

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ DE STRASBOURG (ED414)
Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA-UMR7364)

THÈSE présentée par :

Victor Mathis

soutenue le : **08 décembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Biologie/Neurosciences**

**Implication de l'Habénula latérale dans
les processus mnésiques chez le Rat**

THÈSE dirigée par :

M. Jean-Christophe Cassel Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. Pascale Gisquet-Verrier Directrice de Recherches, Université Paris-Sud

M. Bézard Erwan Directeur de Recherches, Université de Bordeaux

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. Jorge Mendoza Chargé de Recherches, CNRS - Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les docteurs Pascale Gisquet-Verrier, Erwan Bézard et Jorge Mendoza de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse et d'avoir enrichi la discussion ayant suivi ma présentation.

Je remercie chaudement mon directeur de thèse et par la même occasion le directeur du LNCA, le professeur Jean-Christophe Cassel. Merci de m'avoir ouvert les portes du laboratoire et communiqué ton amour de la science. Je m'excuse également, tu as dû supporter tous mes délires, au détour d'un couloir ou lorsque tu nous rendais visite dans notre bureau, qu'ils concernent le DREADD ou que ce ne soient que des moments de folie passagère.

Je souhaite également remercier le doyen de la faculté de psychologie et le directeur adjoint du LNCA, le docteur Christian Kelche. Merci « El Rossignolo », tout d'abord de ne pas avoir « acheté », puis d'avoir été une figure paternelle au sein de ce laboratoire. Merci pour ton honnêteté, ton humour et ton soutien. Si le LNCA est une famille c'est grâce à toi.

Merci également aux docteurs Monique Majchrzak et Alexandra Barbelivien, pour toute l'aide que vous m'avez apporté lors de l'étude concernant la mémoire de travail mais aussi pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir.

Merci au docteur Romain Goutagny. Tu as su me communiquer ta vision de la science à travers ta volonté de développer tous les outils techniques les plus récents et innovants. Je te remercie également pour tous les bons moments passés en dehors du laboratoire, grâce à toi j'ai compris que la science était « cool » !

Merci à vous mesdames, les docteurs Anne Pereira de Vasconcelos et Katia Befort. Anouchka merci pour ta bonne humeur et pour le temps que tu as bien accepté de perdre pour relire mon introduction... Cette fois c'est moi qui t'en dois une.

Merci à toi Katess d'avoir apporté dans ce laboratoire ton dynamisme et ta gaieté. Je suis persuadé qu'il y a plein de chose à faire en combinant tes projets et ceux de Lucas. Dommage que la triche à la soirée de Noël vienne entacher ton image...

Merci à toi « Madame Mathis », j'espère que notre homonymie n'a pas été trop difficile à vivre. Je te remercie de m'avoir accepté dans ton équipe, grâce à toi j'ai appris que « Dame nature » avait beaucoup à nous dire.

Je tiens également à remercier le professeur Pierre Veinante d'avoir participé à mon jury de mi-thèse et pour tous ces conseils concernant nos études de traçage.

De la même manière, un grand merci au docteur Béatrice Bothorel, à Dominique Ciocca et Vincent-Joseph Poirel pour leur aide technique et leur disponibilité lors des dosages de corticostérone.

Je remercie également tous les membres du LNCA qui m'ont accompagné durant ma thèse. Merci Dom, Céline, Aline, Daniel, Karine, Laurette, Olivier, Patrick et Patrick pour votre bonne humeur et tous ces moments passés en votre compagnie.

Mes pensées vont également à vous, les « anciens » du LNCA JBB, JBF, Julien, Thibault, Raphaëlle, vous avez grandement contribué à la bonne ambiance du laboratoire. Je n'oublie pas les « nouveaux », Estelle, Caroline, Amélie, Marie-Guému, les frères lumières, bon courage, je n'ai aucun doute sur votre capacité à créer une ambiance chaleureuse et je vous souhaite toute la réussite que vous méritez.

Je souhaite également remercier Daniel, Georges et Olivier d'avoir pris le plus grand soin de mes animaux.

