQuown & Wood, 2011). Autrement dit, les complexes répresseurs exerceraient une répression transcriptionnelle constante, excepté lorsqu'une activité importante déclenche le besoin de transcription pour des fonctions cellulaires. McQuown et Wood s'appuient notamment sur le travail de Vecsey et ses collègues (2007) montrant qu'une inhibition des HDACs conduit au maintien de l'expression des IEGs et du facteur de transcription Nr4a2, 2h après un conditionnement de peur. Cela suggérerait que les HDACi empêchent la « réinitialisation » de la chromatine dans son état réprimé par les complexes répresseurs, engendrant une expression génique plus durable (McQuown & Wood, 2011). Par ailleurs, ils abordent le contexte des apprentissages « infra-liminaire », comme ceux que nous avons utilisés dans ces travaux, en tant que stimulus insuffisant pour le retrait des « freins moléculaires », mais suffisant en étant couplé à un HDACi (McQuown & Wood, 2011), ce qui explique notre choix pour ce type d'apprentissage. Ainsi, la « force » de l'évènement, que nous pourrions associer à sa pertinence, serait un levier pour le retrait des complexes répresseurs, permettant la formation d'une mémoire à long terme. Nous pourrions donc penser que les complexes répresseurs font partie d'un mécanisme mis en place pour sélectionner les informations pertinentes et les garder en mémoire. La conservation de toutes les informations que nous intégrons chaque jour ne serait pas appropriée et engendrerait un coût énergétique inutile. En effet, la transcription des gènes et la production de protéine a un certain coût en terme d'énergie (Wagner, 2005), mais ces processus étant nécessaires à la formation de la mémoire à long terme, cela serait donc une dépense supplémentaire pour l'organisme. Dans le cas d'hypermnésies présentes dans les troubles de stress post-traumatique (Desmedt et al., 2015) ou les troubles du spectre autistique (Etchepareborda et al., 2007), la répression médiée par ces complexes pourrait être altérée et participer aux perturbations mnésiques.

Enfin, il existe un grand nombre d'études montrant qu'une inhibition des HDACs permet d'améliorer la mémoire à long terme. Aussi, la pertinence d'utiliser un nouvel inhibiteur est à questionner au vu du fait qu'il est largement admis maintenant que les HDACi facilitent la mise

en place de la mémoire. Cependant, les études mentionnées précédemment utilisent des agents pharmacologiques ciblant et inhibant des classes entières de HDAC comme la TSA (*Hawk et al., 2011; Vecsey et al., 2007*), le SAHA (*Guan et al., 2009*) ou le NaB (*Levenson et al., 2004; Stefanko et al., 2009*). Bien que des études aient examiné le rôle de HDAC1 ou de HDAC2 par des approches génétiques (*Guan et al., 2009; Morris et al., 2013*), l'impact de l'inhibition spécifique et simultanée de ces deux enzymes reste inexploré. Il demeure donc important de garder à l'esprit la raison pour laquelle nous avons décidé d'utiliser le Cpd-60.

d. Perspectives concernant le rôle de SIN3A-HDACs dans le vieillissement cognitif

Comme évoqué précédemment, notre objectif ultime était d'étudier le rôle de ce complexe dans le déclin cognitif lié à l'âge. Bien que les difficultés à développer un modèle chez les souris adultes nous aient empêchées de poursuivre cet objectif chez la souris âgée, nous avons tout de même souhaité observer s'il y avait des changements de l'expression de *Sin3a* ainsi que ses taux protéiques au cours du vieillissement. Notre hypothèse étant que les déficits de mémoire des souris âgées pourraient être expliqués par une augmentation de SIN3A qui conduirait à une augmentation de la répression transcriptionnelle des gènes de plasticité, médiée par les HDACs 1/2.

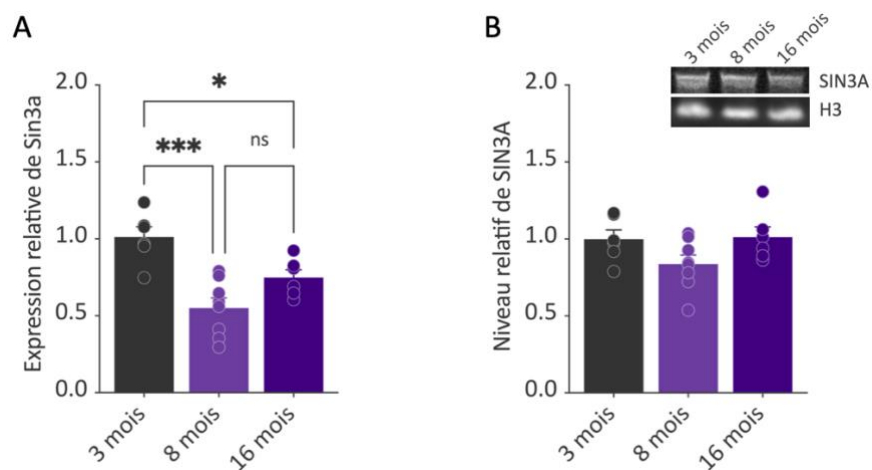


Figure 32. Effet de l'âge sur l'expression de *Sin3a* et les taux protéiques de SIN3A dans l'hippocampe des souris. (A) Expression relative de *Sin3a* dans l'hippocampe dorsal de souris âgées de 3 (n=6), 8 (n=8) ou 16 (n=6) mois. (B) Taux protéiques relatifs de SIN3A dans l'hippocampe dorsal de souris âgées de 3 (n=6), 8 (n=8) ou 16 (n=16) mois. Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM, *p<0.05, ***p<0.001.

Suite au sacrifice de souris âgées de 3, 8 et 16 mois, nous avons quantifié les ARNm de *Sin3a* ainsi que les taux protéiques de SIN3A dans leurs hippocampes dorsaux. Nos résultats indiquent que les souris âgées de 8 et 16 mois présentent une diminution significative de l'expression de

Sin3a dans l'hippocampe dorsal (**Figure 32A** : ANOVA à un facteur, effet de l'âge $F(2,17)=13.82$, $p=0.0003$; tests de comparaisons multiples, 3 mois vs 8 mois, $p=0.0002$, 3 mois vs 16 mois, $p=0.0314$, 8 mois vs 16 mois, $p=0.0886$) sans diminution des taux protéiques associés (**Figure 32B** : ANOVA à un facteur, $F(2,17)=2.748$, $p=0.0924$). La diminution d'expression de *Sin3a* a été confirmée dans l'hippocampe de souris C57Bl/6SJL âgées de 17 mois en comparaison à des souris de 3 mois (données non montrées).

Ainsi, contrairement à notre hypothèse, SIN3A ne serait pas surexprimée dans le cerveau des individus âgés. Néanmoins, des données montrent que les taux de REST sont augmentés dans le cerveau humain âgé (*Lu et al., 2014*) de même que ceux de HDAC2 chez la souris âgée (*Chouliaras et al., 2013; Singh & Thakur, 2014*). Il se pourrait donc que l'action répressive augmente avec l'âge, non pas en augmentant la plateforme de recrutement du complexe, à savoir SIN3A, mais par l'intermédiaire des protéines de liaison à l'ADN ainsi que des enzymes effectrices. Nous pourrions notamment questionner si le fait de surexprimer *Sin3a* dans l'hippocampe de souris âgées par une approche virale, altérerait davantage les performances mnésiques des individus. De même, la diminution d'expression de *Sin3a* que nous observons pourrait refléter une tentative de compensation de l'organisme afin de maintenir les capacités de mémoire.

En conclusion, nous avons mis en évidence chez la souris adulte, une facilitation de la mémoire contextuelle à long terme, suite à la diminution d'expression de *Sin3a*, sans montrer qu'elle était due à une diminution de la protéine. De plus, bien que l'injection de Cpd-60 dans l'hippocampe des souris augmente l'acétylation de H3K9, elle n'affecte pas les performances mnésiques des individus.

S'agissant du début du projet initialement planifié, les résultats de ce travail soulèvent plus de questions qu'ils n'apportent de réponses, mais nous avons émis un certain nombre d'hypothèses afin d'améliorer les stratégies employées et ouvrir de nouvelles pistes de réflexion pour élucider les contributions de SIN3A-HDACs dans la formation de la mémoire.

PARTIE II – Effet de l'âge sur la réponse comportementale et cérébrale des souris à un stimulus de looming

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

a. Émotions, peurs et comportements défensifs

Théories des émotions

Dans son milieu naturel, la survie d'un animal dépend notamment de sa capacité à s'adapter aux modifications de son environnement ou à se défendre face à l'attaque de prédateurs. La présence d'un danger ou d'un prédateur est perçue comme un stimulus pertinent pour engendrer une réponse au stress chez les proies.

Le terme « stress » est utilisé pour décrire une perturbation de l'homéostasie et la réponse au stress, incluant un ensemble de processus physiologiques et comportementaux, tend à restaurer cette homéostasie (*Cannon, 1935*). Les mécanismes physiologiques de réponse au stress sont bien connus (*pour revue Lee et al., 2015*). En effet, le stress engendre une activation du système nerveux sympathique générant une augmentation de la fréquence cardiaque, un relargage de glucose dans le sang, une dilatation des bronchioles ainsi que des changements du flux sanguin afin d'augmenter la vigilance de l'individu tout en diminuant l'activité du système digestif et urinaire. D'un point de vue comportemental, plusieurs réponses ont été décrites comme la fuite, l'immobilité ou l'attaque. Nous reviendrons sur ce point un peu plus tard.

Un stimulus menaçant ou dangereux déclenche aussi une réaction émotionnelle. Plusieurs théories ont été avancées pour tenter d'expliquer la relation entre les réponses physiologiques et la réponse émotionnelle. La peur peut être définie comme une émotion ressentie par l'individu face à une menace ou un danger. Il existe 4 théories classiques des émotions (i.e. peur, joie, surprise, colère, tristesse, dégoût).

La première de ces théories est celle de **James-Lange**, initialement proposée par William James (*James, 1884*) et suivie par Carl Lange (*Lange & James, 1885*) qui affirme que la peur est ressentie suite à la perception des changements physiologiques activés par le système nerveux sympathique et induits suite à un stimulus menaçant, émotionnellement pertinent. Les émotions ressenties seraient ainsi le résultat de différents ensembles de changements physiologiques (e.g. un ensemble de changements conduirait à de la peur, tandis que d'autres engendreraient de la colère). Cette théorie se résumerait par « Je ressens de la peur parce que je tremble ».

La seconde théorie est celle de **Cannon-Bard** qui propose que l'évènement déclenchant la réponse émotionnelle, déclenche aussi de façon simultanée et indépendante, les changements

physiologiques (*Cannon, 1931, 1927*). Autrement dit, la perception de l'émotion n'est pas due aux changements corporels mais se réalise au même moment : « Je ressens de la peur et je tremble en même temps ».

La troisième théorie, énoncée par **Schachter et Singer**, repose sur le fait que puisque différentes émotions sont associées aux mêmes changements physiologiques, un traitement cognitif doit survenir au même moment pour permettre d'identifier l'état émotionnel (*Schachter & Singer, 1962*). Ainsi, les manifestations physiques seraient analysées de façon cognitive simultanément engendrant ainsi le sentiment de peur : « Je suppose que je tremble parce que j'ai peur ».

Enfin, la dernière théorie diffère un peu des trois premières puisqu'elle ne met pas en jeu les changements physiologiques qui se produisent. Selon cette théorie, les émotions peuvent survenir même en l'absence de manifestation physique. Selon **Arnold**, les émotions découleraient de l'évaluation inconsciente d'une situation, tandis que les sentiments seraient le reflet conscient de cette évaluation inconsciente, soutenu par le fait que même un stimulus subliminal peut susciter une émotion (*Young & Arnold, 1963*). Ainsi, **Lazarus** propose que les émotions surgissent suite à une série d'évaluations (i.e. déterminer si l'évènement est positif ou négatif pour l'individu, déterminer si l'individu a les capacités pour faire face à l'évènement) (*Lazarus, 1982*). Autrement dit, les émotions seraient le résultat de processus cognitifs : « Je pense que c'est une situation dangereuse et c'est pourquoi j'ai peur et je tremble ».

Peurs et comportements défensifs

Il existe différents dangers et menaces engendrant une émotion de peur chez l'animal. Les stimuli menaçants sont principalement de 3 types : les prédateurs, l'attaque par des congénères et les caractéristiques de l'environnement (e.g. hauteur, incendie, inondation). Des stimuli internes peuvent être ajoutés à cette liste, tels que les stimuli douloureux ou les signaux de suffocation.

Par ailleurs, la peur est associée à différentes réponses comportementales chez l'animal. Parmi celles-ci, nous retrouvons communément la fuite, l'évitement, le « freezing », la menace ou l'attaque défensive ainsi que le *risk assessment* (l'évaluation du risque, caractérisée par la cessation de l'activité en cours, un scanning de l'environnement et une orientation vers le stimulus) ainsi que bien d'autres pouvant être plus spécifiques de certaines espèces.

Le choix de la réponse comportementale est notamment déterminé par les caractéristiques de la menace et de l'environnement. En effet, la distance à laquelle se situe la menace par rapport à l'individu menacé est importante dans le choix de la réponse défensive (Hennig et al., 1976), de même que la présence ou non d'une échappatoire (Vale et al., 2017) (Figure 33). D'autres paramètres peuvent entrer en jeu pour moduler ces comportements, comme la vitesse d'approche du prédateur (Bhattacharyya et al., 2017; Cooper et al., 2009; De Franceschi et al., 2016) ou encore, la présence d'une source de nourriture (Liden et al., 2010).

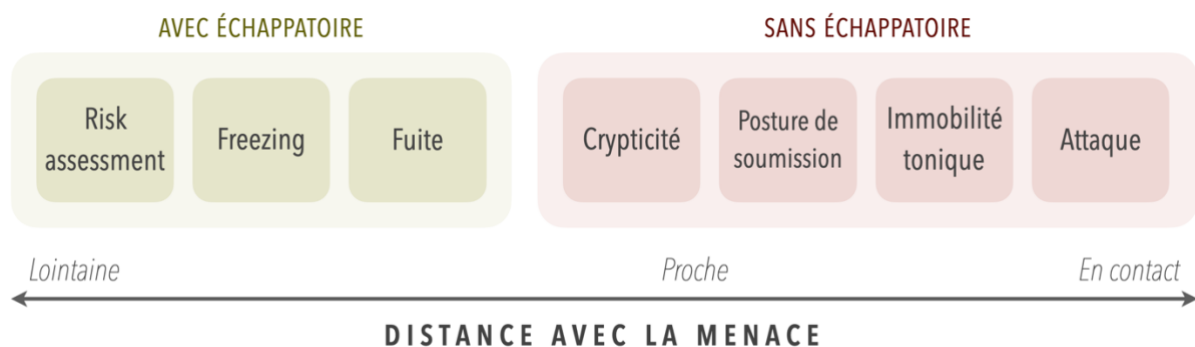


Figure 33. Réponses comportementales défensives selon la présence ou l'absence d'une échappatoire et selon la distance séparant l'individu menacé du prédateur (adapté de Carli & Farabollini 2022).

Une menace lointaine va engendrer de façon privilégiée un comportement de *risk assessment*, puisque la menace est encore considérée comme potentielle. Si le stimulus menaçant est plus proche, des comportements de freezing ou même de fuite, si cette dernière est possible, seront exprimés. Lorsque la menace est proche, les individus peuvent tenter de se confondre dans leur environnement (i.e. mécanismes de crypticité), d'adopter des postures de soumission ou de présenter une immobilité tonique (i.e. inhibition motrice profonde causant une paralysie) (Carli & Farabollini, 2022). Enfin, au contact direct avec le prédateur, des comportements d'attaque sont envisageables à l'encontre de ce dernier (Blanchard and Blanchard, 2008). En principe, l'animal sélectionne la meilleure stratégie pour éviter la menace et augmenter ses chances de survie.

Parmi les comportements défensifs précédemment mentionnés, le « freezing » (i.e. une immobilité totale seulement perturbée par les mouvements respiratoires) et la fuite sont particulièrement bien conservés au cours de l'évolution et entre les espèces. En effet, ces réponses comportementales induites par un stimulus menaçant sont retrouvées chez les

lézards (*Hennig et al., 1976*), les écureuils (*Dill & Houtman, 1989*), les écrevisses (*Liden et al., 2010*), les poissons (*Domenici, 2010; Temizer et al., 2015*), les drosophiles (*Von Reyn et al., 2017; Zacarias et al., 2018*), les oiseaux (*De Haas et al., 2012; Papini et al., 2019*), les souris (*Yilmaz & Meister, 2013*) et, bien évidemment, les humains (*Sagliano et al., 2014; Terburg et al., 2018*). Le freezing et la fuite seront les comportements défensifs étudiés dans la suite de ce travail de thèse.

La littérature chez les rongeurs montre que deux types de peur sont étudiés : la peur apprise et la peur innée. La peur apprise est la plus étudiée et est générée lorsqu'un individu a précédemment associé un stimulus neutre (e.g. un son, un contexte) à un stimulus aversif (e.g. une odeur de prédateur, un choc électrique au niveau des pattes). La peur apprise est donc déclenchée par un élément initialement neutre. Au contraire, la peur innée ne requiert aucun apprentissage pour être déclenchée ; il s'agit de la réaction immédiate au stimulus aversif ou à la menace elle-même. Bien que différentes car elles ne sont pas déclenchées par les mêmes stimuli, ces deux peurs sont liées : un stimulus induisant une peur innée est nécessaire pour associer un élément neutre à cette peur générée et pour que cet élément neutre puisse lui-même déclencher une réponse de peur, alors qualifiée d'« apprise », lorsque l'individu y sera à nouveau exposé.

La peur apprise a été étudiée en profondeur par l'utilisation du conditionnement pavlovien qui, chez les rongeurs, associe communément un contexte et un son à un choc électrique au niveau des pattes (*voir PARTIE I – I.a.Généralités – Les systèmes de mémoire*). Ce test comportemental a été mentionné dans plus de 8000 articles au cours des 50 dernières années avec près de la moitié de ces mentions provenant de publications apparues entre 2014 et aujourd'hui (*références PubMed*). Plusieurs revues ont fait l'analyse des mécanismes sous-jacents au conditionnement de peur et aux différentes phases de mémoire associées (*Frankland et al., 2019; Herry & Johansen, 2014; Li et al., 2023; Maren, 2001; Tonegawa et al., 2018, 2015; Tovote et al., 2015*). Les réseaux cérébraux impliqués dans l'encodage et le rappel des mémoires de peur ont été bien décrits (*pour revue, Gross & Canteras, 2012*) et mettent en jeu des structures telles que l'amygdale, l'hypothalamus mais aussi la substance grise périaqueducule qui permet la sortie comportementale, sur laquelle l'expérimentateur se base pour évaluer le niveau de mémoire de l'animal.

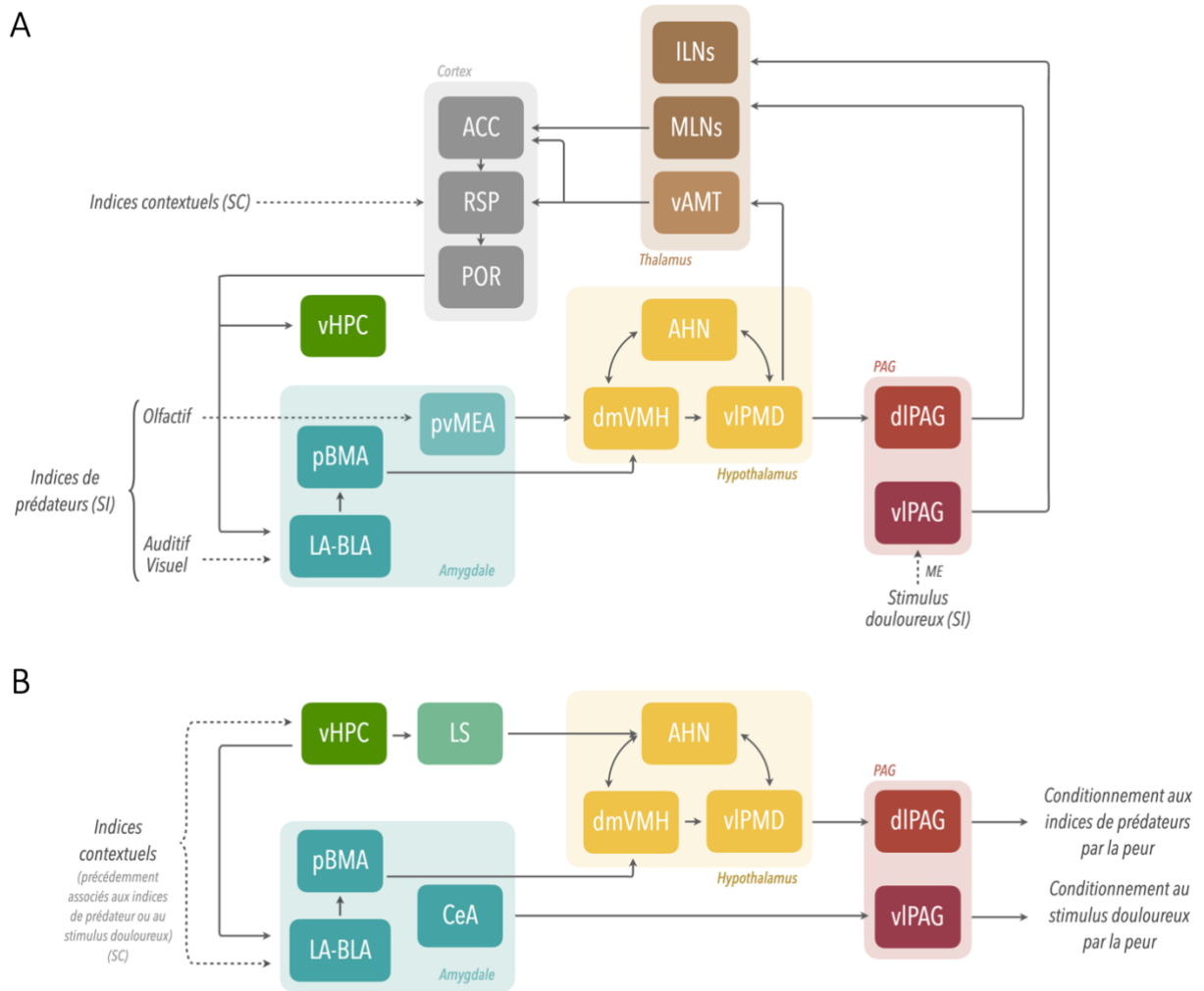


Figure 34. Schéma récapitulatif des structures et voies cérébrales impliquées dans (A) l'encodage et (B) le rappel des mémoires de peur (*adapté de Gross & Canteras 2012*). dIPAG, substance grise périaqueducule dorsolatérale ; vIPAG, substance grise périaqueducule ventrolatérale ; BLA, amygdale basolatérale ; LA, amygdale latérale ; vHPC, hippocampe ventral ; AHN, noyau antérieur de l'hypothalamus ; ACC, cortex cingulaire antérieur ; dmVMH, partie dorsomédiale du noyau ventromédial de l'hypothalamus ; ILNs, noyaux intralaminaires du thalamus ; MLNs, noyaux médians du thalamus ; pBMA, amygdale basomédiale postérieure ; POR, cortex postrhinal ; pvMEA, partie postéroventrale de l'amygdale médiale ; RSP, cortex rétrosplénial ; vAMT, partie ventrale du noyau antéro-médial du thalamus ; vIPMD, partie ventrolatérale du noyau prémamillaire dorsal ; LS, septum latéral ; SC, stimulus conditionné ; SI, stimulus inconditionné

Comme nous le verrons par la suite, certaines de ces structures sont impliquées dans la réponse de peur innée, comme le thalamus, la substance grise périaqueducule ainsi que l'amygdale. Il y aurait donc une certaine superposition des voies impliquées dans l'expression d'une peur apprise et d'une peur innée.

b. Dispositifs et stimuli générant les réponses de peur

Chez les rongeurs, une diversité de dispositifs et de stimuli peut être utilisée pour générer des comportements de peur.

La peur de la hauteur, assez peu étudiée, peut être déclenchée par l'exposition des individus à des lieux en hauteur ouverts ou fermés (*open/enclosed high-place exposure*) tels qu'une plateforme positionnée à 20 cm du sol, ou une boîte d'attente s'ouvrant sur cette plateforme qui peut être ouverte ou cloisonnée par des parois transparentes (Liu et al., 2021). L'exposition à ces lieux situés en hauteur génère un comportement de freezing chez les souris (Liu et al., 2021; Miyata et al., 2007).

Assez récemment, un dispositif mimant une inondation a été utilisé comme conditionnement de peur non-douloureux et plus spécifiquement dans un test d'aversion pour le contexte de conditionnement (*conditioned place aversion*) (Goltseker & Barak, 2018). Bien que les auteurs ne fassent pas mention du comportement des individus lors de la phase d'inondation, il est possible que de futures études utilisent ce dispositif pour étudier les comportements de défense face à ce type de menace environnementale.

Des stimuli auditifs sont aussi employés pour générer des réponses de peur. En effet, des ultrasons entre 17 et 20 kHz induisent des comportements de fuite et de freezing chez les souris exposées (Mongeau et al., 2003). Une autre étude utilisant des ultrasons entre 1 et 64 kHz, a principalement observé des réponses de fuite suite à l'émission du son (Xiong et al., 2015).

Les indices olfactifs sont communément utilisés. Il s'agit de molécules odorantes provenant des sécrétions corporelles (e.g. urine, fèces, salive) des prédateurs (e.g. félins, rats, serpents, oiseaux de proie, renards) (Isogai et al., 2011; Rosen et al., 2015) ou des congénères stressés (Bombail et al., 2018; Brechbühl et al., 2008). Ces substances induisent principalement du freezing (Ayers et al., 2013) mais peuvent aussi déclencher des comportements d'évitement (Fendt & Endres, 2008).

En ce qui concerne les stimuli internes, comme mentionné précédemment, l'administration de stimuli douloureux est fréquemment employée lors du conditionnement de peur pour induire la formation d'une peur apprise. Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude ne les a utilisés pour générer des comportements de peur innée. Bien que le freezing soit le comportement principalement mesuré en conditionnement de peur, la douleur peut aussi induire un comportement d'agressivité ou d'attaque, comme cela a été observé chez le rat (Blanchard and Blanchard, 1977) mais il reste difficile de distinguer l'agressivité offensive de l'agressivité défensive exprimée par les individus (Blanchard et al., 2003).

Finalement, dans la littérature récente, les indices visuels imitant des prédateurs sont de plus en plus utilisés pour étudier les phénomènes de peur innée chez les rongeurs : il s'agit des stimuli de « looming » et de « sweeping ».

c. Les stimuli de looming et de sweeping

Le stimulus de looming imite l'approche rapide d'un prédateur volant, tel un oiseau de proie qui serait en chasse et attaquerait le rongeur dans la vie sauvage. Concrètement, le stimulus est présenté sur un écran placé au-dessus d'une arène et correspond à un disque noir qui s'agrandit rapidement pour mimer le rapprochement d'un objet et pouvant suggérer un contact imminent avec ce dernier. Le looming permet d'induire une réaction de fuite et/ou de freezing chez la souris (Yilmaz & Meister, 2013). Le stimulus de sweeping imite seulement le passage du prédateur volant au-dessus de l'individu, comme un oiseau de proie qui ne ferait que passer, sans s'approcher, sans attaquer, qui ne ferait que scanner son environnement à la recherche d'une proie. Il s'agit donc d'un disque noir de taille constante qui traverserait l'écran à une vitesse constante. Ce stimulus induit une réponse de freezing sans fuite (De Franceschi et al., 2016).

Il existe une grande variété de protocoles et de dispositifs pour étudier les comportements induits par ces stimuli. Selon les études, plusieurs facteurs sont modifiés tels que la forme de l'arène (e.g. couloir, arène ronde ou rectangulaire), la présence ou l'absence d'un abri, le déclenchement manuel ou automatique du stimulus, la durée du temps d'habituation au dispositif, et les paramètres des stimuli (e.g. la taille, la vitesse, le contraste).

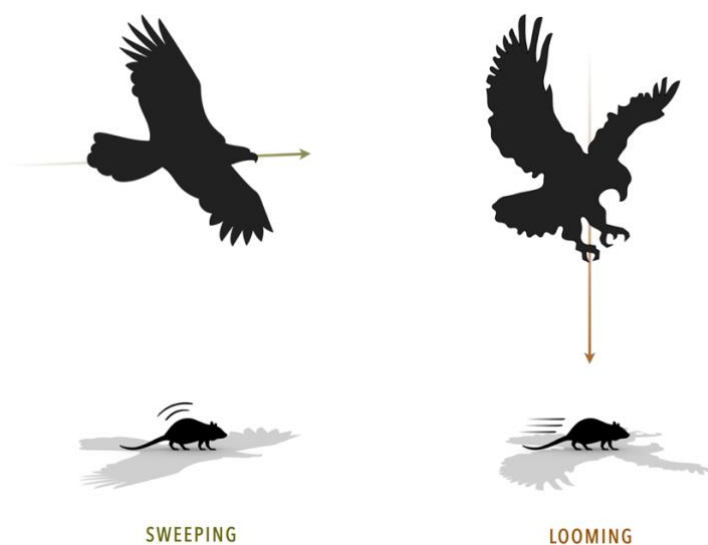


Figure 35. Représentation schématique des stimuli de sweeping et de looming.

Le stimulus de sweeping est encore assez peu utilisé. De Franceschi et collaborateurs ont mis en évidence chez les souris que la vision seule permettait de différencier les stimuli de looming et de sweeping et que ce dernier engendrait une réponse de freezing (De Franceschi et al., 2016). Par la suite, Lees et ses collègues (2020) ont utilisé le stimulus de sweeping pour observer des déficits de freezing chez un modèle de souris dont une population des cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs) est absente. Ainsi, la sous-population Brn3b des RGCs serait nécessaire à la réponse de freezing suite au stimulus de sweeping, laissant intact le comportement défensif de freezing induit par le looming (Lees et al., 2020). D'autre part, un phénomène d'habituation a été observé suite à la présentation répétée de stimuli de sweeping : les individus cessent d'exprimer une réponse de freezing lors de la présentation du stimulus (Tafreshiha et al., 2021). Dans cette étude, les animaux ne répondaient que lorsque les stimuli étaient différents de celui initialement répété, en terme de taille ou de forme (Tafreshiha et al., 2021). Très récemment, le sweeping a été utilisé pour explorer les différentes réponses comportementales selon la localisation du stimulus (e.g. au-dessus ou sur le côté de l'individu) (Solomon et al., 2023). Les auteurs ont montré que le sweeping induisait du freezing lorsqu'il était présenté au-dessus de l'individu, mais que ce comportement diminuait lorsque le stimulus apparaissait sur le côté (Solomon et al., 2023).

Concernant stimulus de looming, davantage d'études ont examiné l'impact de différents facteurs sur la réponse défensive induite. Dans un modèle murin de troubles du spectre autistique, il a été montré que les comportements de défense suite à la présentation du looming sont altérés (Hu et al., 2017). L'effet du stress a aussi été étudié par Li et collaborateurs (2018) qui ont montré que des souris stressées présentaient une latence de fuite plus courte et passaient plus de temps dans l'abri (Li et al., 2018). La consommation chronique d'alcool aurait, quant à elle, un effet seulement chez les souris femelles en augmentant les comportements de défense (Neira et al., 2022). Sur un tout autre sujet, un modèle murin présentant une hypomyélinisation du système nerveux central montre des déficits de mémoire à long terme suite à un conditionnement de peur, mais aussi une absence de réponse défensive au stimulus de looming (Nguyen et al., 2020). Des souris atteintes d'une neurodégénérescence spécifiquement au niveau du cervelet fuiraient davantage que les souris « contrôles » lorsque le stimulus est émis (Bohne et al., 2022). Enfin, deux publications ont étudié la mise en place des réponses comportementales défensives après la naissance. La première montre que le

looming induit un comportement de fuite entre 14 et 16 jours post-natal (P14-P16) qui serait complètement développé autour de P20-P24 (*Chen et al., 2022*). La seconde étude réalisée par Narushima et ses collègues (*2022*) mentionne une augmentation de la probabilité de fuir à P28. Dans cette même étude, les auteurs ont exploré l'effet d'une perturbation de l'expérience visuelle en élevant des souris dans le noir, de P21 à P28. Cette privation supprime l'augmentation de la probabilité de fuite précédemment observée chez les individus élevés de manière conventionnelle et entraîne une augmentation de la probabilité de freezing (*Narushima et al., 2022*).

D'autre part, beaucoup ont étudié les voies cérébrales impliquées et modulant les réponses de peur innée.

d. Structures cérébrales et réseaux neuronaux impliqués dans les comportements de peur innée suite à un stimulus de looming

Les structures cérébrales et les circuits neuronaux qui sous-tendent les réponses de peur innée ont principalement été étudiés à l'aide de traceurs antérogrades et rétrogrades, de manipulations optogénétiques et chémogénétiques, d'électrophysiologie ainsi que de l'imagerie calcique.

Comme mentionné précédemment, certaines structures clés sous-tendant la peur apprise sont aussi impliquées dans la régulation des comportements de peur innée.

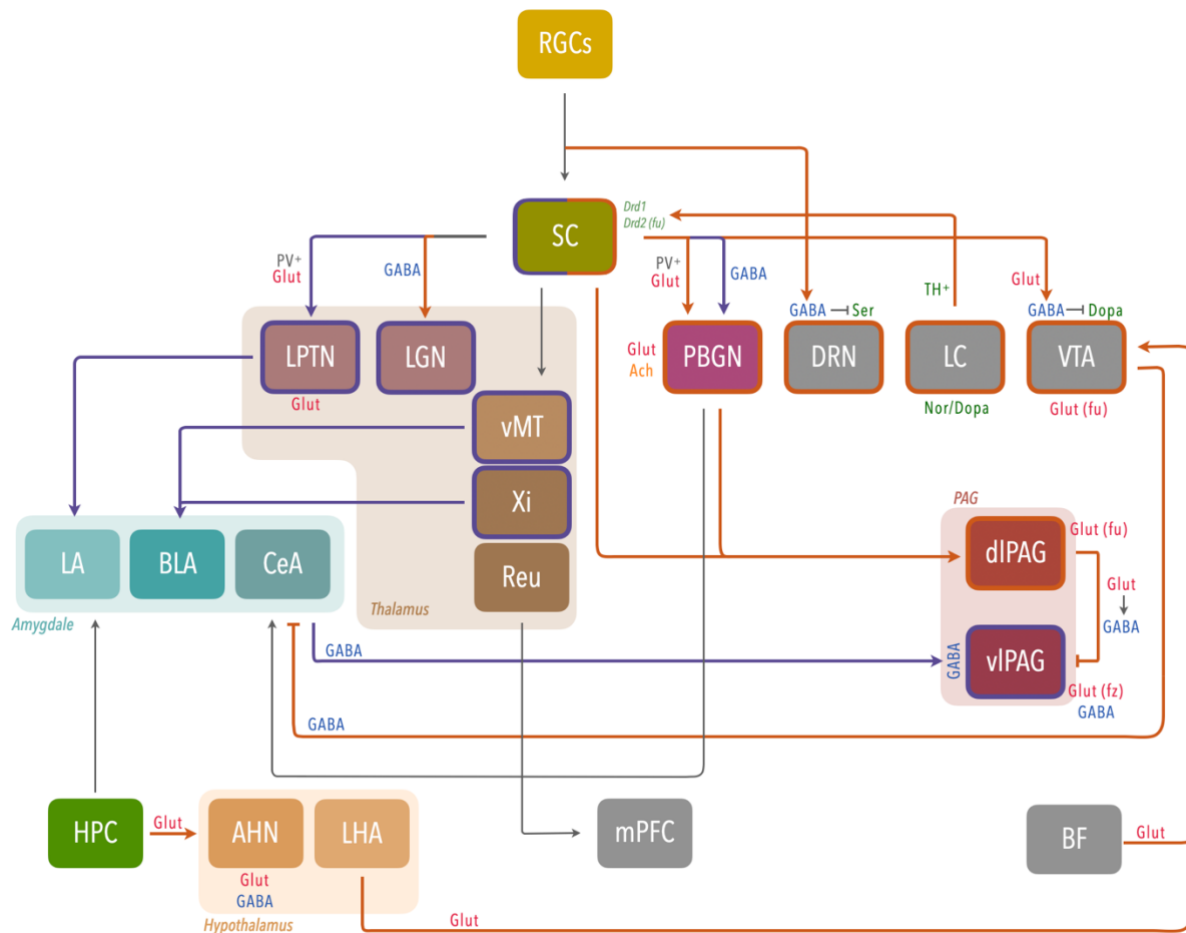


Figure 36. Schéma récapitulatif des structures et voies cérébrales impliquées dans la réponse de peur innée suite à un stimulus visuel. Les structures bordées de violet sont davantage impliquées dans la réponse de freezing tandis que les structures bordées d'orange sont davantage impliquées dans la réponse de fuite, il en est de même pour les voies violettes et oranges. DRN, noyau du raphé dorsal ; LC, locus coeruleus ; dIPAG, substance grise périaqueducule dorsolatérale ; vIPAG, substance grise périaqueducule ventrolatérale ; VTA, aire tegmentale ventrale ; RGCs, cellules ganglionnaires de la rétine ; SC, colliculus supérieur ; LPTN, noyau latéro-postérieur du thalamus ; LGN, noyau géniculé latéral ; PBGN, noyau parabimigéminale ; vMT, noyaux ventro-médians du thalamus ; Xi, noyau xiphoid ; Reu, noyau reuniens ; mPFC, cortex préfrontal médial ; BLA, amygdale basolatérale ; LA, amygdale latérale ; CeA, amygdale centrale ; HPC, hippocampe ; AHN, noyau antérieur de l'hypothalamus ; LHA, aire hypothalamique latérale ; BF, basal forebrain ; Glut, glutamate ; GABA, γ -aminobutyric acid ; Dopa, dopamine ; Ser, sérotonine ; Nor, noradrénaline ; TH, tyrosine hydroxylase ; PV, parvalbumine ; ACh, acétylcholine ; Drd1/2, récepteurs à la dopamine ; fu, comportement de fuite ; fz, comportement de freezing

Les stimuli visuels sont perçus par les photorécepteurs de la rétine et le message nerveux généré est transmis à différentes structures cérébrales grâce aux cellules ganglionnaires (i.e. les neurones de la rétine) (RGCs). D'un point de vue anatomique, une population de RGCs innerve les colliculi supérieurs (SC) (Huang et al., 2017). Les SC reçoivent entre 85 et 90% des efférences de la rétine (Ellis et al., 2016) et correspondent aussi à une structure de projection majoritaire du cortex visuel (Dräger, 1974). Les SC sont connectés à l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Zhou et al., 2019). Plus précisément, les neurones glutamatergiques des SC projettent

aux neurones GABAergiques de la VTA qui envoient leurs projections au niveau de l'amygdale (Zhou et al., 2019). Aussi, une activation par optogénétique des afférences des SC arrivant à la VTA induit des comportements de défense suite au stimulus de looming (Zhou et al., 2019). La VTA est elle-même connectée au cerveau antérieur basal (*basal forebrain*, BF) mais aussi à l'aire hypothalamique latérale (LHA), dont les activations respectives induisent les réponses de peur innée (Barbano et al., 2020; Cai et al., 2022). De plus, des neurones à parvalbumine (PV⁺) des SC projettent directement au noyau parabigéminale (PBGN) et au noyau latéro-postérieur du thalamus (LPTN) (Deichler et al., 2020; Shang et al., 2018; Wei et al., 2015). Shang et collaborateurs (2018) ont montré qu'une activation par stimulation optogénétique de la voie SC-PBGN induit une fuite suivie de freezing, tandis que l'activation de la voie SC-LPTN induit un comportement de freezing immédiat. D'autre part, les SC projettent également des neurones GABAergiques au niveau du noyau géniculé latéral (LGN) et au PBGN, dont les inhibitions augmentent la réponse de freezing ou la réponse de fuite respectivement (Li et al., 2023). La connexion entre les SC et la substance grise périaqueducal dorsale (dPAG) régule l'initiation du comportement de fuite (Evans et al., 2018). En effet, en couplant l'imagerie calcique et l'optogénétique, Evans et ses collègues ont proposé un modèle où la menace est intégrée au niveau des SC, et seul le passage d'un certain seuil permet le déclenchement de l'initiation du comportement de fuite par activation de la dPAG (Evans et al., 2018). Les SC envoient aussi des projections au thalamus ventro-médian (vMT) (Krout et al. 2001), incluant les noyaux reuniens (Reu) et xiphoïde (Xi), qui contrôle la réaction à une menace visuelle (Salay et al., 2018). Le locus coeruleus (LC) est aussi connecté aux SC en projetant des neurones exprimant la tyrosine hydroxylase (TH⁺) (Li et al., 2018). Cette voie serait notamment impliquée dans les effets du stress qui engendre une accélération de la fuite lors du stimulus de looming (Li et al., 2018). Ces neurones pourraient agir au niveau des SC en activant les récepteurs à la dopamine Drd2, impliqués dans le comportement de fuite lors d'un stimulus de looming (Montardy et al., 2022). Enfin, les SC agissent de concert avec le noyau du raphé dorsal (DRN) (Huang et al., 2017). En effet, les RGCs projettent aux SC et activent la voie SC-LPTN-BLA induisant du freezing, mais ils projettent aussi au DRN facilitant la fuite par inhibition indirecte des neurones sérotoninergiques (Huang et al., 2017).

De plus, il est bien établi que l'amygdale présente une implication majeure dans la peur (LeDoux, 2000) ainsi que dans la réponse au stimulus de looming. En effet, il a été montré que la réponse de freezing induite par le looming est augmentée lorsque le circuit entre le vMT et l'amygdale

basolatérale (BLA) est activé (*Salay et al., 2018*). À l'inverse, l'inactivation de la BLA inhibe le comportement de peur induit par le looming (*Wei et al., 2015*). Le noyau central de l'amygdale (CeA) semble aussi impliqué dans les comportements de défense (*Shang et al., 2015; Zhou et al., 2019*) notamment par sa connexion à la substance grise périaqueducule (PAG) (*Tovote et al., 2016*). Effectivement, l'activation de la CeA conduit à la désinhibition des neurones de la substance grise périaqueducule ventrolatérale (vlPAG), induisant un comportement de freezing. À l'inverse, des neurones de la substance grise périaqueducule dorsolatérale (dlPAG) inhibent ceux de la vlPAG et induisent ainsi un comportement de fuite (*Tovote et al., 2016*). Ainsi, la PAG semble être une structure clé pour réguler les comportements de peur en réponse à une menace. Aussi, une étude récente montre que le circuit entre l'hippocampe (HPC) et le noyau antérieur de l'hypothalamus (AHN) contrôle la fuite dirigée vers l'abri (*Bang et al., 2022*). L'hippocampe ventral projette des afférences glutamatergiques au niveau des neurones GABAergiques et glutamatergiques de l'AHN (*Bang et al., 2022*).

e. Vieillesse et peur

Le vieillissement est lié à un ensemble de changements comportementaux, cellulaires et moléculaires. Plusieurs études se sont intéressées aux modifications des comportements des souris avec l'âge en utilisant toute une batterie de tests comportementaux afin de mettre en évidence différents aspects notamment moteurs, mnésiques et émotionnels (*Shoji & Miyakawa, 2019; Yanai & Endo, 2021*).