J'ai maintenant une partie moins évidente à rédiger car quoi que j'écrive ou dise, je ne parviendrai certainement pas à transmettre le bonheur, la chance voire la fierté que j'ai eu de vous avoir à mes côtés durant ces trois années ou plus.

Des raisons administratives ont empêché que ton nom apparaisse sur cette thèse, c'est donc ici que je te dis merci Lucas, pour tout... Ta patience, ton écoute, tout le savoir que tu as pu me transmettre. Je suis fier d'avoir pu accomplir tant de choses sous ta responsabilité. Merci également de m'avoir calmé dans mes folies, de m'avoir secoué lorsqu'il le fallait et finalement de m'avoir supporté... Tu es au sommet des directeurs de thèse ! J'espère sincèrement que tous tes projets vont voir le jour

au LNCA et que nous seront encore amenés à travailler ensemble. Maintenant, « y'a plus qu'à ! ».

Merci Pascal ! D'avoir partagé ta passion pour la science et ta bonne humeur délirante. Mais surtout, derrière tous les éclats de rire, les moments barrés, merci pour ton réconfort et ton soutien. Je n'exagérerai pas le propos pour éviter de t'embarrasser. Je garderai également en mémoire ton goût vestimentaire sans pareil !

Merci à vous trois du bureau, Karinette, Birgitte, les mamans du LNCA et Valoche, pour votre bonne humeur. Mes trois années au LNCA n'auraient pas été les mêmes sans vous. J'imagine votre soulagement à l'idée d'un peu de tranquillité. Je vous souhaite tout le bonheur et la réussite possible ! Valentine, j'espère que tes projets se réaliseront. Brigitte et Karine, je vous remercie pour toute l'aide technique que vous m'avez apporté et tout le savoir transmis. Pour tout le reste, je ne sais comment vous remercier, votre bienveillance m'a porté durant toute ma thèse. Brigitte, j'espère que tu pourras oublier cette expérience C-Fos traumatisante... Désolé, mais je me sens obligé d'ajouter une mention spéciale à la responsable des anesthésiques, merci pour ta patience !

Jean-Louis et Caroline, bien qu'arrivés tardivement dans ce bureau, vous avez été des colocataires géniaux, merci !

Mes remerciements vont également à toutes ces personnes qui ont du supporter de loin, parfois sans les comprendre, mes passages autistiques. Merci à vous de m'avoir fait régulièrement oublier ma thèse, sans votre soutien ces trois années auraient été bien plus difficiles à vivre.

Une pensée spéciale à mes coéquipiers, Cédric, Quentin, Justas, Brice, Ben, Jérémy, Sven, Davor, Nemandja, Nikola et Lara. Tous ces moments avec vous ont toujours été de véritables bouffées d'oxygène.

Merci à vous, Nicolas, Hélène, le petit Lucas, Julien, Léo, Hugo, Marine de m'avoir permis de garder le moral, d'avoir supporté le caractère parfois difficile que j'ai pu avoir... Sans vous en apercevoir vous appartenez à ces travaux de thèse.

Merci également à Titi (surout pour ton humour inqualifiable), Jacques, Anne-Cécile, Juliette, Mathieu et Jojo-Gaston, je n'imaginai pas que des voisins pourraient être d'un tel réconfort et soutien ! Merci !

Un grand merci à mes parents et à toi, Delph, d'être cet éternel soutien...

Enfin, un immense merci à toi Clémentine, j' imagine ta souffrance quotidienne...
Merci d'être celle que tu es pour me supporter et pour me guider parfois. Espérons que nos rêves se réalisent, je t'aime.