TESTS	Yanai & Endo 2021 (C57Bl/6J de 22 mois)	Shoji & Miyakawa 2019 (C57Bl/6J de 22-26 mois)	
Santé générale	↗ poids corporel	↘ poids corporel ↘ température corporelle	
Rotarod	↘ gait velocity (temps passé sans tomber à une certaine vitesse)	↘ latence à la chute	CAPACITÉS MOTRICES ET SENSIBILITÉ À LA DOULEUR
Wire hanging/grip test	↘ force	↘ force	
Sensibilité au choc	↗ seuil de sensibilité	-	
Hot plate test	Pas de différence entre jeunes et âgées	↘ latence à lécher/secouer les pattes	
Open field Activité en cage d'élevage	↘ activité locomotrice ↘ relèvement (rearing) ↗ immobilité	↘ activité locomotrice ↘ activité verticale	COMPORTEMENTS DE TYPE ANXIEUX ET DÉPRESSIFS
Light/dark transition test	-	↘ activité locomotrice ↘ temps passé dans la chambre illuminée	
Elevated-Plus Maze	-	↘ activité locomotrice ↘ nombre d'entrées dans les bras	
Marble burying	↘ nombre de billes enterrées ↗ immobilité	-	
Porsolt forced swim test	-	↗ immobilité	COMPORTEMENTS SOCIAUX
Tail suspension test	-	↗ immobilité	
Test social à 3 chambres	-	Sociabilité identique aux jeunes ↘ préférence pour la nouveauté sociale	
Social interaction	-	↗ temps de contact	RÉPONSE SENSORI-MOTRICE
Startle response test/ prepulse inhibition test	-	↘ sursaut au son altération de l'inhibition au prépulse	
T-maze	-	↘ alternance spontanée	MÉMOIRE DE TRAVAIL, DE PEUR ET SPATIALE
Fear conditioning	↗ freezing en pré-son à 24h ↗ freezing au contexte à 48h	↘ freezing en conditionnement de peur indicé	
Barnes maze	↗ latence à trouver la cible ↘ temps dans le quadrant cible ↘ nose-pokes dans le trou cible	↗ latence à trouver la cible pendant l'apprentissage ↘ temps dans zone cible en probe test à 1 ou 10 jours	
Morris Water Maze	↗ latence à trouver la plateforme en apprentissage ↘ vitesse de nage ↘ nombre de croisements plateforme en probe test	-	

Tableau 9. Récapitulatif des altérations comportementales observées chez les souris C57Bl/6J âgées.

De façon générale, les souris âgées présentent une altération de l'activité locomotrice et de la coordination motrice, ainsi que des comportements de type anxieux, une augmentation de la sensibilité à la douleur mais aussi des déficits de la mémoire spatiale et de travail (Shoji & Miyakawa, 2019; Yanai & Endo, 2021). De plus, la réponse de freezing suite à un conditionnement de peur est altérée chez les rongeurs âgés (Gould & Feiro, 2005; Moyer & Brown, 2006; Shoji & Miyakawa, 2019). Malgré la grande variété de tests comportementaux à laquelle les souris âgées ont été soumises, peu de connaissances sont disponibles concernant l'impact du vieillissement sur les comportements de peur innée induits par un stimulus de looming.

Au niveau neurobiologique, le vieillissement est associé à de multiples altérations cellulaires et moléculaires comme une activité aberrante des réseaux neuronaux (Mattson & Arumugam,

2018). Le déficit cognitif des rats âgés est également lié à une diminution de la connectivité fonctionnelle cérébrale (Ash et al., 2016). Des changements structuraux au niveau du cerveau se produisent au cours du vieillissement avec des altérations morphologiques de l'amygdale (Von Bohlen Und Halbach & Unsicker, 2002), des changements de volume des couches superficielles des colliculi supérieurs avec une augmentation du nombre de cellules gliales (Díaz et al., 2003), ainsi que des modifications astrocytaires dans la substance grise périaqueducule (Jaworska-Adamu et al., 2014). De nombreuses modifications moléculaires ont aussi été observées avec le vieillissement telles qu'une altération de l'expression des gènes et des régulations épigénétiques (voir PARTIE I – I.e. Vieillesse, mémoire et transcription génique – Altérations cellulaires et moléculaires dues à l'âge) mais aussi une augmentation de stress oxydatif associée à des dysfonctions mitochondriales (pour revue, Ionescu-Tucker & Cotman, 2021).

Ainsi, le vieillissement est caractérisé par de nombreux changements comportementaux associés à des altérations cellulaires et moléculaires observées au niveau cérébral.

PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE & OBJECTIFS

II. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Des comportements de défense adaptés sont essentiels pour la survie d'une espèce. Les réponses de peur innée ont été étudiées chez la souris adulte ainsi que les voies cérébrales et réseaux neuronaux impliqués dans la modulation de ces réponses. Bien que le développement des comportements de défense induits par un stimulus de looming s'effectue dans les premières semaines suivant la naissance de l'individu, nous ne savons pas comment le vieillissement impacte ces comportements et les réseaux cérébraux sous-jacents à leur expression.

Le vieillissement engendre des déficits comportementaux ainsi que des altérations cellulaires et moléculaires. Sur la base de ces données, nous avons émis l'hypothèse que les comportements de peur innée en réponse au looming seraient altérés chez des souris âgées, et que le recrutement des réseaux cérébraux impliqués dans la réponse défensive serait modifié.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons fixé les objectifs suivants :

- i. Comparer les comportements de peur innée lors d'un stimulus de looming chez des souris jeunes (3-4 mois) et âgées (23-25 mois).
- ii. Explorer l'activation de structures cérébrales impliquées dans l'élaboration de ces comportements de défense, par marquage immunohistochimique de la protéine c-Fos suite au looming, chez les souris jeunes et âgées.
- iii. Comparer la connectivité fonctionnelle cérébrale par des analyses de corrélation de la densité de cellules c-Fos⁺ entre ces structures, chez les souris jeunes et âgées.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre font l'objet d'un manuscrit soumis pour publication dans le journal *Neurobiology of Aging* (manuscrit de l'article soumis en Annexe 1).

MATÉRIELS & MÉTHODES

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

a. Autorisations à expérimenter

L'ensemble des protocoles expérimentaux utilisant des animaux de laboratoire est conforme aux directives européennes (2010/63/EU) et a été approuvé par le comité d'éthique local ainsi que le Ministère français de l'Éducation et de la Recherche (APAFIS#12342-2017082111489451 v6 et #12343-2017111516096417 v9).

b. Animaux

L'ensemble des expérimentations a été réalisé sur des souris mâles et femelles C57Bl/6Jrj âgées de 3-4 mois et de 23-25 mois. Les souris utilisées proviennent à l'origine de Janvier Labs (France) avant de maintenir leur reproduction en interne dans l'animalerie du Centre de Biologie Intégrative (CBI, Toulouse). Elles sont hébergées en groupe de 4 à 6 animaux avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Les conditions d'hébergement sont constantes avec un cycle jour/nuit de 12h (7h30 – 19h30) et une température de 23°C.

c. Tests comportementaux

Les tests comportementaux sont réalisés le matin. Les souris sont placées dans la salle du dispositif une heure avant le début de l'expérimentation, afin de réduire l'impact du déplacement depuis la stabulation sur leur comportement.

Chaque animal est isolé 4 jours avant le début des tests comportementaux et manipulé durant les 2 jours précédant le test de looming.

Looming

Le dispositif comportemental (IMETRONIC, France) est constitué d'une arène rectangulaire (40x38x31 cm) et comprenant un abri noir opaque (12.5x10x4.5 cm). Un écran (27.5x46.5 cm) est positionné au-dessus de l'arène pour présenter les stimuli (Figure 37).

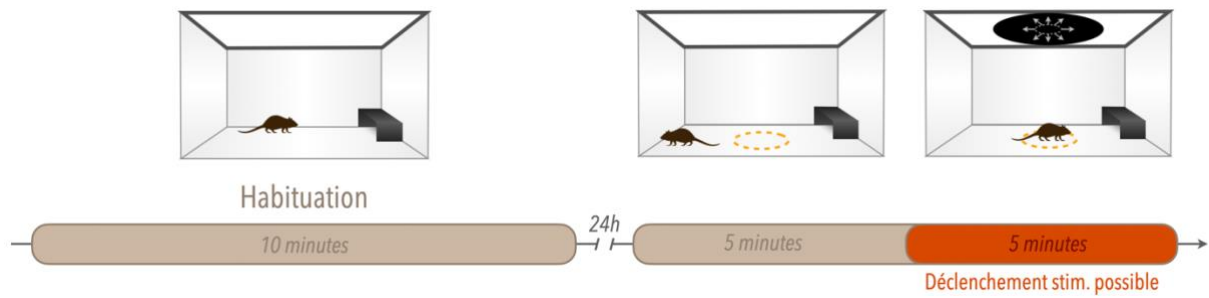


Figure 37. Dispositif et déroulement du test de looming.

Le stimulus de looming correspond à un cercle noir de 1 cm de diamètre qui apparaît au centre de l'écran et s'agrandit jusqu'à 25 cm de diamètre en 250 ms puis reste fixe pendant encore 250 ms. Cette séquence est répétée 10 fois à 500 ms d'intervalle (Figure 38).

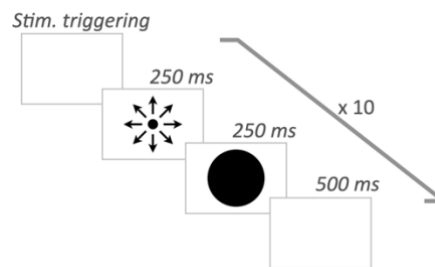


Figure 38. Représentation schématique du stimulus de looming utilisé.

Le premier jour du test comportemental, chaque souris est placée dans l'arène pour une session d'habituation de 10 minutes. Lors de celle-ci, nous vérifions que la souris a exploré l'abri. L'animal est ensuite replacé dans sa cage.

Le second jour du test, chaque individu est replacé dans l'arène, libre de l'explorer durant 5 minutes, à partir desquelles son passage dans un cercle virtuel tracé au centre de l'arène déclenche le stimulus (Figure 37). Un cut-off est défini à 10 minutes. Si l'animal ne passe pas au centre de l'arène dans ce délai, il sera simplement replacé dans sa cage et exclu de l'expérience. L'arène et l'abri sont nettoyés à l'éthanol 30% après chaque animal.

Dans la suite de ce travail, nous distinguons trois conditions ou groupes de souris. Les animaux « Home-cage » n'ont jamais été exposés à l'arène ou au stimulus de looming, ils ont seulement été isolés et manipulés de la même façon que les groupes « Contrôle » et « Looming ». Les souris « Contrôle » ont été soumises à la session d'habituation dans

l'arène du looming, mais le jour du test, leur passage dans la zone centrale de l'arène ne déclenchait pas le stimulus. Enfin, le groupe de souris « Looming » a été exposé au stimulus le jour du test.

Conditionnement de peur au contexte (Contextual Fear Conditioning, CFC)

Le dispositif comportemental se compose d'une boîte insérée dans une armoire insonorisée et constituant le contexte de conditionnement. Ce dernier correspond à une arène carrée (25x25x35 cm) en plexiglas transparent dans une boîte aux parois blanches. Un pattern (21x29.7 cm) représentant des lignes noires verticales est affiché sur une des parois latérales de la boîte. Le plancher de l'arène correspond à des barreaux métalliques afin que le choc électrique puisse être délivré aux pattes de la souris. La luminosité est de 42.5 lux. Un bruit blanc (70 dB) est émis dans ce contexte dès que la souris y est placée. Le dispositif est nettoyé à l'eau distillée après chaque animal.

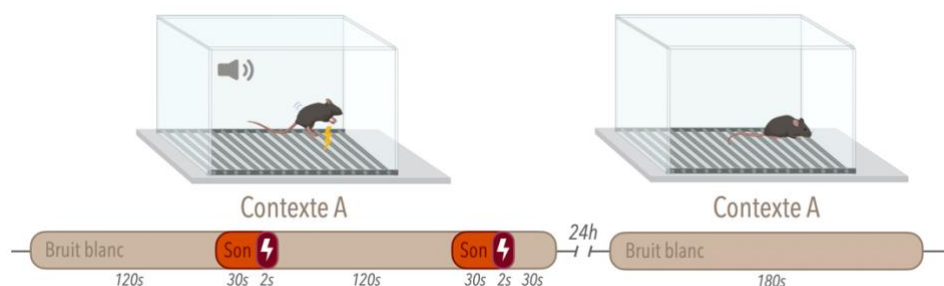


Figure 39. Dispositif et déroulement du conditionnement contextuel par la peur.

Le premier jour correspond au conditionnement des souris. Les souris sont placées une par une dans le contexte qu'elles peuvent explorer librement durant 120 secondes. Un son (7 kHz, 70 dB) est alors émis durant 30 secondes et un choc électrique (2 secondes à 0.7 mA) est délivré aux pattes de l'animal après 148 secondes d'exploration. Cette séquence est répétée une seconde fois et se termine par 30 secondes d'exploration.

Le second jour, nous testons la mémoire contextuelle des souris en les replaçant une par une dans le contexte de conditionnement durant 3 minutes.

À chaque fois que la souris est placée dans le dispositif, un comportement de peur est mesuré : le freezing. Ce comportement, dont la durée est interprétée comme le niveau de

mémoire de l'individu, correspond à une absence de mouvement de l'animal à l'exception des mouvements respiratoires.

L'émission du choc électrique, du son et du bruit blanc est programmée avec le logiciel Poly Fear (IMETRONIC, France) qui collecte aussi les données du temps de freezing de l'animal. Ce temps est mesuré grâce à des faisceaux infrarouges quadrillant les arènes qui sont coupés par l'animal en mouvement. Un comportement de freezing est défini par l'absence de coupure des faisceaux durant plus de 1000 ms.

d. Perfusion intra-cardiaque

Afin de récupérer le cerveau des animaux pour des expériences d'immunohistochimie, les souris sont mises à mort par injection intrapéritonéale de 0.1 mL d'euthanasiant (Euthasol vet, Dechra) puis perfusées de façon intra-cardiaque à un débit de 20 mL/min avec du NaCl 0.9% à 4°C pendant 60 secondes. Le cerveau est ensuite collecté et plongé dans une solution de PFA 4% pendant 48 heures avant d'être transféré dans une solution de sucre 30% contenant de l'azide de sodium 0.1% pendant 48 heures minimum.

e. Immunohistochimie anti c-Fos

Des coupes frontales de 30 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome à congélation (Leica SM2010R, Leica Biosystems, Nanterre, France) à partir des cerveaux précédemment collectés sur toute l'étendue rostro-caudale. Pour chaque cerveau, les coupes sont placées dans une série de 12 tubes contenant du cryoprotectant (Tris HCl ; Tris Base ; NaCl ; éthylène glycol ; glycérol), avant d'être conservées à -20°C.

Les coupes flottantes (30 µm d'épaisseur ; espacées de 360 µm) sont lavées 2 fois pendant 30 minutes dans du PBST avant de subir un traitement inactivant les peroxydases endogènes (10% méthanol ; 10% H₂O₂ ; PBST) pendant 15 minutes. Après 2 lavages au PBST, elles sont incubées dans une solution de blocage (PBST ; 10% NDS ; 1% BSA à 10 mg/mL) pendant une heure. Elles sont ensuite incubées toute la nuit sous agitation dans la solution à 1/1000 d'anticorps primaires (PBST ; 10% NDS ; 1% BSA à 10mg/mL ; anticorps de lapin anti c-Fos Abcam ab190289). Le lendemain, elles sont lavées 2 fois pendant 20 minutes dans du PBST avant d'être incubées dans la solution à 1/500 d'anticorps secondaires (PBST ; 10% NDS ; 1% BSA à 10 mg/mL ; anticorps d'âne anti-lapin Alexa 555 Life Tech

A31572) pendant une heure et demie. Finalement, les coupes sont rincées puis colorées au Hoechst (1/10000) et montées sur lame et sous lamelle avec du Mowiol.

f. Acquisition et analyse d'images pour le marquage c-Fos

Les acquisitions d'images sont effectuées avec un microscope à fluorescence (Leica DM6000 B) et à l'aide du logiciel Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France). Pour chaque structure cérébrale analysée, 3 images sont acquises sur 3 coupes successives avec un objectif 10X. La densité de cellules immunopositives pour c-Fos (cellules c-Fos⁺) est estimée sur chacune des 3 images puis la densité moyenne est calculée. Pour une structure donnée, chaque valeur individuelle correspond donc à la densité moyenne obtenue sur 3 coupes successives du cerveau. Brièvement, le contour des régions d'intérêt est d'abord tracé manuellement à partir des images en Hoechst, grâce au logiciel ImageJ (ImageJ, MD, États-Unis) et selon l'atlas du cerveau de souris (*Paxinos & Franklin, 2001*). Le contour est ensuite transposé sur les images obtenues pour le signal c-Fos. Un seuillage, déterminé pour chaque région d'intérêt, est appliqué et le nombre de cellules c-Fos⁺ est automatiquement compté grâce à la fonction « analyze particles » dont les paramètres sont fixés pour chaque région d'intérêt.

g. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 10.

Analyse du comportement et de la densité de cellules c-Fos⁺

Pour les analyses du comportement, la significativité statistique a été déterminée par un test exact de Fisher pour la proportion de souris montrant un comportement de fuite et par un test de Mann-Whitney pour la latence à fuir. Pour la densité de cellules c-Fos⁺, la significativité statistique a été démontrée en utilisant l'ANOVA à un facteur pour chaque structure cérébrale et chaque âge, suivi de tests post-hoc de Tuckey lorsque l'ANOVA était significative. Nous n'avons pas pu comparer les densités de cellules c-Fos⁺ entre les souris jeunes et âgées puisque les expériences d'immunohistochimie ont été réalisées en utilisant deux lots différents d'anticorps anti c-Fos (Abcam ab190289 ; #GR3379960-1 pour les souris jeunes and Abcam ab190289 ; #1026805-1 pour les souris âgées).

Corrélations inter-régionales

Dans chaque groupe expérimental (« Home-cage », « Contrôle », « Looming ») et pour chaque âge, le coefficient de corrélation de Pearson (valeur de r) a été déterminé pour les comparaisons par paire des densités de cellules c-Fos⁺ entre les 10 régions cérébrales étudiées. Autrement dit, chaque densité de cellules c-Fos⁺ d'une structure a été corrélée avec la densité de cellules c-Fos⁺ des 9 autres structures. L'ensemble des corrélations est représenté par les matrices de corrélation (Figures 44A et 45A).

Analyse des corrélations et connectivité fonctionnelle

Les coefficients de corrélation de Pearson (valeur de r) précédemment calculés ainsi que les densités de cellules c-Fos⁺ ont été utilisés pour construire des réseaux de connectivité fonctionnelle entre les structures. Chaque région cérébrale étudiée est représentée par un nœud (cercle), dont la taille est proportionnelle au facteur multiplicatif de la densité de cellules c-Fos⁺ dans une région pour une condition, par rapport à la même région de la condition « Home-cage ». En d'autres termes, une augmentation de la densité de cellules c-Fos⁺ pour une condition par rapport à la condition « Home-cage », se traduira par une augmentation du diamètre du cercle représentant la structure concernée dans le réseau. Les lignes de connexion dans le réseau représentent les corrélations de Pearson (valeur de r) entre les régions cérébrales et ne montrent que les corrélations dont la valeur de p est inférieure à 0.05. L'épaisseur des lignes de connexion est proportionnelle à la valeur du coefficient de corrélation de Pearson. Autrement dit, une ligne épaisse correspond à une haute valeur de r . Le package igraph sur R (v1.2.4.1) a été utilisé pour visualiser les réseaux.

L'ensemble des résultats des analyses statistiques sont détaillés dans les tableaux en **Annexe 2**.

RÉSULTATS

IV. RÉSULTATS

a. La réponse comportementale induite par le looming est modifiée avec l'âge

Afin d'évaluer la réponse de peur chez des souris jeunes (3-4 mois) et âgées (23-25 mois), nous avons soumis les animaux au stimulus de looming imitant l'approche rapide d'un prédateur volant au-dessus de la souris.

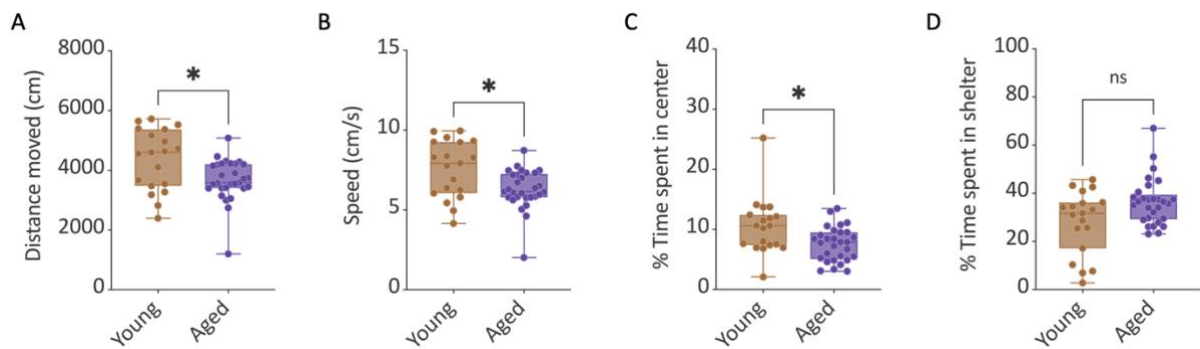


Figure 40. Mesure des comportements de type anxieux et de l'activité locomotrice pendant la session d'habituation. Pendant la session d'habituation, en comparaison aux jeunes souris (n=19), les souris âgées (n=29) montrent (A) une diminution de la distance parcourue, (B) diminution de leur vitesse moyenne et (C) un pourcentage de temps passé au centre de l'arène diminué mais (D) un pourcentage de temps passé au niveau de l'abri similaire. Les données sont représentées par la médiane, *p<0.05

Avant le jour du test, les souris ont d'abord été habituées au dispositif lors d'une session d'exploration de l'arène. Lors de celle-ci, nous avons observé que les souris âgées, par rapport aux jeunes souris, parcouraient une distance plus courte, à une vitesse diminuée et qu'elles passaient moins de temps au centre de l'arène (Figure 40 : test de Mann-Whitney, distance parcourue, p=0.0230, vitesse moyenne, p=0.0152, temps passé au centre, p=0.0162, temps passé dans l'abri, p=0.0545). Cela confirme que le vieillissement entraîne une altération de l'activité locomotrice ainsi que des comportements de type anxieux.

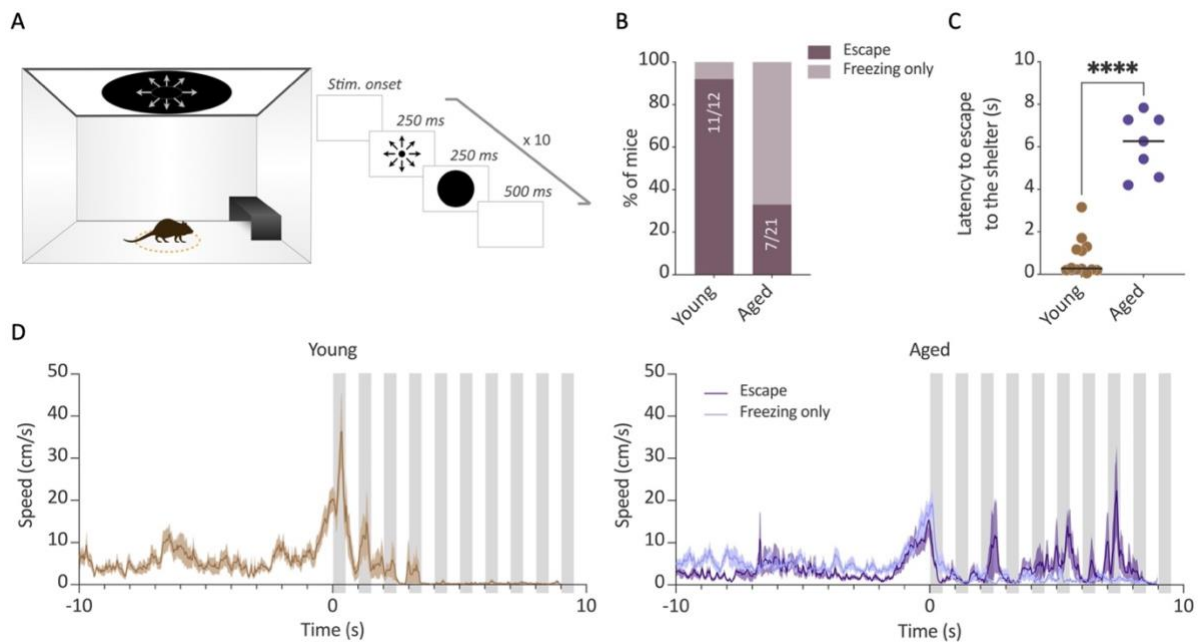


Figure 41. Effet de l'âge sur le comportement de peur innée en réponse au stimulus de looming chez les souris. (A) Représentation schématique du dispositif comportemental générant le stimulus de looming (gauche). Le stimulus est présenté lorsque la souris entre dans une zone centrale virtuelle (cercle orange pointillé) selon la séquence indiquée (droite). (B) Pourcentage de jeunes souris (3-4 mois) et de souris âgées (23-25 mois) exprimant un comportement de fuite pendant le stimulus de looming. (C) Latence à la fuite vers l'abri après le déclenchement du stimulus pour les jeunes souris (n=11) et les souris âgées (n=7). Les données sont représentées par la médiane, ****, $p < 0.0001$ (chaque point représente un animal). (D) Vitesse des jeunes souris (gauche, n=12) et des souris âgées (droite, n=21) pendant les 10 secondes précédant (-10 à 0 s) et durant (0 à 10 s) le stimulus de looming. Les souris âgées sont divisées en deux groupes : celles exprimant seulement un comportement de freezing sans fuite (violet clair, n=14) et celles exprimant un comportement de fuite en plus du freezing (violet foncé, n=7). Chaque barre grise représente un stimulus de looming comme indiqué en (A). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM.

Le jour du test, nous avons observé que le stimulus de looming induit un comportement de fuite robuste vers l'abri chez la plupart des jeunes souris (92%). De façon intéressante, plus de la moitié des souris âgées (67%) ne fuient pas et répondent de façon prédominante par du freezing au stimulus de looming. Seulement un tiers des souris âgées fuient vers l'abri face au looming (Figure 41B : test exact de Fisher, réponse de fuite chez les jeunes, n=12, 11/12 [92%] *versus* âgées, n=21, 7/21 [33%], $p=0.0028$). Nous pouvons noter que la latence à fuir vers l'abri est augmentée chez les souris âgées comparées aux jeunes (Figure 41C : test de Mann-Whitney, latence à fuir chez les jeunes, n=11, 0.28 sec *versus* âgées, n=7, 6.27 sec, $p < 0.0001$). En effet, en détaillant davantage notre analyse, nous avons pu observer que la vitesse des jeunes souris augmente immédiatement quand le stimulus est déclenché et qu'elles fuient. La vitesse chute ensuite rapidement quand les souris montrent du freezing sous l'abri. À l'inverse, la vitesse des

souris âgées diminue immédiatement après le déclenchement du stimulus. La majorité d'entre elles montrent d'abord du freezing puis deux groupes peuvent être distingués : un premier dans lequel les souris maintiennent ce comportement de freezing avec une vitesse faible et un second où les souris fuient vers l'abri avec une vitesse élevée. Pour résumer, ces résultats montrent que les souris âgées présentent de façon prédominante un comportement de freezing déclenché par un danger visuel, tandis qu'une minorité d'entre elles adopte un comportement de fuite tardif.

b. L'activité cellulaire déclenchée en réponse au stimulus de looming est modifiée par l'âge.

Les souris jeunes et âgées ont été sacrifiées 90 minutes après le test de looming afin de cibler le pic d'expression de la protéine c-Fos, marqueur de l'activité cellulaire. Après une immunohistochimie contre cette protéine, les densités de cellules c-Fos immunopositives (c-Fos⁺) ont été estimées dans 10 régions cérébrales d'intérêt et comparées entre les conditions « Home-cage », « Contrôle » et « Looming » pour chaque âge. Les régions cérébrales d'intérêt ont été sélectionnées sur la base de la littérature pour leur importance dans la réponse de peur innée.

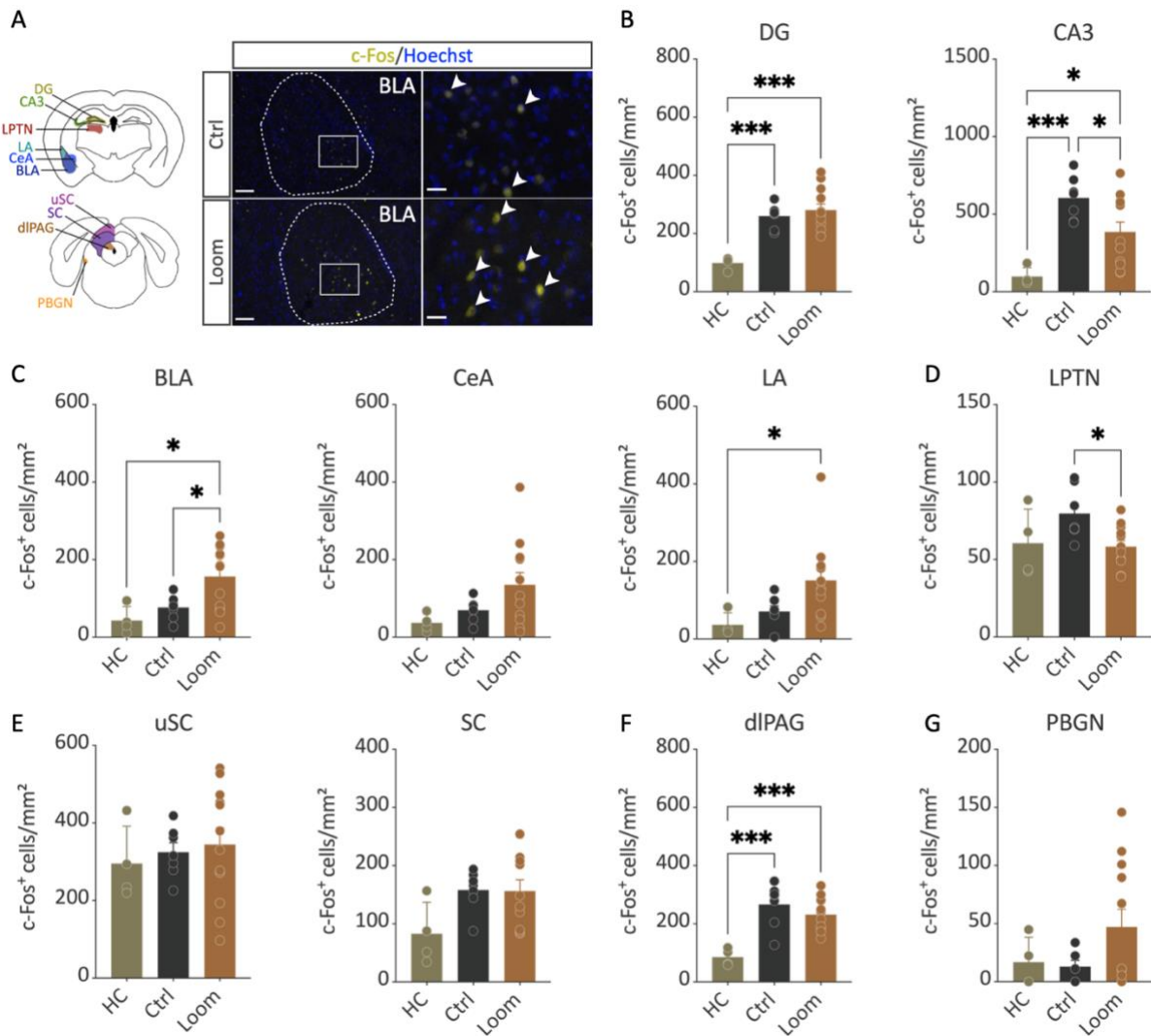


Figure 42. Quantification du marquage c-Fos dans plusieurs régions cérébrales en réponse au looming chez les jeunes souris. (A) (Gauche) Représentation schématique des régions cérébrales sélectionnées pour l'analyse des immunohistochimies c-Fos [Bregma -1.82 (*haut*) et -4.16 mm (*bas*)]. (Droite) Photomicrographes des coupes de cerveau après immunohistochimie anti c-Fos et contre-colorées au Hoechst. Les flèches blanches indiquent la présence de cellules c-Fos⁺ dans la BLA des souris « Contrôles » (Ctrl) et « Looming » (Loom) [barres d'échelle = 100 μ m/25 μ m]. Analyses des densités de cellules c-Fos⁺ dans (B) le gyrus denté (DG) et la région CA3 de l'hippocampe dorsal, (C) l'amygdale basolatérale (BLA), centrale (CeA) et latérale (LA), (D) le noyau latéro-postérieur du thalamus (LPTN), (E) le colliculus supérieur (SC) et ses couches superficielles (uSC), (F) la substance grise périaqueducule dorsolatérale (dIPAG) et (G) le noyau parabigéminale (PBGN) des souris « Home-Cage » (HC, n=4), « Contrôles » (Ctrl, n=7) et « Looming » (Loom, n=12). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ; *p<0.05, ***p<0.001.

Une ANOVA à un facteur a été réalisée pour chaque structure chez les souris jeunes et révèle un effet de la condition sur la densité de cellules c-Fos⁺ pour la BLA et la LA (Figure 42C : $F(2,20)=6.347$, $p=0.007$ et $F(2,20)=4.299$, $p=0.0280$, respectivement), la région CA3 et le DG de l'hippocampe (Figure 42A : $F(2,20)=9.905$, $p=0.001$ et $F(2,20)=14.32$, $p=0.0001$, respectivement), le LPTN (Figure 42D : $F(2,20)=4.084$, $p=0.033$), ainsi que la dIPAG (Figure 42F : $F(2,20)=13.06$, $p=0.0002$). Nous notons une augmentation significative de la densité de cellules

c-Fos⁺ entre les groupes « Contrôle » et « Looming » au niveau de la BLA. Ceci était attendu puisque les souris ont exprimé une réponse de peur au stimulus visuel activant ainsi le circuit cérébral de la peur où l'amygdale est une structure clé. De plus, nous observons une diminution significative du marquage c-Fos entre les groupes « Contrôle » et « Looming » pour la région CA3 et le LPTN. Aussi, pour une partie des jeunes souris, le stimulus de looming est associé à une augmentation, bien que non-significative comparée aux autres groupes, de la densité de cellule c-Fos⁺ au niveau du PBGN (Figure 42G : $F(2,19)=1.689$, $p=0.2114$). Par ailleurs, nous notons aussi une augmentation de cellules c-Fos⁺ pour les conditions « Contrôle » et « Looming » comparées au groupe « Home-cage » au niveau de l'hippocampe dorsal (DG et CA3) suggérant un rôle pour ces structures dans l'encodage du contexte spatial. De plus, les groupes « Looming » et « Contrôle » présentent une augmentation de densité de cellules marquées dans la dIPAG comparée aux souris « Home-cage ». Cependant, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence au niveau de la CeA (Figure 42C : $F(2,20)=2.742$, $p=0.0886$), des SC et des couches superficielles des SC (Figure 42E : $F(2,20)=2.794$, $p=0.0851$ et $F(2,20)=0.2557$, $p=0.7768$, respectivement). Ainsi, l'exposition à l'arène et au stimulus de looming conduit à des changements notables de l'activité cellulaire chez les jeunes souris. De façon plus spécifique, ces modifications ont été observées dans l'hippocampe et l'amygdale, ainsi que dans la substance grise périaqueducule, chacune de ces régions étant impliquée dans les comportements innés de défense.

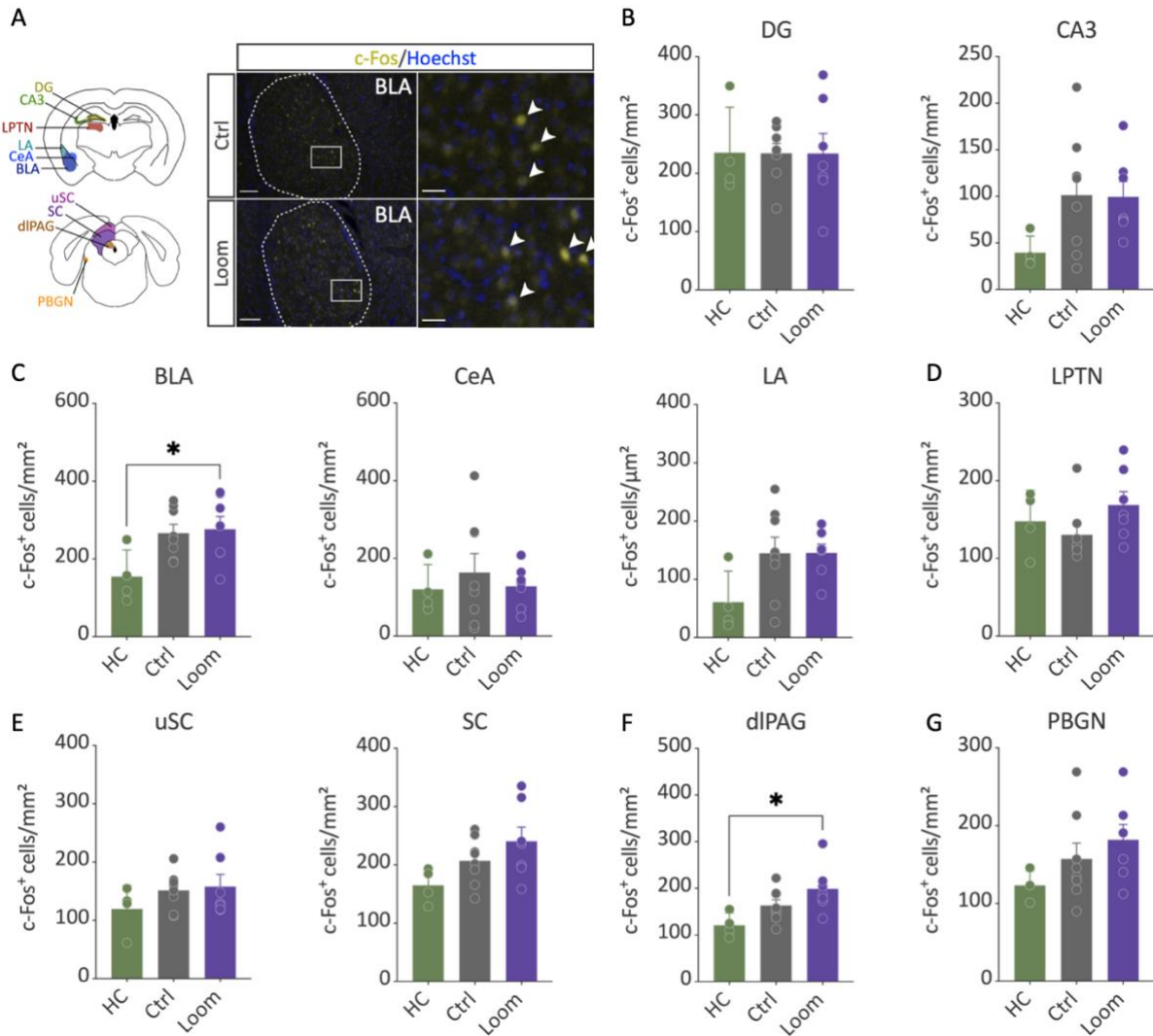


Figure 43. Quantification du marquage c-Fos dans plusieurs régions cérébrales en réponse au looming chez les souris âgées. (A) (Gauche) Représentation schématique des régions cérébrales sélectionnées pour l'analyse des immunohistochimies c-Fos [Bregma -1.82 (*haut*) et -4.16 mm (*bas*)]. (Droite) Photomicrographes des coupes de cerveau après immunohistochimie anti c-Fos et contrecolorées au Hoechst. Les flèches blanches indiquent la présence de cellules c-Fos⁺ dans la BLA des souris « Contrôles » (Ctrl) et « Looming » (Loom) [barres d'échelle = 100 μ m/25 μ m]. Analyses des densités de cellules c-Fos⁺ dans (B) le gyrus denté (DG) et la région CA3 de l'hippocampe dorsal, (C) l'amygdale basolatérale (BLA), centrale (CeA) et latérale (LA), (D) le noyau latéro-postérieur du thalamus (LPTN), (E) le colliculus supérieur (SC) et ses couches superficielles (uSC), (F) la substance grise périaqueducule dorsolatérale (dIPAG) et (G) le noyau parabigéminale (PBGN) des souris « Home-Cage » (HC, n=4), « Contrôles » (Ctrl, n=8) et « Looming » (Loom, n=7). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ; *p<0.05.

Concernant les souris âgées, les analyses par ANOVA à un facteur indiquent des changements d'activité cellulaire seulement au niveau de la BLA (Figure 43C : $F(2,16)=4.047$, $p=0.0378$) et de la dIPAG (Figure 43F : $F(2,16)=4.910$, $p=0.0217$). Aucune différence significative entre les conditions n'a pu être mise en évidence pour les 8 autres (DG : $F(2,16)=0.0004230$, $p=0.9996$; CA3 : $F(2,16)=2.247$, $p=0.1380$; CeA : $F(2,16)=0.3355$, $p=0.7199$; LA : $F(2,16)=2.985$, $p=0.0791$; LPTN : $F(2,16)=1.681$, $p=0.2174$; SC : $F(2,16)=2.991$, $p=0.0788$; uSC : $F(2,16)=1.061$, $p=0.3691$;

PBGN : $F(2,16)=1.747$, $p=0.2060$). Contrairement aux jeunes souris, l'exposition à l'arène ne modifie pas l'activité cérébrale des souris âgées (comparaison entre les conditions « Contrôles » et « Home-cage ») et le stimulus de looming n'induit de modifications de l'activité cellulaire qu'au niveau de deux des structures analysées (BLA et dIPAG). Cela suggère que les souris âgées présentent une altération de l'activation cérébrale suite au looming. Ce genre de déficit d'activation a déjà été observé après une tâche de reconnaissance testant la mémoire de souris âgées où une altération de l'activation du cerveau a été corrélée à de faibles performances mnésiques (*Belblidia et al., 2018*).

c. Le stimulus de looming recrute des circuits cérébraux différents selon l'âge

Afin d'étudier l'activation cérébrale dans son ensemble et d'appréhender la connectivité fonctionnelle entre les 10 régions cérébrales sélectionnées, nous avons recherché la co-variation de la densité de cellules c-Fos⁺ pour chaque paire de structures et pour chaque âge. Il en résulte 45 corrélations pour chaque condition et chaque âge, représentées par des matrices de corrélation (Figures 44A et 45A) et des réseaux (Figures 44B et 45B). Pour les matrices, les corrélations significatives sont signalées par des étoiles selon leur valeur de p. Les réseaux ne montrent que les corrélations significatives (positives en lignes pleines et négatives en lignes pointillées) depuis la matrice de corrélation entre les structures étudiées.

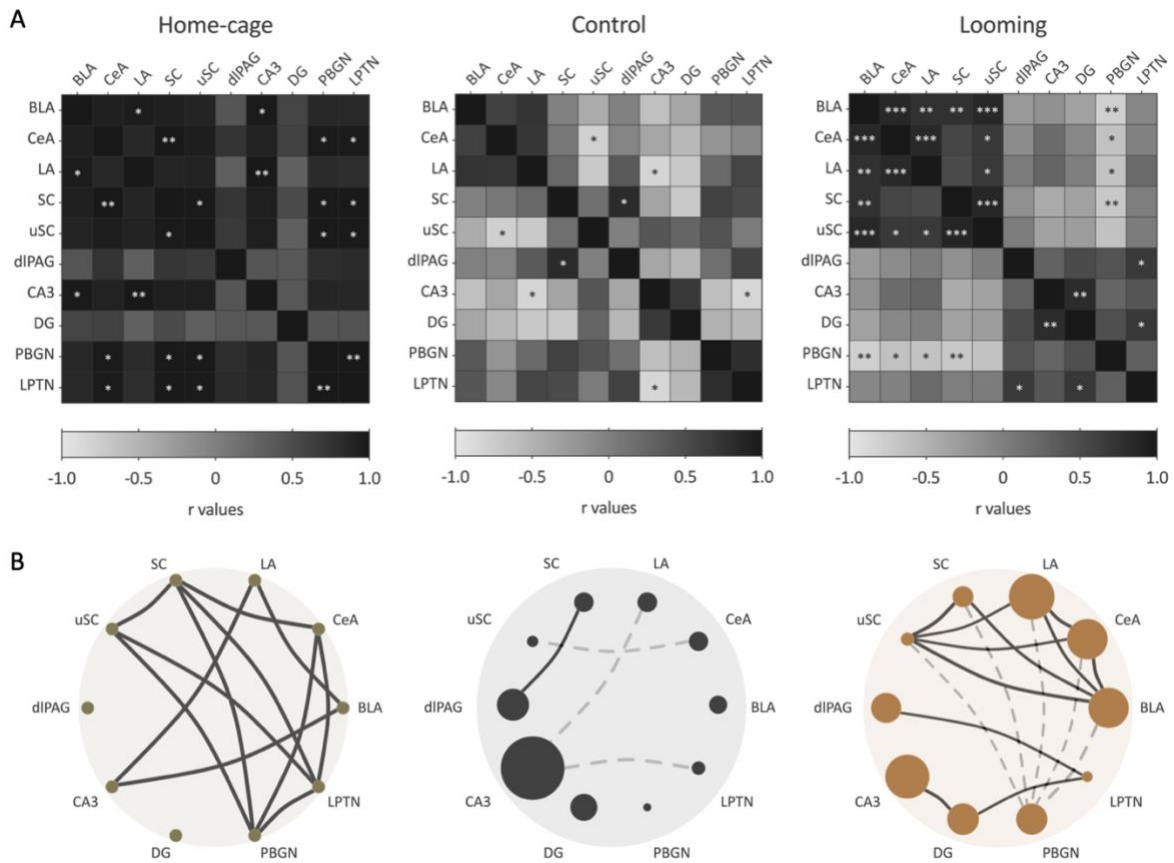


Figure 44. Matrices de corrélation et réseaux de connectivité fonctionnelle cérébrale recrutés par le stimulus de looming chez les jeunes souris. **(A)** Analyse de corrélation entre les densités de cellules c-Fos⁺ des régions cérébrales des souris « Home-Cage », « Contrôles » et « Looming ». La couleur de chaque case représente la valeur du coefficient de corrélation de Pearson (r values entre -1 et 1) selon les régions cérébrales comparées. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(B)** Représentations en réseau pour chaque matrice de corrélation ne montrant que les corrélations significatives positives (lignes noires) et négatives (lignes grises pointillées). Chaque structure cérébrale est représentée par un cercle dont la taille représente le fold-change de la densité de cellules c-Fos⁺ entre les groupes expérimentaux (« Contrôles » et « Looming ») et le groupe « Home-cage ». L'épaisseur de la ligne connectant deux structures représente la valeur de r de la corrélation. LA, amygdale latérale ; CeA, amygdale centrale ; BLA, amygdale basolatérale ; LPTN, noyau latéro-postérieur du thalamus ; PBGN, noyau parabigéminale ; DG, gyrus denté de l'hippocampe dorsal ; CA3, région CA3 de l'hippocampe dorsal ; dIPAG, substance grise périaqueducule dorsolatérale ; uSC, couches superficielles du colliculus supérieur ; SC, colliculus supérieur.

Cette analyse révèle un plus grand nombre de corrélations positives et négatives pour le groupe « Looming » comparé au groupe « Contrôle ». Pour les jeunes souris exposées seulement à l'arène (groupe « Contrôle »), nous observons principalement des corrélations négatives entre les régions cérébrales et notamment avec la région CA3 qui est la structure la plus activée dans le groupe « Contrôle ». Pour le groupe « Looming », nous observons des connexions entre les noyaux amygdaliens (LA, BLA, CeA) et les SC ainsi que le PBGN. Ceci était attendu puisqu'il existe des connexions anatomiques entre ces 3 structures (Shang et al., 2015; Wei et al., 2015). Par ailleurs, l'hippocampe dorsal (CA3 et DG) semble former un réseau avec le LPTN dont l'activité

est liée à celle de la dlPAG. Finalement, pour le groupe « Home-cage », la matrice de corrélations suggère un état stable à faible activité du réseau, caractérisé par une large connectivité inter-régionale principalement soutenue par des corrélations positives et sans l'émergence de sous-réseau particulier.

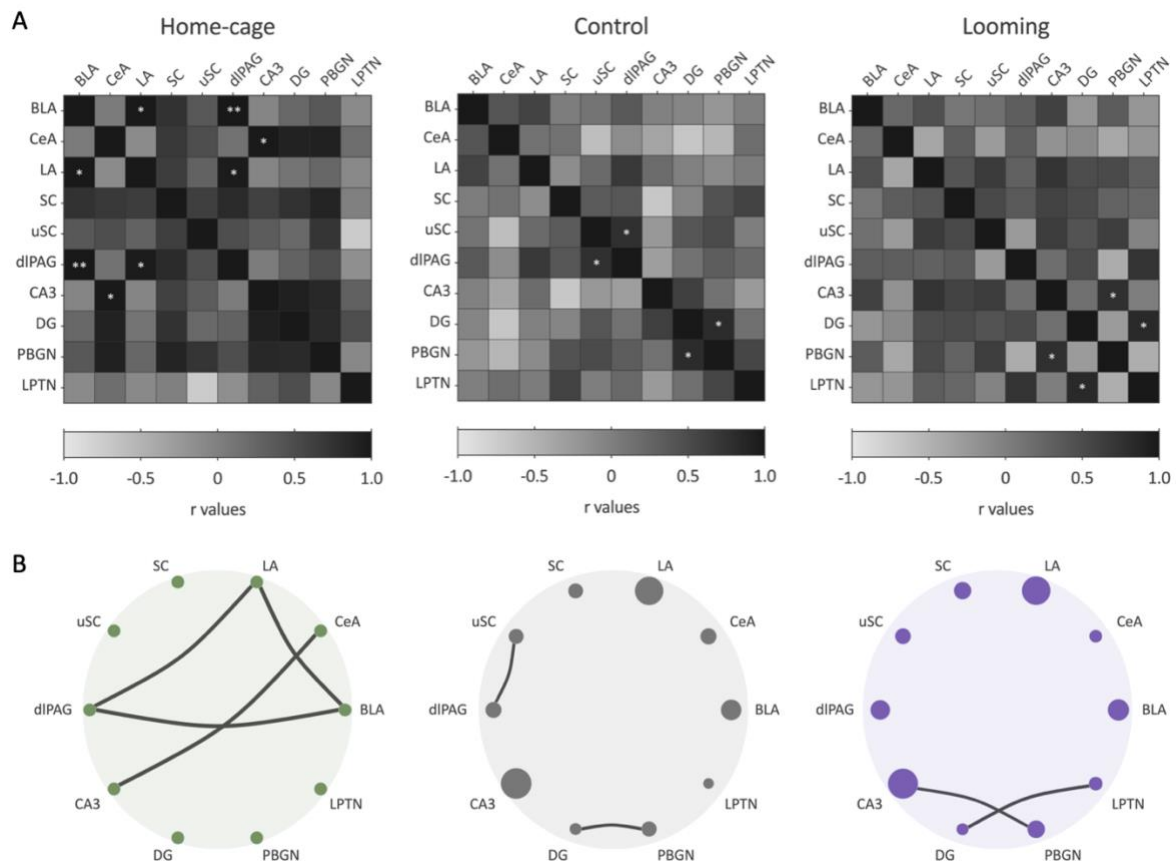


Figure 45. Matrices de corrélation et réseaux de connectivité fonctionnelle cérébrale recrutés par le stimulus de looming chez les souris âgées. **(A)** Analyse de corrélation entre les densités de cellules c-Fos⁺ des régions cérébrales des souris « Home-Cage », « Contrôles » et « Looming ». La couleur de chaque case représente la valeur du coefficient de corrélation de Pearson (r values entre -1 et 1) selon les régions cérébrales comparées. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. **(B)** Représentations en réseau pour chaque matrice de corrélation ne montrant que les corrélations significatives positives (lignes noires) et négatives (lignes grises pointillées). Chaque structure cérébrale est représentée par un cercle dont la taille représente le fold-change de la densité de cellules c-Fos⁺ entre les groupes expérimentaux (« Contrôles » et « Looming ») et le groupe « Home-cage ». L'épaisseur de la ligne connectant deux structures représente la valeur de r de la corrélation. LA, amygdale latérale ; CeA, amygdale centrale ; BLA, amygdale basolatérale ; LPTN, noyau latéro-postérieur du thalamus ; PBGN, noyau parabigéminale ; DG, gyrus denté de l'hippocampe dorsal ; CA3, région CA3 de l'hippocampe dorsal ; dlPAG, substance grise périaqueducule dorsolatérale ; uSC, couches superficielles du colliculus supérieur ; SC, colliculus supérieur.

L'effet du contexte, révélé avec le groupe « Contrôle », et du stimulus de looming, sur l'activité cérébrale dans les régions étudiées semble être majoritairement perdu chez les souris âgées. En effet, seule l'augmentation d'activation cellulaire au niveau de la BLA et de la dlPAG est préservée chez les souris âgées comparées aux individus « Home-cage ».

Contrairement aux jeunes, aucun schéma de corrélation évident, ni aucune connectivité fonctionnelle n'ont émergé suite au stimulus de looming. Seules deux corrélations positives entre l'hippocampe, le LPTN et le PBGN surviennent. De façon intéressante, la connectivité fonctionnelle des groupes « Contrôle » et « Home-cage » ne diffère pas vraiment de la condition « Looming » suggérant que la connectivité fonctionnelle observée chez les souris soumises au stimulus de looming est altérée avec l'âge. Ce résultat est en accord avec une précédente étude montrant une diminution de connectivité fonctionnelle associée à des déficits cognitifs chez des rats âgés (*Ash et al., 2016*).

DISCUSSION & CONCLUSION

V. DISCUSSION & CONCLUSION

L'objectif de ces travaux était de déterminer l'impact de l'âge sur le comportement de peur innée en réponse à un stimulus de looming et les structures cérébrales impliquées. Nous avons montré que les souris âgées peuvent présenter une réponse de peur modifiée suite au stimulus visuel, avec un comportement de freezing plutôt qu'une fuite dirigée vers l'abri comme exprimée par une majorité de jeunes souris. Les souris âgées soumises au stimulus de looming présentent une augmentation de cellules c-Fos⁺ seulement au niveau de la BLA et de la dIPAG, tandis que les jeunes souris ont des changements d'activité au niveau de l'hippocampe (CA3 et DG), des noyaux amygdaliens (BLA et LA), du LPTN et de la dIPAG. De plus, la connectivité fonctionnelle entre ces structures semble altérée chez les souris âgées suite au stimulus de looming.

a. Le comportement de peur innée est altéré chez les souris âgées

Dès le début de ces travaux, nous avons décidé d'isoler les souris avant le test de looming afin d'induire une réponse de fuite robuste comme cela avait déjà été montré (*Lenzi et al., 2022*). Ce comportement a bien été observé chez les jeunes souris, mais très peu chez les souris âgées. L'isolement social implique une augmentation de la vigilance (*Williams et al., 2009*) et de la réactivité (*Siegfried et al., 1981; Zelikowsky et al., 2018*) ce qui pourrait expliquer la réponse de fuite chez les jeunes souris. Cependant, il est aussi connu que l'isolement social favorise l'anxiété (*Ieraci et al., 2016*) et que le vieillissement est aussi accompagné par une altération des comportements de types anxieux et dépressifs (*Li et al., 2020*). En accord avec ces données, nous avons observé que les souris âgées passaient moins de temps dans la zone centrale de l'arène comparées aux jeunes (**Figure 40C**), ce qui pourrait être interprété comme une augmentation de leur niveau d'anxiété. Ainsi, il est possible que les souris âgées soient encore plus anxieuses que les jeunes, notamment à cause de l'isolement, ce qui pourrait impacter leur réponse de peur au stimulus.

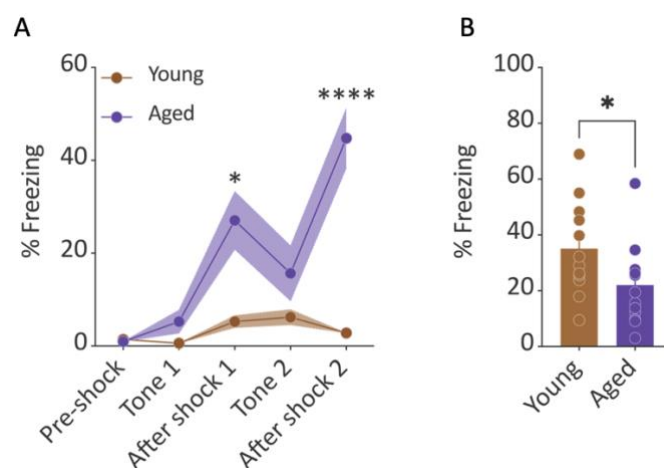


Figure 46. Conditionnement de peur au contexte chez les souris jeunes et âgées. Les souris jeunes (n=12) et âgées (n=14) qui n'ont pas été utilisées pour réaliser les immunohistochimies c-Fos après le looming, ont été soumises à un conditionnement de peur au contexte. (A) Lors du conditionnement, les souris âgées présentent une exacerbation du comportement de freezing après avoir reçu les chocs électriques par rapport aux jeunes souris. (B) Les souris âgées ont un pourcentage de freezing diminué par rapport aux jeunes souris lorsqu'elles sont replacées dans le contexte de conditionnement 24h après). Les données sont représentées par la moyenne \pm SEM ; *p<0.05.

Compte tenu du comportement inattendu de freezing exprimé par les souris âgées en réponse au stimulus de looming, il est probable que le vieillissement affecte également la réponse de ces individus à un autre stimulus aversif. Ainsi, nous avons soumis des souris âgées à des chocs électriques dans un contexte de conditionnement de peur et nous avons observé les taux de freezing immédiatement après l'administration des chocs (Figure 46A). D'après nos résultats, ces stimuli aversifs induisent, de façon similaire au stimulus de looming, une augmentation du niveau de freezing immédiate chez les souris âgées qui n'est pas retrouvée chez les jeunes souris (Figure 46A : ANOVA à 2 facteurs, effet de l'âge, $F(1,24)=16.99$, $p=0.0004$; effet du temps, $F(2.156,51.74)=17.89$, $p<0.0001$; effet de l'interaction âge x temps, $F(4,96)=14.60$, $p<0.0001$; tests post-hoc de Šidák, après choc 1, âgées vs jeunes, $p=0.0212$; après choc 2, âgées vs jeunes, $p<0.0001$). Cette réponse de freezing augmentée pourrait être due à une augmentation de sensibilité à la douleur, comme cela a déjà été montré chez des souris âgées (Shoji & Miyakawa, 2019). D'autre part, l'hypothèse d'une réponse de freezing exacerbée à cause d'une augmentation de l'anxiété chez les souris âgées pourrait être vérifiée en utilisant des substances anxiolytiques ou antidépresseives. En effet, l'administration de ces molécules induit une diminution du freezing après un conditionnement de peur (Conti et al., 1990; Inoue et al., 2011). Néanmoins, l'utilisation de stimuli douloureux pour induire un comportement de peur

innée reste un sujet débattu et il serait certainement plus approprié d'étudier ces comportements autrement que par l'administration de chocs électriques (*voir plus loin*).

Nous pourrions aussi nous demander si l'expression du freezing plutôt que de la fuite ne serait pas associée aux déficits locomoteurs observés chez les souris âgées. En effet, la fuite requiert certaines capacités motrices qui pourraient être affectées par l'âge. Ainsi, un test d'évitement actif (*active avoidance*) permettrait de mettre en évidence l'absence de fuite en réponse à un stimulus douloureux, même dans un environnement présentant une possibilité d'échappatoire. Cette perspective conduit également à la notion de résignation qui désigne le fait de supporter un événement inévitable, sans protestation, sans lutte de façon passive. Le niveau de résignation des animaux est un des symptômes associés aux comportements de type dépressifs et étudiés par l'intermédiaire des tests de nage forcée et de suspension caudale. Lors de ces tests, un pourcentage élevé d'immobilité des souris est interprété comme un état de résignation. Il a été montré que cet état est augmenté chez les souris âgées de 24 mois (*Li et al., 2020*) et que l'isolement social le favorise (*Ieraci et al., 2016*). Ainsi, il se pourrait que l'état de résignation des souris âgées soumises au test de looming soit aussi exacerbé, conduisant à un comportement passif de freezing plutôt qu'à un comportement actif de fuite.

D'autre part, le vieillissement conduit à un déclin des facultés sensorielles des souris. En effet, avec l'âge, des déficits au niveau de l'ouïe ont été détectés (*Ison et al., 2007; Li & Borg, 1991*), de même que des perturbations de l'olfaction (*Patel & Larson, 2009*). Les souris C57Bl/6 âgées présentent aussi une diminution de l'acuité visuelle et de la sensibilité au contraste (*Lehmann et al., 2012*). Même si nous pouvons exclure une perte totale de la vision chez les souris âgées – puisque chacune d'entre elles a réagi d'une manière ou d'une autre (i.e. freezing et/ou fuite) au stimulus de looming – il est possible qu'elles aient perçu le stimulus d'une autre façon. Un stimulus de looming moins contrasté devient moins saillant et diminue la probabilité de fuite (*Evans et al., 2018*). Ainsi, une altération de la perception du stimulus de looming avec une diminution de la sensibilité au contraste chez les souris âgées pourrait expliquer le changement de réponse défensive observé.

Par ailleurs, l'effet de l'âge sur la réponse au looming a été très peu étudiée. Liu et collaborateurs (*2022*) ont exploré la réponse au looming au cours de la vie des souris et n'ont observé aucune différence de comportement chez des souris âgées de 20 mois par rapport à de jeunes individus. La différence entre cette étude et nos travaux pourrait résider dans l'utilisation de dispositifs différents pour présenter le stimulus de looming. Effectivement, les

auteurs de cette étude ont utilisé une arène ronde sans abri, mais ouverte sur un couloir étroit et constituant ainsi la *safe place*. De plus, le stimulus présenté consiste en 15 répétitions séparées de 30 ms d'un agrandissement du disque noir en 300 ms et restant statique pendant 50 ms. Enfin, une des différences majeures avec les travaux de Liu et ses collègues demeure dans l'isolement social que nous avons appliqué à nos souris, puisqu'ils ont utilisé des souris hébergées en groupes tout au long de leur étude. Comme mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, il existe une grande variété de dispositifs et de stimuli utilisée pour les tests de looming. Cela pourrait rendre délicate la comparaison entre certaines études puisque les conditions environnementales sont importantes dans le choix des comportements de défense.

Finalement, il serait intéressant d'étudier si des changements comportementaux et cérébraux similaires à ceux que nous avons observés chez les souris âgées dans ces travaux sont induits par d'autres stimuli engendrant une peur innée. Bien entendu, il serait possible d'exposer les souris à des stimuli impliquant d'autres afférences sensorielles (e.g. auditives, olfactives) mais un contrôle de leurs fonctions sensorielles serait alors nécessaire afin de vérifier qu'elles perçoivent ces stimuli.

b. Les réseaux de connectivité fonctionnelle et l'activation cellulaire sont altérés chez les souris âgées

Nous avons observé des augmentations de la densité de cellules c-Fos⁺ dans plusieurs structures cérébrales chez les jeunes souris soumises au stimulus de looming, conduisant à l'émergence d'une connectivité fonctionnelle spécifique entre les régions impliquées dans la réponse de peur innée. De façon intéressante, les souris âgées ne présentent pas cette signature en terme de connectivité fonctionnelle associée au looming.

Il a été montré que l'expression de c-Fos diminue dans le cerveau de rats âgés (*Lee et al., 1998*) et que le vieillissement est couplé à un déséquilibre entre excitation et inhibition au niveau cérébral (*Wong et al., 2006*). Ces altérations pourraient expliquer la perte du réseau de connectivité fonctionnelle et la réponse comportementale modifiée des souris âgées.

Quel que soit l'âge des souris, nous n'avons pas observé de changement de la densité de cellules c-Fos⁺ dans les SC suite au stimulus de looming. Ce résultat est étonnant car une augmentation du nombre de cellules c-Fos⁺ a déjà été observée dans les SC suite au stimulus de looming chez la souris (*Hu et al., 2017*). Néanmoins, les SC semblent bien intégrés au sein

du réseau de connectivité fonctionnelle des jeunes souris soumises au looming (*Figure 44B*), avec un nombre important de corrélations significatives les reliant aux noyaux amygdaliens ainsi qu'au PBGN.

Aussi, nous avons pu observer une augmentation d'activité cellulaire au niveau du PBGN et une diminution de cette activité au niveau du LPTN chez les jeunes souris. Cette co-occurrence pourrait être corrélée au comportement de défense déclenché par le stimulus. En effet, l'activation de la voie SC-PBGN conduit à une réponse de fuite tandis que l'activation de la voie SC-LPTN induit du freezing (*Shang et al., 2018*). Ainsi, la réponse de fuite observée pourrait être due à une activation dominante du PBGN et une inactivation du LPTN. Par ailleurs, les effets du stimulus sur la densité de cellules c-Fos⁺ au PBGN et LPTN sont perdus chez les souris âgées. Nous pourrions donc émettre l'hypothèse qu'il existe un déséquilibre entre les deux voies précédemment décrites conduisant à une réponse comportementale au looming inadaptée chez les souris âgées. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'enregistrer l'activité du PBGN et du LPTN dans le cerveau des souris âgées lors de leur exposition au stimulus de looming.

D'autre part, nous avons aussi montré une augmentation du marquage c-Fos⁺ au niveau de la dlPAG chez les jeunes souris soumises au looming ce qui est consistant avec l'implication de cette région dans le comportement de fuite (*Tovote et al., 2016*). L'activation de la dlPAG est aussi présente chez les souris âgées. Néanmoins, lorsque l'on compare la taille du nœud dans le réseau de connectivité fonctionnelle des souris âgées, à celle des jeunes souris, cette augmentation est moins prononcée, ce qui pourrait être relié à l'absence de fuite chez les souris âgées. La vlPAG est aussi impliquée dans le comportement de freezing (*Tovote et al., 2016*). Il serait donc intéressant de quantifier la densité de cellules c-Fos⁺ dans cette région afin de déterminer si elle est suractivée chez les souris âgées, et ainsi corrélée au comportement de freezing observé.

De plus, nous avons montré une activation de la BLA des jeunes souris soumises au looming. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Hu et collaborateurs (*2017*), montrant une augmentation du nombre de cellules c-Fos⁺ dans la BLA des souris exposées au stimulus de looming par rapport au groupe « Contrôle ». Nous avons également observé une activation de la BLA dans le groupe « Looming » des souris âgées mais aussi chez les souris de la condition « Contrôle ». Cela pourrait être dû à l'anxiété élevée des souris âgées ainsi qu'à l'exposition à l'arène qui suractive les cellules de la BLA. En effet, l'exposition à un stress ou à un champ

ouvert (*open field*) augmente le nombre de cellules exprimant c-Fos dans ce noyau amygdalien (Hale et al., 2006; Kovács et al., 2018).

Finalement, nous avons observé une augmentation de densité de cellules c-Fos⁺ au niveau de l'hippocampe dorsal (DG et CA3) quand les jeunes souris sont exposées au dispositif de looming avec ou sans le stimulus. Comme attendu, ces changements ne sont pas retrouvés dans les cerveaux âgés. En effet, des altérations des fonctions hippocampiques induites par le vieillissement ont déjà été décrites (Rosenzweig & Barnes, 2003). Néanmoins, étant donné que l'hippocampe ventral est impliqué dans les comportements de peur apprise (Esclassan et al., 2009) ainsi que dans ceux de peur innée (Bang et al., 2022), il serait intéressant de poursuivre l'analyse de densité de cellules c-Fos⁺ dans cette structure.

Par rapport à l'ensemble des structures déjà connues pour être impliquées dans la réponse comportementale de peur innée (Figure 36), nos analyses se limitent à environ la moitié d'entre elles. Cependant, il serait tout à fait possible et vraiment intéressant de les poursuivre dans les structures que nous n'avons pas eu le temps d'observer.

c. Limites de l'approche immunohistochimique contre c-Fos

L'observation de la protéine c-Fos en tant que marqueur de l'activité cellulaire est une technique très répandue dans le domaine des neurosciences et qui a déjà été utilisée dans plusieurs études sur le comportement de peur innée (Hu et al., 2017; Li et al., 2018) mais également de peur apprise (Silva et al., 2019). En tant qu'IEG, l'expression de *c-fos* présente un pic à environ 30 minutes post-stimulation tandis que la production de protéine c-Fos montre un pic entre 60 et 120 minutes après la stimulation (Cullinan et al., 1995; Kovács & Sawchenko, 1996). Notre approche visant à détecter la protéine c-Fos suite au stimulus de looming présente donc une résolution temporelle limitée comparée à d'autres stratégies permettant une visualisation en temps réel et *in vivo* de l'activité des populations cellulaires (e.g. l'électrophysiologie *in vivo* ou l'imagerie calcique). Ces méthodes, abondamment employées pour l'étude des voies impliquées dans les réponses de peur innée, seraient par ailleurs essentielles pour vérifier les hypothèses que nous avons pu formuler dans la partie précédente, notamment celle concernant la mesure de l'activité du LPTN et du PBGN dans le cerveau des souris âgées.

Néanmoins, ces stratégies nécessitent l'implantation intra-crâniale ou intracérébrale de dispositifs d'enregistrement ou de stimulation imposants sur la tête de l'animal, altérant potentiellement la perception du stimulus qui est présenté au-dessus de l'individu. La création, la validation et l'ajustement de nouveaux dispositifs, notamment de réalité virtuelle, sont en développement pour pallier ces limites et immerger l'animal dans un environnement virtuel (Pinke et al., 2023).

Dans une démarche plus éthique, permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés et approfondir les analyses déjà effectuées, des approches de double marquage immunohistochimique sur les coupes cérébrales que nous possédons déjà seraient utiles pour distinguer les types cellulaires activés, co-marqués par l'anticorps anti c-Fos. Nous pourrions envisager d'utiliser des marqueurs des neurones glutamatergiques (e.g. vGlut), GABAergiques (e.g. Gad), dopaminergiques ou noradrénergiques (e.g. TH) ou encore sérotoninergique (e.g. TPH ou SERT). En effet, certains types de neurones sont directement impliqués dans la réponse comportementale de peur innée comme les neurones GABAergiques et glutamatergiques des SC (Li et al., 2023; Zhou et al., 2019) et de la PAG (Tovote et al., 2016), les neurones dopaminergiques/noradrénergiques du LC (Li et al., 2018) ou encore les neurones sérotoninergiques du DRN (Huang et al., 2017).

Enfin, comme cela a été précisé précédemment (voir III.g. Analyses statistiques - Analyse du comportement et de la densité de cellules c-Fos⁺) la réalisation des immunohistochimies sur les coupes cérébrales ne permet pas de comparer directement les densités de cellules c-Fos⁺ entre les souris jeunes et âgées. La réplication de ces expérimentations avec l'utilisation d'un même lot d'anticorps, nous permettrait d'effectuer ce genre d'analyse et d'avoir une meilleure vision sur l'activité cellulaire présente dans le cerveau âgé comparée à celle d'un cerveau jeune.

d. Le looming : une nouvelle façon de conditionner les souris par la peur ?

En accord avec cette vision éthique de la recherche, la possibilité d'induire un conditionnement de peur en administrant un stimulus aversif mais indolore aux animaux mérite d'être envisagée. En effet, les stimuli induisant des comportements défensifs énoncés dans l'introduction de ces travaux, sont aversifs et pourraient ainsi remplacer les stimuli douloureux habituellement employés. Cela a déjà été montré par l'exposition directe à des prédateurs ou à des congénères agressifs (Silva et al., 2013) mais aussi par l'utilisation de molécules olfactives provenant de prédateurs telles que la triméthylthiazoline ou TMT (fèces de renard), une odeur de chat ou de

l'urine de coyote (*Takahashi et al., 2007; Wallace & Rosen, 2000; Wang et al., 2013*). Dans ces études, des stimuli plus pertinents sur le plan écologique remplacent les chocs électriques administrés aux rongeurs dans un contexte de conditionnement, et la sortie comportementale correspond à une augmentation du freezing des individus replacés dans le contexte de conditionnement.

À ce jour, peu d'études ont tenté d'utiliser des stimuli visuels mimant des prédateurs comme stimulus inconditionné (*Heinemans & Moita, 2022; Zambetti et al., 2022*). Zambetti et collaborateurs ont mis en place un protocole dans un environnement « naturaliste ». L'objectif de ce dispositif était de reproduire ce qu'il pourrait se passer dans la vie sauvage des animaux. Pour cela, des rats ayant eu une restriction alimentaire sont placés dans une arène à la recherche de nourriture. Plusieurs groupes ont été formés pour le conditionnement : les animaux recevant de façon classique un choc électrique suite à l'émission d'un son (T/S) ; ceux soumis à un stimulus de looming suite à l'émission du son (T/O) ; ceux recevant un choc électrique lors de la soumission au looming suite au son (T/O/S) ou sans le son (O/S). En plus de la présence du stimulus de looming, une autre nouveauté dans cette étude est l'implantation de fils électriques au niveau de la nuque des rats. Cela permet l'administration du choc électrique au niveau d'une région corporelle écologiquement plus pertinente que les pattes, puisque les prédateurs attaquent principalement les rongeurs par le haut. Ainsi, les rats sont conditionnés selon l'association des stimuli précédemment décrits. Lors d'un test réalisé 24h plus tard, il a été observé que seuls les groupes T/O/S et O/S présentaient une latence plus longue à sortir du nid pour chercher la nourriture que lors du conditionnement. Ceci suggère que les animaux évitent la zone associée à l'attaque par le prédateur. Ainsi, le stimulus de looming associé au choc électrique permettrait une meilleure association du contexte à l'évènement aversif dans cet environnement naturaliste (*Zambetti et al., 2022*).

Heinemans et Moita (*2022*) ont tenté de faire associer un son à un stimulus de looming aux rats dans un contexte classique de conditionnement. Par comparaison avec des rats ayant reçu un conditionnement par des chocs électriques, elles ont mis en évidence une augmentation de freezing bien moins importante lors de la réémission du son (*Heinemans & Moita, 2022*). Néanmoins, il semblerait que le looming permet de former une mémoire à long terme de l'association du son au stimulus de looming (*Heinemans & Moita, 2022*).

Ces deux études montrent que le looming permet de conditionner les rats par la peur, mais aucune d'elle ne montre un conditionnement au contexte sans application de choc électrique.

Il serait donc intéressant de placer les rongeurs dans une arène et de les soumettre au looming puis de les replacer dans cette arène le lendemain pour observer leur comportement seulement par réexposition au contexte de conditionnement (e.g. temps de freezing, temps passé sous l'abri).

En conclusion, notre travail montre pour la première fois que le vieillissement affecte la réponse de peur innée à un stimulus visuel menaçant, et que cela est associé à une altération des réseaux cérébraux recrutés chez la souris. Dans le futur, d'autres études seront nécessaires pour poursuivre l'identification des mécanismes cérébraux et voies neuronales engagés dans les comportements défensifs induits par le looming.

BIBLIOGRAPHIE

-A-

Abdou, K., Shehata, M., Choko, K., Nishizono, H., Matsuo, M., Muramatsu, S., Inokuchi, K., 2018. Synapse-specific representation of the identity of overlapping memory engrams. *Science* 360, 1227–1231. <https://doi.org/10.1126/science.aat3810>

Agranoff, B.W., Davis, R.E., Casola, L., Lim, R., 1967. Actinomycin D Blocks Formation of Memory of Shock-Avoidance in Goldfish. *Science* 158, 1600–1601. <https://doi.org/10.1126/science.158.3808.1600>

Ahmed, B.Y., Chakravarthy, S., Eggers, R., Hermens, W.T., Zhang, J.Y., Niclou, S.P., Levelt, C., Sablitzky, F., Anderson, P.N., Lieberman, A., Verhaagen, J., 2004. Efficient delivery of Cre-recombinase to neurons in vivo and stable transduction of neurons using adeno-associated and lentiviral vectors. *BMC Neuroscience*.

Alarcón, J.M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R., Barco, A., 2004. Chromatin Acetylation, Memory, and LTP Are Impaired in CBP+/- Mice. *Neuron* 42, 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.05.021>

Alland, L., David, G., Shen-Li, H., Potes, J., Muhle, R., Lee, H.-C., Hou, H., Chen, K., DePinho, R.A., 2002. Identification of Mammalian Sds3 as an Integral Component of the Sin3/Histone Deacetylase Corepressor Complex. *Molecular and Cellular Biology* 22, 2743–2750. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.8.2743-2750.2002>

Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., DePinho, R.A., 1997. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387, 49–55. <https://doi.org/10.1038/387049a0>

Allen, H.F., Wade, P.A., Kutateladze, T.G., 2013. The NuRD architecture. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3513–3524. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1256-2>

Alvarez, P., Squire, L.R., 1994. Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 7041–7045. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.15.7041>

Anagnostaras, S.G., Maren, S., Fanselow, M.S., 1999. Temporally Graded Retrograde Amnesia of Contextual Fear after Hippocampal Damage in Rats: Within-Subjects Examination. *J. Neurosci.* 19, 1106–1114. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-03-01106.1999>

Andrés, M.E., Burger, C., Peral-Rubio, M.J., Battaglioli, E., Anderson, M.E., Grimes, J., Dallman, J., Ballas, N., Mandel, G., 1999. CoREST: A functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9873–9878. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9873>

Artegiani, B., Lyubimova, A., Muraro, M., Van Es, J.H., Van Oudenaarden, A., Clevers, H., 2017. A Single-Cell RNA Sequencing Study Reveals Cellular and Molecular Dynamics of the Hippocampal Neurogenic Niche. *Cell Reports* 21, 3271–3284. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.050>

Ash, J.A., Lu, H., Taxier, L.R., Long, J.M., Yang, Y., Stein, E.A., Rapp, P.R., 2016. Functional connectivity with the retrosplenial cortex predicts cognitive aging in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 12286–12291. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525309113>

Awh, E., Vogel, E.K., Oh, S.-H., 2006. Interactions between attention and working memory. *Neuroscience* 139, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.023>

Ayer, D.E., Lawrence, Q.A., Eisenman, R.N., 1995. Mad-max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80, 767–776. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90355-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90355-0)

Ayers, L.W., Asok, A., Heyward, F.D., Rosen, J.B., 2013. Freezing to the predator odor 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) is disrupted by olfactory bulb removal but not trigeminal deafferentation. *Behavioural Brain Research* 253, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.06.034>

-B-

Babu, A., Verma, R.S., 1987. Chromosome Structure: Euchromatin and Heterochromatin, in: *International Review of Cytology*. Elsevier, pp. 1–60. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61435-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61435-7)

Bach, M.E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y.-F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., 1999. Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation *in vitro* and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5280–5285. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5280>

Baddeley, A., 1992. Working Memory. *Science* 255, 556–559. <https://doi.org/10.1126/science.1736359>

Bagheri, A., Habibzadeh, P., Razavipour, S., Volmar, C.-H., Chee, N., Brothers, S., Wahlestedt, C., Mowla, S., Faghihi, M., 2019. HDAC Inhibitors Induce BDNF Expression and Promote Neurite Outgrowth in Human Neural Progenitor Cells-Derived Neurons. *IJMS* 20, 1109. <https://doi.org/10.3390/ijms20051109>

Bahari-Javan, S., Maddalena, A., Kerimoglu, C., Wittnam, J., Held, T., Bähr, M., Burkhardt, S., Delalle, I., Kügler, S., Fischer, A., Sananbenesi, F., 2012. HDAC1 Regulates Fear Extinction in Mice. *J. Neurosci.* 32, 5062–5073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0079-12.2012>

Bailey, C.H., Chen, M., 1988. Long-term memory in *Aplysia* modulates the total number of varicosities of single identified sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2373–2377. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.7.2373>

Bak, M., Silaharoglu, A., Møller, M., Christensen, M., Rath, M.F., Skryabin, B., Tommerup, N., Kauppinen, S., 2008. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA* 14, 432–444. <https://doi.org/10.1261/rna.783108>

- Balasubramanian, M., Dingemans, A.J.M., Albaba, S., Richardson, R., Yates, T.M., Cox, H., Douzgou, S., Armstrong, R., Sansbury, F.H., Burke, K.B., Fry, A.E., Ragge, N., Sharif, S., Foster, A., De Sandre-Giovannoli, A., Elouej, S., Vasudevan, P., Mansour, S., Wilson, K., Stewart, H., Heide, S., Nava, C., Keren, B., Demirdas, S., Brooks, A.S., Vincent, M., Isidor, B., Küry, S., Schouten, M., Leenders, E., Chung, W.K., Haeringen, A. van, Scheffner, T., Debray, F.-G., White, S.M., Palafoll, M.I.V., Pfundt, R., Newbury-Ecob, R., Kleefstra, T., 2021. Comprehensive study of 28 individuals with SIN3A-related disorder underscoring the associated mild cognitive and distinctive facial phenotype. *Eur J Hum Genet* 29, 625–636. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-00769-7>
- Ballak, S.B., Degens, H., De Haan, A., Jaspers, R.T., 2014. Aging related changes in determinants of muscle force generating capacity: A comparison of muscle aging in men and male rodents. *Ageing Research Reviews* 14, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.005>
- Bang, J.Y., Sunstrum, J.K., Garand, D., Parfitt, G.M., Woodin, M., Inoue, W., Kim, J., 2022. Hippocampal-hypothalamic circuit controls context-dependent innate defensive responses. *eLife* 11, e74736. <https://doi.org/10.7554/eLife.74736>
- Barbano, M.F., Wang, H.-L., Zhang, S., Miranda-Barrientos, J., Estrin, D.J., Figueroa-González, A., Liu, B., Barker, D.J., Morales, M., 2020. VTA Glutamatergic Neurons Mediate Innate Defensive Behaviors. *Neuron* 107, 368–382.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.04.024>
- Barnes, V.L., Bhat, A., Unnikrishnan, A., Heydari, A.R., Arking, R., Pile, L.A., 2014. SIN3 is critical for stress resistance and modulates adult lifespan. *Aging* 6, 645–660. <https://doi.org/10.18632/aging.100684>
- Barrett, R.M., Malvaez, M., Kramar, E., Matheos, D.P., Arrizon, A., Cabrera, S.M., Lynch, G., Greene, R.W., Wood, M.A., 2011. Hippocampal Focal Knockout of CBP Affects Specific Histone Modifications, Long-Term Potentiation, and Long-Term Memory. *Neuropsychopharmacol* 36, 1545–1556. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.61>
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Goas, J.A., Lippa, A.S., 1980. Age-Related Changes in Passive Avoidance Retention: Modulation with Dietary Choline. *Science* 209, 301–303. <https://doi.org/10.1126/science.7384805>
- Beatty, W.W., Salmon, D.P., Bernstein, N., Butters, N., 1987. Remote memory in a patient with amnesia due to hypoxia. *Psychol. Med.* 17, 657–665. <https://doi.org/10.1017/S0033291700025897>
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2007. Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF-Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron* 53, 261–277. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.025>
- Belayet, J.B., Beamish, S., Rahaman, M., Alanani, S., Viridi, R.S., Frick, D.N., Rahman, A.F.M.T., Ulicki, J.S., Biswas, S., Arnold, L.A., Roni, M.S.R., Cheng, E.Y., Steeber, D.A., Frick, K.M., Hossain, M.M., 2022. Development of a Novel, Small-Molecule Brain-Penetrant Histone Deacetylase Inhibitor That Enhances Spatial Memory Formation in Mice. *J. Med. Chem.* 65, 3388–3403. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01928>

- Belblidia, H., Leger, M., Abdelmalek, A., Quiedeville, A., Calocer, F., Boulouard, M., Jozet-Alves, C., Freret, T., Schumann-Bard, P., 2018. Characterizing age-related decline of recognition memory and brain activation profile in mice. *Experimental Gerontology* 106, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.03.006>
- Ben Abdallah, N.M.-B., Filipkowski, R.K., Pruschy, M., Jaholkowski, P., Winkler, J., Kaczmarek, L., Lipp, H.-P., 2013. Impaired long-term memory retention: Common denominator for acutely or genetically reduced hippocampal neurogenesis in adult mice. *Behavioural Brain Research* 252, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.034>
- Benito, E., Urbanke, H., Ramachandran, B., Barth, J., Halder, R., Awasthi, A., Jain, G., Capece, V., Burkhardt, S., Navarro-Sala, M., Nagarajan, S., Schütz, A.-L., Johnsen, S.A., Bonn, S., Lührmann, R., Dean, C., Fischer, A., 2015. HDAC inhibitor-dependent transcriptome and memory reinstatement in cognitive decline models. *Journal of Clinical Investigation* 125, 3572–3584. <https://doi.org/10.1172/JCI79942>
- Benjamin, J.S., Pilarowski, G.O., Carosso, G.A., Zhang, L., Huso, David.L., Goff, L.A., Vernon, H.J., Hansen, K.D., Bjornsson, H.T., 2017. A ketogenic diet rescues hippocampal memory defects in a mouse model of Kabuki syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 125–130. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611431114>
- Berndsen, C.E., Denu, J.M., 2008. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology* 18, 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.11.004>
- Bhattacharyya, K., McLean, D.L., MacIver, M.A., 2017. Visual Threat Assessment and Reticulospinal Encoding of Calibrated Responses in Larval Zebrafish. *Current Biology* 27, 2751-2762.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.012>
- Bian, C., Huang, Y., Zhu, H., Zhao, Y., Zhao, J., Zhang, J., 2018. Steroid Receptor Coactivator-1 Knockdown Decreases Synaptic Plasticity and Impairs Spatial Memory in the Hippocampus of Mice. *Neuroscience* 377, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.02.034>
- Biderman, N., Bakkour, A., Shohamy, D., 2020. What Are Memories For? The Hippocampus Bridges Past Experience with Future Decisions. *Trends in Cognitive Sciences* 24, 542–556. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2020.04.004>
- Bieszczad, K.M., Bechay, K., Rusche, J.R., Jacques, V., Kudugunti, S., Miao, W., Weinberger, N.M., McGaugh, J.L., Wood, M.A., 2015. Histone Deacetylase Inhibition via RGFP966 Releases the Brakes on Sensory Cortical Plasticity and the Specificity of Memory Formation. *J. Neurosci.* 35, 13124–13132. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0914-15.2015>
- Bird, C.M., Burgess, N., 2008. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci* 9, 182–194. <https://doi.org/10.1038/nrn2335>
- Blalock, E.M., Chen, K.-C., Sharrow, K., Herman, J.P., Porter, N.M., Foster, T.C., Landfield, P.W., 2003. Gene Microarrays in Hippocampal Aging: Statistical Profiling Identifies Novel Processes Correlated with Cognitive Impairment. *J. Neurosci.* 23, 3807–3819. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03807.2003>

- Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., 2008. Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety, in: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp. 63–79. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7)
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1977. Aggressive behavior in the rat. *Behavioral Biology* 21, 197–224. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(77\)90308-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(77)90308-X)
- Blanchard, R.J., Wall, P.M., Blanchard, D.C., 2003. Problems in the study of rodent aggression. *Hormones and Behavior* 44, 161–170. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(03\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(03)00127-2)
- Bohne, P., Rybarski, M., Mourabit, D.B.-E., Krause, F., Mark, M.D., 2022. Cerebellar contribution to threat probability in a SCA6 mouse model. *Human Molecular Genetics* 31, 3807–3828. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac135>
- Boitard, C., Cavaroc, A., Sauvant, J., Aubert, A., Castanon, N., Layé, S., Ferreira, G., 2014. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 40, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.005>
- Bombail, V., Barret, B., Raynaud, A., Jérôme, N., Saint-Albin, A., Ridder, C., Collin, A., Leterrier, C., Guilloteau, L.A., Nielsen, B.L., 2018. In search of stress odours across species: Behavioural responses of rats to faeces from chickens and rats subjected to various types of stressful events. *Applied Animal Behaviour Science* 205, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.10.013>
- Bottomley, M.J., 2004. Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO Reports* 5, 464–469. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400146>
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., Kandel, E.R., 1998. Different Training Procedures Recruit Either One or Two Critical Periods for Contextual Memory Consolidation, Each of Which Requires Protein Synthesis and PKA. *Learn. Mem.* 5, 365–374. <https://doi.org/10.1101/lm.5.4.365>
- Bousiges, O., Vasconcelos, A.P.D., Neidl, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., Panteleeva, I., Loeffler, J.-P., Cassel, J.-C., Boutillier, A.-L., 2010. Spatial Memory Consolidation is Associated with Induction of Several Lysine-Acetyltransferase (Histone Acetyltransferase) Expression Levels and H2B/H4 Acetylation-Dependent Transcriptional Events in the Rat Hippocampus. *Neuropsychopharmacol* 35, 2521–2537. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.117>
- Brami-Cherrier, K., Lavaur, J., Pagès, C., Arthur, J.S.C., Caboche, J., 2007. Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *Journal of Neurochemistry* 101, 697–708. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04352.x>
- Brechbühl, J., Klaey, M., Broillet, M.-C., 2008. Grueneberg Ganglion Cells Mediate Alarm Pheromone Detection in Mice. *Science* 321, 1092–1095. <https://doi.org/10.1126/science.1160770>
- Bredy, T.W., Wu, H., Crego, C., Zellhoefer, J., Sun, Y.E., Barad, M., 2007. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn. Mem.* 14, 268–276. <https://doi.org/10.1101/lm.500907>

Bridi, M., Schoch, H., Florian, C., Poplawski, S.G., Banerjee, A., Hawk, J.D., Porcari, G.S., Lejards, C., Hahn, C.-G., Giese, K.-P., Havekes, R., Spruston, N., Abel, T., 2020. Transcriptional corepressor SIN3A regulates hippocampal synaptic plasticity via Homer1/mGluR5 signaling. *JCI Insight* 5, e92385. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92385>

Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., Rampon, C., 2005. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience* 21, 513–521. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03875.x>

Burns, A.M., Farinelli-Scharly, M., Hugues-Ascery, S., Sanchez-Mut, J.V., Santoni, G., Gräff, J., 2022. The HDAC inhibitor CI-994 acts as a molecular memory aid by facilitating synaptic and intracellular communication after learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2116797119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116797119>

-C-

Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J., 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531, 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.09.001>

Cai, P., Chen, H.-Y., Tang, W.-T., Hu, Y.-D., Chen, S.-Y., Lu, J.-S., Lin, Z.-H., Huang, S.-N., Hu, L.-H., Su, W.-K., Li, Q.-X., Lin, Z.-J., Kang, T.-R., Yan, X.-B., Liu, P.-C., Chen, L., Yin, D., Wu, S.-Y., Li, H.-Y., Yu, C., 2022. A glutamatergic basal forebrain to midbrain circuit mediates wakefulness and defensive behavior. *Neuropharmacology* 208, 108979. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2022.108979>

Campos-Beltrán, D., Marshall, L., 2021. Changes in sleep EEG with aging in humans and rodents. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 473, 841–851. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02545-y>

Cannon, W.B., 1935. STRESSES AND STRAINS OF HOMEOSTASIS: *The American Journal of the Medical Sciences* 189, 13–14. <https://doi.org/10.1097/00000441-193501000-00001>

Cannon, W.B., 1931. Against the James-Lange and the thalamic theories of emotion. *Psychological Review* 38, 281–295. <https://doi.org/10.1037/h0072957>

Cannon, W.B., 1927. The James-Lange Theory of Emotions: A Critical Examination and an Alternative Theory. *The American Journal of Psychology* 39, 106. <https://doi.org/10.2307/1415404>

Cantor, D.J., David, G., 2017. The chromatin-associated Sin3B protein is required for hematopoietic stem cell functions in mice. *Blood* 129, 60–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-721746>

Carli, G., Farabollini, F., 2022. Introduction to defensive behavior in vertebrates, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 37–49. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2022.02.002>

Castellano, J.F., Fletcher, B.R., Kelley-Bell, B., Kim, D.H., Gallagher, M., Rapp, P.R., 2012. Age-Related Memory Impairment Is Associated with Disrupted Multivariate Epigenetic Coordination in the Hippocampus. *PLoS ONE* 7, e33249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033249>

- Castellucci, V.F., Kandel, E.R., 1974. A Quantal Analysis of the Synaptic Depression Underlying Habituation of the Gill-Withdrawal Reflex in *Aplysia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 5004–5008. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.12.5004>
- Castro, C.A., Hogan, J.B., Benson, K.A., Shehata, C.W., Landauer, M.R., 1995. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 50, 521–526. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)00331-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)00331-9)
- Chandru, A., Bate, N., Vuister, G.W., Cowley, S.M., 2018. Sin3A recruits Tet1 to the PAH1 domain via a highly conserved Sin3-Interaction Domain. *Sci Rep* 8, 14689. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32942-w>
- Chatterjee, S., Mizar, P., Cassel, R., Neidl, R., Selvi, B.R., Mohankrishna, D.V., Vedamurthy, B.M., Schneider, A., Bousiges, O., Mathis, C., Cassel, J.-C., Eswaramoorthy, M., Kundu, T.K., Boutillier, A.-L., 2013. A Novel Activator of CBP/p300 Acetyltransferases Promotes Neurogenesis and Extends Memory Duration in Adult Mice. *Journal of Neuroscience* 33, 10698–10712. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5772-12.2013>
- Chaubal, A., Pile, L.A., 2018. Same agent, different messages: insight into transcriptional regulation by SIN3 isoforms. *Epigenetics & Chromatin* 11, 17. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0188-y>
- Chen, J., Huang, X., Tao, C., Wang, L., Chen, Z., Li, X., Zeng, Q., Ma, M., Zhang, R., Wu, Z., 2020. Berberine chloride suppresses non-small cell lung cancer by deregulating Sin3A/TOP2B pathway in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 86, 151–161. <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04050-y>
- Chen, S., Tan, H., Wang, Z., Tseng, Y., Li, X., Wang, L., 2022. Formation of the Looming-evoked Innate Defensive Response during Postnatal Development in Mice. *Neurosci. Bull.* 38, 741–752. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00821-0>
- Chiu, C.-C., Liao, Y.-E., Yang, L.-Y., Wang, Jing-Ya, Tweedie, D., Karnati, H.K., Greig, N.H., Wang, Jia-Yi, 2016. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Methods* 272, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.06.018>
- Chouliaras, L., Van Den Hove, D., Kenis, G., Draanen, M., Hof, P., Os, J., Steinbusch, H., Schmitz, C., Rutten, B., 2013. Histone Deacetylase 2 in the Mouse Hippocampus: Attenuation of Age-Related Increase by Caloric Restriction. *CAR* 10, 868–876. <https://doi.org/10.2174/1567205011310080009>
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P.S., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., Goodman, R.H., 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855–859. <https://doi.org/10.1038/365855a0>
- Chwang, W.B., Arthur, J.S., Schumacher, A., Sweatt, J.D., 2007. The Nuclear Kinase Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase 1 Regulates Hippocampal Chromatin Remodeling in Memory Formation. *J. Neurosci.* 27, 12732–12742. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2522-07.2007>

- Chwang, W.B., O’Riordan, K.J., Levenson, J.M., Sweatt, J.D., 2006. ERK/MAPK regulates hippocampal histone phosphorylation following contextual fear conditioning. *Learn. Mem.* 13, 322–328. <https://doi.org/10.1101/lm.152906>
- Citri, A., Malenka, R.C., 2008. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacol* 33, 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Clayton, N.S., Dickinson, A., 1998. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395, 272–274. <https://doi.org/10.1038/26216>
- Codina, A., Benoit, G., Gooch, J.T., Neuhaus, D., Perlmann, T., Schwabe, J.W.R., 2004. Identification of a Novel Co-regulator Interaction Surface on the Ligand Binding Domain of Nurr1 Using NMR Footprinting. *Journal of Biological Chemistry* 279, 53338–53345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409096200>
- Collingridge, G.L., Peineau, S., Howland, J.G., Wang, Y.T., 2010. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 11, 459–473. <https://doi.org/10.1038/nrn2867>
- Conti, L.H., Maciver, C.R., Ferkany, J.W., Abreu, M.E., 1990. Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. *Psychopharmacology* 102, 492–497. <https://doi.org/10.1007/BF02247130>
- Cooper, W.E., Hawlena, D., Pérez-Mellado, V., 2009. Interactive effect of starting distance and approach speed on escape behavior challenges theory. *Behavioral Ecology* 20, 542–546. <https://doi.org/10.1093/beheco/arp029>
- Cowley, S.M., Iritani, B.M., Mendrysa, S.M., Xu, T., Cheng, P.F., Yada, J., Liggitt, H.D., Eisenman, R.N., 2005. The mSin3A Chromatin-Modifying Complex Is Essential for Embryogenesis and T-Cell Development. *Mol Cell Biol* 25, 6990–7004. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.6990-7004.2005>
- Crosio, C., Heitz, E., Allis, C.D., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P., 2003. Chromatin remodeling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *Journal of Cell Science* 116, 4905–4914. <https://doi.org/10.1242/jcs.00804>
- Cull-Candy, S., Brickley, S., Farrant, M., 2001. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 327–335. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00215-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00215-4)
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., Akil, H., Watson, S.J., 1995. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64, 477–505. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00355-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00355-9)
- Cutter, A.R., Hayes, J.J., 2015. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters* 589, 2914–2922. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>

-D-

Dagnas, M., Mons, N., 2013. Region- and age-specific patterns of histone acetylation related to spatial and cued learning in the water maze: Histone Acetylation and Memory Formation. *Hippocampus* 23, 581–591. <https://doi.org/10.1002/hipo.22116>

Dahan, L., Rampon, C., Florian, C., 2020. Age-related memory decline, dysfunction of the hippocampus and therapeutic opportunities. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 102, 109943. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109943>

Dana, H., Chalbatani, G.M., Mahmoodzadeh, H., Gharagouzlo, E., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mazraeh, A., Marmari, V., Rashno, M.M., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Ebrahimi, M., Abadi, S.J., 2017. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int. J Biomed Sci.* 13, 48–57. <https://doi.org/10.59566/IJBS.2017.13048>

Dannenber, J.-H., David, G., Zhong, S., Van Der Torre, J., Wong, W.H., DePinho, R.A., 2005. mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev.* 19, 1581–1595. <https://doi.org/10.1101/gad.1286905>

David, G., Grandinetti, K.B., Finnerty, P.M., Simpson, N., Chu, G.C., DePinho, R.A., 2008. Specific requirement of the chromatin modifier mSin3B in cell cycle exit and cellular differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4168–4172. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710285105>

Day, J.J., Sweatt, J.D., 2010. DNA methylation and memory formation. *Nat Neurosci* 13, 1319–1323. <https://doi.org/10.1038/nn.2666>

De Haas, E.N., Kops, M.S., Bolhuis, J.E., Groothuis, T.G.G., Ellen, E.D., Rodenburg, T.B., 2012. The relation between fearfulness in young and stress-response in adult laying hens, on individual and group level. *Physiology & Behavior* 107, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.08.002>

De Jager, P.L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L.C., Yu, L., Eaton, M.L., Keenan, B.T., Ernst, J., McCabe, C., Tang, A., Raj, T., Replogle, J., Brodeur, W., Gabriel, S., Chai, H.S., Younkin, C., Younkin, S.G., Zou, F., Szyf, M., Epstein, C.B., Schneider, J.A., Bernstein, B.E., Meissner, A., Ertekin-Taner, N., Chibnik, L.B., Kellis, M., Mill, J., Bennett, D.A., 2014. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat Neurosci* 17, 1156–1163. <https://doi.org/10.1038/nn.3786>

Dean, R.L., Scozzafava, J., Goas, J.A., Regan, B., Beer, B., Bartus, R.T., 1981. Age-related differences in behavior across the life span of the C57BL/6J mouse. *Experimental Aging Research* 7, 427–451. <https://doi.org/10.1080/03610738108259823>

De Franceschi, G., Vivattanasarn, T., Saleem, A.B., Solomon, S.G., 2016. Vision Guides Selection of Freeze or Flight Defense Strategies in Mice. *Current Biology* 26, 2150–2154. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.006>

- Deichler, A., Carrasco, D., Lopez-Jury, L., Vega-Zuniga, T., Márquez, N., Mpodozis, J., Marín, G.J., 2020. A specialized reciprocal connectivity suggests a link between the mechanisms by which the superior colliculus and parabigeminal nucleus produce defensive behaviors in rodents. *Sci Rep* 10, 16220. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72848-0>
- Delcuve, G.P., Khan, D.H., Davie, J.R., 2012. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors.
- DeNardo, L.A., Liu, C.D., Allen, W.E., Adams, E.L., Friedmann, D., Fu, L., Guenther, C.J., Tessier-Lavigne, M., Luo, L., 2019. Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. *Nat Neurosci* 22, 460–469. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0318-7>
- Denny, C.A., Kheirbek, M.A., Alba, E.L., Tanaka, K.F., Brachman, R.A., Laughman, K.B., Tomm, N.K., Turi, G.F., Losonczy, A., Hen, R., 2014. Hippocampal Memory Traces Are Differentially Modulated by Experience, Time, and Adult Neurogenesis. *Neuron* 83, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.018>
- Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A., 2005. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 84, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.002>
- Desmedt, A., Marighetto, A., Piazza, P.-V., 2015. Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder. *Biological Psychiatry* 78, 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.06.017>
- Díaz, F., Moreno, P., Villena, A., Vidal, L., Pérez De Vargas, I., 2003. Effects of aging on neurons and glial cells from the superficial layers of the superior colliculus in rats. *Microscopy Res & Technique* 62, 431–438. <https://doi.org/10.1002/jemt.10404>
- Dill, L.M., Houtman, R., 1989. The influence of distance to refuge on flight initiation distance in the gray squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Can. J. Zool.* 67, 233–235. <https://doi.org/10.1139/z89-033>
- Domenici, P., 2010. Context-dependent variability in the components of fish escape response: integrating locomotor performance and behavior. *J. Exp. Zool.* 313A, 59–79. <https://doi.org/10.1002/jez.580>
- Dragatsis, I., Zeitlin, S., 2000. CaMKII α -cre transgene expression and recombination patterns in the mouse brain. *genesis* 26, 133–135. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-968X\(200002\)26:2<133::AID-GENE10>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<133::AID-GENE10>3.0.CO;2-V)
- Dräger, U.C., 1974. Autoradiography of tritiated proline and fucose transported transneuronally from the eye to the visual cortex in pigmented and albino mice. *Brain Research* 82, 284–292. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90607-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90607-6)
- Dudchenko, P.A., 2004. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28, 699–709. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.002>

-E-

Ellis, E.M., Gauvain, G., Sivyer, B., Murphy, G.J., 2016. Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. *Journal of Neurophysiology* 116, 602–610. <https://doi.org/10.1152/jn.00227.2016>

Encinas, J.M., Michurina, T.V., Peunova, N., Park, J.-H., Tordo, J., Peterson, D.A., Fishell, G., Koulakov, A., Enikolopov, G., 2011. Division-Coupled Astrocytic Differentiation and Age-Related Depletion of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell* 8, 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>

Ercoskun, P., Yuce Kahraman, C., 2021. WITTEVEEN–KOLK syndrome: The first patient from Turkey. *American J of Med Genetics Pt A* 185, 617–619. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61950>

Esclassan, F., Coutureau, E., Di Scala, G., Marchand, A.R., 2009. Differential contribution of dorsal and ventral hippocampus to trace and delay fear conditioning. *Hippocampus* 19, 33–44. <https://doi.org/10.1002/hipo.20473>

Etchepareborda, M.C., Díaz-Lucero, A., Pascuale, M.J., Abad-Mas, L., Ruiz-Andrés, R., 2007. [Asperger's syndrome, little teachers: special skills]. *Rev Neurol* 44 Suppl 2, S43-47.

Evans, D.A., Stempel, A.V., Vale, R., Ruehle, S., Lefler, Y., Branco, T., 2018. A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions. *Nature* 558, 590–594. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0244-6>

-F-

Fahlström, A., Yu, Q., Ulfhake, B., 2011. Behavioral changes in aging female C57BL/6 mice. *Neurobiology of Aging* 32, 1868–1880. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.003>

Fendt, M., Endres, T., 2008. 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor – Just repugnant or really fear-inducing? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 32, 1259–1266. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.05.010>

Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S.L., Le, T., Li, E., Sweatt, J.D., Silva, A.J., Fan, G., 2010. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 13, 423–430. <https://doi.org/10.1038/nn.2514>

Ferrer, A., Schultz-Rogers, L., Kaiwar, C., Kempainen, J.L., Klee, E.W., Gavrilova, R.H., 2019. Three rare disease diagnoses in one patient through exome sequencing. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 5, a004390. <https://doi.org/10.1101/mcs.a004390>

Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., Tsai, L.-H., 2007. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* 447, 178–182. <https://doi.org/10.1038/nature05772>

Flood, J.F., Cherkin, A., 1986. Scopolamine effects on memory retention in mice: A model of dementia? *Behavioral and Neural Biology* 45, 169–184. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(86\)90750-8](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(86)90750-8)

Fontán-Lozano, Á., Romero-Granados, R., Troncoso, J., Múnera, A., Delgado-García, J.M., Carrión, Á.M., 2008. Histone deacetylase inhibitors improve learning consolidation in young and in KA-induced-neurodegeneration and SAMP-8-mutant mice. *Molecular and Cellular Neuroscience* 39, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.06.009>

Fordyce, D.E., Whner, J.M., 1993. Effects of aging on spatial learning and hippocampal protein kinase c in mice. *Neurobiology of Aging* 14, 309–317. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90116-5](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90116-5)

Foster, T.C., Kumar, A., 2002. Calcium Dysregulation in the Aging Brain. *Neuroscientist* 8, 297–301. <https://doi.org/10.1177/107385840200800404>

Frankland, P.W., Bontempi, B., 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119–130. <https://doi.org/10.1038/nrn1607>

Frankland, P.W., Josselyn, S.A., Köhler, S., 2019. The neurobiological foundation of memory retrieval. *Nat Neurosci* 22, 1576–1585. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0493-1>

Fuentes, P., Cánovas, J., Berndt, F.A., Noctor, S.C., Kukuljan, M., 2012. CoREST/LSD1 Control the Development of Pyramidal Cortical Neurons. *Cerebral Cortex* 22, 1431–1441. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr218>

-G-

Ganai, S.A., Ramadoss, M., Mahadevan, V., 2016. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors - emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration. *CN* 14, 55–71. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666151021111609>

Gao, J., Wang, W.-Y., Mao, Y.-W., Gräff, J., Guan, J.-S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S.C., Tsai, L.-H., 2010. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* 466, 1105–1109. <https://doi.org/10.1038/nature09271>

Gao, Z., Ure, K., Ding, P., Nashaat, M., Yuan, L., Ma, J., Hammer, R.E., Hsieh, J., 2011. The Master Negative Regulator REST/NRSF Controls Adult Neurogenesis by Restraining the Neurogenic Program in Quiescent Stem Cells. *Journal of Neuroscience* 31, 9772–9786. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1604-11.2011>

Gargano, A., Olabiyi, B.F., Palmisano, M., Zimmer, A., Bilkei-Gorzo, A., 2023. Possible role of locus coeruleus neuronal loss in age-related memory and attention deficits. *Front. Neurosci.* 17, 1264253. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1264253>

Gilbert, T.M., Zürcher, N.R., Catanese, M.C., Tseng, C.-E.J., Di Biase, M.A., Lyall, A.E., Hightower, B.G., Parmar, A.J., Bhanot, A., Wu, C.J., Hibert, M.L., Kim, M., Mahmood, U., Stufflebeam, S.M., Schroeder, F.A., Wang, C., Roffman, J.L., Holt, D.J., Greve, D.N., Pasternak, O., Kubicki, M., Wey, H.-Y., Hooker, J.M., 2019. Neuroepigenetic signatures of age and sex in the living human brain. *Nat Commun* 10, 2945. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11031-0>

Gold, P.E., 1986. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology* 46, 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(86\)90927-1](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(86)90927-1)

- Goltseker, K., Barak, S., 2018. Flood-conditioned place aversion as a novel non-pharmacological aversive learning procedure in mice. *Sci Rep* 8, 7280. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25568-5>
- Gould, T., Feiro, O., 2005. Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamine treatment. *Behavioural Brain Research* 165, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.040>
- Gräff, J., Woldemichael, B.T., Berchtold, D., Dewarrat, G., Mansuy, I.M., 2012. Dynamic histone marks in the hippocampus and cortex facilitate memory consolidation. *Nat Commun* 3, 991. <https://doi.org/10.1038/ncomms1997>
- Grimes, J.A., Nielsen, S.J., Battaglioli, E., Miska, E.A., Speh, J.C., Berry, D.L., Atouf, F., Holdener, B.C., Mandel, G., Kouzarides, T., 2000. The Co-repressor mSin3A Is a Functional Component of the REST-CoREST Repressor Complex. *Journal of Biological Chemistry* 275, 9461–9467. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9461>
- Gross, C.T., Canteras, N.S., 2012. The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci* 13, 651–658. <https://doi.org/10.1038/nrn3301>
- Grzenda, A., Lomber, G., Zhang, J.-S., Urrutia, R., 2009. Sin3: Master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1789, 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.05.007>
- Guan, J.-S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.-H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J.F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J.E., DePinho, R.A., Jaenisch, R., Tsai, L.-H., 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature07925>
- Guan, Z., Giustetto, M., Lomvardas, S., Kim, J.-H., Miniaci, M.C., Schwartz, J.H., Thanos, D., Kandel, E.R., 2002. Integration of Long-Term-Memory-Related Synaptic Plasticity Involves Bidirectional Regulation of Gene Expression and Chromatin Structure. *Cell* 111, 483–493. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01074-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01074-7)
- Gulmez Karaca, K., Kupke, J., Brito, D.V.C., Zeuch, B., Thome, C., Weichenhan, D., Lutsik, P., Plass, C., Oliveira, A.M.M., 2020. Neuronal ensemble-specific DNA methylation strengthens engram stability. *Nat Commun* 11, 639. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14498-4>
- Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D., Paylor, R.E., Lubin, F.D., 2010. Histone Methylation Regulates Memory Formation. *J. Neurosci.* 30, 3589–3599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3732-09.2010>
- Gupta-Agarwal, S., Franklin, A.V., DeRamus, T., Wheelock, M., Davis, R.L., McMahon, L.L., Lubin, F.D., 2012. G9a/GLP Histone Lysine Dimethyltransferase Complex Activity in the Hippocampus and the Entorhinal Cortex Is Required for Gene Activation and Silencing during Memory Consolidation. *J. Neurosci.* 32, 5440–5453. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0147-12.2012>

-H-

Haettig, J., Stefanko, D.P., Multani, M.L., Figueroa, D.X., McQuown, S.C., Wood, M.A., 2011. HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learning & Memory* 18, 71–79. <https://doi.org/10.1101/lm.1986911>

Hakimi, M.-A., Bochar, D.A., Chenoweth, J., Lane, W.S., Mandel, G., Shiekhattar, R., 2002. A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7420–7425. <https://doi.org/10.1073/pnas.112008599>

Halder, D., Lee, C.-H., Hyun, J.Y., Chang, G.-E., Cheong, E., Shin, I., 2017. Suppression of Sin3A activity promotes differentiation of pluripotent cells into functional neurons. *Sci Rep* 7, 44818. <https://doi.org/10.1038/srep44818>

Hale, M.W., Bouwknecht, J.A., Spiga, F., Shekhar, A., Lowry, C.A., 2006. Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. *Brain Research Bulletin* 71, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.09.001>

Hamieh, A.M., Camperos, E., Hernier, A.M., Castagné, V., 2021. C57BL/6 mice as a preclinical model to study age-related cognitive deficits: Executive functions impairment and inter-individual differences. *Brain Research* 1751, 147173. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147173>

Hammelrath, L., Škokić, S., Khmelinskii, A., Hess, A., Van Der Knaap, N., Staring, M., Lelieveldt, B.P.F., Wiedermann, D., Hoehn, M., 2016. Morphological maturation of the mouse brain: An in vivo MRI and histology investigation. *NeuroImage* 125, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.10.009>

Han, H., 2018. RNA Interference to Knock Down Gene Expression, in: DiStefano, J.K. (Ed.), *Disease Gene Identification, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 293–302. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16

Hansen, K.F., Sakamoto, K., Aten, S., Price, K.H., Loeser, J., Hesse, A.M., Page, C.E., Pelz, C., Arthur, J.S.C., Impey, S., Obrietan, K., 2016. Targeted deletion of miR-132/-212 impairs memory and alters the hippocampal transcriptome. *Learn. Mem.* 23, 61–71. <https://doi.org/10.1101/lm.039578.115>

Harman, M.F., Martín, M.G., 2020. Epigenetic mechanisms related to cognitive decline during aging. *J of Neuroscience Research* 98, 234–246. <https://doi.org/10.1002/jnr.24436>

Hashikawa-Hobara, N., Mishima, S., Okujima, C., Shitanishi, Y., Hashikawa, N., 2021. Npas4 impairs fear memory via phosphorylated HDAC5 induced by CGRP administration in mice. *Sci Rep* 11, 7006. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86556-w>

Hawk, J.D., Florian, C., Abel, T., 2011. Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learning & Memory* 18, 367–370. <https://doi.org/10.1101/lm.2097411>

Heideman, M.R., Lancini, C., Proost, N., Yanover, E., Jacobs, H., Dannenberg, J.-H., 2014. Sin3a-associated Hdac1 and Hdac2 are essential for hematopoietic stem cell homeostasis and contribute differentially to hematopoiesis. *Haematologica* 99, 1292–1303. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.092643>

Heinemans, M., Moita, M.A., 2022. Looming stimuli reliably drive innate, but not learned, defensive responses in rats. <https://doi.org/10.1101/2022.02.07.479432>

Hennig, C.W., Dunlap, W.P., Gallup, G.G., 1976. The Effect of Distance Between Predator and Prey and the Opportunity to Escape on Tonic Immobility in *Anolis Carolinensis*. *Psychol Rec* 26, 312–320. <https://doi.org/10.1007/BF03394393>

Herry, C., Johansen, J.P., 2014. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat Neurosci* 17, 1644–1654. <https://doi.org/10.1038/nn.3869>

Hof, A.E.V., Campagne, P., Rigden, D.J., Yung, C.J., Lingley, J., Quail, M.A., Hall, N., Darby, A.C., Saccheri, I.J., 2016. The industrial melanism mutation in British peppered moths is a transposable element. *Nature* 534, 102–105. <https://doi.org/10.1038/nature17951>

Hoffmann, A., Spengler, D., 2019. Chromatin Remodeling Complex NuRD in Neurodevelopment and Neurodevelopmental Disorders. *Front. Genet.* 10, 682. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00682>

Hu, Y., Chen, Z., Huang, L., Xi, Y., Li, B., Wang, H., Yan, J., Lee, T.M.C., Tao, Q., So, K.-F., Ren, C., 2017. A translational study on looming-evoked defensive response and the underlying subcortical pathway in autism. *Sci Rep* 7, 14755. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15349-x>

Huang, Hei-Jen, Huang, Hsin-Yu, Hsieh-Li, H.M., 2019. MGCD 0103, a selective histone deacetylase inhibitor, ameliorates oligomeric A β ₂₅₋₃₅-induced anxiety and cognitive deficits in a mouse model. *CNS Neurosci Ther* 25, 175–186. <https://doi.org/10.1111/cns.13029>

Huang, K.-P., 1989. The mechanism of protein kinase C activation. *Trends in Neurosciences* 12, 425–432. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(89\)90091-X](https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90091-X)

Huang, L., Yuan, T., Tan, M., Xi, Y., Hu, Y., Tao, Q., Zhao, Z., Zheng, J., Han, Y., Xu, F., Luo, M., Sollars, P.J., Pu, M., Pickard, G.E., So, K.-F., Ren, C., 2017. A retinorecipient projection regulates serotonergic activity and looming-evoked defensive behaviour. *Nat Commun* 8, 14908. <https://doi.org/10.1038/ncomms14908>

Huston, J.P., Chao, O.Y., 2023. Probing the nature of episodic memory in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 144, 104930. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104930>

-|-

Ieraci, A., Mallei, A., Popoli, M., 2016. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plasticity* 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/6212983>

Igaz, L.M., Vianna, M.R.M., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2002. Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning. *J. Neurosci.* 22, 6781–6789. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06781.2002>

Inoue, T., Kitaichi, Y., Koyama, T., 2011. SSRIs and conditioned fear. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35, 1810–1819. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.09.002>

Ionescu-Tucker, A., Cotman, C.W., 2021. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 107, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>

Ishizuka, T., Lazar, M.A., 2005. The Nuclear Receptor Corepressor Deacetylase Activating Domain Is Essential for Repression by Thyroid Hormone Receptor. *Molecular Endocrinology* 19, 1443–1451. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0009>

Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V.N., Dulac, C., 2011. Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature* 478, 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature10437>

Ison, J.R., Allen, P.D., O'Neill, W.E., 2007. Age-Related Hearing Loss in C57BL/6J Mice has both Frequency-Specific and Non-Frequency-Specific Components that Produce a Hyperacusis-Like Exaggeration of the Acoustic Startle Reflex. *JARO* 8, 539–550. <https://doi.org/10.1007/s10162-007-0098-3>

-J-

James, W., 1884. II.—WHAT IS AN EMOTION? *Mind* os-IX, 188–205. <https://doi.org/10.1093/mind/os-IX.34.188>

Jaworska-Adamu, J., Krawczyk, A., Rycerz, K., Krawczyk-Marc, I., 2014. Age-related astrocytic changes in the periaqueductal gray matter (PAG) in rats. *Med. Weter.*

Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the Histone Code. *Science* 293, 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>

Jing, X., Sui, W.-H., Wang, S., Xu, X.-F., Yuan, R., Chen, X.-R., Ma, H.-X., Zhu, Y.-X., Sun, J.-K., Yi, F., Chen, Z.-Y., Wang, Y., 2017. HDAC7 Ubiquitination by the E3 Ligase CBX4 Is Involved in Contextual Fear Conditioning Memory Formation. *J. Neurosci.* 37, 3848–3863. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2773-16.2017>

-K-

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., 1982. Molecular Biology of Learning: Modulation of Transmitter Release. *Science* 218, 433–443. <https://doi.org/10.1126/science.6289442>

Kao, Y.-C., Wang, I.-F., Tsai, K.-J., 2018. miRNA-34c Overexpression Causes Dendritic Loss and Memory Decline. *IJMS* 19, 2323. <https://doi.org/10.3390/ijms19082323>

Kart-Teke, E., De Souza Silva, M., Huston, J., Dere, E., 2006. Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of Learning and Memory* 85, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.002>

- Kim, J., Fanselow, M., 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675–677. <https://doi.org/10.1126/science.1585183>
- Kim, M.-S., Akhtar, M.W., Adachi, M., Mahgoub, M., Bassel-Duby, R., Kavalali, E.T., Olson, E.N., Monteggia, L.M., 2012. An Essential Role for Histone Deacetylase 4 in Synaptic Plasticity and Memory Formation. *J. Neurosci.* 32, 10879–10886. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2089-12.2012>
- Kitamura, T., Ogawa, S.K., Roy, D.S., Okuyama, T., Morrissey, M.D., Smith, L.M., Redondo, R.L., Tonegawa, S., 2017. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science* 356, 73–78. <https://doi.org/10.1126/science.aam6808>
- Koehl, M., Abrous, D.N., 2011. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J of Neuroscience* 33, 1101–1114. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07609.x>
- Korzus, E., Rosenfeld, M.G., Mayford, M., 2004. CBP Histone Acetyltransferase Activity Is a Critical Component of Memory Consolidation. *Neuron* 42, 961–972. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.002>
- Koseki, T., Mouri, A., Mamiya, T., Aoyama, Y., Toriumi, K., Suzuki, S., Nakajima, A., Yamada, T., Nagai, T., Nabeshima, T., 2012. Exposure to enriched environments during adolescence prevents abnormal behaviours associated with histone deacetylation in phencyclidine-treated mice. *Int. J. Neuropsychopharm.* 15, 1489–1501. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001672>
- Koshibu, K., Gräff, J., Beullens, M., Heitz, F.D., Berchtold, D., Russig, H., Farinelli, M., Bollen, M., Mansuy, I.M., 2009. Protein Phosphatase 1 Regulates the Histone Code for Long-Term Memory. *J. Neurosci.* 29, 13079–13089. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3610-09.2009>
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kovács, K., Sawchenko, P., 1996. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J. Neurosci.* 16, 262–273. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-01-00262.1996>
- Kovács, L.Á., Schiessl, J.A., Nafz, A.E., Csernus, V., Gaszner, B., 2018. Both Basal and Acute Restraint Stress-Induced c-Fos Expression Is Influenced by Age in the Extended Amygdala and Brainstem Stress Centers in Male Rats. *Front. Aging Neurosci.* 10, 248. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00248>
- Kozikowski, A.P., Shen, S., Pardo, M., Tavares, M.T., Szarics, D., Benoy, V., Zimprich, C.A., Kutil, Z., Zhang, G., Bařinka, C., Robers, M.B., Van Den Bosch, L., Eubanks, J.H., Jope, R.S., 2019. Brain Penetrable Histone Deacetylase 6 Inhibitor SW-100 Ameliorates Memory and Learning Impairments in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 1679–1695. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00600>
- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W., 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>

Krout, K.E., Loewy, A.D., Westby, G.W.M., Redgrave, P., 2001. Superior colliculus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 431, 198–216. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010305\)431:2<198::AID-CNE1065>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010305)431:2<198::AID-CNE1065>3.0.CO;2-8)

Kumar, A., Foster, T.C., 2019. Alteration in NMDA Receptor Mediated Glutamatergic Neurotransmission in the Hippocampus During Senescence. *Neurochem Res* 44, 38–48. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2634-4>

Kwapis, J.L., Alaghband, Y., López, A.J., Long, J.M., Li, X., Shu, G., Bodinayake, K.K., Matheos, D.P., Rapp, P.R., Wood, M.A., 2019. HDAC3-Mediated Repression of the *Nr4a* Family Contributes to Age-Related Impairments in Long-Term Memory. *J. Neurosci.* 39, 4999–5009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2799-18.2019>

Kyrylenko, S., Korhonen, P., Kyrylenko, O., Roschier, M., Salminen, A., 2000. Expression of Transcriptional Repressor Proteins mSin3A and 3B during Aging and Replicative Senescence. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275, 455–459. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3325>

-L-

Lacagnina, A.F., Brockway, E.T., Crovetti, C.R., Shue, F., McCarty, M.J., Sattler, K.P., Lim, S.C., Santos, S.L., Denny, C.A., Drew, M.R., 2019. Distinct hippocampal engrams control extinction and relapse of fear memory. *Nat Neurosci* 22, 753–761. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0361-z>

Ladd-Acosta, C., Hansen, K.D., Briem, E., Fallin, M.D., Kaufmann, W.E., Feinberg, A.P., 2014. Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Mol Psychiatry* 19, 862–871. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.114>

Lange, C.G., James, W., 1885. *The Emotions*, Knight Dunlap Johns Hopkins University. ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.

Latypova, X., Vincent, M., Mollé, A., Adebambo, O.A., Fourgeux, C., Khan, T.N., Caro, A., Rosello, M., Orellana, C., Niyazov, D., Lederer, D., Deprez, M., Capri, Y., Kannu, P., Tabet, A.C., Levy, J., Aten, E., den Hollander, N., Splitt, M., Walia, J., Immken, L.L., Stankiewicz, P., McWalter, K., Suchy, S., Louie, R.J., Bell, S., Stevenson, R.E., Rousseau, J., Willem, C., Retiere, C., Yang, X.-J., Campeau, P.M., Martinez, F., Rosenfeld, J.A., Le Caignec, C., Küry, S., Mercier, S., Moradkhani, K., Conrad, S., Besnard, T., Cogné, B., Katsanis, N., Bézieau, S., Poschmann, J., Davis, E.E., Isidor, B., 2021. Haploinsufficiency of the Sin3/HDAC corepressor complex member SIN3B causes a syndromic intellectual disability/autism spectrum disorder. *The American Journal of Human Genetics* 108, 929–941. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.03.017>

Lazarus, R.S., 1982. Thoughts on the relations between emotion and cognition. *American Psychologist* 37, 1019–1024. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.37.9.1019>

Lazzarim, M.K., Targa, A., Sardi, N.F., Hack, G.R., Tobaldini, G., Martynhak, B.J., Fischer, L., 2020. Pain impairs consolidation, but not acquisition or retrieval of a declarative memory. *Behavioural Pharmacology* 31, 707–715. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000576>

- Lechner, H.A., Squire, L.R., Byrne, J.H., 1999. 100 Years of consolidation - Remembering Müller and Pilzecker.
- LeDoux, J.E., 2000. Emotion Circuits in the Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- Lee, D.Y., Kim, E., Choi, M.H., 2015. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Reports* 48, 209–216. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.4.275>
- Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2005. An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437, 432–435. <https://doi.org/10.1038/nature04021>
- Lee, Y.I., Park, K.H., Baik, S.H., Cha, C.I., 1998. Attenuation of c-Fos basal expression in the cerebral cortex of aged rat: *NeuroReport* 9, 2733–2736. <https://doi.org/10.1097/00001756-199808240-00009>
- Lees, R.N., Akbar, A.F., Badea, T.C., 2020. Retinal ganglion cell defects cause decision shifts in visually evoked defense responses. *Journal of Neurophysiology* 124, 1530–1549. <https://doi.org/10.1152/jn.00474.2019>
- Lehmann, K., Schmidt, K.-F., Löwel, S., 2012. Vision and visual plasticity in ageing mice. *Restorative Neurology and Neuroscience* 30, 161–178. <https://doi.org/10.3233/RNN-2012-110192>
- Lenzi, S.C., Cossell, L., Grainger, B., Olesen, S.F., Branco, T., Margrie, T.W., 2022. Threat history controls flexible escape behavior in mice. *Current Biology* 32, 2972-2979.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.05.022>
- Lesburgueres, E., Gobbo, O.L., 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. <https://doi.org/10.1126/science.1196164>
- Leslie, J.H., Nedivi, E., 2011. Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity. *Progress in Neurobiology* 94, 223–237. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.05.002>
- Levenson, J.M., O’Riordan, K.J., Brown, K.D., Trinh, M.A., Molfese, D.L., Sweatt, J.D., 2004. Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus. *Journal of Biological Chemistry* 279, 40545–40559. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402229200>
- Levenson, J.M., Roth, T.L., Lubin, F.D., Miller, C.A., Huang, I.-C., Desai, P., Malone, L.M., Sweatt, J.D., 2006. Evidence That DNA (Cytosine-5) Methyltransferase Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *Journal of Biological Chemistry* 281, 15763–15773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511767200>
- Lewis, M.J., Liu, J., Libby, E.F., Lee, M., Crawford, N.P.S., Hurst, D.R., 2016. SIN3A and SIN3B differentially regulate breast cancer metastasis. *Oncotarget* 7, 78713–78725. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12805>

- Li, C., Kühn, N.K., Alkisar, I., Sans-Dublanc, A., Zemmouri, F., Paesmans, S., Calzoni, A., Ooms, F., Reinhard, K., Farrow, K., 2023. Pathway-specific inputs to the superior colliculus support flexible responses to visual threat. *Sci. Adv.* 9, eade3874. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade3874>
- Li, H.-S., Borg, E., 1991. Age-related Loss of Auditory Sensitivity in Two Mouse Genotypes. *Acta Oto-Laryngologica* 111, 827–834. <https://doi.org/10.3109/00016489109138418>
- Li, J., Guo, Y., Schroeder, F.A., Youngs, R.M., Schmidt, T.W., Ferris, C., Konradi, C., Akbarian, S., 2004. Dopamine D₂-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase A and NMDA receptor signaling. *Journal of Neurochemistry* 90, 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02569.x>
- Li, Lei, Feng, X., Zhou, Z., Zhang, H., Shi, Q., Lei, Z., Shen, P., Yang, Q., Zhao, B., Chen, S., Li, Lin, Zhang, Y., Wen, P., Lu, Z., Li, X., Xu, F., Wang, L., 2018. Stress Accelerates Defensive Responses to Looming in Mice and Involves a Locus Coeruleus-Superior Colliculus Projection. *Current Biology* 28, 859-871.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.005>
- Li, M., Su, S., Cai, W., Cao, J., Miao, X., Zang, W., Gao, S., Xu, Y., Yang, J., Tao, Y.-X., Ai, Y., 2020. Differentially Expressed Genes in the Brain of Aging Mice With Cognitive Alteration and Depression- and Anxiety-Like Behaviors. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 814. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00814>
- Li, Y., Zhi, W., Qi, B., Wang, L., Hu, X., 2023. Update on neurobiological mechanisms of fear: illuminating the direction of mechanism exploration and treatment development of trauma and fear-related disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 17, 1216524. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1216524>
- Liden, W.H., Phillips, M.L., Herberholz, J., 2010. Neural control of behavioural choice in juvenile crayfish. *Proc. R. Soc. B.* 277, 3493–3500. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1000>
- Lisman, J., Yasuda, R., Raghavachari, S., 2012. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* 13, 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrn3192>
- Liu, J., Lin, L., Wang, D.V., 2021. Representation of Fear of Heights by Basolateral Amygdala Neurons. *J. Neurosci.* 41, 1080–1091. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0483-20.2020>
- Liu, X., Feng, X., Huang, H., Huang, K., Xu, Y., Ye, S., Tseng, Y.-T., Wei, P., Wang, L., Wang, F., 2022. Male and female mice display consistent lifelong ability to address potential life-threatening cues using different post-threat coping strategies. *BMC Biol* 20, 281. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01486-x>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopez-Atalaya, J.P., Gervasini, C., Mottadelli, F., Spena, S., Piccione, M., Scarano, G., Selicorni, A., Barco, A., Larizza, L., 2012. Histone acetylation deficits in lymphoblastoid cell lines from patients with Rubinstein–Taybi syndrome. *J Med Genet* 49, 66–74. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100354>

LoPresti, P., 2019. The Selective HDAC6 Inhibitor ACY-738 Impacts Memory and Disease Regulation in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *Front. Neurol.* 10, 519. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00519>

Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., Yang, T.-H., Kim, H.-M., Drake, D., Liu, X.S., Bennett, D.A., Colaiácovo, M.P., Yankner, B.A., 2014. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 507, 448–454. <https://doi.org/10.1038/nature13163>

Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., Yankner, B.A., 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain 429, 9. <https://doi.org/doi:10.1038/nature02661>

Lubin, F.D., Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2008. Epigenetic Regulation of *bdnf* Gene Transcription in the Consolidation of Fear Memory. *J. Neurosci.* 28, 10576–10586. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008>

Lubin, F.D., Sweatt, J.D., 2007. The I κ B Kinase Regulates Chromatin Structure during Reconsolidation of Conditioned Fear Memories. *Neuron* 55, 942–957. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.039>

Lynch, M.A., 2004. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev* 84, 50.