Table des matières

Avant-propos	
1. Cadre générale de la recherche	I
2. Objectifs et déroulement des travaux	III
3. Structure de la thèse	VII
Introduction	1
1. Le complexe habénulaire	2
2. L'habénula latérale	5
2.1. Anatomie générale.....	5
2.2. Connectivité de l'HbL.....	6
2.3. Les récepteurs présents au sein de l'HbL.....	9
2.4. Caractérisation des neurones de l'HbL.....	11
2.5. L'HbL, une structure idéalement positionnée au centre du cerveau	15
2.6. Fonctions.....	16
3. La mémoire	28
3.1. Généralités et classification des mémoires	28
3.2. La classification des mémoires.....	29
3.3. Mémoire à court terme	29
3.4. La mémoire à long terme	30
3.5. Les processus mnésiques.....	34
3.6. Neuroanatomie de la mémoire	44
3.7. Neurochimie de la mémoire	53
3.8. Modélisation de la mémoire chez le rongeur	58
4. Habénula et mémoire	65
4.1. La connectivité de l'HbL au service des processus mnésiques ?.....	65

4.2.	<i>L'HbL, est-elle impliquée dans les processus mnésiques à travers les autres fonctions auxquelles elle participe ?</i>	66
	Matériels et méthodes	72
	Matériels et méthodes	73
1.	Souche utilisée	73
2.	Conditions d'élevage	73
3.	Interventions chirurgicales	74
3.1	<i>Implantation de guides canules</i>	74
3.2.	<i>Traceurs rétrogrades et antérogrades</i>	77
3.3.	<i>Procédure de micro-instillation</i>	78
4.	Évaluation de la mémoire de travail en cage de conditionnement opérant	82
4.1.	<i>Principe de la tâche</i>	83
4.2.	<i>Restriction alimentaire</i>	83
4.3.	<i>Dispositif</i>	84
4.4.	<i>Protocole d'acquisition</i>	85
4.5.	<i>Variables analysées</i>	90
5.	Évaluation de la mémoire de référence spatiale en piscine de Morris	90
5.1.	<i>Principe du test</i>	90
5.2.	<i>Dispositif</i>	91
5.3.	<i>Protocole expérimental</i>	91
5.4.	<i>Variables analysées</i>	94
5.5.	<i>Protocoles d'inactivation</i>	95
6.	Évaluation du niveau d'anxiété à l'aide du labyrinthe en croix surélevé	95
6.1.	<i>Principe du test</i>	95
6.2.	<i>Dispositif</i>	96
6.3.	<i>Conditions de test</i>	97
6.4.	<i>Déroulement du test</i>	97

7.	Evaluation du niveau d'anxiété en champ ouvert	98
7.1.	<i>Principe du test.....</i>	98
7.2.	<i>Dispositif</i>	98
7.3.	<i>Déroulement du test</i>	99
7.4.	<i>Variables analysées.....</i>	100
8.	Mesure de l'activité locomotrice en cage d'élevage	100
8.1.	<i>Dispositif</i>	100
8.2.	<i>Déroulement de la mesure.....</i>	101
9.	Evaluation de la coordination motrice	101
9.1.	<i>Principe du test.....</i>	101
9.2.	<i>Dispositif</i>	101
9.3.	<i>Déroulement de l'expérience</i>	102
10.	Prélèvements sanguins et dosages de corticostérone	103
10.1.	<i>Prélèvements sanguins.....</i>	104
10.2.	<i>Prélèvements sanguins sans tests comportementaux</i>	106
10.3.	<i>Prélèvements sanguins en situation de test comportemental</i>	107
10.4.	<i>Dosage de corticostérone.....</i>	107
11.	Techniques histologiques	108
11.1.	<i>Mise à mort des animaux et prélèvement des cerveaux.....</i>	108
11.2.	<i>Coupes des cerveaux</i>	110
11.3.	<i>Vérifications histologiques</i>	110
12.	Statistiques	111
	Résultats	112
1.	Publication 1: Etude de l'implication de l'HbL et de la connexion CPFm-HbL dans la mémoire de travail ..	114
2.	Conclusion de la publication 1.....	115