-M-

Maddox, S.A., Schafe, G.E., 2011. Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. *Learn. Mem.* 18, 579–593. <https://doi.org/10.1101/lm.2243411>

Mahan, A.L., Mou, L., Shah, N., Hu, J.-H., Worley, P.F., Ressler, K.J., 2012. Epigenetic Modulation of Homer1a Transcription Regulation in Amygdala and Hippocampus with Pavlovian Fear Conditioning. *Journal of Neuroscience* 32, 4651–4659. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3308-11.2012>

Main, P., Tan, W.J., Wheeler, D., Fitzsimons, H.L., 2021. Increased Abundance of Nuclear HDAC4 Impairs Neuronal Development and Long-Term Memory. *Front. Mol. Neurosci.* 14, 616642. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.616642>

Maren, S., 2001. Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 897–931. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897>

Maren, S., Fanselow, M.S., 1997. Electrolytic Lesions of the Fimbria/Fornix, Dorsal Hippocampus, or Entorhinal Cortex Produce Anterograde Deficits in Contextual Fear Conditioning in Rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 67, 142–149. <https://doi.org/10.1006/nlme.1996.3752>

Martin, C., Zhang, Y., 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 838–849. <https://doi.org/10.1038/nrm1761>

Mattson, M.P., Arumugam, T.V., 2018. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metabolism* 27, 1176–1199. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>

- Maurice, T., Duclot, F., Meunier, J., Naert, G., Givalois, L., Meffre, J., Célérier, A., Jacquet, C., Copois, V., Mechti, N., Ozato, K., Gongora, C., 2008. Altered Memory Capacities and Response to Stress in p300/CBP-Associated Factor (PCAF) Histone Acetylase Knockout Mice. *Neuropsychopharmacol* 33, 1584–1602. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301551>
- McClelland, J.L., McNaughton, B.L., O'Reilly, R.C., 1995. Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: Insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. *Psychological Review* 102, 419–457. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.102.3.419>
- McGaugh, J.L., 2000. Memory—a Century of Consolidation 287, 4.
- McQuown, S.C., Barrett, R.M., Matheos, D.P., Post, R.J., Rogge, G.A., Alenghat, T., Mullican, S.E., Jones, S., Rusche, J.R., Lazar, M.A., Wood, M.A., 2011. HDAC3 Is a Critical Negative Regulator of Long-Term Memory Formation. *Journal of Neuroscience* 31, 764–774. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5052-10.2011>
- McQuown, S.C., Wood, M.A., 2011. HDAC3 and the molecular brake pad hypothesis. *Neurobiology of Learning and Memory* 96, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.04.005>
- Miller, C.A., Sweatt, J.D., 2007. Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron* 53, 857–869. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.022>
- Milner, B., Penfield, W., 1955. The effect of hippocampal lesions on recent memory. *Trans Am Neurol Assoc* 42–48.
- Miyata, S., Shimoi, T., Hirano, S., Yamada, N., Hata, Y., Yoshikawa, N., Ohsawa, M., Kamei, J., 2007. Effects of Serotonergic Anxiolytics on the Freezing Behavior in the Elevated Open-Platform Test in Mice. *J Pharmacol Sci* 105, 272–278. <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0070314>
- Molnár, E., 2011. Long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2011.07.017>
- Mongeau, R., Miller, G.A., Chiang, E., Anderson, D.J., 2003. Neural Correlates of Competing Fear Behaviors Evoked by an Innately Aversive Stimulus. *J. Neurosci.* 23, 3855–3868. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03855.2003>
- Monsey, M.S., Ota, K.T., Akingbade, I.F., Hong, E.S., Schafe, G.E., 2011. Epigenetic Alterations Are Critical for Fear Memory Consolidation and Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala. *PLoS ONE* 6, e19958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019958>
- Montardy, Q., Zhou, Z., Li, L., Yang, Q., Lei, Z., Feng, X., Chen, Shanping, Shi, Q., Zhang, H., Chen, Shuran, Zhang, Z., Zhao, B., Xu, F., Lu, Z., Wang, L., 2022. Dopamine modulates visual threat processing in the superior colliculus via D2 receptors. *iScience* 25, 104388. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104388>
- Moore, L.D., Le, T., Fan, G., 2013. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacol* 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., Llorens-Martín, M., 2019. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med* 25, 554–560. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9>

Morris, M.J., Mahgoub, M., Na, E.S., Pranav, H., Monteggia, L.M., 2013. Loss of Histone Deacetylase 2 Improves Working Memory and Accelerates Extinction Learning. *J. Neurosci.* 33, 6401–6411. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1001-12.2013>

Morse, S., Butler, A., Davis, R., Soller, I., Lubin, F., 2015. Environmental Enrichment Reverses Histone Methylation Changes in the Aged Hippocampus and Restores Age-Related Memory Deficits. *Biology* 4, 298–313. <https://doi.org/10.3390/biology4020298>

Moscovitch, M., Nadel, L., Winocur, G., Gilboa, A., Rosenbaum, R.S., 2006. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Current Opinion in Neurobiology* 16, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.03.013>

Moser, M.-B., Moser, E.I., 1998. Distributed Encoding and Retrieval of Spatial Memory in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 7535–7542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-18-07535.1998>

Moyer, J.R., Brown, T.H., 2006. Impaired trace and contextual fear conditioning in aged rats. *Behavioral Neuroscience* 120, 612–624. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.3.612>

Müller, G.E., Pilzecker, A., 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss.

-N-

Nadel, L., Hardt, O., 2011. Update on Memory Systems and Processes. *Neuropsychopharmacol* 36, 251–273. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.169>

Nagy, L., Kao, H.-Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., Evans, R.M., 1997. Nuclear Receptor Repression Mediated by a Complex Containing SMRT, mSin3A, and Histone Deacetylase. *Cell* 89, 373–380. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80218-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80218-4)

Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A., 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386–389. <https://doi.org/10.1038/30764>

Narumi-Kishimoto, Y., Araki, N., Migita, O., Kawai, T., Okamura, K., Nakabayashi, K., Kaname, T., Ozawa, Y., Ozawa, H., Takada, F., Hata, K., 2019. Novel SIN3A mutation identified in a Japanese patient with Witteveen-Kolk syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 62, 103547. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.09.014>

Narushima, M., Agetsuma, M., Nabekura, J., 2022. Development and experience-dependent modulation of the defensive behaviors of mice to visual threats. *J Physiol Sci* 72, 5. <https://doi.org/10.1186/s12576-022-00831-7>

Nasmyth, K., Stillman, D., Kipling, D., 1987. Both positive and negative regulators of HO transcription are required for mother-cell-specific mating-type switching in yeast. *Cell* 48, 579–587. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90236-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90236-4)

Neira, S., Hassanein, L.A., Stanhope, C.M., Buccini, M.C., D'Ambrosio, S.L., Flanigan, M.E., Haun, H.L., Boyt, K.M., Bains, J.S., Kash, T.L., 2022. Chronic alcohol consumption alters home-cage behaviors and responses to ethologically relevant predator tasks in mice. *Alcoholism Clin & Exp Res* 46, 1616–1629. <https://doi.org/10.1111/acer.14901>

Nelson, E.D., Bal, M., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2011. Selective impact of MeCP2 and associated histone deacetylases on the dynamics of evoked excitatory neurotransmission. *Journal of Neurophysiology* 106, 193–201. <https://doi.org/10.1152/jn.00751.2010>

Nguyen, H., Meservey, L.M., Ishiko-Silveria, N., Zhou, M., Huang, T.-T., Fu, M., 2020. Fear Deficits in Hypomyelinated *Tppp* Knock-Out Mice. *eNeuro* 7, ENEURO.0170-20.2020. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0170-20.2020>

Norris, C.M., Halpain, S., Foster, T.C., 1998. Alterations in the Balance of Protein Kinase/Phosphatase Activities Parallel Reduced Synaptic Strength During Aging. *Journal of Neurophysiology* 80, 1567–1570. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.3.1567>

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462–465. <https://doi.org/10.1038/307462a0>

-O-

Okabe, S., 2007. Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Molecular and Cellular Neuroscience* 34, 503–518. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.01.006>

Oliveira, A.M.M., Estévez, M.A., Hawk, J.D., Grimes, S., Brindle, P.K., Abel, T., 2011. Subregion-specific p300 conditional knock-out mice exhibit long-term memory impairments. *Learn. Mem.* 18, 161–169. <https://doi.org/10.1101/lm.1939811>

Oliveira, A.M.M., Hemstedt, T.J., Bading, H., 2012. Rescue of aging-associated decline in *Dnmt3a2* expression restores cognitive abilities. *Nat Neurosci* 15, 1111–1113. <https://doi.org/10.1038/nn.3151>

Oliveira, A.M.M., Wood, M.A., McDonough, C.B., Abel, T., 2007. Transgenic mice expressing an inhibitory truncated form of p300 exhibit long-term memory deficits. *Learning & Memory* 14, 564–572. <https://doi.org/10.1101/lm.656907>

Olton, D.S., Samuelson, R.J., 1976. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 2, 97–116. <https://doi.org/10.1037/0097-7403.2.2.97>

Orlando, L.R., Ayala, R., Kett, L.R., Curley, A.A., Duffner, J., Bragg, D.C., Tsai, L., Dunah, A.W., Young, A.B., 2009. Phosphorylation of the homer-binding domain of group I metabotropic glutamate receptors by cyclin-dependent kinase 5. *Journal of Neurochemistry* 110, 557–569. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06139.x>

Osten, P., Dittgen, T., Licznarski, P., 2006. Lentivirus-Based Genetic Manipulations in Neurons In Vivo, in: Kittler, J.T., Moss, S.J. (Eds.), *The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology*, *Frontiers in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

- Palomer, E., Martín-Segura, A., Baliyan, S., Ahmed, T., Balschun, D., Venero, C., Martin, M.G., Dotti, C.G., 2016. Aging Triggers a Repressive Chromatin State at *Bdnf* Promoters in Hippocampal Neurons. *Cell Reports* 16, 2889–2900. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.028>
- Pao, P.-C., Patnaik, D., Watson, L.A., Gao, F., Pan, L., Wang, J., Adaikkan, C., Penney, J., Cam, H.P., Huang, W.-C., Pantano, L., Lee, A., Nott, A., Phan, T.X., Gjoneska, E., Elmsaouri, S., Haggarty, S.J., Tsai, L.-H., 2020. HDAC1 modulates OGG1-initiated oxidative DNA damage repair in the aging brain and Alzheimer's disease. *Nat Commun* 11, 2484. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16361-y>
- Papini, M.R., Penagos-Corzo, J.C., Pérez-Acosta, A.M., 2019. Avian Emotions: Comparative Perspectives on Fear and Frustration. *Front. Psychol.* 9, 2707. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02707>
- Park, G., Tan, J., Garcia, G., Kang, Y., Salvesen, G., Zhang, Z., 2016. Regulation of Histone Acetylation by Autophagy in Parkinson Disease. *Journal of Biological Chemistry* 291, 3531–3540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.675488>
- Patel, R.C., Larson, J., 2009. Impaired olfactory discrimination learning and decreased olfactory sensitivity in aged C57Bl/6 mice. *Neurobiology of Aging* 30, 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.007>
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. ed. Academic Press, San Diego.
- Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittnam, J.L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Dettenhofer, M., Kang, H., Farinelli, L., Chen, W., Fischer, A., 2010. Altered Histone Acetylation Is Associated with Age-Dependent Memory Impairment in Mice 328, 6.
- Penner, 2010. An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction. *Fronti.Ag.Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnagi.2010.00009>
- Penner, M.R., Parrish, R.R., Hoang, L.T., Roth, T.L., Lubin, F.D., Barnes, C.A., 2016. Age-related changes in *Egr 1* transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Hippocampus* 26, 1008–1020. <https://doi.org/10.1002/hipo.22583>
- Penner, M.R., Roth, T.L., Chawla, M.K., Hoang, L.T., Roth, E.D., Lubin, F.D., Sweatt, J.D., Worley, P.F., Barnes, C.A., 2011. Age-related changes in *Arc* transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Neurobiology of Aging* 32, 2198–2210. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.009>
- Perry, S., Kiragasi, B., Dickman, D., Ray, A., 2017. The Role of Histone Deacetylase 6 in Synaptic Plasticity and Memory. *Cell Reports* 18, 1337–1345. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.028>

Phan, M.L., Gergues, M.M., Mahidadia, S., Jimenez-Castillo, J., Vicario, D.S., Bieszczad, K.M., 2017. HDAC3 Inhibitor RGFP966 Modulates Neuronal Memory for Vocal Communication Signals in a Songbird Model. *Front. Syst. Neurosci.* 11, 65. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00065>

Phillips, R.G., LeDoux, J.E., 1992. Differential Contribution of Amygdala and Hippocampus to Cued and Contextual Fear Conditioning 12.

Pigliucci, M., Murren, C.J., Schlichting, C.D., 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology* 209, 2362–2367. <https://doi.org/10.1242/jeb.02070>

Pinke, D., Issa, J.B., Dara, G.A., Dobos, G., Dombek, D.A., 2023. Full field-of-view virtual reality goggles for mice. *Neuron* 111, 3941-3952.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.11.019>

Pitts, D.G., 1982. Visual acuity as a function of age. *J Am Optom Assoc* 53, 117–124.

Pribadi, A.K., Chalasani, S.H., 2022. Fear conditioning in invertebrates. *Front. Behav. Neurosci.* 16, 1008818. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1008818>

Pulya, S., Mahale, A., Bobde, Y., Routholla, G., Patel, T., Swati, Biswas, S., Sharma, V., Kulkarni, O.P., Ghosh, B., 2021. PT3: A Novel Benzamide Class Histone Deacetylase 3 Inhibitor Improves Learning and Memory in Novel Object Recognition Mouse Model. *ACS Chem. Neurosci.* 12, 883–892. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.0c00721>

-Q-

Quevedo, J., Vianna, M.R.M., Roesler, R., Izquierdo, I., Rose, S.P.R., 1999. Two Time Windows of Anisomycin-Induced Amnesia for Inhibitory Avoidance Training in Rats: Protection from Amnesia by Pretraining but not Pre-exposure to the Task Apparatus. *L E A R N I N G* 9.

-R-

Rao, D.D., Vorhies, J.S., Senzer, N., Nemunaitis, J., 2009. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 746–759. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.004>

Rao-Ruiz, P., Couey, J.J., Marcelo, I.M., Bouwkamp, C.G., Slump, D.E., Matos, M.R., Van Der Loo, R.J., Martins, G.J., Van Den Hout, M., Van Ijcken, W.F., Costa, R.M., Van Den Oever, M.C., Kushner, S.A., 2019. Engram-specific transcriptome profiling of contextual memory consolidation. *Nat Commun* 10, 2232. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09960-x>

Rasmussen, T., Schliemann, T., Sørensen, J.C., Zimmer, J., West, M.J., 1996. Memory impaired aged rats: No loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiology of Aging* 17, 143–147. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)02032-2](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)02032-2)

Reijmers, L.G., Perkins, B.L., Matsuo, N., Mayford, M., 2007. Localization of a Stable Neural Correlate of Associative Memory. *Science* 317, 1230–1233. <https://doi.org/10.1126/science.1143839>

Reolon, G.K., Maurmann, N., Werenicz, A., Garcia, V.A., Schröder, N., Wood, M.A., Roesler, R., 2011. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behavioural Brain Research* 221, 329–332. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.033>

Roopra, A., Sharling, L., Wood, I.C., Briggs, T., Bachfischer, U., Paquette, A.J., Buckley, N.J., 2000. Transcriptional Repression by Neuron-Restrictive Silencer Factor Is Mediated via the Sin3-Histone Deacetylase Complex. *Mol Cell Biol* 20, 2147–2157. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.6.2147-2157.2000>

Rosen, J.B., Asok, A., Chakraborty, T., 2015. The smell of fear: innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. *Front. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00292>

Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology* 69, 143–179. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00126-0)

Rowe, W.B., Blalock, E.M., Chen, K.-C., Kadish, I., Wang, D., Barrett, J.E., Thibault, O., Porter, N.M., Rose, G.M., Landfield, P.W., 2007. Hippocampal Expression Analyses Reveal Selective Association of Immediate-Early, Neuroenergetic, and Myelinogenic Pathways with Cognitive Impairment in Aged Rats. *Journal of Neuroscience* 27, 3098–3110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4163-06.2007>

Rudenko, A., Dawlaty, M.M., Seo, J., Cheng, A.W., Meng, J., Le, T., Faull, K.F., Jaenisch, R., Tsai, L.-H., 2013. Tet1 Is Critical for Neuronal Activity-Regulated Gene Expression and Memory Extinction. *Neuron* 79, 1109–1122. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.08.003>

Ruppertsberg, J.P., Kitzing, E.V., Schoepfer, R., 1994. The mechanism of magnesium block of NMDA receptors. *Seminars in Neuroscience* 6, 87–96. <https://doi.org/10.1006/smns.1994.1012>

Ryan, T.J., Roy, D.S., Pignatelli, M., Arons, A., Tonegawa, S., 2015. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science* 348, 1007–1013. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5542>

-S-

Sagliano, L., Cappuccio, A., Trojano, L., Conson, M., 2014. Approaching threats elicit a freeze-like response in humans. *Neuroscience Letters* 561, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.038>

Salay, L.D., Ishiko, N., Huberman, A.D., 2018. A midline thalamic circuit determines reactions to visual threat. *Nature* 557, 183–189. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0078-2>

Salmon, D.P., Lasker, B.R., Butters, N., 1988. Remote Memory in a Patient with Circumscribed Amnesia.

Salvato, G., De Maio, G., Bottini, G., 2017. Exploring biased attention towards body-related stimuli and its relationship with body awareness. *Sci Rep* 7, 17234. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17528-2>

- Samorajski, T., Delaney, C., Durham, L., Ordy, J.M., Johnson, J.A., Dunlap, W.P., 1985. Effect of exercise on longevity, body weight, locomotor performance, and passive-avoidance memory of C57BL/6J mice. *Neurobiology of Aging* 6, 17–24. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(85\)90066-1](https://doi.org/10.1016/0197-4580(85)90066-1)
- Sando, R., Gounko, N., Pieraut, S., Liao, L., Yates, J., Maximov, A., 2012. HDAC4 Governs a Transcriptional Program Essential for Synaptic Plasticity and Memory. *Cell* 151, 821–834. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.037>
- Schachter, S., Singer, J., 1962. Cognitive, social, and physiological determinants of emotional state. *Psychological Review* 69, 379–399. <https://doi.org/10.1037/h0046234>
- Schafe, G.E., LeDoux, J.E., 2000. Memory Consolidation of Auditory Pavlovian Fear Conditioning Requires Protein Synthesis and Protein Kinase A in the Amygdala. *J. Neurosci.* 20, RC96–RC96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-18-j0003.2000>
- Schoenherr, C.J., Paquette, A.J., Anderson, D.J., 1996. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9881–9886. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9881>
- Schroeder, F.A., Lewis, M.C., Fass, D.M., Wagner, F.F., Zhang, Y.-L., Hennig, K.M., Gale, J., Zhao, W.-N., Reis, S., Barker, D.D., Berry-Scott, E., Kim, S.W., Clore, E.L., Hooker, J.M., Holson, E.B., Haggarty, S.J., Petryshen, T.L., 2013. A Selective HDAC 1/2 Inhibitor Modulates Chromatin and Gene Expression in Brain and Alters Mouse Behavior in Two Mood-Related Tests. *PLoS ONE* 8, e71323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071323>
- Scoville, W.B., Milner, B., 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions 11.
- Semon, R.W., 1921. *The mneme*. G. Allen & Unwin Limited.
- Shang, C., Chen, Z., Liu, A., Li, Y., Zhang, J., Qu, B., Yan, F., Zhang, Y., Liu, W., Liu, Z., Guo, X., Li, D., Wang, Y., Cao, P., 2018. Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice. *Nat Commun* 9, 1232. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03580-7>
- Shang, C., Liu, Z., Chen, Z., Shi, Y., Wang, Q., Liu, S., Li, D., Cao, P., 2015. A parvalbumin-positive excitatory visual pathway to trigger fear responses in mice. *Science* 348, 1472–1477. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8694>
- Sheppard, H.M., Harries, J.C., Hussain, S., Bevan, C., Heery, D.M., 2001. Analysis of the Steroid Receptor Coactivator 1 (SRC1)-CREB Binding Protein Interaction Interface and Its Importance for the Function of SRC1. *Molecular and Cellular Biology* 21, 39–50. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.39-50.2001>
- Shoji, H., Miyakawa, T., 2019. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57 BL /6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharm Rep* 39, 100–118. <https://doi.org/10.1002/npr2.12052>

- Siddiqui, S.A., Singh, S., Ugale, R., Ranjan, V., Kanojia, R., Saha, S., Tripathy, S., Kumar, S., Mehrotra, S., Modi, D.R., Prakash, A., 2019. Regulation of HDAC1 and HDAC2 during consolidation and extinction of fear memory. *Brain Research Bulletin* 150, 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.05.011>
- Siegfried, B., Alleva, E., Oliverio, A., Puglisi-Allegra, S., 1981. Effects of isolation on activity, reactivity, excitability and aggressive behavior in two inbred strains of mice. *Behavioural Brain Research* 2, 211–218. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(81\)90056-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(81)90056-5)
- Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A., Dudkowska, M., Krzystyniak, A., Mosieniak, G., Wesierska, M., Wlodarczyk, J., 2021. Cellular Senescence in Brain Aging. *Front. Aging Neurosci.* 13, 646924. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.646924>
- Silva, B.A., Burns, A.M., Gräff, J., 2019. A cFos activation map of remote fear memory attenuation. *Psychopharmacology* 236, 369–381. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5000-y>
- Silva, B.A., Gross, C.T., Gräff, J., 2016. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization. *Learn. Mem.* 23, 544–555. <https://doi.org/10.1101/lm.042812.116>
- Silva, B.A., Mattucci, C., Krzywkowski, P., Murana, E., Illarionova, A., Grinevich, V., Canteras, N.S., Ragozzino, D., Gross, C.T., 2013. Independent hypothalamic circuits for social and predator fear. *Nat Neurosci* 16, 1731–1733. <https://doi.org/10.1038/nn.3573>
- Silverstein, R.A., Ekwall, K., 2005. Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet* 47, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0541-5>
- Singh, P., Thakur, M.K., 2018. Histone Deacetylase 2 Inhibition Attenuates Downregulation of Hippocampal Plasticity Gene Expression during Aging. *Mol Neurobiol* 55, 2432–2442. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0490-x>
- Singh, P., Thakur, M.K., 2014. Reduced recognition memory is correlated with decrease in DNA methyltransferase1 and increase in histone deacetylase2 protein expression in old male mice. *Biogerontology* 15, 339–346. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9504-5>
- Solomon, S.G., Janbon, H., Bimson, A., Wheatcroft, T., 2023. Visual spatial location influences selection of instinctive behaviours in mouse. *R. Soc. open sci.* 10, 230034. <https://doi.org/10.1098/rsos.230034>
- Spiegel, A.M., Sewal, A.S., Rapp, P.R., 2014. Epigenetic contributions to cognitive aging: disentangling mindspan and lifespan. *Learn. Mem.* 21, 569–574. <https://doi.org/10.1101/lm.033506.113>
- Squire, L.R., 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory* 82, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- Squire, L.R., 1986. Mechanisms of Memory. *Science* 232, 1612–1619. <https://doi.org/10.1126/science.3086978>
- Squire, L.R., Alvarez, P., 1995. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Current Opinion in Neurobiology* 5, 169–177. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80023-9](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80023-9)

Squire, L.R., Barondes, S.H., 1973. Memory impairment during prolonged training in mice given inhibitors of cerebral protein synthesis. *Brain Research* 56, 215–225. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90336-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90336-3)

Squire, L.R., Barondes, S.H., 1970. Actinomycin-D: Effects on Memory at Different Times after Training. *Nature* 225, 649–650. <https://doi.org/10.1038/225649a0>

Srivastava, S., Thakur, M.K., 2018. Transcriptional co-repressor SIN3A silencing rescues decline in memory consolidation during scopolamine-induced amnesia. *J. Neurochem.* 145, 204–216. <https://doi.org/10.1111/jnc.14320>

Stefanko, D.P., Barrett, R.M., Ly, A.R., Reolon, G.K., Wood, M.A., 2009. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 9447–9452. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903964106>

Stemmer, P.M., Klee, C.B., 1994. Dual Calcium Ion Regulation of Calcineurin by Calmodulin and Calcineurin B. *Biochemistry* 33, 6859–6866. <https://doi.org/10.1021/bi00188a015>

Sternberg, P., Stern, M., Clark, I., Herskowitz, I., 1987. Activation of the yeast HO gene by release from multiple negative controls. *Cell* 48, 567–577. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90235-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90235-2)

Strack, S., Barban, M.A., Wadzinski, B.E., Colbran, R.J., 1997. Differential Inactivation of Postsynaptic Density-Associated and Soluble Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II by Protein Phosphatases 1 and 2A. *Journal of Neurochemistry* 68, 2119–2128. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68052119.x>

Sui, L., Wang, Y., Ju, L.-H., Chen, M., 2012. Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory* 97, 425–440. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.03.007>

-T-

Tafreshiha, A., Van Der Burg, S.A., Smits, K., Blömer, L.A., Heimel, J.A., 2021. Visual stimulus-specific habituation of innate defensive behaviour in mice. *Journal of Experimental Biology* 224, jeb230433. <https://doi.org/10.1242/jeb.230433>

Takahashi, L.K., Hubbard, D.T., Lee, I., Dar, Y., Sipes, S.M., 2007. Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. *Behavioral Neuroscience* 121, 100–110. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.1.100>

Takakura, M., Nakagawa, R., Ota, T., Kimura, Y., Ng, M.Y., Alia, A.G., Okuno, H., Hirano, Y., 2021. Rpd3/CoRest-mediated activity-dependent transcription regulates the flexibility in memory updating in *Drosophila*. *Nat Commun* 12, 628. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20898-x>

Tam, G.W.C., van de Lagemaat, L.N., Redon, R., Strathdee, K.E., Croning, M.D.R., Malloy, M.P., Muir, W.J., Pickard, B.S., Deary, I.J., Blackwood, D.H.R., Carter, N.P., Grant, S.G.N., 2010. Confirmed rare copy number variants implicate novel genes in schizophrenia. *Biochemical Society Transactions* 38, 445–451. <https://doi.org/10.1042/BST0380445>

- Tammaro, A., Daniels, E.G., Hu, I.M., 'T Hart, K.C., Reid, K., Juni, R.P., Butter, L.M., Vasam, G., Kamble, R., Jongejan, A., Aviv, R.I., Roelofs, J.J.T.H., Aronica, E., Boon, R.A., Menzies, K.J., Houtkooper, R.H., Janssens, G.E., 2024. HDAC1/2 inhibitor therapy improves multiple organ systems in aged mice. *iScience* 27, 108681. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108681>
- Tanaka, K.Z., Pevzner, A., Hamidi, A.B., Nakazawa, Y., Graham, J., Wiltgen, B.J., 2014. Cortical Representations Are Reinstated by the Hippocampus during Memory Retrieval. *Neuron* 84, 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.037>
- Taubenfeld, S.M., Milekic, M.H., Monti, B., Alberini, C.M., 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β . *Nat Neurosci* 4, 813–818. <https://doi.org/10.1038/90520>
- Taylor, K.K., Tanaka, K.Z., Reijmers, L.G., Wiltgen, B.J., 2013. Reactivation of Neural Ensembles during the Retrieval of Recent and Remote Memory. *Current Biology* 23, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.019>
- Temizer, I., Donovan, J.C., Baier, H., Semmelhack, J.L., 2015. A Visual Pathway for Looming-Evoked Escape in Larval Zebrafish. *Current Biology* 25, 1823–1834. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.002>
- Terburg, D., Scheggia, D., Triana Del Rio, R., Klumpers, F., Ciobanu, A.C., Morgan, B., Montoya, E.R., Bos, P.A., Giobellina, G., Van Den Burg, E.H., De Gelder, B., Stein, D.J., Stoop, R., Van Honk, J., 2018. The Basolateral Amygdala Is Essential for Rapid Escape: A Human and Rodent Study. *Cell* 175, 723-735.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.028>
- Teyler, T.J., DiScenna, P., 1986. The Hippocampal Memory Indexing Theory 100, 147–154.
- Thackaberry, E.A., Wang, X., Schweiger, M., Messick, K., Valle, N., Dean, B., Sambrone, A., Bowman, T., Xie, M., 2014. Solvent-based formulations for intravenous mouse pharmacokinetic studies: tolerability and recommended solvent dose limits. *Xenobiotica* 44, 235–241. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.845706>
- Thut, P.D., Lindell, T.J., 1973. Alpha-amanitin inhibition of mouse brain form II ribonucleic acid polymerase and passive avoidance retention. *Molecular pharmacology* 10, 146–154.
- Tomé, D.F., Zhang, Y., Aida, T., Mosto, O., Lu, Y., Chen, M., Sadeh, S., Roy, D.S., Clopath, C., 2024. Dynamic and selective engrams emerge with memory consolidation. *Nat Neurosci* 27, 561–572. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01551-w>
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., Redondo, R., 2015a. Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron* 87, 918–931. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.002>
- Tonegawa, S., Morrissey, M.D., Kitamura, T., 2018. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat Rev Neurosci* 19, 485–498. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0031-2>
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D.S., Ryan, T.J., 2015b. Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology* 35, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.07.009>

- Tong, J.K., Hassig, C.A., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., Schreiber, S.L., 1998. Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* 395, 917–921. <https://doi.org/10.1038/27699>
- Tovote, P., Esposito, M.S., Botta, P., Chaudun, F., Fadok, J.P., Markovic, M., Wolff, S.B.E., Ramakrishnan, C., Fenno, L., Deisseroth, K., Herry, C., Arber, S., Lüthi, A., 2016. Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature* 534, 206–212. <https://doi.org/10.1038/nature17996>
- Tovote, P., Fadok, J.P., Lüthi, A., 2015. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci* 16, 317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>
- Trouche, S., Bontempi, B., Roulet, P., Rampon, C., 2009. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5919–5924. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811054106>
- Trouche, S., Sasaki, J.M., Tu, T., Reijmers, L.G., 2013. Fear Extinction Causes Target-Specific Remodeling of Perisomatic Inhibitory Synapses. *Neuron* 80, 1054–1065. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.047>
- Tulving, E., 2002. Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annu. Rev. Psychol.* 53, 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>
- Tulving, E., 2001. Episodic memory and common sense: how far apart? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356, 1505–1515. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0937>
- Tulving, E., Schacter, D.L., 1990. Priming and Human Memory Systems. *Science* 247, 301–306. <https://doi.org/10.1126/science.2296719>

-V-

- Vale, R., Evans, D.A., Branco, T., 2017. Rapid Spatial Learning Controls Instinctive Defensive Behavior in Mice. *Current Biology* 27, 1342–1349. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.031>
- Van Dongen, L.C.M., Wingbermühle, E., Dingemans, A.J.M., Bos-Roubos, A.G., Vermeulen, K., Pop-Purceanu, M., Kleefstra, T., Egger, J.I.M., 2020. Behavior and cognitive functioning in WITTEVEEN–KOLK syndrome. *American J of Med Genetics Pt A* 182, 2384–2390. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61775>
- Van Oevelen, C., Bowman, C., Pellegrino, J., Asp, P., Cheng, J., Parisi, F., Micsinai, M., Kluger, Y., Chu, A., Blais, A., David, G., Dynlacht, B.D., 2010. The Mammalian Sin3 Proteins Are Required for Muscle Development and Sarcomere Specification. *Molecular and Cellular Biology* 30, 5686–5697. <https://doi.org/10.1128/MCB.00975-10>
- Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., Wood, M.A., 2007. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. *Journal of Neuroscience* 27, 6128–6140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0296-07.2007>

Verret, L., Krezymon, A., Halley, H., Trouche, S., Zerwas, M., Lazouret, M., Lassalle, J.-M., Rampon, C., 2013. Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiology of Aging* 34, 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.013>

Vetere, G., Tran, L.M., Moberg, S., Steadman, P.E., Restivo, L., Morrison, F.G., Ressler, K.J., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2019. Memory formation in the absence of experience. *Nat Neurosci* 22, 933–940. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0389-0>

Villain, H., Florian, C., Rouillet, P., 2016. HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice. *Sci Rep* 6, 27015. <https://doi.org/10.1038/srep27015>

Von Bernhardi, R., Eugénín-von Bernhardi, L., Eugénín, J., 2015. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00124>

Von Bohlen Und Halbach, O., Unsicker, K., 2002. Morphological alterations in the amygdala and hippocampus of mice during ageing. *Eur J of Neuroscience* 16, 2434–2440. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02405.x>

Von Bohlen Und Halbach, O., Zacher, C., Gass, P., Unsicker, K., 2006. Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *J. Neurosci. Res.* 83, 525–531. <https://doi.org/10.1002/jnr.20759>

Von Reyn, C.R., Nern, A., Williamson, W.R., Breads, P., Wu, M., Namiki, S., Card, G.M., 2017. Feature Integration Drives Probabilistic Behavior in the *Drosophila* Escape Response. *Neuron* 94, 1190-1204.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.036>

-W-

Wagner, A., 2005. Energy Constraints on the Evolution of Gene Expression. *Molecular Biology and Evolution* 22, 1365–1374. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi126>

Wallace, K.J., Rosen, J.B., 2000. Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: Elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behavioral Neuroscience* 114, 912–922. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.114.5.912>

Wang, D., Wang, B., Liu, Y., Dong, X., Su, Y., Li, S., 2019. Protective Effects of ACY-1215 Against Chemotherapy-Related Cognitive Impairment and Brain Damage in Mice. *Neurochem Res* 44, 2460–2469. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02882-6>

Wang, I.-F., Ho, P.-C., Tsai, K.-J., 2022. MicroRNAs in Learning and Memory and Their Impact on Alzheimer’s Disease. *Biomedicines* 10, 1856. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081856>

Wang, J.-G., Cai, Q., Zheng, J., Dong, Y.-S., Li, J.-J., Li, J.-C., Hao, G.-Z., Wang, C., Wang, J.-L., 2016. Epigenetic Suppression of GADs Expression is Involved in Temporal Lobe Epilepsy and Pilocarpine-Induced Mice Epilepsy. *Neurochem Res* 41, 1751–1760. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1891-3>

- Wang, M.E., Fraize, N.P., Yin, L., Yuan, R.K., Petsagourakis, D., Wann, E.G., Muzzio, I.A., 2013. Differential roles of the dorsal and ventral hippocampus in predator odor contextual fear conditioning. *Hippocampus* 23, 451–466. <https://doi.org/10.1002/hipo.22105>
- Wang, R.-Y., Phang, R.-Z., Hsu, P.-H., Wang, W.-H., Huang, H.-T., Liu, I.Y., 2013. *In vivo* knockdown of hippocampal miR-132 expression impairs memory acquisition of trace fear conditioning: Knockdown of miR-132 Impairs Trace Fear Conditioning. *Hippocampus* 23, 625–633. <https://doi.org/10.1002/hipo.22123>
- Wang, W., Cheng, L., Pan, F., Xue, B., Wang, D., Chen, Z., Li, C., 2011. Intracellular Trafficking of Histone Deacetylase 4 Regulates Long-Term Memory Formation. *The Anatomical Record* 294, 1025–1034. <https://doi.org/10.1002/ar.21389>
- Wei, P., Liu, N., Zhang, Z., Liu, X., Tang, Y., He, X., Wu, B., Zhou, Z., Liu, Y., Li, J., Zhang, Y., Zhou, X., Xu, L., Chen, L., Bi, G., Hu, X., Xu, F., Wang, L., 2015. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. *Nat Commun* 6, 6756. <https://doi.org/10.1038/ncomms7756>
- Whittle, N., Maurer, V., Murphy, C., Rainer, J., Bindreither, D., Hauschild, M., Scharinger, A., Oberhauser, M., Keil, T., Brehm, C., Valovka, T., Striessnig, J., Singewald, N., 2016. Enhancing dopaminergic signaling and histone acetylation promotes long-term rescue of deficient fear extinction. *Transl Psychiatry* 6, e974–e974. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.231>
- Williams, J.B., Pang, D., Delgado, B., Kocherginsky, M., Tretiakova, M., Krausz, T., Pan, D., He, J., McClintock, M.K., Conzen, S.D., 2009. A Model of Gene-Environment Interaction Reveals Altered Mammary Gland Gene Expression and Increased Tumor Growth following Social Isolation. *Cancer Prevention Research* 2, 850–861. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0238>
- Wimmer, M.E., Hernandez, P.J., Blackwell, J., Abel, T., 2012. Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice. *Neurobiology of Aging* 33, 2220–2224. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.007>
- Winocur, G., Moscovitch, M., 2011. Memory Transformation and Systems Consolidation. *J Int Neuropsychol Soc* 17, 766–780. <https://doi.org/10.1017/S1355617711000683>
- Winters, B.D., Forwood, S.E., Cowell, R.A., Saksida, L.M., Bussey, T.J., 2004. Double Dissociation between the Effects of Peri-Posterior Cortex and Hippocampal Lesions on Tests of Object Recognition and Spatial Memory: Heterogeneity of Function within the Temporal Lobe. *J. Neurosci.* 24, 5901–5908. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1346-04.2004>
- Witteveen, J.S., Willemsen, M.H., Dombroski, T.C.D., Nillesen, W.M., van Hulten, J.A., Jansen, E.J.R., Verkaik, D., Veenstra-Knol, H.E., 2016. Haploinsufficiency of MeCP2-interacting transcriptional co-repressor SIN3A causes mild intellectual disability by affecting the development of cortical integrity. *Nature Genetics* 48, 13.
- Wong, T.P., Marchese, G., Casu, M.A., Ribeiro-da-Silva, A., Cuello, A.C., De Koninck, Y., 2006. Imbalance towards inhibition as a substrate of aging-associated cognitive impairment. *Neuroscience Letters* 397, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.055>

Wood, M.A., Attner, M.A., Oliveira, A.M.M., Brindle, P.K., Abel, T., 2006. A transcription factor-binding domain of the coactivator CBP is essential for long-term memory and the expression of specific target genes. *Learn. Mem.* 13, 609–617. <https://doi.org/10.1101/lm.213906>

Wood, M.A., Kaplan, M.P., Park, A., Blanchard, E.J., Oliveira, A.M.M., Lombardi, T.L., Abel, T., 2005. Transgenic mice expressing a truncated form of CREB-binding protein (CBP) exhibit deficits in hippocampal synaptic plasticity and memory storage. *Learn. Mem.* 12, 111–119. <https://doi.org/10.1101/lm.86605>

-X-

Xiong, X.R., Liang, F., Zingg, B., Ji, X., Ibrahim, L.A., Tao, H.W., Zhang, L.I., 2015. Auditory cortex controls sound-driven innate defense behaviour through corticofugal projections to inferior colliculus. *Nat Commun* 6, 7224. <https://doi.org/10.1038/ncomms8224>

Xu, X., Holmes, T.C., Luo, M.-H., Beier, K.T., Horwitz, G.D., Zhao, F., Zeng, W., Hui, M., Semler, B.L., Sandri-Goldin, R.M., 2020. Viral Vectors for Neural Circuit Mapping and Recent Advances in Trans-synaptic Anterograde Tracers. *Neuron* 107, 1029–1047. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.010>

-Y-

Yamada, T., Yang, Y., Hemberg, M., Yoshida, T., Cho, H.Y., Murphy, J.P., Fioravante, D., Regehr, W.G., Gygi, S.P., Georgopoulos, K., Bonni, A., 2014. Promoter Decommissioning by the NuRD Chromatin Remodeling Complex Triggers Synaptic Connectivity in the Mammalian Brain. *Neuron* 83, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.039>

Yanai, S., Endo, S., 2021. Functional Aging in Male C57BL/6J Mice Across the Life-Span: A Systematic Behavioral Analysis of Motor, Emotional, and Memory Function to Define an Aging Phenotype. *Front. Aging Neurosci.* 13, 697621. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.697621>

Yang, W., Zhou, X., Ma, T., 2019. Memory Decline and Behavioral Inflexibility in Aged Mice Are Correlated With Dysregulation of Protein Synthesis Capacity. *Front. Aging Neurosci.* 11, 246. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00246>

Yang, Y.-C., Chen, C.-N., Wu, C.-I., Huang, W.-J., Kuo, T.-Y., Kuan, M.-C., Tsai, T.-H., Huang, J.-S., Huang, C.-Y., 2013. NBM-T-L-BMX-OS01, Semisynthesized from Osthole, Is a Novel Inhibitor of Histone Deacetylase and Enhances Learning and Memory in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/514908>

Ye, F., Tian, S., Hu, H., Yu, Z., 2020. Electroacupuncture reduces scopolamine-induced amnesia via mediating the miR-210/SIN3A and miR-183/SIN3A signaling pathway. *Mol Med* 26, 107. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00233-8>

Yeh, S.-H., Lin, C.-H., Gean, P.-W., 2004. Acetylation of Nuclear Factor- κ B in Rat Amygdala Improves Long-Term but not Short-Term Retention of Fear Memory. *Mol Pharmacol* 65, 1286–1292. <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1286>

Yilmaz, M., Meister, M., 2013. Rapid Innate Defensive Responses of Mice to Looming Visual Stimuli. *Current Biology* 23, 2011–2015. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.015>

You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M., Schreiber, S.L., 2001. CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1454–1458. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1454>

Young, P.T., Arnold, M.B., 1963. Emotion and Personality. *The American Journal of Psychology* 76, 516. <https://doi.org/10.2307/1419805>

-Z-

Zacarias, R., Namiki, S., Card, G.M., Vasconcelos, M.L., Moita, M.A., 2018. Speed dependent descending control of freezing behavior in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun* 9, 3697. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05875-1>

Zambetti, P.R., Schuessler, B.P., Lecamp, B.E., Shin, A., Kim, E.J., Kim, J.J., 2022. Ecological analysis of Pavlovian fear conditioning in rats. *Commun Biol* 5, 830. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03802-1>

Zelikowsky, M., Hui, M., Karigo, T., Choe, A., Yang, B., Blanco, M.R., Beadle, K., Gradinaru, V., Deverman, B.E., Anderson, D.J., 2018. The Neuropeptide Tac2 Controls a Distributed Brain State Induced by Chronic Social Isolation Stress. *Cell* 173, 1265-1279.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.037>

Zhang, D., Yoon, H.-G., Wong, J., 2005. JMJD2A Is a Novel N-CoR-Interacting Protein and Is Involved in Repression of the Human Transcription Factor Achaete Scute-Like Homologue 2 (ASCL2/Hash2). *Molecular and Cellular Biology* 25, 6404–6414. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.15.6404-6414.2005>

Zhang, F., Rein, B., Zhong, P., Shwani, T., Conrow-Graham, M., Wang, Z.-J., Yan, Z., 2021. Synergistic inhibition of histone modifiers produces therapeutic effects in adult Shank3-deficient mice. *Transl Psychiatry* 11, 99. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01233-w>

Zhang, H., Hu, S., Yang, P., Long, H., Ma, Q., Yin, D., Xu, G., 2024. HDAC9-mediated calmodulin deacetylation induces memory impairment in Alzheimer’s disease. *CNS Neurosci Ther* 30, e14573. <https://doi.org/10.1111/cns.14573>

Zhang, L., Liu, C., Wu, J., Tao, J., Sui, X., Yao, Z., Xu, Y., Huang, L., Zhu, H., Sheng, S., Qin, C., 2014. Tubastatin A/ACY-1215 Improves Cognition in Alzheimer’s Disease Transgenic Mice. *JAD* 41, 1193–1205. <https://doi.org/10.3233/JAD-140066>

Zhou, W., He, Y., Rehman, A.U., Kong, Y., Hong, S., Ding, G., Yalamanchili, H.K., Wan, Y.-W., Paul, B., Wang, C., Gong, Y., Zhou, Wenxian, Liu, H., Dean, J., Scalais, E., O’Driscoll, M., Morton, J.E.V., Hou, X., Wu, Q., Tong, Q., Liu, Z., Liu, P., Xu, Y., Sun, Z., 2019. Loss of function of NCOR1 and NCOR2 impairs memory through a novel GABAergic hypothalamus–CA3 projection. *Nat Neurosci* 22, 205–217. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0311-1>

Zhou, Z., Liu, X., Chen, S., Zhang, Z., Liu, Y., Montardy, Q., Tang, Y., Wei, P., Liu, N., Li, L., Song, R., Lai, J., He, X., Chen, C., Bi, G., Feng, G., Xu, F., Wang, L., 2019. A VTA GABAergic Neural Circuit Mediates Visually Evoked Innate Defensive Responses. *Neuron* 103, 473-488.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.027>

Zola-Morgan, S., Squire, L., Amaral, D., 1989a. Lesions of the hippocampal formation but not lesions of the fornix or the mammillary nuclei produce long-lasting memory impairment in monkeys. *J. Neurosci.* 9, 898–913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-03-00898.1989>

Zola-Morgan, S., Squire, L., Amaral, D., 1989b. Lesions of the amygdala that spare adjacent cortical regions do not impair memory or exacerbate the impairment following lesions of the hippocampal formation. *J. Neurosci.* 9, 1922–1936. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-06-01922.1989>

Zovoilis, A., Agbemenyah, H.Y., Agis-Balboa, R.C., Stilling, R.M., Edbauer, D., Rao, P., Farinelli, L., Delalle, I., Schmitt, A., Falkaj, P., Bahari-Javan, S., Burkhardt, S., Sananbenesi, F., Fischer, A., 2011. microRNA-34c is a novel target to treat dementias: microRNA-34c is a novel target to treat dementias. *The EMBO Journal* 30, 4299–4308. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.327>

ANNEXES

ANNEXE 1 – ARTICLE SOUMIS POUR PUBLICATION

Age-associated alteration of innate defensive response to a looming stimulus and brain functional connectivity pattern in mice

Célia Bak¹, Aroha Boutin¹, Sébastien Gauzin¹, Camille Lejards¹, Claire Rampon¹, Cédric Florian¹

¹Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Toulouse III, 31400, Toulouse, France

Corresponding author: cedrick.florian@univ-tlse3.fr

Acknowledgments : We thank Virginie Bourlier (I2MC, Toulouse) for providing us full access to fluorescent microscopy. We also thank the CBI-ANEXPLO mice facility for animal care and the CBI-Mouse Behavioral Core (MBC) for behavioral support.

Highlights :

- Innate defensive response to a looming stimulus changes in old mice
- Brain activity induced by looming is modified in aged mice
- Looming-evoked functional brain connectivity pattern change in aged mice
-

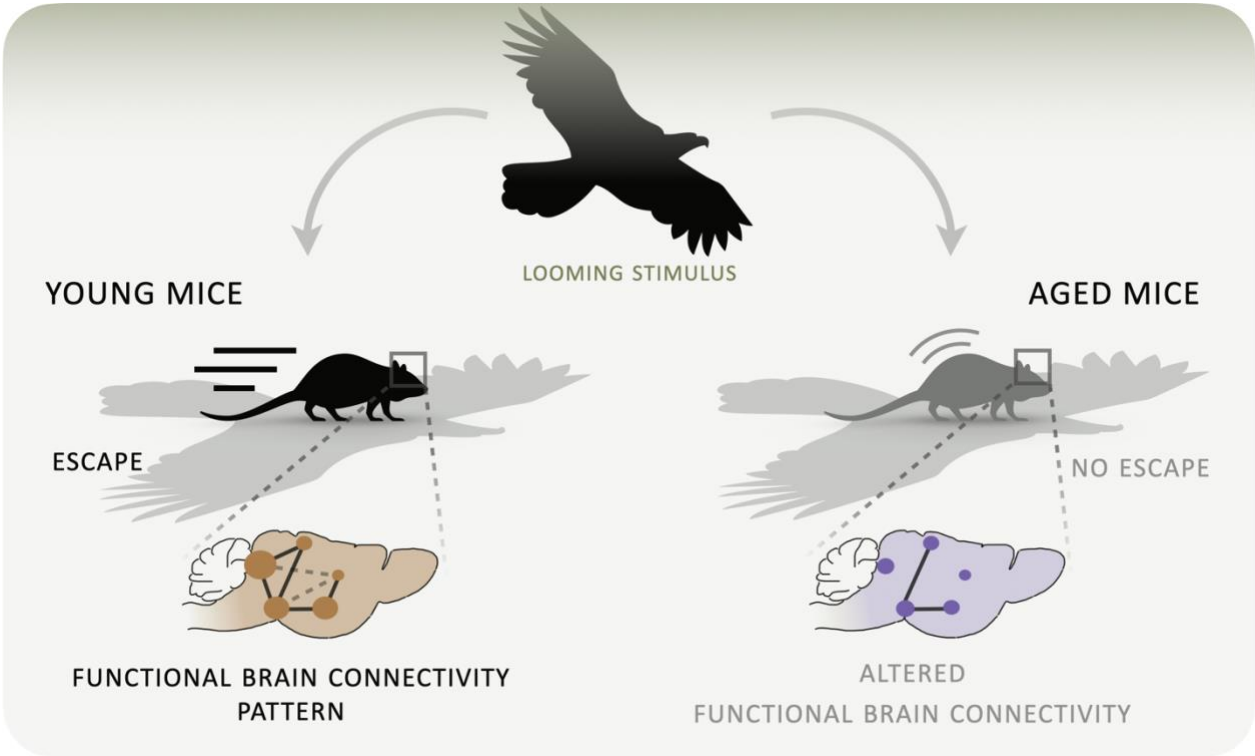
Abstract :

Adapted innate defensive behaviors are essential for species survival. While these behaviors start to develop early in an individual's life, there is still much to be understood about how they evolve with advancing age. Considering that aging is often accompanied by various cognitive and physical declines, we propose that innate fear behaviors and underlying cerebral mechanisms might undergo modifications in older individuals. Our study investigates this hypothesis by examining how aged mice respond to a looming visual threat compared to their younger counterparts. Our findings indicate that aged mice exhibit a different fear response than young mice when facing this imminent threat. Specifically, unlike young mice, aged mice tend to predominantly display freezing behavior without seeking shelter. Interestingly, this altered behavioral response in aged mice is linked to a distinct pattern of functional brain connectivity compared to young mice. Notably, we highlight a lack of a consistent brain activation

following the fear response in aged mice, suggesting that innate defensive behaviors undergo changes with aging.

Keywords : aging, brain activation, c-Fos, fear behavior, defensive behavior, looming

Graphical abstract :



Introduction

Fear can be defined as an emotion experienced by an individual in the face of danger or threat, and which elicits multiple behavioral responses. Among these, freezing (i.e. total immobility, except for respiratory movements) and escaping behaviors are particularly well conserved through evolution and across species. Indeed, these threat-evoked responses can be found in lizards (Hennig et al., 1976), squirrels (Dill and Houtman, 1989), crayfishes (Liden et al., 2010), fishes (Domenici, 2010; Temizer et al., 2015), drosophila (Von Reyn et al., 2017; Zacarias et al., 2018), birds (De Haas et al., 2012; Papini et al., 2019), mice (Yilmaz and Meister, 2013) and in humans (Sagliano et al., 2014; Terburg et al., 2018). The critical choice between freezing and flight in response to risks of predation appears to be a major criterion in survival. This choice is determined by several factors, including environmental characteristics and threat features (Bhattacharyya et al., 2017; Hennig et al., 1976; Liden et al., 2010; Vale et al., 2017).

In rodents, a variety of setups and environmental stimuli are employed to assess fear behaviors. For instance, painful experiences (e.g. electrical foot-shock), predator odors (e.g. fox urine) or visual cues imitating predators (e.g. looming and sweeping stimuli) are commonly used (Silva et al., 2016). Two types of fear are mainly studied in rodents: learned fear and innate fear. The *learned fear response* is elicited when the individual has previously associated a neutral stimulus (e.g. a tone or a context) with an aversive stimulus (e.g. a predator odor or an electrical foot-shock), so that the learned fear is triggered by the neutral element. In contrast, the *innate fear response* requires no prior learning, it is the immediate reaction to the aversive stimulus or threat itself. This innate fear response has been explored in rodents using looming or sweeping stimuli. The looming stimulus mimics the rapid approach of a flying predator, producing flight and/or freezing reactions, while the sweeping stimulus mimics the predator passing above the subject, eliciting only a freezing reaction (De Franceschi et al., 2016; Yilmaz and Meister, 2013). The brain structures and circuits underlying the fear-evoked responses to a looming stimulus have been explored. Numerous studies have demonstrated the role of the superior colliculus (SC) in regulating these responses. Anatomically, a subset of retinal ganglion cells innervates the SC (Huang et al., 2017), which is connected to the ventral tegmental area and mediates the innate defensive behaviors elicited by looming (Z. Zhou et al., 2019). Furthermore, the SC contains parvalbumin neurons that

project directly to the parabrachial nucleus (PBN) located in the midbrain and the lateral posterior thalamic nucleus (LPTN) (Shang et al., 2018). Interestingly, it was found that the optogenetic activation of the SC-PBN pathway induces flight followed by a freezing response, while activation of SC-LPTN triggers immediate freezing behavior (Shang et al., 2018). In addition, the anatomical connection between the SC and the dorsal periaqueductal gray (dPAG) mediates the initiation of escape behavior, as it has been shown by coupling calcium imaging and optogenetic approaches (Evans et al., 2018). Finally, the SC send projections to the ventral midline thalamus (Krouse et al., 2001) which controls the reaction to visual threats (Salay et al., 2018), but it is also connected to the locus coeruleus (Li et al., 2018) and works in concert with the dorsal raphe nucleus (Huang et al., 2017). Furthermore, it is well established that the amygdala has a major implication in fear (LeDoux, 2000), as well as in the response to a looming stimulus. Indeed, Salay and collaborators showed an increase of the looming-evoked freezing response when the neural circuit between the ventral midline thalamus nuclei and the basolateral amygdala (BLA) is activated (Salay et al., 2018). Conversely, inactivation of the BLA silenced the fear behavior induced by the looming stimulus (Wei et al., 2015). The central amygdala (CeA) is also involved in defensive behaviors (Shang et al., 2015; Z. Zhou et al., 2019), notably through its neuronal connection to the PAG (Tovote et al., 2016). In their study, Tovote and colleagues showed that CeA activation induces the disinhibition of the ventrolateral PAG (vlPAG) neurons, resulting in freezing behavior in mice. In contrast, dorsolateral PAG (dlPAG) escape-evoking neurons inhibit vlPAG neurons, thereby inducing a flight response. Therefore, the PAG appears to be a key structure for regulating fear behavior in response to threat. Finally, a recent study shows that the neuronal circuit between the hippocampus and the anterior hypothalamic nucleus controls the goal-directed escape toward a shelter (Bang et al., 2022).

Aging is often accompanied by profound behavioral changes, notably regarding locomotor activity and motor coordination, anxiety-like behaviors, auditory startle response, pain sensitivity, as well as spatial and working memory (Shoji and Miyakawa, 2019). For instance, the freezing response to auditory cues after Pavlovian fear conditioning is impaired in aged rodents (Gould and Feiro, 2005; Moyer and Brown, 2006; Shoji and Miyakawa, 2019). At the neurobiological level, aging is associated with numerous cellular alterations such as aberrant activity of neuronal network (Mattson and Arumugam, 2018) and

cognitive impairments in aged rats have been linked to a decrease in functional brain connectivity (Ash et al., 2016). Brain structural changes occur during aging, including morphological alterations in the amygdala (Von Bohlen Und Halbach and Unsicker, 2002), changes in the volume of superficial layers of the SC with an increase of glial cells (Díaz et al., 2003), as well as astrocytic changes in the PAG (Jaworska-Adamu et al., 2014). Thus, aging is characterized by a wide range of changes, from behavioral to cellular level. However, little is known about the impact of aging on innate fear behavior (Liu et al., 2022).

Therefore, in the present study, we examine looming-evoked behaviors and cellular activity in brain regions involved in these defensive responses, in young (3-4 months) and aged (23-25 months) mice.

Materials and methods

Animals

Young (3-4 months) and aged (23-25 months) adult C57Bl/6Jrj female and male mice were used. Initially, mice were obtained from Janvier Labs (France) before being bred and maintained in the animal facility of the Center for Integrative Biology (CBI, Toulouse). Animals were housed in groups of four to six animals, at 23°C with a 12-hour light-dark cycle (8:00 AM – 8:00 PM) with *ad libitum* access to water and food. All the procedures were approved by the French Ministry of Research and local ethic committees (APAFIS #12342-2017082111489451 v6 and #12343-2017111516096417 v9) and conducted in compliance with the European directive 2010/63/UE.

Looming test

Four days before the start of behavioral experiments, each animal was housed individually. Animals were handled for 2 minutes during the two days preceding the behavioral test.

The apparatus (Imetronic, France) consisted of a rectangular arena (40cm x 38cm x 31cm) containing an opaque shelter (12,5cm x 10cm x 4,5cm), gathered under a screen to display visual stimuli.

The first day, each mouse was allowed to explore the arena and shelter freely during 10 minutes of habituation, without any stimulus. The next day, each animal was placed back in the arena for 5 minutes, after which, the mouse could trigger the looming stimulus by entering a virtual zone located in the center

of the arena. The looming stimulus consisted of 10 repetitions of a black disc expanding from a diameter from 1 cm to 25 cm in 250 ms and remaining on the screen for another 250 ms. The stimulus was repeated with an intertrial interval of 500 ms (Figure 1A). Mice innate fear response was observed during the 10 seconds of the looming stimulus. The setup was cleaned with 30% ethanol between each mouse.

All habituation and looming test sessions were recorded and analyzed using Ethovision XT 16 software (Noldus, Netherlands). Mice velocity, distance moved, and time spent in the different zones of the arena were measured. Freezing behavior was defined as an event lasting at least one second during which the mouse's speed was less than 15% of its average speed calculated over the 10 seconds preceding the stimulus. Conversely, escape behavior was defined as an event in which the mouse reaches the shelter at a speed 4 times greater than its average speed calculated over the 10 seconds preceding the stimulus. Each mouse was considered as freezing and/or escaping if it displays this behavior at least once.

Animals of "home-cage" group were not subjected to either the habituation session or the looming stimulus. Mice in the "control" group underwent the same habituation session as those in the "looming" group, but did not trigger the looming stimulus upon entering the virtual central area during the test day.

Tissue processing and c-Fos immunohistochemistry

C-Fos immunohistochemistry was performed on mice from the three experimental groups. Mice from the control and looming conditions were deeply anesthetized with a high dose of pentobarbital (Euthasol vet, Dechra) and transcardially perfused (0,9% NaCl), 90 minutes after removal from the arena. Brains were dissected and post-fixed in paraformaldehyde solution (4% PFA) for 48h before being stored in a 30% sucrose solution (0,1% sodium azide). Then, 30 μ m-thick coronal sections were obtained using a cryomicrotome (Leica SM2010R, Leica Biosystems, Nanterre, France) and were stored in a cryoprotectant solution at -20°C until use.

Series of 1/12 free-floating sections were then put through an immunostaining protocol against c-Fos. On day one, sections were washed in 0,1M phosphate buffered saline containing 0,25% triton (PBST) and then placed in a solution containing 10% methanol and 10% H₂O₂ in PBST to block endogenous peroxydases. After a rinse with PBST, sections were incubated for 1h in a blocking solution (10% NDS;

1% BSA; PBST). Finally, they were incubated in the blocking solution containing rabbit anti-c-Fos primary antibody (1/1000 ; Abcam ab190289 ; #GR3379960-1 ; #1026805-1) overnight at room temperature under agitation. The next day, the sections were rinsed in PBST before being incubated for 90 minutes in the blocking solution containing a fluorescent secondary antibody (Alexa 555 donkey anti-rabbit antibody ; 1/500 ; Life Tech A31572). Finally, the sections were rinsed and stained with Hoechst (1/10000) before being mounted on slides and coverslipped using a Mowiol medium.

Image acquisition and analysis

Images were obtained from these brain sections observed with a 10X objective of a fluorescence microscope (Leica DM6000 B, Leica, Nanterre, France) equipped with Mercator software (Explora Nova, La Rochelle, France).

Densities of c-Fos-immunopositive (c-Fos⁺) cells were estimated from images using Image J software. Briefly, cerebral structures outlines were manually traced on Hoechst images according to a mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2001) and reported on c-Fos images where a fixed threshold was applied for each brain region. C-Fos⁺ cells were then counted using the “analyze particle” function for which we determined and set the parameters for each structure. The density of c-Fos⁺ cells was then calculated, so that each individual value represents the mean of measurements obtained from images acquired on three successive brain sections (separated by 360 µm) of the same animal.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Prism 10 software.

Statistical analysis of behavior and c-Fos⁺ cell density

For behavioral analysis, the statistical significance was determined by a Fisher's exact test for the proportion of mice showing an escape behavior and by a Mann-Whitney test for the latency to escape. For c-Fos⁺ cell density analysis, the statistical significance was assessed using one-way ANOVA for each brain structure, followed by Tuckey's multiple comparisons tests when the ANOVA was significant. We were not able to compare c-Fos⁺ cell densities between young and aged mice since the

immunohistochemistry experiments were carried on using 2 lots of antibodies against c-Fos (Abcam ab190289 ; #GR3379960-1 for young mice and Abcam ab190289 ; #1026805-1 for aged mice).

Inter-regional correlation analysis

Within each experimental group (“home-cage”, “control”, “young looming” and “aged looming”), Pearson correlation coefficients were determined for the pairwise comparisons of densities of c-Fos⁺ cells between all 10 studied brain areas.

Network connectivity and correlation analysis

Calculations of Pearson correlation coefficients and densities of c-Fos⁺ cells were used to build network comparisons. Each brain region analyzed in this study was represented by a node, and the node size was proportional to the fold change of c-Fos density in a region of an experimental group compared to the same region in the “home-cage” group. The network connection lines show Pearson correlations between brain structures and were filtered to visualize correlations with a p-value < 0,05. Lines width relates to the r value of the correlation between connected regions, a thick line denotes a high r value. The igraph package in R (v1.2.4.1) was used to visualize the networks.

Results

Behavioral response to looming stimuli is modified by age

In order to investigate the innate fear response in young (3-4 months) and old (23-25 months) mice, we submitted animals to a looming stimulus which imitates a flying predator rapidly approaching the mouse from above (Figure 1A).

Prior to testing the innate fear response, mice were first habituated to the setup. During this habituation session, we observed that aged mice moved a reduced distance, at a lower average speed and spend less time in the center compared to young mice (Figure S1 : distance moved, p=0.0230, mean speed, p=0.0152, center time, p=0.0162, shelter time, p=0.0545, Mann-Whitney tests). This confirms that with age, mice show altered locomotor activity and anxiety-like behavior.

The looming stimulus triggers a robust flight response to the shelter in most of the young mice (92%) (Figure 1B). Interestingly in aged mice, we observed that 67% of them showed a predominant freezing

behavior when confronted to the looming stimulus and only a third of them escaped toward the shelter (Figure 1B : escape response in young, n=12 mice, 11/12 [92%] versus aged, n=21 mice, 7/21 [33%], $p=0.0028$, Fisher's exact test). Noticeably, the latency to escape toward the shelter was higher in aged compared to young mice (Figure 1C : escape latency in young, n=11 mice, 0.28s versus aged, n=7 mice, 6.27s, $p<0.0001$, Mann-Whitney test). A thorough analysis revealed that the speed of young mice increased immediately when the stimulus was triggered and the mice escaped (Figure 1D). Then, the speed dropped rapidly as the mice froze under the shelter (Figure 1D, left panel). In contrast to young mice, the speed of aged mice decreased immediately after stimulus onset. Most of them first exhibited a freezing behavior, after which two groups could be distinguished, one maintaining a freezing response with low speed (light purple, n=14) and the other escaping toward the shelter with high speed (dark purple, n=7) (Figure 1D, right panel). Overall, these data show that aged mice predominantly exhibit freezing behavior in response to innate fear triggered by visual threat, while a minority of them adopt delayed flight behavior.

Brain activity triggered in response to looming stimuli is affected with age

Mice were sacrificed 90 minutes after the looming test, in order to target peak expression of the neuronal activity marker c-Fos. Following c-Fos immunohistochemistry, the density of c-Fos-immunopositive (c-Fos⁺) cells was estimated in ten brain regions of interest (Figures 2A and 3A) and compared between home-cage, control and looming conditions for each age. Brain regions were selected according to their involvement in fear-evoked responses to a looming stimulus.

A one-way ANOVA analysis performed on each single brain structure of young mice revealed a significant condition/group effect on c-Fos⁺ cell density for the BLA and the LA (Figure 2C : $F_{(2,20)}=6.347$, $p=0.007$ and $F_{(2,20)}=4.299$, $p=0.0280$, respectively), the CA3 region and the dentate gyrus (DG) (Figure 2B : $F_{(2,20)}=9.905$, $p=0.001$ and $F_{(2,20)}=14.32$, $p=0.0001$, respectively), the LPTN (Figure 2D : $F_{(2,20)}=4.084$, $p=0.033$), as well as the dlPAG (Figure 2F : $F_{(2,20)}=13.06$, $p=0.0002$). Noticeably, we observed a significant increase of c-Fos⁺ cell density between control and looming groups in the BLA (Figure 2C). This was expected since the mice expressed a fear response to the visual stimulus and thus activated their fear brain pathways, in which the amygdala is a core structure (LeDoux, 2000).

Furthermore, a significant decrease of c-Fos labeling was observed in CA3 region (Figure 2B) and in the LPTN (Figure 2D) when comparing control and looming conditions. Also, in a relevant proportion of young mice (5/12), looming was associated with higher, but non-significantly different, c-Fos⁺ cell density in the PBGN compared to other groups (Figure 2G : $F_{(2,19)}=1.689$, $p=0.2114$). Besides, we also noticed an increase of c-Fos⁺ cell density for the control and looming groups compared to the home-cage condition in dorsal hippocampal areas (DG and CA3, Figure 2B) likely related to the contribution of these regions to spatial context encoding (Moser and Moser, 1998). Also, there was an increase in c-Fos⁺ cells in the dIPAG of the control and looming groups compared to the home-cage mice (Figure 2F). However, we did not observe any significant change of cellular activity between the three different groups in the CeA (Figure 2C : $F_{(2,20)}=2.742$, $p=0.0886$), the SC and its upper layers (uSC) (Figure 2E : $F_{(2,20)}=2.794$, $p=0.0851$ and $F_{(2,20)}=0.2557$, $p=0.7768$, respectively). Thus, the exposure to the arena and the looming stimulus led to notable changes in brain cellular activity in young mice. In particular, these changes were observed in the hippocampus, the amygdala and the dIPAG, known to be involved in innate defensive behaviors (Bang et al., 2022; Salay et al., 2018; Shang et al., 2015; Tovote et al., 2016; Wei et al., 2015; Z. Zhou et al., 2019).

Concerning aged mice, ANOVA analysis reveals significant changes in cellular activity between the three groups exclusively in BLA (Figure 3C : $F_{(2,16)}=4.047$, $p=0.0378$) and dIPAG (Figure 3F : $F_{(2,16)}=4.910$, $p=0.0217$). No significant difference in cellular activation was observed in the other eight structures when comparing the 3 conditions (DG : $F_{(2,16)}=0.0004230$, $p=0.9996$; CA3 : $F_{(2,16)}=2.247$, $p=0.1380$; CeA : $F_{(2,16)}=0.3355$, $p=0.7199$; LA : $F_{(2,16)}=2.985$, $p=0.0791$; LPTN : $F_{(2,16)}=1.681$, $p=0.2174$; SC : $F_{(2,16)}=2.991$, $p=0.0788$; uSC : $F_{(2,16)}=1.061$, $p=0.3691$; PBGN : $F_{(2,16)}=1.747$, $p=0.2060$). In contrast to young mice, exposure to the arena does not modify basal brain activity in aged mice (compared to home-cage), and the looming stimulus induces a variation (increase) in cellular activity only in rare brain regions (BLA, dIPAG). This suggests that there is an alteration of the brain activation following the looming event in aged mice. Such alterations have already been observed after recognition memory tasks in old mice, with impaired brain activity correlated to poor memory performance (Belblidia et al., 2018).

Looming stimulus recruits different brain networks depending on age

To better appreciate the neural network involved in response to looming stimuli, we investigated the functional connectivity between the 10 brain regions selected for c-Fos analysis by assessing the co-variation of c-Fos⁺ cell density for each pair of brain structures. We managed to represent the 45 correlations for each group by matrices (Figure 4A) and networks (Figure 4B). On the matrices, significant correlations are signaled by stars according to their p-values. The networks show only the significant correlations from the matrix between the structures studied. This analysis reveals that the number of positive and negative correlations is higher in the looming compared to the control condition. For young mice exposed only to the context, negative correlations are mainly observed between brain regions and in particular with CA3, which is the most activated structure in the control group.

Functional connectivity networks were observed in response to the looming stimulus. Amygdala nuclei (LA, BLA, CeA) exhibit robust functional connections with the SC and the PBGN which was expected, based on the anatomical connections between those 3 structures (Shang et al., 2015; Wei et al., 2015). Besides, the dorsal hippocampus (DG and CA3) seems to form a functional network with the LPTN, which activity is linked to that of the dlPAG. Finally, in the home-cage condition, the correlation matrices suggest a stable, low-activity steady-state characterized by broad inter-regional connectivity, mainly supported by positive correlations and with no particular sub-network emerging.

The effect of context - assessed with the control group - and of the impending stimulus on brain activity in the regions studied seems largely lost in aged mice. Indeed, only the increase in neuronal activation in BLA and dlPAG is preserved in aged mice subjected to looming (compared to aged-matched home-cage), while hippocampal and lateral amygdala activations have disappeared (Figure 3).

Correlation matrices (Figure 5A) and networks (Figure 5B) representations were generated for aged mice under each condition. In contrast to young mice, no obvious correlation pattern or clear functional connectivity emerged following looming stimuli. Only two positive correlations between the hippocampus, the LPTN and the PBGN arose. Strikingly, functional connectivity in home-cage and control groups did not differ markedly from the looming condition, suggesting that the functional brain connectivity observed in young mice following the looming stimulus is altered with age.

Discussion

This study aimed to investigate whether aging induces changes in innate defensive behavior in response to a looming stimulus and whether those behavioral responses are associated with modifications in brain structures activity. We showed that aged mice exhibit more freezing behavior instead of escape when confronted with this visual threat stimulus, while young mice present a robust flight response. Following the stimulus presentation, old mice show an increase in c-Fos⁺ cell density only in the BLA and the dlPAG, while young mice exhibit modifications of activity in the hippocampus (DG and CA3), amygdalar nuclei (BLA and LA), LPTN and dlPAG. Additionally, functional brain connectivity is altered in aged mice in response to a looming stimulus.

In this study, we chose to individually-house the mice to induce a robust flight response to the looming stimulus (Lenzi et al., 2022). This behavior was indeed observed in young mice but not in aged mice. Social isolation involves an increase of vigilance (Williams et al., 2009) and reactivity (Siegfried et al., 1981; Zelikowsky et al., 2018) which could contribute to explain the escape response in young mice. However, it is also known that social isolation leads to anxiety (Ieraci et al., 2016) and that aging is accompanied by altered anxiety and depressive-like behaviors (Li et al., 2020). In line with these data, we observed that aged mice spent less time in the virtual central zone of the arena compared to the young mice (Figure S1C). Thus, we can hypothesize that aged mice are even more anxious than young ones, due to the isolation, which could impact their fear response to the stimulus. Indeed, another aversive event like an electrical foot-shock in a fear conditioning paradigm induces, similarly to the looming stimulus, a higher freezing response immediately after electrical foot-shocks for aged mice compared to the young (Figure S2B : Two-way ANOVA, age effect, $F_{(1,24)}=16.99$, $p=0.0004$; time effect, $F_{(2,156,51.74)}=17.89$, $p<0.0001$; interaction age x time effect, $F_{(4,96)}=14.60$, $p<0.0001$; Šídák's post-hoc tests, after shock 1, aged vs young, $p=0.0212$; after shock 2, aged vs young, $p<0.0001$). The hypothesis of the freezing response exacerbation due to an increase of anxiety in aged mice could be tested using anxiolytic or antidepressant substances which are known to decrease freezing following a fear conditioning (Conti et al., 1990; Inoue et al., 2011).

Another aspect to be considered is that aging leads to a decline of visual acuity and contrast sensibility in C57Bl/6 mice (Lehmann et al., 2012). Even though we can exclude a complete loss of vision in the

aged mice - since all of them somehow react to the looming stimulus (i.e. froze and/or escaped) - we must keep in mind that they could perceive the stimulus in a different way than young mice. Actually, it was reported that a less contrasted looming stimulus decreases the escape probability in mice as the stimulus becomes less salient (Evans et al., 2018). Thus, an altered perception of the looming stimulus with a decreased contrast sensitivity in aged mice, may explain the change of defensive behavioral response.

The effect of age on the response to a looming stimulus has been little studied. Liu and collaborators explored the looming-evoked response across the mouse lifespan and observed no behavioral difference for 20 month-old mice (Liu et al., 2022). The difference between their study and ours may reside in the use of different looming setups but also in the transient social isolation, since they use group-housed mice.

We observed notable increases of c-Fos⁺ cell density in brain structures of young mice submitted to the looming stimulus. These changes in brain cellular activation have led to the emergence of a pattern of functional connectivity between brain regions implicated in innate fear responses. Interestingly, aged mice do not present a functional connectivity signature associated with the looming. This result is consistent with a previous study showing a decrease in brain functional connectivity in aged rats associated with cognitive deficits (Ash et al., 2016). Furthermore, it has been shown that c-Fos expression decreases in the brain of aged rats (Lee et al., 1998) and that aging is coupled with excitation/inhibition imbalance (Wong et al., 2006) which could explain the loss of functional connectivity network and the maladaptive behavioral response of old mice. Also, we observed an increase of cell activity in PBGN and a decrease in LPTN in young mice. This co-occurrence could be correlated with the observed defensive behavior triggered by the stimulus. Indeed, activation of the SC-PBGN pathway leads to an escape response while activation of the SC-LPTN induces freezing (Shang et al., 2018). In this way, the observed escape response triggered by the looming stimulus could reflect the dominant activation of the PBGN and the inactivation of the LPTN. However, in aged mice, the stimulus fails to trigger the c-Fos⁺ cell activation pattern seen in young mice in the PBGN and the LPTN. Thus, we may hypothesize that old mice exhibit an imbalance between the two brain pathways described above, leading to a maladaptive fear reaction to the looming stimulus. Besides, we also identified an

increase of c-Fos⁺ labeling in the dIPAG of the young looming group, which is consistent with the implication of this region in the escape behavior (Tovote et al., 2016). The dIPAG activation was also present in aged mice. However, when we compare between ages, the node size in the network representation, this increase is less pronounced in old mice, which could be related to their absence of flight response. In addition, we showed an activation of the BLA in both control and looming groups of aged mice. This could be due to the heightened anxiety of aged mice, as well as the exposure to the arena that suractivate the cellular activity of the BLA, since the exposure to a stress or to an open-field increases c-Fos expression in this amygdalar nucleus (Hale et al., 2006; Kovács et al., 2018). Finally, we observed increases of c-Fos labeling in the DG and the CA3 of the dorsal hippocampus when young mice are exposed to the looming setup. As expected, these changes are not found in aged brains, in line with known age-related alterations of hippocampal functions (Rosenzweig and Barnes, 2003).

In conclusion, our study reveals that aging affects the innate fear response to a threatening visual stimulus and recruits an altered functional brain network. Further investigations will identify the deeper brain mechanisms underlying defensive behavior to a looming stimulus in mice at different ages.

References

- Ash, J.A., Lu, H., Taxier, L.R., Long, J.M., Yang, Y., Stein, E.A., Rapp, P.R., 2016. Functional connectivity with the retrosplenial cortex predicts cognitive aging in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 12286–12291. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525309113>
- Bang, J.Y., Sunstrum, J.K., Garand, D., Parfitt, G.M., Woodin, M., Inoue, W., Kim, J., 2022. Hippocampal-hypothalamic circuit controls context-dependent innate defensive responses. *eLife* 11, e74736. <https://doi.org/10.7554/eLife.74736>
- Belblidia, H., Leger, M., Abdelmalek, A., Quiedeville, A., Calocer, F., Boulouard, M., Jozet-Alves, C., Freret, T., Schumann-Bard, P., 2018. Characterizing age-related decline of recognition memory and brain activation profile in mice. *Experimental Gerontology* 106, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.03.006>
- Bhattacharyya, K., McLean, D.L., MacIver, M.A., 2017. Visual Threat Assessment and Reticulospinal Encoding of Calibrated Responses in Larval Zebrafish. *Current Biology* 27, 2751–2762.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.012>
- Conti, L.H., Maciver, C.R., Ferkany, J.W., Abreu, M.E., 1990. Footshock-induced freezing behavior in rats as a model for assessing anxiolytics. *Psychopharmacology* 102, 492–497. <https://doi.org/10.1007/BF02247130>
- De Haas, E.N., Kops, M.S., Bolhuis, J.E., Groothuis, T.G.G., Ellen, E.D., Rodenburg, T.B., 2012. The relation between fearfulness in young and stress-response in adult laying hens, on individual and group level. *Physiology & Behavior* 107, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.08.002>
- De Franceschi, G., Vivattanasarn, T., Saleem, A.B., Solomon, S.G., 2016. *Vision Guides*

Selection of Freeze or Flight Defense Strategies in Mice. *Current Biology* 26, 2150–2154. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.006>

Díaz, F., Moreno, P., Villena, A., Vidal, L., Pérez De Vargas, I., 2003. Effects of aging on neurons and glial cells from the superficial layers of the superior colliculus in rats. *Microscopy Res & Technique* 62, 431–438. <https://doi.org/10.1002/jemt.10404>

Dill, L.M., Houtman, R., 1989. The influence of distance to refuge on flight initiation distance in the gray squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Can. J. Zool.* 67, 233–235. <https://doi.org/10.1139/z89-033>

Domenici, P., 2010. Context-dependent variability in the components of fish escape response: integrating locomotor performance and behavior. *J. Exp. Zool.* 313A, 59–79. <https://doi.org/10.1002/jez.580>

Evans, D.A., Stempel, A.V., Vale, R., Ruehle, S., Lefler, Y., Branco, T., 2018. A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions. *Nature* 558, 590–594. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0244-6>

Gould, T., Feiro, O., 2005. Age-related deficits in the retention of memories for cued fear conditioning are reversed by galantamine treatment. *Behavioural Brain Research* 165, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.040>

Hale, M.W., Bouwknecht, J.A., Spiga, F., Shekhar, A., Lowry, C.A., 2006. Exposure to high- and low-light conditions in an open-field test of anxiety increases c-Fos expression in specific subdivisions of the rat basolateral amygdaloid complex. *Brain Research Bulletin* 71, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.09.001>

Hennig, C.W., Dunlap, W.P., Gallup, G.G., 1976. The Effect of Distance Between Predator and Prey and the Opportunity to Escape on Tonic Immobility in *Anolis Carolinensis*. *Psychol Rec* 26, 312–320. <https://doi.org/10.1007/BF03394393>

Huang, L., Yuan, T., Tan, M., Xi, Y., Hu, Y., Tao, Q., Zhao, Z., Zheng, J., Han, Y., Xu, F., Luo, M., Sollars, P.J., Pu, M., Pickard, G.E., So, K.-F., Ren, C., 2017. A retinoreciprocal projection regulates serotonergic activity and looming-evoked defensive behaviour. *Nat Commun* 8, 14908. <https://doi.org/10.1038/ncomms14908>

Ieraci, A., Mallei, A., Popoli, M., 2016. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. *Neural Plasticity* 2016, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/6212983>

Inoue, T., Kitaichi, Y., Koyama, T., 2011. SSRIs and conditioned fear. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35, 1810–1819. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.09.002>

Jaworska-Adamu, J., Krawczyk, A., Rycerz, K., Krawczyk-Marć, I., 2014. Age-related astrocytic changes in the periaqueductal gray matter (PAG) in rats. *Med. Weter.*

Kovács, L.Á., Schiessl, J.A., Nafz, A.E., Csernus, V., Gaszner, B., 2018. Both Basal and Acute Restraint Stress-Induced c-Fos Expression Is Influenced by Age in the Extended Amygdala and Brainstem Stress Centers in Male Rats. *Front. Aging Neurosci.* 10, 248. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00248>

Krout, K.E., Loewy, A.D., Westby, G.W.M., Redgrave, P., 2001. Superior colliculus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.* 431, 198–216. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010305\)431:2<198::AID-CNE1065>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010305)431:2<198::AID-CNE1065>3.0.CO;2-8)

LeDoux, J.E., 2000. Emotion Circuits in the Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>

Lee, Y.I., Park, K.H., Baik, S.H., Cha, C.I., 1998. Attenuation of c-Fos basal expression in the cerebral cortex of aged rat: *NeuroReport* 9, 2733–2736. <https://doi.org/10.1097/00001756-199808240-00009>

Lehmann, K., Schmidt, K.-F., Löwel, S., 2012. Vision and visual plasticity in ageing mice. *Restorative Neurology and Neuroscience* 30, 161–178. [249](https://doi.org/10.3233/RNN-2012-</p></div><div data-bbox=)

- Lenzi, S.C., Cossell, L., Grainger, B., Olesen, S.F., Branco, T., Margrie, T.W., 2022. Threat history controls flexible escape behavior in mice. *Current Biology* 32, 2972-2979.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.05.022>
- Li, Lei, Feng, X., Zhou, Z., Zhang, H., Shi, Q., Lei, Z., Shen, P., Yang, Q., Zhao, B., Chen, S., Li, Lin, Zhang, Y., Wen, P., Lu, Z., Li, X., Xu, F., Wang, L., 2018. Stress Accelerates Defensive Responses to Looming in Mice and Involves a Locus Coeruleus-Superior Colliculus Projection. *Current Biology* 28, 859-871.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.005>
- Li, M., Su, S., Cai, W., Cao, J., Miao, X., Zang, W., Gao, S., Xu, Y., Yang, J., Tao, Y.-X., Ai, Y., 2020. Differentially Expressed Genes in the Brain of Aging Mice With Cognitive Alteration and Depression- and Anxiety-Like Behaviors. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 814. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00814>
- Liden, W.H., Phillips, M.L., Herberholz, J., 2010. Neural control of behavioural choice in juvenile crayfish. *Proc. R. Soc. B.* 277, 3493–3500. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1000>
- Liu, X., Feng, X., Huang, H., Huang, K., Xu, Y., Ye, S., Tseng, Y.-T., Wei, P., Wang, L., Wang, F., 2022. Male and female mice display consistent lifelong ability to address potential life-threatening cues using different post-threat coping strategies. *BMC Biol* 20, 281. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01486-x>
- Mattson, M.P., Arumugam, T.V., 2018. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metabolism* 27, 1176–1199. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>
- Moser, M.-B., Moser, E.I., 1998. Distributed Encoding and Retrieval of Spatial Memory in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 7535–7542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-18-07535.1998>
- Moyer, J.R., Brown, T.H., 2006. Impaired trace and contextual fear conditioning in aged rats. *Behavioral Neuroscience* 120, 612–624. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.3.612>
- Papini, M.R., Penagos-Corzo, J.C., Pérez-Acosta, A.M., 2019. Avian Emotions: Comparative Perspectives on Fear and Frustration. *Front. Psychol.* 9, 2707. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.02707>
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. ed. Academic Press, San Diego.
- Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A., 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology* 69, 143–179. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00126-0)
- Sagliano, L., Cappuccio, A., Trojano, L., Conson, M., 2014. Approaching threats elicit a freeze-like response in humans. *Neuroscience Letters* 561, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.038>
- Salay, L.D., Ishiko, N., Huberman, A.D., 2018. A midline thalamic circuit determines reactions to visual threat. *Nature* 557, 183–189. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0078-2>
- Shang, C., Chen, Z., Liu, A., Li, Y., Zhang, J., Qu, B., Yan, F., Zhang, Y., Liu, W., Liu, Z., Guo, X., Li, D., Wang, Y., Cao, P., 2018. Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice. *Nat Commun* 9, 1232. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03580-7>
- Shang, C., Liu, Z., Chen, Z., Shi, Y., Wang, Q., Liu, S., Li, D., Cao, P., 2015. A parvalbumin-positive excitatory visual pathway to trigger fear responses in mice. *Science* 348, 1472–1477. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8694>
- Shoji, H., Miyakawa, T., 2019. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57 BL /6J strain maintained under a genetic stability program. *Neuropsychopharm Rep* 39, 100–118. <https://doi.org/10.1002/npr2.12052>
- Siegfried, B., Alleva, E., Oliverio, A., Puglisiallegra, S., 1981. Effects of isolation on activity,

reactivity, excitability and aggressive behavior in two inbred strains of mice. *Behavioural Brain Research* 2, 211–218. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(81\)90056-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(81)90056-5)