3. Publication 2: Etude de l'implication de l'HbL dans l'encodage et le rappel d'une mémoire spatiale de référence.....	116
3.1. Résultats complémentaires	117
3.2 Conclusion du second test de rétention.....	118
3.3 Conclusions générales de la publication 2 et des résultats complémentaires.....	119
3.4 Expérience complémentaire : possible latéralisation fonctionnelle de l'HbL.....	120
4. Rôle de l'HbL dans la gestion du stress et les comportements anxieux	124
4.1 Introduction.....	124
4.2 Evaluation du niveau d'anxiété en CO :.....	125
4.3 Matériels et méthodes	125
4.4 Résultats.....	126
4.5 Conclusions du comportement en CO :.....	129
4.6 Evaluation de la réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien	131
4.7 Conséquences d'une inactivation de l'HbL sur les niveaux de corticostérone en condition de test comportemental en piscine de Morris.....	135
Test de rétention : Les résultats comportementaux sont présentés sur la figure 59.....	136
4.8 DONNÉES CORTICOSTÉRONNE.....	139
4.9 CONCLUSIONS	140
Discussion	141
1. Récapitulatif.....	142
2. Considérations techniques.....	142
3. Rôle de l'HbL dans les processus mnésiques	146
4. L'HbL comme interface entre émotions et cognition.....	148
5. Interprétations alternatives	151
6. Vers une théorie unifiée du rôle de l'HbL	152
7. Perspectives.....	155
7.1 Inclure l'HbL dans le réseau cérébral responsable de la MdT.....	155

7.2 Etudier l'organisation interne de l'HbL.....	155
7.3 Etudier le rôle de l'HbL dans une mémoire émotionnelle.....	156
Annexes	158
Mise en place de la technique pharmacogénétique, le DREADD	159
1. Introduction.....	159
1.1 L'outil pharmacogénétique.....	159
1.2 Les RcpG, des récepteurs de choix pour le DREADD.....	160
2. Le DREADD.....	161
2.1 Les vecteurs viraux.....	162
2.2 Les VAA, les vecteurs viraux par excellence ?.....	164
2.3 La spécificité du DREADD.....	165
2.4 Les avantages du DREADD.....	166
3. Matériels et méthodes.....	167
3.1 Souche utilisée et condition d'élevage.....	167
3.2 Vecteur viral utilisé	167
Représentation du vecteur viral utilisé lors de nos expériences (récupérée sur le site web d'UNC Vector Core, University of North Carolina).	168
3.3 Procédure chirurgicale d'instillation des virus	168
3.4 Injection de CNO	169
3.5 Test comportementaux.....	169
3.6 Résultats	170
Comparaison avec la méthode de micro-instillation.....	172
4. Conclusion	174
5. Perspectives.....	174
Bibliographie.....	177

Liste des figures

Introduction

Figure 1 anatomie de l'HbL.....	2
Figure 2 Asymétrie de l'Hb chez les téléostéens et chez l'Homme.	3
Figure 3 localisation des sous-régions de l'Hb chez les téléostéens et chez les mammifères.....	4
Figure 4 Organisation des sous-régions de l'HbL et de l'HbM.....	5
Figure 5 Les afférences et efférences principales de l'HbL chez le Rat	7
Figure 6 L'HbL un centre intégrateur cérébral	9
Figure 7 Morphologie et profils électrophysiologiques des neurones de l'HbL	12
Figure 8 Le contrôle de l'HbL sur les différents systèmes de neurotransmission	16
Figure 9 L'HbL code la « non-récompense ».....	17
Figure 10 Activité électrique du réseau reliant le GPi, l'HbL et les neurones dopaminergiques lors d'une situation non récompensante.....	18
Figure 11 Immunomarquage C-Fos dans l'HbL suite à différents stress chez le Rat.	21
Figure 12 L'HbL comme interface entre émotions et cognition.....	27
Figure 13 Représentation schématique des différentes mémoires humaines, adaptée de Squire et Zola-Morgan, 2015.....	29
Figure 14 Schéma des trois étapes nécessaires à la formation et au rappel d'un souvenir.....	34
Figure 15 « États » du souvenir en fonction du temps.....	35
Figure 16 Formation d'assemblée de neurones impliqués dans un souvenir	37
Figure 17 Les principales théories de la consolidation systémiques	40
Figure 18 Les neurones mis en jeu lors de l'apprentissage sont nécessaire au rappel d'un souvenir	43
Figure 19 Les différents « systèmes » de mémoire	46
Figure 20 Le labyrinthe radial à huit bras	60
Figure 21 Le test de la piscine de Morris.....	62
Figure 22 Schéma d'un protocole de conditionnement de peur chez le rongeur.....	64
Figure 23 Liens de l'HbL avec les systèmes de mémoire et les centres neuromodulateurs.....	66