Silva, B.A., Gross, C.T., Gräff, J., 2016. The neural circuits of innate fear: detection, integration, action, and memorization. *Learn. Mem.* 23, 544–555. <https://doi.org/10.1101/lm.042812.116>

Temizer, I., Donovan, J.C., Baier, H., Semmelhack, J.L., 2015. A Visual Pathway for Looming-Evoked Escape in Larval Zebrafish. *Current Biology* 25, 1823–1834. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.002>

Terburg, D., Scheggia, D., Triana Del Rio, R., Klumpers, F., Ciobanu, A.C., Morgan, B., Montoya, E.R., Bos, P.A., Giobellina, G., Van Den Burg, E.H., De Gelder, B., Stein, D.J., Stoop, R., Van Honk, J., 2018. The Basolateral Amygdala Is Essential for Rapid Escape: A Human and Rodent Study. *Cell* 175, 723–735.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.028>

Tovote, P., Esposito, M.S., Botta, P., Chaudun, F., Fadok, J.P., Markovic, M., Wolff, S.B.E., Ramakrishnan, C., Fenno, L., Deisseroth, K., Herry, C., Arber, S., Lüthi, A., 2016. Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature* 534, 206–212. <https://doi.org/10.1038/nature17996>

Vale, R., Evans, D.A., Branco, T., 2017. Rapid Spatial Learning Controls Instinctive Defensive Behavior in Mice. *Current Biology* 27, 1342–1349. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.031>

Von Bohlen Und Halbach, O., Unsicker, K., 2002. Morphological alterations in the amygdala and hippocampus of mice during ageing. *Eur J of Neuroscience* 16, 2434–2440. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02405.x>

Von Reyn, C.R., Nern, A., Williamson, W.R., Breads, P., Wu, M., Namiki, S., Card, G.M., 2017. Feature Integration Drives Probabilistic Behavior in the *Drosophila* Escape Response. *Neuron* 94, 1190–1204.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.036>

Wei, P., Liu, N., Zhang, Z., Liu, X., Tang, Y., He, X., Wu, B., Zhou, Z., Liu, Y., Li, J., Zhang, Y., Zhou, X., Xu, L., Chen, L., Bi, G., Hu, X., Xu, F., Wang, L., 2015. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. *Nat Commun* 6, 6756. <https://doi.org/10.1038/ncomms7756>

Williams, J.B., Pang, D., Delgado, B., Kocherginsky, M., Tretiakova, M., Krausz, T., Pan, D., He, J., McClintock, M.K., Conzen, S.D., 2009. A Model of Gene-Environment Interaction Reveals Altered Mammary Gland Gene Expression and Increased Tumor Growth following Social Isolation. *Cancer Prevention Research* 2, 850–861. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0238>

Wong, T.P., Marchese, G., Casu, M.A., Ribeiro-da-Silva, A., Cuello, A.C., De Koninck, Y., 2006. Imbalance towards inhibition as a substrate of aging-associated cognitive impairment. *Neuroscience Letters* 397, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.055>

Yilmaz, M., Meister, M., 2013. Rapid Innate Defensive Responses of Mice to Looming Visual Stimuli. *Current Biology* 23, 2011–2015. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.015>

Zacarias, R., Namiki, S., Card, G.M., Vasconcelos, M.L., Moita, M.A., 2018. Speed dependent descending control of freezing behavior in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun* 9, 3697. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05875-1>

Zelikowsky, M., Hui, M., Karigo, T., Choe, A., Yang, B., Blanco, M.R., Beadle, K., Gradinaru, V., Deverman, B.E., Anderson, D.J., 2018. The Neuropeptide Tac2 Controls a Distributed Brain State Induced by Chronic Social Isolation Stress. *Cell* 173, 1265–1279.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.037>

Zhou, Z., Liu, X., Chen, S., Zhang, Z., Liu, Y., Montardy, Q., Tang, Y., Wei, P., Liu, N., Li, L., Song, R., Lai, J., He, X., Chen, C., Bi, G., Feng, G., Xu, F., Wang, L., 2019. A VTA GABAergic Neural Circuit Mediates Visually Evoked Innate Defensive Responses. *Neuron* 103, 473–488.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.027>

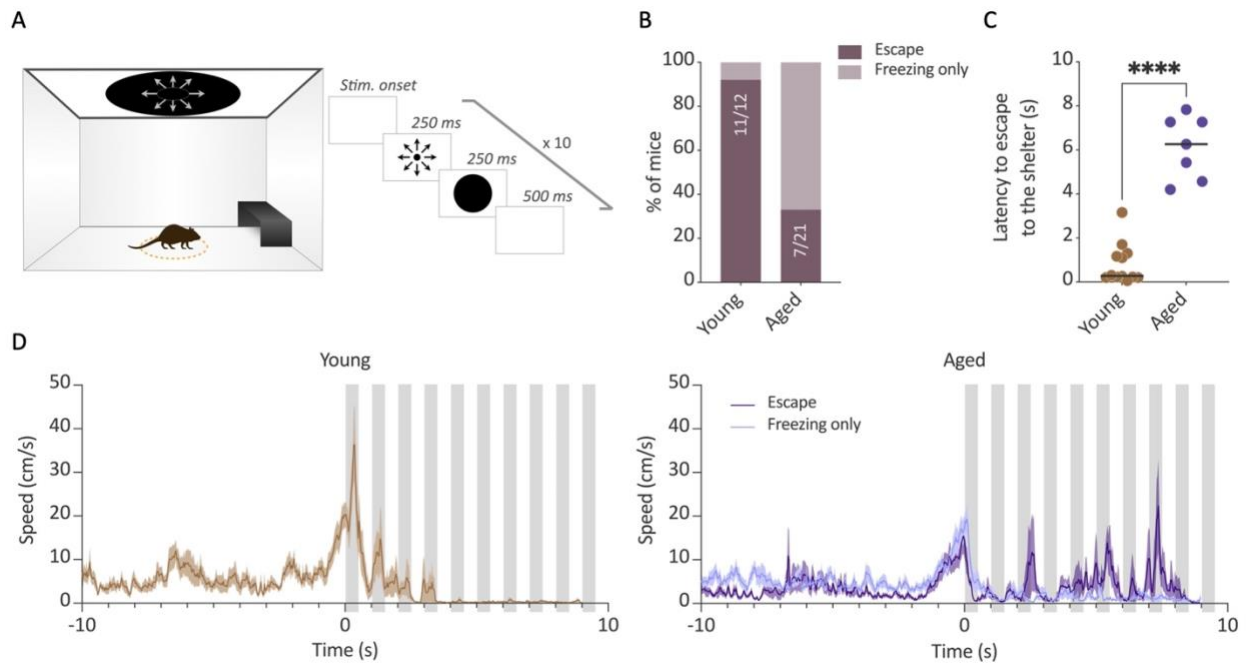


Figure 1. Aged mice do not show robust escape behavior in response to looming stimuli

(A) Representation of the behavioral apparatus generating looming stimulus (left). The stimulus is presented when the mouse enters a virtual central zone (orange dotted circle) according to the indicated timing (right). (B) Percentage of young (3-4 months) and aged (23-25 months) mice showing escape behavior during looming stimuli. (C) Latency to escape to the shelter after stimulus onset for young (n=11) and aged (n=7) mice. Data are represented by the median, **** p<0.0001 (each dot represents an animal). (D) Speed of young (left panel, n=12) and aged (right panel, total n=21) mice for 10 seconds before (-10 to 0 s) and during (0 to 10 s) the stimulus. The performance of aged mice is displayed in 2 groups : animals showing only a freezing response (no escape behavior) (light purple, n=14) and those showing both escape and freezing behavior (dark purple, n=7). Each gray bar represents a looming stimulus, as shown in A. Data are represented as mean \pm SEM.

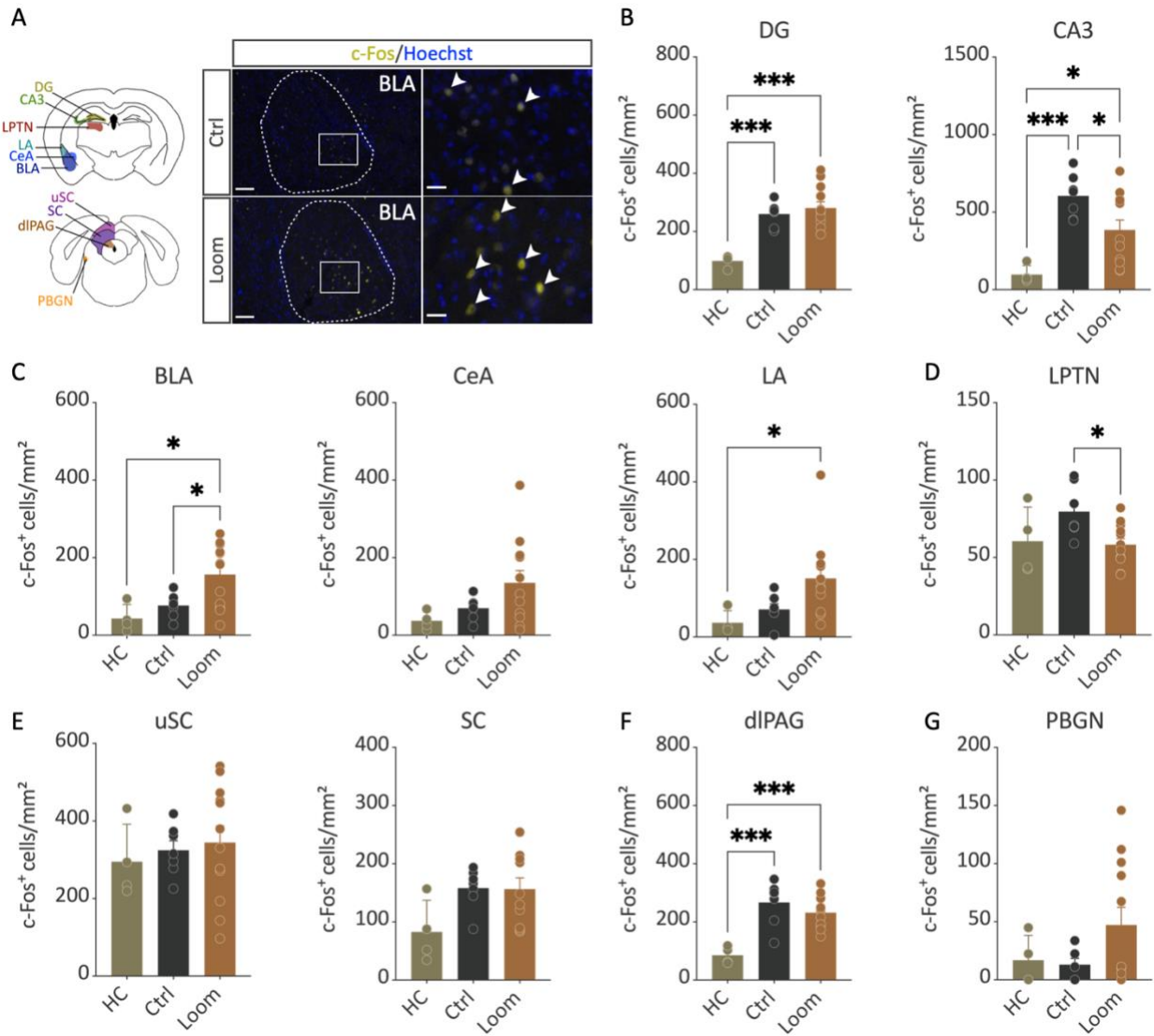


Figure 2. C-Fos expression in various brain regions in response to looming stimuli in young mice (A) (left) Schematic representation of brain structures selected for c-Fos immunohistochemistry analysis [Bregma -1,82 (*top*) and -4,16 mm (*bottom*)]. (Right) Photomicrographs of brain sections following c-Fos immunohistochemistry and counterstaining with Hoechst. Arrows indicate the presence of c-Fos immunolabeled (c-Fos⁺) cells in the BLA of control (Ctrl) and looming (Loom) animals (scale bars = 100 μ m/25 μ m). Density analysis of c-Fos⁺ cells in (B) the dentate gyrus (DG) and the CA3 region of the dorsal hippocampus, (C) the basolateral (BLA), central (CeA) and lateral (LA) amygdala, (D) the lateral posterior thalamic nucleus (LPTN), (E) the superior colliculus (SC) and its upper layers (uSC), (F) the dorsolateral periaqueductal gray (dIPAG) and (G) the parabigeminal nucleus (PBGN) of “Home-Cage” (HC, n=4), “Control” (Ctrl, n=7) and “Looming” (Loom, n=12) animals. Data are represented as mean \pm SEM ; *p<0.05, ***p<0.001 by Tuckey post-hoc tests.

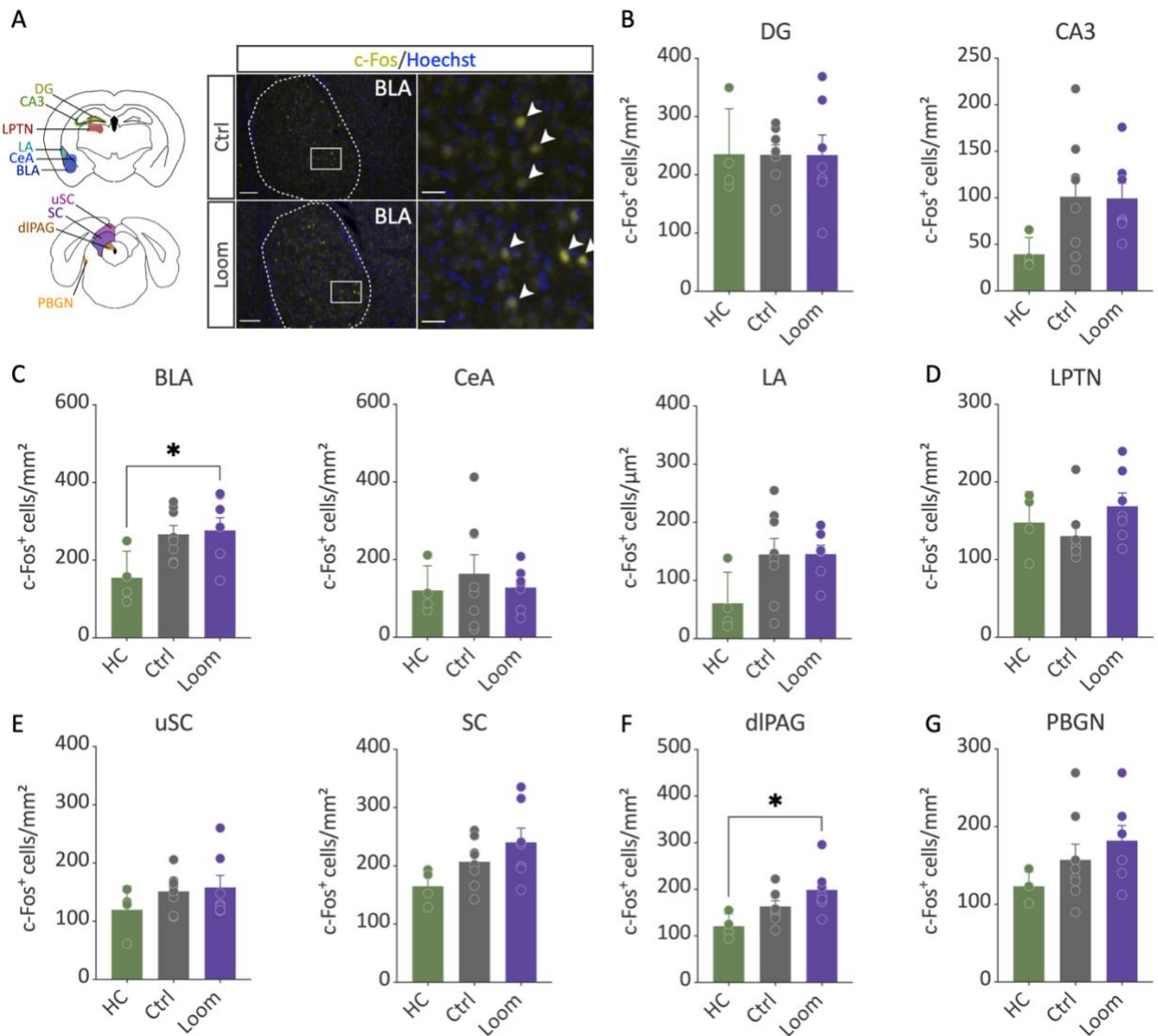


Figure 3. Looming stimuli do not trigger noticeable changes in brain activity of aged mice (A) (left) Schematic representation of brain structures analyzed for c-Fos immunostaining [Bregma - 1,82 (*top*) and -4,16 mm (*bottom*)]. (right) Photomicrographs of c-Fos immunolabeled cells (arrows) in the BLA of Control and Looming mice (scale bar = 100 μ m/25 μ m). Density analysis of c-Fos⁺ cells in (B) the dentate gyrus (*DG*) and the CA3 region of the dorsal hippocampus, (C) the basolateral (*BLA*), central (*CeA*) and lateral (*LA*) amygdala, (D) the lateral posterior thalamic nucleus (*LPTN*), (E) the superior colliculus (*SC*) and its upper layers (*uSC*), (F) the dorsolateral periaqueductal gray (*dlPAG*) and (G) the parabigeminal nucleus (*PBGN*) of “Home-Cage” (HC, n=4), “Control” (Ctrl, n=8) and “Looming” (Loom, n=7) mice. Data are shown as mean \pm SEM ; * p <0.05 by Tuckey post-hoc tests.

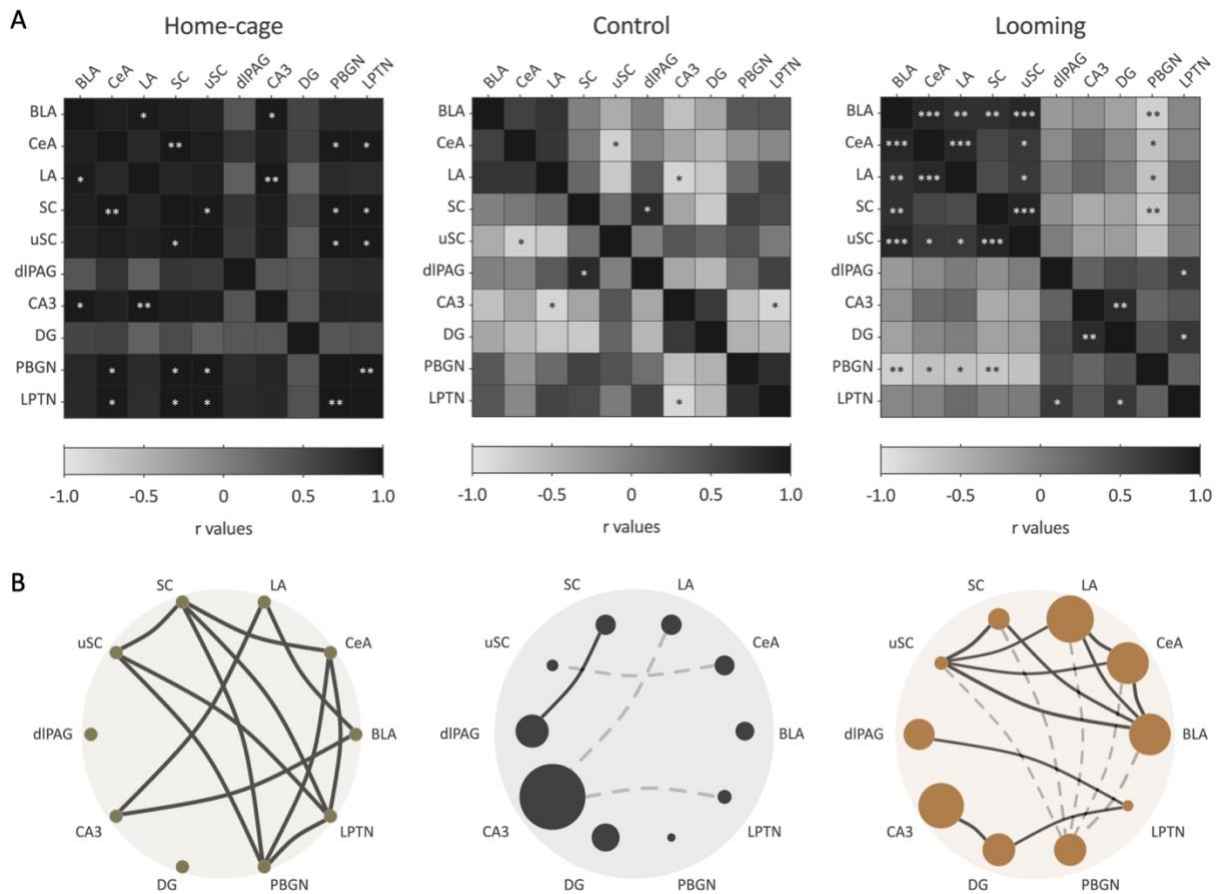


Figure 4. Correlation matrix and functional brain connectivity networks recruited by looming stimuli in young mice

(A) Correlational analysis of c-Fos expression between brain regions of young animals in «Home-Cage», «Control» and «Looming» groups. The color of each box depicts Pearson's correlation coefficient (r values range from -1 to 1) according to the brain regions being compared. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) The network representations for each correlation matrix show only significant positive (solid black lines) or negative (dashed gray lines) correlations. Each brain structure is plotted as a circle with a size representing the fold change in c-Fos⁺ cell density between experimental (Control and Looming) and Home-Cage conditions. Thickness of the link represents the r value of the correlation. *LA* (lateral amygdala), *CeA* (central amygdala), *BLA* (basolateral amygdala), *LPTN* (lateral posterior thalamic nucleus), *PBGN* (parabigeminal nucleus), *DG* (dentate gyrus of the dorsal hippocampus), *CA3* (CA3 region of the dorsal hippocampus), *dlPAG* (dorsolateral periaqueductal gray), *uSC* (upper layers of superior colliculus), *SC* (superior colliculus).

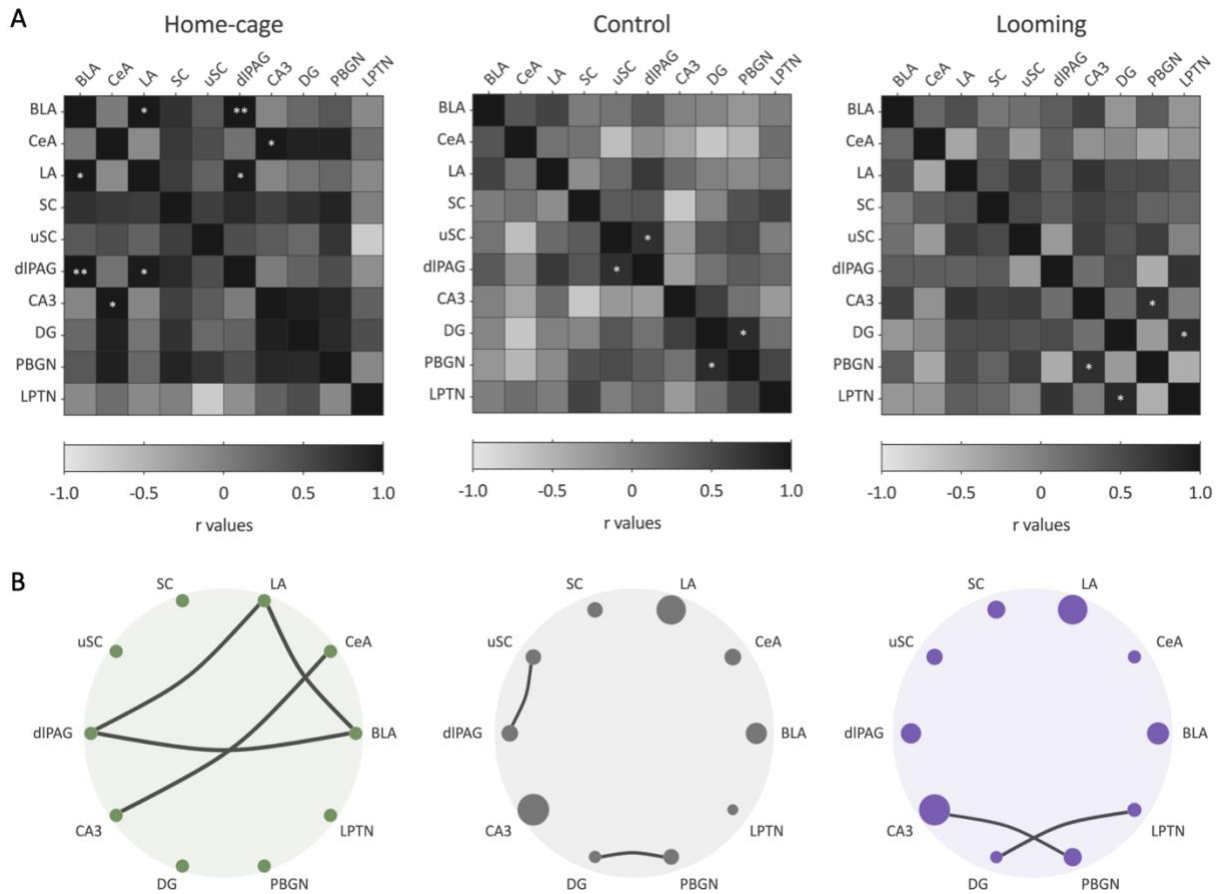


Figure 5. Correlation matrix and functional brain connectivity networks recruited by looming stimuli in aged mice

(A) Correlational analysis of c-Fos expression between brain regions of aged mice in «Home-Cage», «Control» and «Looming» groups. The color of each box depicts the Pearson correlation coefficient (ranging from -1 to 1) according to the brain regions being compared. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) The network representations for each correlation matrix only show significant positive correlations. Each brain structure is plotted as a circle with a size representing the fold change in c-Fos⁺ cell density between experimental (control and looming) and home-cage conditions. The line thickness represents the r correlation value. LA (lateral amygdala), CeA (central amygdala), BLA (basolateral amygdala), LPTN (lateral posterior thalamic nucleus), PBGN (parabigeminal nucleus), DG (dentate gyrus of the dorsal hippocampus), CA3 (CA3 region of the dorsal hippocampus), dlPAG (dorsolateral periaqueductal gray), uSC (upper layers of superior colliculus), SC (superior colliculus).

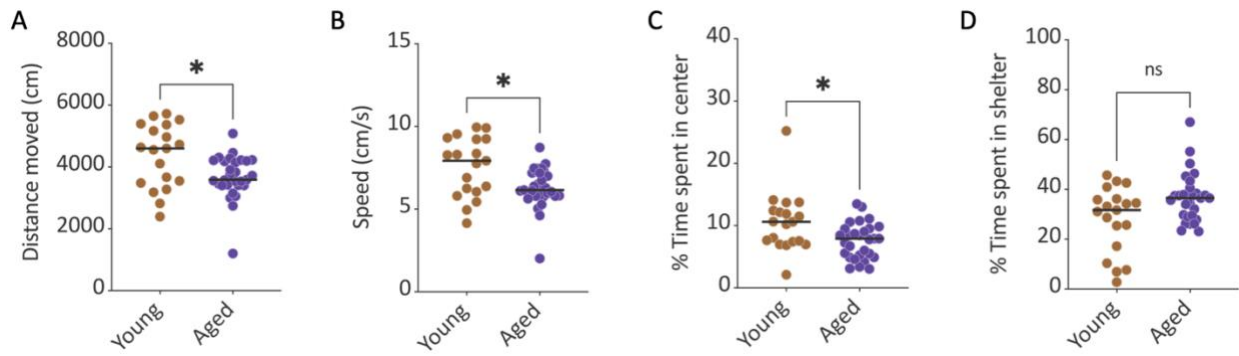


Figure S1. Locomotion and anxiety-related behaviors during habituation session

During the habituation session, aged mice (n=29) compared to young mice (n=19), showed a significantly reduced distance traveled (A), a reduced mean speed (B), a lower percentage of time spent in the central zone of the setup (Figure 1A) (C) but a similar percentage of time in the shelter (D). Data are represented by the median, *p<0.05.

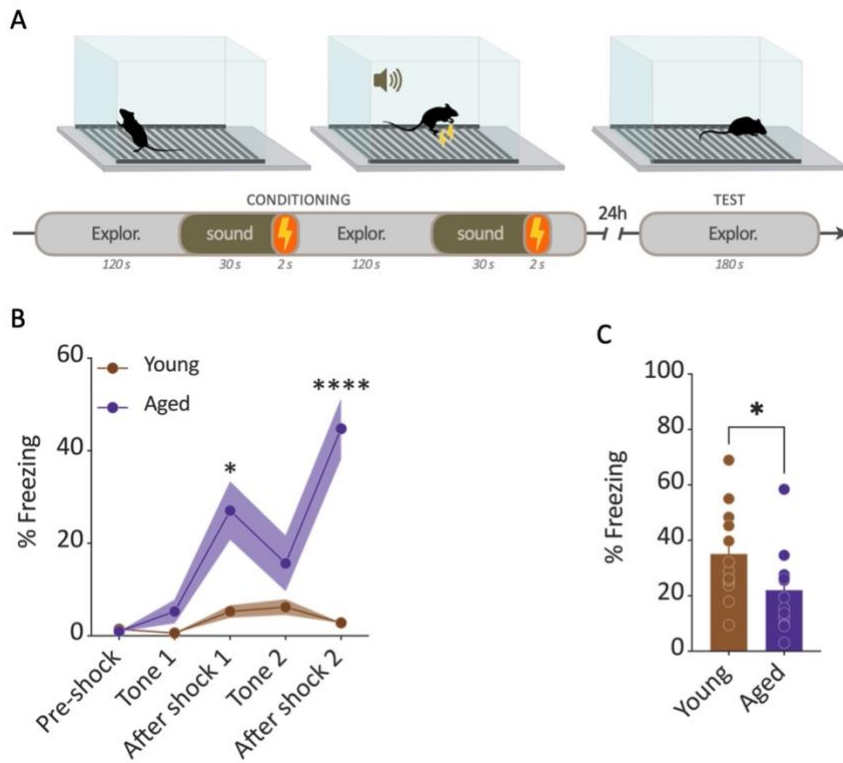


Figure S2. Contextual fear conditioning

Young (n=12) and aged (n=14) mice that were not used for c-Fos immunohistochemistry after the looming test, were subjected to contextual fear conditioning. **(A)** On the first day, each mouse freely explored the conditioning context for 2 minutes followed by 30 seconds of a tone (7kHz, 70dB) before receiving a 2-second electric foot-shock (0.7 mA). This sequence was repeated a second time, ending with 30 seconds of exploration. **(B)** Freezing behavior was measured for each mouse using the POLY software (Imetronic, France). Data indicate that aged mice present an increased freezing behavior after the electrical foot-shocks compared to young mice (Two-way ANOVA followed by Šídák's multiple comparisons test, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$). **(C)** The following day, the mice were tested in the conditioning context for 3 minutes (without any sound or electric foot-shock) and the freezing behavior was measured (POLY software, Imetronic, France). As expected, data indicate that aged mice have impaired long-term contextual memory (Mann-Whitney test, * $p < 0.05$). Data are represented by the mean \pm SEM.

ANNEXE 2 – TABLEAUX DES ANALYSES STATISTIQUES

FIG.	CONDITIONS	MOY/MED	SD/SEM	N	ANALYSES	FACTEURS	DÉTAILS	P-VALUES
18B	siRNA Ctrl 24h	1,012013954	0,185/0,093	4	Two-way ANOVA	Temps x traitement	F (5, 35) = 6,058	0,0004
	siRNA Ctrl 48h	1,002623045	0,087/0,05	3		Temps	F (5, 35) = 6,525	0,0002
	siRNA Ctrl 96h	1,015011537	0,22/0,127	3		Traitement	F (1, 35) = 9,601	0,0038
	siRNA Ctrl 7j	1,0026568	0,09/0,052	3	Uncorrected Fisher's LSD	siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a	-	-
	siRNA Ctrl 15j	1,04642415	0,379/0,170	5		24h	-	0,0096
	siRNA Ctrl 30j	1,006098608	0,125/0,063	4		48h	-	0,0172
	siRNA Sin3a 24h	0,119033169	0,096/0,048	4		96h	-	0,0153
	siRNA Sin3a 48h	0,122045038	0,091/0,045	4		7j	-	0,0324
	siRNA Sin3a 96h	0,056089689	0,016/0,009	3		15j	-	0,0033
	siRNA Sin3a 7j	0,218809225	0,086/0,043	4		30j	-	0,8043
	siRNA Sin3a15j	1,927650288	1,137/0,464	6		-	-	-
	siRNA Sin3a 30j	1,087443449	0,108/0,054	4		-	-	-
18C	siRNA Ctrl 24h	1	0,119/0,084	2	-	-	-	-
	siRNA Ctrl 96h	1	0,105/0,074	2		-	-	-
	siRNA Ctrl 7j	1	0,229/0,162	2		-	-	-
	siRNA Sin3a 24h	1,151	0,245/0,173	2		-	-	-
	siRNA Sin3a 96h	0,785	0,232/0,164	2		-	-	-
	siRNA Sin3a 7j	0,853	0,074/0,052	2		-	-	-
19B	siRNA Ctrl	31,67	4,557/2,631	3	Shapiro-Wilk test	siRNA Ctrl	-	0,7073
	siRNA Sin3a	22,82	7,17/2,927	6	siRNA Sin3a	-	0,3088	
					Unpaired t test	siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a	t=1,916, df=7	0,0969
19C	siRNA Ctrl pré-choc	1,333	1,764/1,018	3	Two-way RM ANOVA	Temps x traitement	F (1, 7) = 0,03574	0,8554
	siRNA Sin3a pré-choc	4,556	4,204/1,716	6		Temps	F (1, 7) = 30,49	0,0009
	siRNA Ctrl 24h contexte	36,85	17,27/9,971	3		Traitement	F (1, 7) = 0,2892	0,6074
	siRNA Sin3a 24h contexte	42,59	22,34/9,12	6	Uncorrected Fisher's LSD	pré-choc vs 24h contexte	-	-
					siRNA Ctrl	-	0,0138	
					siRNA Sin3a	-	0,0017	
19D	siRNA Ctrl pré-son	21,94	1,273/0,735	3	Two-way RM ANOVA	Temps x traitement	F (1, 7) = 0,1183	0,741
	siRNA Sin3a pré-son	27,5	12,73/5,195	6		Temps	F (1, 7) = 8,883	0,0205
	siRNA Ctrl son	38,06	12,2/7,044	3		Traitement	F (1, 7) = 0,5258	0,4919
	siRNA Sin3a son	40,28	8,394/3,427	6	Uncorrected Fisher's LSD	pré-son vs son	-	-
						siRNA Ctrl	-	0,0812
					siRNA Sin3a	-	0,0564	
20B	siRNA Ctrl 24h	1,069129526	0,475/0,274	3	Two-way ANOVA	Temps x traitement	F (5, 34) = 1,069	0,3946
	siRNA Ctrl 48h	1,038423794	0,319/0,143	5		Temps	F (5, 34) = 1,221	0,3208
	siRNA Ctrl 96h	1,030649332	0,299/0,173	3		Traitement	F (1, 34) = 0,04342	0,8362
	siRNA Ctrl 7j	1,018715273	0,227/0,131	3	-	-	-	-
	siRNA Ctrl 15j	1,053150674	0,359/0,18	4		-	-	-
	siRNA Ctrl 30j	1,013234014	0,194/0,112	3		-	-	-
	siRNA Sin3a 24h	1,783387799	1,6/1,131	2		-	-	-
	siRNA Sin3a 48h	0,844812541	0,541/0,242	5		-	-	-
	siRNA Sin3a 96h	0,540581337	0,558/0,322	3		-	-	-
	siRNA Sin3a 7j	1,0128545	0,435/0,217	4		-	-	-
	siRNA Sin3a15j	0,974426361	0,046/0,021	5		-	-	-
siRNA Sin3a 30j	0,895900852	0,182/0,074	6	-	-	-		
20C	siRNA Ctrl 24h	1	0,292/0,168	3	Two-way ANOVA	Temps x traitement	F (5, 35) = 1,206	0,3268
	siRNA Ctrl 48h	1	0,128/0,057	5		Temps	F (5, 35) = 1,208	0,326
	siRNA Ctrl 96h	1	0,172/0,099	3		Traitement	F (1, 35) = 0,3745	0,5445
	siRNA Ctrl 7j	1	0,192/0,111	3	-	-	-	-
	siRNA Ctrl 15j	1	0,168/0,084	4		-	-	-
	siRNA Ctrl 30j	1	0,184/0,106	3		-	-	-
	siRNA Sin3a 24h	1,437333333	0,596/0,344	3		-	-	-
	siRNA Sin3a 48h	1,0382	0,225/0,101	5		-	-	-
	siRNA Sin3a 96h	0,986333333	0,278/0,16	3		-	-	-
	siRNA Sin3a 7j	1,002	0,233/0,116	4		-	-	-
	siRNA Sin3a15j	0,9398	0,123/0,055	5		-	-	-
	siRNA Sin3a 30j	0,8555	0,151/0,062	6		-	-	-
	21B	siRNA Ctrl	1,027511372	0,277/0,16		3	Shapiro-Wilk test	siRNA Ctrl
siRNA Sin3a		0,956057765	0,334/0,167	4	siRNA Sin3a	effectif trop faible	-	

	siRNA Ctrl	1,114942625			Mann Whitney test	siRNA Ctrl vs siRNA Sin3a	-	0,4286
	siRNA Sin3a	1,040225909					-	
22B	shRNA Scrambled	1,007	0,135/0,067	4	Shapiro-Wilk test	shRNA Scrambled	-	0,0626
	shRNA Sin3a 2 sem	0,8606	0,104/0,046	5		shRNA Sin3a 2 sem	-	0,815
	shRNA Sin3a 3 sem	1,074	0,132/0,066	4		shRNA Sin3a 3 sem	-	0,3739
	shRNA Sin3a 4 sem	1,06	0,324/0,145	5		shRNA Sin3a 4 sem	-	0,8901
					One-way ANOVA	Temps	F (3, 14) = 1,121	0,3741
23	shRNA Scr	0,9143	0,114/0,047	6	Shapiro-Wilk test	shRNA Scr	-	0,4815
	shRNA Sin3a 1	0,5695	0,064/0,026	6		shRNA Sin3a 1	-	0,9725
	shRNA Sin3a 2	0,5134	0,054/0,022	6		shRNA Sin3a 2	-	0,7187
	shRNA Sin3a 3	0,5125	0,058/0,024	6		shRNA Sin3a 3	-	0,6763
					One-way ANOVA	Traitement	F (3, 20) = 38,32	<0,0001
					Dunnett's multiple comparisons test	shRNA Scr vs. shRNA Sin3a 1	-	<0,0001
						shRNA Scr vs. shRNA Sin3a 2	-	<0,0001
						shRNA Scr vs. shRNA Sin3a 3	-	<0,0001
24B	shRNA Scr	1,015	0,185/0,058	10	Shapiro-Wilk test	shRNA Scr	-	0,4898
	shRNA Sin3a 1	0,7269	0,233/0,095	6		shRNA Sin3a 1	-	0,5049
	shRNA Sin3a 2	0,8181	0,348/0,156	5		shRNA Sin3a 2	-	0,1417
	shRNA Sin3a 3	0,6942	0,149/0,074	4		shRNA Sin3a 3	-	0,7542
					One-way ANOVA	Traitement	F (2, 17) = 6,003	0,0107
				Dunnett's multiple comparisons test	shRNA Scr vs. shRNA Sin3a 1	-	0,0207	
						shRNA Scr vs. shRNA Sin3a 3	-	0,0245
24C	shRNA Scr	1	0,821/0,335	6	Shapiro-Wilk test	shRNA Scr	-	0,6517
	shRNA Sin3a 1	0,8423	0,725/0,296	6		shRNA Sin3a 1	-	0,248
					Unpaired t test	shRNA Scr vs shRNA Sin3a	t=0,3527, df=10	0,7316
25B	shRNA Scr pré-choc	0,550625	0,708/0,177	16	Two-way RM ANOVA	Temps x Traitement	F (1, 30) = 3,559	0,0689
	shRNA Sin3a pré-choc	2,99875	2,79/0,698	16		Temps	F (1, 30) = 514,9	<0,0001
	shRNA Scr 24h contexte	35,69375	8,658/2,164	16	Uncorrected Fisher's LSD	Traitement	F (1, 30) = 9,837	0,0038
	shRNA Sin3a 24h contexte	44,515625	10,552/2,638	16		shRNA Scr vs shRNA Sin3a	-	-
						pré-choc	-	0,3248
						24h contexte	-	0,0007
					pré-choc vs 24h contexte	-	-	
					shRNA Scr	-	<0,0001	
					shRNA Sin3a	-	<0,0001	
25C	shRNA Scr pré-son	22,03125	9,77/2,443	16	Two-way RM ANOVA	Temps x Traitement	F (1, 30) = 1,757	0,195
	shRNA Sin3a pré-son	22,76125	10,804/2,701	16		Temps	F (1, 30) = 58,68	<0,0001
	shRNA Scr son	46,406875	12,257/3,064	16	Uncorrected Fisher's LSD	Traitement	F (1, 30) = 0,6717	0,4189
	shRNA Sin3a son	39,945625	16,256/4,064	16		pré-son vs son	-	-
					shRNA Scr	-	<0,0001	
					shRNA Sin3a	-	0,0001	
26B	shRNA Scr session 1	2054	245,7/86,86	8	Two-way RM ANOVA	Session x Traitement	F (2, 28) = 1,340	0,2781
	shRNA Scr session 2	1406	326,8/115,5	8		Session	F (1,459, 20,42) = 79,46	<0,0001
	shRNA Scr session 3	1195	240,1/84,9	8		Traitement	F (1, 14) = 0,01110	0,9176
	shRNA Sin3a session 1	2195	495,8/175,3	8	Uncorrected Fisher's LSD	session 1 vs session 2	-	-
	shRNA Sin3a session 2	1309	132,6/46,87	8		shRNA Scr	-	0,0006
	shRNA Sin3a session 3	1115	185,6/65,6	8		shRNA Sin3a	-	0,0006
						session 1 vs session 3	-	-
						shRNA Scr	-	<0,0001
						shRNA Sin3a	-	0,0004
						session 2 vs session 3	-	-
				shRNA Scr	-	0,0176		
				shRNA Sin3a	-	0,0362		
26C	shRNA Scr	60,23	24,76/8,755	8	Shapiro-Wilk test	shRNA Scr	-	0,3907
	shRNA Sin3a	50,73	16,37/5,786	8		shRNA Sin3a	-	0,7343
					Unpaired t test	shRNA Scr vs shRNA Sin3a	t=0,9052, df=14	0,3807
26D	shRNA Scr	27,88	13,01/4,599	8	Shapiro-Wilk test	shRNA Scr	-	0,4548
	shRNA Sin3a	33,66	18,93/6,694	8		shRNA Sin3a	-	0,9091
					Unpaired t test	shRNA Scr vs shRNA Sin3a	t=0,7113, df=14	0,4886
26E	shRNA Scr	51,27	5,534/1,957	8	Shapiro-Wilk test	shRNA Scr	-	0,0302

	shRNA Sin3a	55,22	3,357/1,187	8	Mann-Whitney test Wilcoxon Signed Rank Test	shRNA Sin3a	-	0,4174
	shRNA Scr	54,02				shRNA Scr vs shRNA Sin3a	-	0,0499
	shRNA Sin3a	55,84				shRNA Scr vs 50	-	0,7422
						shRNA Sin3a vs 50	-	0,0156
27A	shRNA Scr dorsal	42,35	5,88/2,079	8	Two-way ANOVA	Interaction	F (1, 20) = 0,7022	0,4119
	shRNA Scr ventral	16,77	5,945/2,972	4		Dorsal/ventral	F (1, 20) = 29,52	<0,0001
	shRNA Sin3a dorsal	31,66	13,5/4,773	8		Traitement	F (1, 20) = 3,181	0,0897
	shRNA Sin3a ventral	12,92	7,08/3,54	4	Uncorrected Fisher's LSD	dorsal vs ventral	-	-
						shRNA Scr	-	0,0003
					shRNA Sin3a	-	0,004	
27B	shRNA Scr dorsal	1	0,842/0,298	8	Two-way ANOVA	Interaction	F (1, 20) = 0,03557	0,8523
	shRNA Scr ventral	1	0,653/0,326	4		Dorsal/ventral	F (1, 20) = 0,8707	0,3619
	shRNA Sin3a dorsal	1,311	0,978/0,346	8		Traitement	F (1, 20) = 0,03557	0,8523
	shRNA Sin3a ventral	1,469	1,379/0,689	4			-	-
28B	véhicule		0,459/0,205	5	Shapiro-Wilk test	véhicule	-	0,2762
	Cpd-60 (45mg/kg)	0,7331	0,289/0,145	4		Cpd-60 (45mg/kg)	-	0,6821
	Cpd-60 (65mg/kg)	1,059	0,376/0,168	5		Cpd-60 (65mg/kg)	-	0,1213
	Cpd-60 (85mg/kg)	1,148	0,303/0,136	5		Cpd-60 (85mg/kg)	-	0,1627
					one-way ANOVA	Traitement	F (3, 15) = 1,019	0,4121
28C	véhicule	1	0,526/0,235	5	Shapiro-Wilk test	véhicule	-	0,7654
	Cpd-60 (45mg/kg)	0,9072	0,166/0,083	4		Cpd-60 (45mg/kg)	-	0,5818
	Cpd-60 (65mg/kg)	0,6896	0,28/0,125	5		Cpd-60 (65mg/kg)	-	0,8234
	Cpd-60 (85mg/kg)	0,6795	0,31/0,139	5		Cpd-60 (85mg/kg)	-	0,2872
					one-way ANOVA	Traitement	F (3, 15) = 0,9955	0,4218
29B	véhicule pré-choc	1,689	2,167/0,766	8	Two-way RM ANOVA	Temps x Traitement	F (1, 15) = 1,422	0,2516
	Cpd-60 (45mg/kg) pré-choc	1,577	1,12/0,374	9		Temps	F (1, 15) = 41,56	<0,0001
	véhicule 24h contexte	22,01	13,17/4,656	8		Traitement	F (1, 15) = 1,097	0,3115
	Cpd-60 (45mg/kg) 24h contexte	15,56	10,56/3,521	9	Uncorrected Fisher's LSD	pré-choc vs 24h contexte	-	-
						véhicule	-	<0,0001
					Cpd-60	-	0,0016	
29C	véhicule pré-son	15,94	11,98/4,236	8	Two-way RM ANOVA	Temps x Traitement	F (1, 15) = 1,850	0,1939
	Cpd-60 (45mg/kg) pré-son	19,54	12,76/4,254	9		Temps	F (1, 15) = 34,03	<0,0001
	véhicule son	42,29	15,85/5,605	8		Traitement	F (1, 15) = 0,07106	0,7934
	Cpd-60 (45mg/kg) son	35,93	11,51/3,835	9		pré-son vs son	-	-
					Uncorrected Fisher's LSD	véhicule	-	0,0002
					Cpd-60	-	0,0053	
29D	véhicule	50,33	32,17/11,38	8	Shapiro-Wilk test	véhicule	-	0,27
	Cpd-60 (45mg/kg)	63,29	26,96/8,985	9		Cpd-60 (45mg/kg)	-	0,0742
					Unpaired t test	véhicule vs Cpd-60	t=0,9036, df=15	0,3805
29E	véhicule	3219	792,3/280,1	8	Shapiro-Wilk test	véhicule	-	0,2423
	Cpd-60 (45mg/kg)	3735	984,3/328,1	9		Cpd-60 (45mg/kg)	-	0,8034
					Unpaired t test	véhicule vs Cpd-60	t=1,179, df=15	0,2567
29F	Véhicule Homer1	1,002499268	0,08/0,036	5	Two-way ANOVA	gène x traitement	F (4, 40) = 1,002	0,4178
	Véhicule Cdk5	1,000749726	0,044/0,02	5		Gène	F (4, 40) = 0,6975	0,5982
	Véhicule Gria1	1,003342652	0,094/0,042	5		Traitement	F (1, 40) = 5,396	0,0254
	Véhicule Grin2a	1,00630466	0,125/0,056	5	Šidák's multiple comparisons test	Véhicule vs Cpd-60	-	-
	Véhicule Grin2b	1,037520712	0,299/0,134	5		Homer1	-	0,7854
	Cpd-60 Homer1	0,853158018	0,289/0,129	5		Cdk5	-	0,9953
	Cpd-60 Cdk5	0,941714286	0,107/0,048	5		Gria1	-	0,9996
	Cpd-60 Gria1	1,03837638	0,183/0,082	5		Grin2a	-	0,5058
	Cpd-60 Grin2a	0,802930132	0,311/0,139	5		Grin2b	-	0,1155
	Cpd-60 Grin2b	0,728193528	0,299/0,134	5			-	-
30B	véhicule	1	0,235/0,136	3	Shapiro-Wilk test	véhicule	-	0,435
	Cpd-60 (45mg/kg)	1,426	0,068/0,034	4		Cpd-60 (45mg/kg)	-	0,0893
					Unpaired t test	véhicule vs Cpd-60	t=3,537, df=5	0,0166
31B	véhicule pré-choc	1,521	1,004/0,355	8	Two-way RM ANOVA	Temps x Traitement	F (1, 14) = 0,3455	0,566
	Cpd-60 (45mg/kg) pré-choc	2,029	1,979/0,7	8		Temps	F (1, 14) = 25,15	0,0002
	véhicule 24h contexte	26,11	20,33/7,189	8		Traitement	F (1, 14) = 0,2363	0,6344
	Cpd-60 (45mg/kg) 24h contexte	21,46	13,44/4,751	8	Uncorrected Fisher's LSD	pré-choc vs 24h contexte	-	-
					véhicule	-	0,0014	

						Cpd-60	-	0,0074
31C	véhicule pré-son	15,73	11,55/4,084	8	Two-way RM ANOVA	Temps x Traitement	F (1, 14) = 0,4217	0,5266
	Cpd-60 (45mg/kg) pré-son	18,54	19,43/6,868	8		Temps	F (1, 14) = 48,49	<0,0001
	véhicule son	45,1	22,16/7,833	8	Uncorrected Fisher's LSD	Traitement	F (1, 14) = 0,7014	0,4164
	Cpd-60 (45mg/kg) son	53,96	11/3,889	8		pré-son vs son	-	-
					véhicule	-	0,0005	
					Cpd-60	-	<0,0001	
32A	3 mois	1,012	0,165/0,067	6	Shapiro-Wilk test	3 mois	-	0,8553
	8 mois	0,5517	0,183/0,065	8		8 mois	-	0,6339
	16 mois	0,7499	0,123/0,05	6		16 mois	-	0,7351
					One-way ANOVA	Âge	F (2, 17) = 13,82	0,0003
					Tuckey's multiple comparisons test	3 mois vs 8 mois	-	0,0002
						3 mois vs 16 mois	-	0,0314
				8 mois vs 16 mois		-	0,0886	
32B	3 mois	0,9998	0,146/0,059	6	Shapiro-Wilk test	3 mois	-	0,5683
	8 mois	0,8378	0,163/0,058	8		8 mois	-	0,7592
	16 mois	1,013	0,162/0,066	6		16 mois	-	0,2639
					One-way ANOVA	Âge	F (2, 17) = 2,748	0,0924
40A	Young	4600		19	Shapiro-Wilk test	Young	-	0,2382
	Aged	3593		29		Aged	-	0,0052
					Mann Whitney test	Aged vs Young	-	0,023
40B	Young	7,935		19	Shapiro-Wilk test	Young	-	0,2554
	Aged	6,155		29		Aged	-	0,0086
					Mann Whitney test	Aged vs Young	-	0,0152
40C	Young	10,61		19	Shapiro-Wilk test	Young	-	0,011
	Aged	7,905		29		Aged	-	0,5349
					Mann Whitney test	Aged vs Young	-	0,0162
40D	Young	31,7		19	Shapiro-Wilk test	Young	-	0,072
	Aged	36,51		29		Aged	-	0,0175
					Mann Whitney test	Aged vs Young	-	0,0545
41B	Escape looming young			11	Fisher's exact test		-	0,0028
	Escape looming aged			7				
	No escape looming young			1				
	No escape looming aged			14				
41C	Young	0,283		11	Shapiro-Wilk test	Young	-	0,0047
	Aged	6,266		7		Aged	-	0,4548
					Mann Whitney test	Aged vs Young	-	<0,0001
42B DG	Looming	281,3	74,06/21,38	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,3876
	Control	260	40,78/15,41	7		Control	-	0,2938
	Home-cage	98,96	21,04/10,52	4		Home-cage	-	0,051
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 14,32	0,0001
					Tukey's multiple comparisons test	Loom vs. Ctrl	-	0,7394
						Loom vs. HC	-	0,0001
				Ctrl vs. HC		-	0,001	
42B CA3	Looming	385,4	222,5/64,23	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,133
	Control	605,7	139/52,53	7		Control	-	0,6163
	Home-cage	97,71	58,15/29,08	4		Home-cage	-	0,0392
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 9,905	0,001
					Tukey's multiple comparisons test	Loom vs. Ctrl	-	0,0499
						Loom vs. HC	-	0,0337
				Ctrl vs. HC		-	0,0007	
42C BLA	Looming	157	80,96/23,37	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,1877
	Control	76,69	31,07/11,74	7		Control	-	0,9848
	Home-cage	43,3	35,84/17,92	4		Home-cage	-	0,4419
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 6,347	0,0073
					Tukey's multiple comparisons test	Loom vs. Ctrl	-	0,0398
						Loom vs. HC	-	0,0156
				Ctrl vs. HC		-	0,6872	
42C CeA	Looming	135,5	108,4/31,28	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,1996
	Control	69,66	28,92/10,93	7		Control	-	0,8602

	Home-cage	37,21	23,51/11,75	4		Home-cage	-	0,8522
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 2,742	0,0886
42C LA	Looming	151,5	100,1/28,91	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,0328
	Control	71,15	37,99/14,36	7		Control	-	0,5908
	Home-cage	36,9	30,74/15,37	4		Home-cage	-	0,0221
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 4,299	0,028
					Tukey's multiple comparisons test	Loom vs. Ctrl	-	0,1024
						Loom vs. HC	-	0,0488
						Ctrl vs. HC	-	0,7661
42D LPTN	Looming	58,28	13,61/3,93	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,7566
	Control	79,63	16,84/6,367	7		Control	-	0,2427
	Home-cage	60,58	21,94/10,97	4		Home-cage	-	0,3296
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 4,084	0,0326
					Tukey's multiple comparisons test	Loom vs. Ctrl	-	0,0292
						Loom vs. HC	-	0,9667
						Ctrl vs. HC	-	0,1683
42E uSC	Looming	344,7	149,8/43,25	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,5484
	Control	324,5	65,16/24,63	7		Control	-	0,9823
	Home-cage	295,1	96,85/48,43	4		Home-cage	-	0,2782
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 0,2557	0,7768
42E SC	Looming	156,4	66,73/19,26	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,0663
	Control	158,1	35,01/13,23	7		Control	-	0,2101
	Home-cage	82,85	54,18/27,09	4		Home-cage	-	0,5513
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 2,794	0,0851
42F dIPAG	Looming	231,6	53,67/15,49	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,9489
	Control	267,1	75,27/28,45	7		Control	-	0,2045
	Home-cage	85,61	29,49/14,74	4		Home-cage	-	0,2641
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 20) = 13,06	0,0002
					Tukey's multiple comparisons test	Loom vs. Ctrl	-	0,4236
						Loom vs. HC	-	0,0009
						Ctrl vs. HC	-	0,0002
42G PBGN	Looming	47,17	52,67/15,2	12	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,0128
	Control	13,1	13,12/5,357	6		Control	-	0,4207
	Home-cage	16,84	21,49/10,75	4		Home-cage	-	0,2725
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 19) = 1,689	0,2114
43B DG	Looming	234,2	90,65/34,26	7	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,7968
	Control	234,4	47,64/16,84	8		Control	-	0,4264
	Home-cage	235,5	78,15/39,08	4		Home-cage	-	0,1078
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 16) = 0,0004230	0,9996
43B CA3	Looming	99,48	43,24/16,34	7	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,3458
	Control	101,4	65,1/23,02	8		Control	-	0,7313
	Home-cage	39,55	17,76/8,879	4		Home-cage	-	0,0567
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 16) = 2,247	0,138
43C BLA	Looming	276,8	85,68/32,38	7	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,4586
	Control	266,9	62,88/22,23	8		Control	-	0,2989
	Home-cage	154,7	68,83/34,42	4		Home-cage	-	0,5305
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 16) = 4,047	0,0378
					Tukey's multiple comparisons test	Loom vs. Ctrl	-	0,9636
						Loom vs. HC	-	0,043
						Ctrl vs. HC	-	0,0582
43C CeA	Looming	128,3	54,09/23,44	7	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,8435
	Control	163,6	138,7/49,04	8		Control	-	0,295
	Home-cage	120,5	63,62/31,81	4		Home-cage	-	0,2772
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 16) = 0,3355	0,7199
43C LA	Looming	145,5	40,08/15,15	7	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,5806
	Control	144,9	77,5/27,4	8		Control	-	0,83
	Home-cage	60,8	53,49/26,74	4		Home-cage	-	0,1552
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 16) = 2,985	0,0791
43D LPTN	Looming	168,8	44,74/16,91	7	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,735
	Control	130,4	36,91/13,05	8		Control	-	0,0024

43E uSC	Home-cage	147,9	39,92/16,96	4	One way ANOVA	Home-cage	-	0,5	
						Conditions	F (2, 16) = 1,681	0,2174	
	Looming	158,2	54,83/20,72	7		Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,0253
	Control	151,4	32,37/11,44	8			Control	-	0,6159
	Home-cage	119,7	40,31/20,16	4	One way ANOVA	Home-cage	-	0,26	
				Conditions		F (2, 16) = 1,061	0,3691		
43E SC	Looming	240,4	64,58/24,41	7		Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,5086
	Control	207,2	40,35/14,26	8			Control	-	0,8944
		Home-cage	165	29,73/14,87	4		Home-cage	-	0,6007
					Conditions		F (2, 16) = 2,991	0,0788	
43F dIPAG	Looming	198,8	49,98/18,89	7	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,3849	
	Control	163,5	34,59/12,23	8		Control	-	0,8562	
		Home-cage	121,2	26,04/13,02		4	Home-cage	-	0,8534
					One way ANOVA	Conditions	F (2, 16) = 4,910	0,0217	
						Tukey's multiple comparisons test	Loom vs. Ctrl	-	0,2315
							Loom vs. HC	-	0,0175
				Ctrl vs. HC	-		0,2222		
43G PBGN	Looming	182	51,63/19,51	7	Shapiro-Wilk test	Looming	-	0,923	
	Control	157,3	57,57/20,35	8		Control	-	0,2707	
		Home-cage	123,5	18,33/9,165		4	Home-cage	-	0,683
						One way ANOVA	Conditions	F (2, 16) = 1,747	0,206
46A	Young pre-shock	1,41	1,854/0,535	12	Two-way RM ANOVA	Time x age	F (4, 96) = 14,60	<0,0001	
	Young tone 1	0,65	1,526/0,438	12		Time	F (2,156, 51,74) = 17,89	<0,0001	
	Young after shock 1	5,29	4,653/1,343	12		Age	F (1, 24) = 16,99	0,0004	
	Young tone 2	6,22	5,678/1,639	12		Aged vs Young	-	-	
	Young after shock 2	2,83	3,187/0,92	12		Pre-shock	-	0,9667	
	Aged pre-shock	0,97	1,181/0,316	14		Šidák's multiple comparisons test	Tone 1	-	0,3747
	Aged tone 1	5,27	9,323/2,492	14			After shock 1	-	0,0212
	Aged after shock 1	27,05	23,436/6,263	14			Tone 2	-	0,5439
	Aged tone 2	15,66	22,2/5,933	14			After shock 2	-	<0,0001
	Aged after shock 2	44,8	24,285/6,49	14			-	-	-
46B	Young	35,14	16,9/4,88	14	Shapiro-Wilk test	Young	-	0,8992	
	Aged	22,08	13,83/3,696	12		Aged	-	0,0949	
					Unpaired t test	Aged vs Young	t=2,168, df=24	0,0202	

Analyses des corrélations chez les souris jeunes

LOOMING	LA vs BLA	LA vs CeA	LA vs DG	LA vs CA3	LA vs uSC	LA vs SC	LA vs dIPAG	LA vs LPTN	LA vs PBGN
r	0,7589	0,8357	-0,001427	0,2515	0,6759	0,5075	0,02455	0,1952	-0,6627
R squared	0,5759	0,6984	0,000002037	0,06324	0,4568	0,2575	0,0006025	0,03809	0,4391
P (two-tailed)	0,0042	0,0007	0,9965	0,4305	0,0158	0,0922	0,9396	0,5433	0,0189
Number of Pairs	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	BLA vs CeA	BLA vs DG	BLA vs CA3	BLA vs uSC	BLA vs SC	BLA vs dIPAG	BLA vs LPTN	BLA vs PBGN	CeA vs DG
r	0,8476	-0,3377	-0,1748	0,8448	0,761	-0,2678	-0,08033	-0,7867	-0,08751
R squared	0,7184	0,114	0,03057	0,7136	0,5792	0,07172	0,006453	0,6188	0,007658
P (two-tailed)	0,0005	0,283	0,5868	0,0005	0,004	0,4	0,804	0,0024	0,7868
Number of Pairs	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	CeA vs CA3	CeA vs uSC	CeA vs SC	CeA vs dIPAG	CeA vs LPTN	CeA vs PBGN	DG vs CA3	DG vs uSC	DG vs SC
r	0,1866	0,6806	0,554	-0,1222	-0,02798	-0,6551	0,8088	-0,2911	-0,3458
R squared	0,03483	0,4632	0,3069	0,01492	0,0007828	0,4291	0,6541	0,08475	0,1196
P (two-tailed)	0,5614	0,0148	0,0616	0,7053	0,9312	0,0208	0,0014	0,3586	0,2709
Number of Pairs	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	DG vs dIPAG	DG vs LPTN	DG vs PBGN	CA3 vs uSC	CA3 vs SC	CA3 vs dIPAG	CA3 vs LPTN	CA3 vs PBGN	uSC vs SC
r	0,5041	0,6892	0,4721	-0,3463	-0,429	0,2852	0,3994	0,252	0,8725
R squared	0,2541	0,475	0,2228	0,1199	0,1841	0,08131	0,1595	0,06351	0,7613
P (two-tailed)	0,0947	0,0132	0,1213	0,2702	0,164	0,369	0,1984	0,4294	0,0002
Number of Pairs	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	uSC vs dIPAG	uSC vs LPTN	uSC vs PBGN	SC vs dIPAG	SC vs LPTN	SC vs PBGN	dIPAG vs LPTN	dIPAG vs PBGN	LPTN vs PBGN
r	0,01469	0,03277	-0,6548	-0,1615	0,01448	-0,7083	0,6704	0,4231	0,3027
R squared	0,0002159	0,001074	0,4287	0,02607	0,0002097	0,5016	0,4494	0,179	0,09162
P (two-tailed)	0,9639	0,9195	0,0208	0,6162	0,9644	0,0099	0,017	0,1706	0,3389
Number of Pairs	12	12	12	12	12	12	12	12	12
CONTROL	LA vs BLA	LA vs CeA	LA vs DG	LA vs CA3	LA vs uSC	LA vs SC	LA vs dIPAG	LA vs LPTN	LA vs PBGN

r	0,7355	0,7147	-0,7096	-0,8389	-0,7239	0,2288	0,3561	0,5617	0,2019
R squared	0,5409	0,5107	0,5035	0,7037	0,524	0,05235	0,1268	0,3155	0,04075
P (two-tailed)	0,0596	0,0711	0,0741	0,0183	0,0659	0,6217	0,433	0,1894	0,7013
Number of Pairs	7	7	7	7	7	7	7	7	6
	BLA vs CeA	BLA vs DG	BLA vs CA3	BLA vs uSC	BLA vs SC	BLA vs dIPAG	BLA vs LPTN	BLA vs PBGN	CeA vs DG
r	0,6034	-0,376	-0,6325	-0,4439	-0,0238	-0,01736	0,3997	0,3781	-0,5581
R squared	0,3641	0,1413	0,4001	0,197	0,0005665	0,0003014	0,1598	0,1429	0,3115
P (two-tailed)	0,1514	0,4059	0,1274	0,3184	0,9596	0,9705	0,3743	0,4599	0,1929
Number of Pairs	7	7	7	7	7	7	7	6	7
	CeA vs CA3	CeA vs uSC	CeA vs SC	CeA vs dIPAG	CeA vs LPTN	CeA vs PBGN	DG vs CA3	DG vs uSC	DG vs SC
r	-0,3772	-0,7971	0,06877	-0,06128	-0,09074	-0,2022	0,6838	0,2563	-0,7249
R squared	0,1423	0,6354	0,004729	0,003756	0,008235	0,04088	0,4676	0,06572	0,5255
P (two-tailed)	0,4042	0,0318	0,8835	0,8962	0,8466	0,7009	0,0903	0,579	0,0653
Number of Pairs	7	7	7	7	7	6	7	7	7
	DG vs dIPAG	DG vs LPTN	DG vs PBGN	CA3 vs uSC	CA3 vs SC	CA3 vs dIPAG	CA3 vs LPTN	CA3 vs PBGN	uSC vs SC
r	-0,5492	-0,5524	-0,4897	0,3973	-0,3698	-0,3904	-0,8617	-0,6209	0,154
R squared	0,3016	0,3052	0,2398	0,1578	0,1368	0,1524	0,7425	0,3855	0,02373
P (two-tailed)	0,2017	0,1984	0,3241	0,3775	0,4142	0,3865	0,0127	0,1884	0,7416
Number of Pairs	7	7	6	7	7	7	7	6	7
	uSC vs dIPAG	uSC vs LPTN	uSC vs PBGN	SC vs dIPAG	SC vs LPTN	SC vs PBGN	dIPAG vs LPTN	dIPAG vs PBGN	LPTN vs PBGN
r	-0,01434	0,03827	0,4255	0,823	0,5041	0,596	0,5971	0,1451	0,789
R squared	0,0002056	0,001464	0,1811	0,6773	0,2541	0,3552	0,3565	0,02104	0,6226
P (two-tailed)	0,9757	0,9351	0,4002	0,023	0,2487	0,2119	0,1569	0,7839	0,0621
Number of Pairs	7	7	6	7	7	6	7	6	6
HOME-CAGE	LA vs BLA	LA vs CeA	LA vs DG	LA vs CA3	LA vs uSC	LA vs SC	LA vs dIPAG	LA vs LPTN	LA vs PBGN
r	0,9533	0,8449	0,2956	0,991	0,9052	0,8817	0,3118	0,7982	0,8235
R squared	0,9089	0,7138	0,08738	0,9822	0,8194	0,7774	0,09724	0,6371	0,6781
P (two-tailed)	0,0467	0,1551	0,7044	0,009	0,0948	0,1183	0,6882	0,2018	0,1765
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	BLA vs CeA	BLA vs DG	BLA vs CA3	BLA vs uSC	BLA vs SC	BLA vs dIPAG	BLA vs LPTN	BLA vs PBGN	CeA vs DG
r	0,9244	0,5691	0,979	0,8894	0,9274	0,4145	0,8389	0,8519	0,5947
R squared	0,8545	0,3239	0,9585	0,7911	0,8601	0,1718	0,7038	0,7258	0,3537
P (two-tailed)	0,0756	0,4309	0,021	0,1106	0,0726	0,5855	0,1611	0,1481	0,4053
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	CeA vs CA3	CeA vs uSC	CeA vs SC	CeA vs dIPAG	CeA vs LPTN	CeA vs PBGN	DG vs CA3	DG vs uSC	DG vs SC
r	0,9075	0,9498	0,9936	0,7303	0,9731	0,972	0,395	0,3166	0,5035
R squared	0,8236	0,9022	0,9873	0,5333	0,9469	0,9449	0,156	0,1003	0,2535
P (two-tailed)	0,0925	0,0502	0,0064	0,2697	0,0269	0,028	0,605	0,6834	0,4965
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	DG vs dIPAG	DG vs LPTN	DG vs PBGN	CA3 vs uSC	CA3 vs SC	CA3 vs dIPAG	CA3 vs LPTN	CA3 vs PBGN	uSC vs SC
r	0,3898	0,4367	0,411	0,9364	0,9328	0,4143	0,8587	0,8781	0,9788
R squared	0,152	0,1907	0,1689	0,8768	0,8701	0,1716	0,7374	0,771	0,9581
P (two-tailed)	0,6102	0,5633	0,589	0,0636	0,0672	0,5857	0,1413	0,1219	0,0212
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	uSC vs dIPAG	uSC vs LPTN	uSC vs PBGN	SC vs dIPAG	SC vs LPTN	SC vs PBGN	dIPAG vs LPTN	dIPAG vs PBGN	LPTN vs PBGN
r	0,677	0,9715	0,982	0,7109	0,9816	0,9851	0,8211	0,7957	0,9988
R squared	0,4583	0,9438	0,9644	0,5054	0,9635	0,9704	0,6742	0,6332	0,9975
P (two-tailed)	0,323	0,0285	0,018	0,2891	0,0184	0,0149	0,1789	0,2043	0,0012
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Analyses des corrélations chez les souris âgées

LOOMING	LA vs BLA	LA vs CeA	LA vs DG	LA vs CA3	LA vs uSC	LA vs SC	LA vs dIPAG	LA vs LPTN	LA vs PBGN
r	0,4555	-0,3837	0,4839	0,7295	0,6643	0,4204	0,2944	0,326	0,5187
R squared	0,2074	0,1472	0,2341	0,5321	0,4413	0,1768	0,08667	0,1063	0,269
P (two-tailed)	0,3044	0,3955	0,2712	0,0628	0,1036	0,3476	0,5216	0,4755	0,2329
Number of Pairs	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	BLA vs CeA	BLA vs DG	BLA vs CA3	BLA vs uSC	BLA vs SC	BLA vs dIPAG	BLA vs LPTN	BLA vs PBGN	CeA vs DG
r	0,2234	-0,2206	0,605	0,1452	0,08114	0,3195	-0,2213	0,345	-0,1105
R squared	0,04989	0,04866	0,366	0,02107	0,006583	0,1021	0,04895	0,119	0,01222
P (two-tailed)	0,6302	0,6346	0,1501	0,7561	0,8627	0,4849	0,6335	0,4485	0,8135
Number of Pairs	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	CeA vs CA3	CeA vs uSC	CeA vs SC	CeA vs dIPAG	CeA vs LPTN	CeA vs PBGN	DG vs CA3	DG vs uSC	DG vs SC
r	-0,1894	-0,2773	0,3346	0,3182	-0,2137	-0,3974	0,1456	0,4286	0,5094
R squared	0,03587	0,07687	0,112	0,1013	0,04568	0,1579	0,02121	0,1837	0,2595
P (two-tailed)	0,6842	0,5472	0,4632	0,4867	0,6454	0,3774	0,7554	0,3373	0,2429
Number of Pairs	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	DG vs dIPAG	DG vs LPTN	DG vs PBGN	CA3 vs uSC	CA3 vs SC	CA3 vs dIPAG	CA3 vs LPTN	CA3 vs PBGN	uSC vs SC
r	0,5068	0,8326	-0,2725	0,6485	0,5833	0,1692	0,01386	0,7661	0,5308

R squared	0,2569	0,6932	0,07428	0,4205	0,3402	0,02864	0,0001922	0,5868	0,2817
P (two-tailed)	0,2457	0,0201	0,5543	0,1151	0,1693	0,7168	0,9765	0,0446	0,2203
Number of Pairs	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	uSC vs dIPAG	uSC vs LPTN	uSC vs PBGN	SC vs dIPAG	SC vs LPTN	SC vs PBGN	dIPAG vs LPTN	dIPAG vs PBGN	LPTN vs PBGN
r	-0,2606	-0,03948	0,6372	0,3566	0,2383	0,272	0,7292	-0,4399	-0,4603
R squared	0,0679	0,001558	0,4061	0,1272	0,05678	0,074	0,5317	0,1935	0,2119
P (two-tailed)	0,5725	0,933	0,1237	0,4323	0,6069	0,5551	0,063	0,3233	0,2987
Number of Pairs	7	7	7	7	7	7	7	7	7
CONTROL	LA vs BLA	LA vs CeA	LA vs DG	LA vs CA3	LA vs uSC	LA vs SC	LA vs dIPAG	LA vs LPTN	LA vs PBGN
r	0,5817	0,1313	-0,01939	0,1896	0,2044	-0,1319	0,6825	0,02573	-0,1152
R squared	0,3383	0,01725	0,0003758	0,03595	0,04176	0,0174	0,4659	0,0006621	0,01326
P (two-tailed)	0,1304	0,7566	0,9637	0,6529	0,6274	0,7555	0,0621	0,9518	0,786
Number of Pairs	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	BLA vs CeA	BLA vs DG	BLA vs CA3	BLA vs uSC	BLA vs SC	BLA vs dIPAG	BLA vs LPTN	BLA vs PBGN	CeA vs DG
r	0,4082	-0,06089	-0,022	0,1041	0,01468	0,3751	-0,002558	-0,2268	-0,6894
R squared	0,1666	0,003707	0,0004839	0,01083	0,0002156	0,1407	0,000006544	0,05143	0,4752
P (two-tailed)	0,3154	0,8861	0,9588	0,8062	0,9725	0,3599	0,9952	0,5891	0,0586
Number of Pairs	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	CeA vs CA3	CeA vs uSC	CeA vs SC	CeA vs dIPAG	CeA vs LPTN	CeA vs PBGN	DG vs CA3	DG vs uSC	DG vs SC
r	-0,3722	-0,6108	0,13	-0,1365	0,1632	-0,5339	0,6137	0,4019	-0,05458
R squared	0,1386	0,373	0,01691	0,01864	0,02663	0,285	0,3766	0,1615	0,002978
P (two-tailed)	0,3639	0,1077	0,7589	0,7472	0,6994	0,1729	0,1056	0,3237	0,8979
Number of Pairs	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	DG vs dIPAG	DG vs LPTN	DG vs PBGN	CA3 vs uSC	CA3 vs SC	CA3 vs dIPAG	CA3 vs LPTN	CA3 vs PBGN	uSC vs SC
r	0,125	0,1465	0,8135	-0,2467	-0,7023	-0,3015	-0,2622	0,1304	0,3525
R squared	0,01561	0,02145	0,6618	0,06088	0,4932	0,0909	0,06873	0,017	0,1243
P (two-tailed)	0,7681	0,7293	0,014	0,5558	0,0521	0,468	0,5305	0,7583	0,3918
Number of Pairs	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	uSC vs dIPAG	uSC vs LPTN	uSC vs PBGN	SC vs dIPAG	SC vs LPTN	SC vs PBGN	dIPAG vs LPTN	dIPAG vs PBGN	LPTN vs PBGN
r	0,7723	0,01161	0,5118	0,3899	0,5891	0,4431	0,2165	0,3295	0,554
R squared	0,5965	0,0001348	0,2619	0,152	0,347	0,1963	0,04689	0,1086	0,3069
P (two-tailed)	0,0247	0,9782	0,1948	0,3396	0,1244	0,2716	0,6065	0,4254	0,1543
Number of Pairs	8	8	8	8	8	8	8	8	8
HOME-CAGE	LA vs BLA	LA vs CeA	LA vs DG	LA vs CA3	LA vs uSC	LA vs SC	LA vs dIPAG	LA vs LPTN	LA vs PBGN
r	0,9885	-0,1122	0,1043	-0,1974	0,2813	0,6483	0,9646	-0,09504	0,238
R squared	0,9771	0,01259	0,01088	0,03898	0,07912	0,4203	0,9304	0,009033	0,05662
P (two-tailed)	0,0115	0,8878	0,8957	0,8026	0,7187	0,3517	0,0354	0,905	0,762
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	BLA vs CeA	BLA vs DG	BLA vs CA3	BLA vs uSC	BLA vs SC	BLA vs dIPAG	BLA vs LPTN	BLA vs PBGN	CeA vs DG
r	0,03503	0,2267	-0,05713	0,3828	0,7546	0,9927	-0,1068	0,3821	0,9119
R squared	0,001227	0,05141	0,003263	0,1466	0,5695	0,9855	0,0114	0,146	0,8315
P (two-tailed)	0,965	0,7733	0,9429	0,6172	0,2454	0,0073	0,8932	0,6179	0,0881
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	CeA vs CA3	CeA vs uSC	CeA vs SC	CeA vs dIPAG	CeA vs LPTN	CeA vs PBGN	DG vs CA3	DG vs uSC	DG vs SC
r	0,9878	0,4782	0,681	0,1308	0,1654	0,9147	0,9283	0,219	0,749
R squared	0,9757	0,2286	0,4637	0,01711	0,02735	0,8366	0,8618	0,04797	0,561
P (two-tailed)	0,0122	0,5218	0,319	0,8692	0,8346	0,0853	0,0717	0,781	0,251
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	DG vs dIPAG	DG vs LPTN	DG vs PBGN	CA3 vs uSC	CA3 vs SC	CA3 vs dIPAG	CA3 vs LPTN	CA3 vs PBGN	uSC vs SC
r	0,2859	0,4828	0,8295	0,3381	0,6005	0,02932	0,2971	0,8459	0,6254
R squared	0,08171	0,2331	0,688	0,1143	0,3606	0,0008599	0,08829	0,7156	0,3912
P (two-tailed)	0,7141	0,5172	0,1705	0,6619	0,3995	0,9707	0,7029	0,1541	0,3746
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	uSC vs dIPAG	uSC vs LPTN	uSC vs PBGN	SC vs dIPAG	SC vs LPTN	SC vs PBGN	dIPAG vs LPTN	dIPAG vs PBGN	LPTN vs PBGN
r	0,4825	-0,7443	0,7266	0,815	-0,008994	0,8871	-0,1606	0,4806	-0,08579
R squared	0,2328	0,554	0,528	0,6642	0,0000809	0,7869	0,02581	0,231	0,00736
P (two-tailed)	0,5175	0,2557	0,2734	0,185	0,991	0,1129	0,8394	0,5194	0,9142
Number of Pairs	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Titre : Exploration du rôle du complexe répresseur transcriptionnel SIN3A-HDAC dans la consolidation de la mémoire et l'effet de l'âge sur la réponse de peur innée chez la souris

Mots clés : épigénétique, consolidation mnésique, hippocampe, vieillissement, peur innée, comportement

Résumé : La mémoire à long terme se forme au cours d'un processus de consolidation nécessitant une transcription de novo de gènes, régulée par des mécanismes épigénétiques. Les modifications épigénétiques, incluant les acétylations des histones qui structurent la chromatine, sont ajoutées ou retirées respectivement par des histones acétyltransférases (HATs) et des histones déacétylases (HDACs). Ces dernières sont recrutées aux gènes cibles par des complexes répresseurs transcriptionnels. Bien qu'encore peu étudiés, la littérature montre l'engagement de ces complexes répresseurs dans la formation de différents types de mémoire, mettant ainsi en exergue la question d'une implication importante de ces derniers dans les processus mnésiques. Ainsi, nous avons choisi d'étudier l'un de ces complexes, SIN3A-HDACs, dans le cadre de la consolidation d'une mémoire dépendante de l'hippocampe. En outre, un grand nombre d'études ont examiné la fonction des HDACs, en particulier les HDACs 1 et 2, dans les processus de la mémoire en utilisant des modèles de souris génétiquement modifiés pour ces enzymes. Cependant, leur rôle dans la phase de consolidation de la mémoire ne peut être mis en évidence que par leur inhibition ponctuelle comme par l'administration d'inhibiteurs pharmacologiques des HDACs. Ainsi, pour tester notre hypothèse selon laquelle le complexe SIN3A-HDACs participe à la formation de la mémoire à long terme, nous avons ciblé spécifiquement les deux entités de ce complexe en tentant d'établir un modèle murin déplété en SIN3A ou en inhibant spécifiquement les HDACs 1 et 2 par l'administration du composé 60 (Cpd-60) dans l'hippocampe dorsal. Les premiers résultats de ce travail de thèse ont montré un rôle de la protéine SIN3A, mais aucun effet du Cpd-60 sur la consolidation de la mémoire contextuelle générée en soumettant des souris adultes à un conditionnement de peur. La première partie de ce manuscrit présente les différentes approches que nous avons utilisées pour cibler SIN3A et les effets d'une injection de Cpd-60 au niveau moléculaire et comportemental. La seconde partie de ce travail de thèse concerne l'effet de l'âge sur la réponse comportementale et cérébrale des souris face à un stimulus de looming, mimant l'approche rapide d'un prédateur volant. Des comportements défensifs adaptés sont essentiels à la survie des espèces. Alors que ces comportements commencent à se développer tôt dans la vie d'un individu, les connaissances sur la façon dont ils évoluent chez les individus plus âgés sont encore peu nombreuses. Considérant que le vieillissement s'accompagne d'un déclin des fonctions cognitives et physiques, nous émettons l'hypothèse que les comportements de peur innée et les mécanismes cérébraux sous-jacents pourraient subir des modifications avec l'âge. Ce travail examine donc cette hypothèse en observant la réaction des souris âgées à un stimulus visuel menaçant, comparativement à des souris jeunes adultes. Nos résultats montrent que les souris âgées manifestent une réponse de peur différente de celle des souris jeunes lorsqu'elles sont confrontées au stimulus de looming. Contrairement aux souris jeunes, les souris âgées ont tendance à adopter un comportement de freezing, sans chercher à fuir vers un abri. Il est intéressant de noter que cette réponse comportementale altérée chez les souris âgées est liée à un profil de connectivité fonctionnelle cérébrale distinct de celui des jeunes souris, avec un déficit d'activation cellulaire dans certaines structures cérébrales clés qui régulent les comportements de peur innée

Title: Exploration of the role of the SIN3A-HDAC transcriptional repressor complex in memory consolidation and the effect of age on innate fear response in mice

Key words: epigenetics, memory consolidation, hippocampus, aging, innate fear, behavior

Abstract: The long term memory is formed through a consolidation process requiring de novo gene transcription, regulated by epigenetic mechanisms. Epigenetic modifications, including histone acetylations that structure chromatin, are added or removed respectively by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). The latter are recruited to targeted genes by transcriptional repressor complexes. Although still understudied, the literature shows the involvement of these repressor complexes in the formation of different types of memory, thus highlighting the question of their significant implication in mnemonic processes. Therefore, we chose to study one of these complexes, SIN3A-HDACs, in the context of hippocampus-dependent memory consolidation. Furthermore, numerous studies have investigated the function of HDACs, especially HDACs 1 and 2, in memory processes using genetically modified mice models for these enzymes. However, their role in the memory consolidation phase can only be demonstrated by their punctual inhibition, such as through acute administration of pharmacological HDAC inhibitors. Thus, to test our hypothesis that the SIN3A-HDAC complex participates in long term memory formation, we specifically targeted the two entities of this complex by attempting to establish a SIN3A-depleted mouse model or by specifically inhibiting HDACs 1 and 2 through the administration of Compound 60 (Cpd-60) in the dorsal hippocampus. The first results of this thesis work showed a role for SIN3A, but no effect of the Cpd-60 on the consolidation of contextual memory generated by subjecting adult mice to fear conditioning. The first part of this manuscript therefore presents the different approaches we used to target SIN3A and the effects of Cpd-60 injection at the molecular and behavioral levels. The second part of this thesis work addresses the effect of age on the behavioral and brain response of mice to a looming stimulus, mimicking the rapid approach of a flying predator. Adaptive defensive behaviors are essential for species survival. While these behaviors begin to develop early in an individual's life, there is still little knowledge about how they evolve in older individuals. Considering that aging is accompanied by a decline in cognitive and physical functions, we hypothesize that innate fear behaviors and underlying brain mechanisms may undergo modifications with age. This work thus examines this hypothesis by observing the reaction of old mice to a threatening visual stimulus compared to young ones. Our results show that aged mice exhibit a different fear response than younger mice when confronted with the looming stimulus. Unlike young mice, old mice tend to adopt a freezing behavior without seeking for a refuge. Interestingly, this altered behavioral response in aged mice is associated with a distinct pattern of brain functional connectivity compared to young mice, with a deficit in cellular activation in key brain structures that regulate innate fear behaviors.