Figure 24 l'HbL une structure responsable de la suppression motrice	67
Figure 25 Etudes du rôle de l'HbL dans une mémoire épisodi-like chez le Rat.....	68
Figure 26 Etude de l'inactivation de l'HbL sur les performances mnésiques ainsi que des cohérences d'activité au rythme thêta entre l'HbL et l'HPC lors d'une tâche de reconnaissance spatiale chez le rat.....	69
Matériels et méthodes	
Figure 27 : Photo d'un rat Long-Evans	73
Figure 28 : Implantation de guides canules chez le Rat	75
Figure 29 : Dispositif de micro-instillation	77
Figure 30 : Procédure de micro-instillation	79
Figure 31 : Décours temporel des micro-instillations précédant les tests comportementaux.....	82
Figure 32 Dispositif de NADP	84
Figure 33 : Protocole d'acquisition de la règle de NADP	87
Figure 34 : La tâche de NADP.....	89
Figure 35 : La piscine de Morris	91
Figure 36 : Protocole de piscine de Morris	92
Figure 37 : Schéma (a) du couloir de thigmotaxie dans la piscine de Morris et (b) de l'annulus autour de la plateforme.....	94
Figure 38 : photographie (a) et schéma (b) du dispositif du labyrinthe en croix surélevé.....	96
Figure 39 Ledispositif du champ ouvert.....	99
Figure 40 : Déroulement du test en CO	99
Figure 41 Photographie d'une cage d'élevage dans le système d'actographie	100
Figure 42 Test de la barre	102
Figure 43 : Axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien.....	104
Figure 44 Prélèvements sanguins	105
Figure 45 : Décours temporel des prélèvements en cage d'élevage	106
Figure 46 : Schéma du décours temporel des prélèvements sanguins lors du test de piscine de Morris.	107
Figure 47 Méthode de dosage RIA.....	108

Résultats

Figure 48 Résultats obtenus suite à l'instillation de muscimol et de LCRa lors d'une expérience préliminaires de MdT.....	114
Figure 49 Résultats du second test de rétention.	117
Figure 50 Distance moyenne au cours des cinq jours d'apprentissage pour les différents groupes de rats.	122
Figure 51 Représentation de plusieurs variables analysées lors du test de rétention.	123
Figure 52 Le dispositif du champ ouvert.....	126
Figure 53 Résultats de la première session de champ ouvert.....	128
Figure 54 Résultats des trois champs ouverts.....	129
Figure 55 Décours temporel des prélèvements en cage d'élevage	132
Figure 56 Décours temporel des prélèvements lors du test de piscine de Morris... ..	133
Figure 57 Résultats des dosages de CORT plasmatique suite à l'inactivation de l'HbL à l'aide de muscimol ou de CNQX.	134
Figure 58 Résultats de l'apprentissage en piscine de Morris.....	137
Figure 59 Résultats du test de rétention	138
Figure 60 Résultat des dosages de corticostérone en piscine de Morris.....	139

Discussion

Figure 61 Effets de nos composés pharmacologiques instillés dans l'HbL	145
Figure 62 L'HbL, une structure intégratrice des informations externes et internes ?	153
Figure 63 L'HbL : un centre intégrateur responsable de l'adaptation comportementale ?.....	154
Figure 64 Proposition d'un circuit préfronto-habénulo-mésencéphalique	156

Annexes

Figure 1 Les récepteurs couplés aux protéines G	160
Figure 2 Les principaux DREADD utilisés en Neurosciences.....	161
Figure 3 Les vecteurs viraux.....	163
Figure 4 Différence d'expression de la GFP exprimée par des neurones infectés par différents sérotypes de VAA.	165
Figure 5	168
Figure 6 Photographie de neurones de l'HbL exprimant le DREADD.....	171
Figure 7 Activité locomotrice des rats suite aux différentes injections IP de NaCl et CNO	172
Figure 8 Comparaison des techniques de micro-instillations et du DREADD sur l'activité locomotrice des rats.....	173
Figure 9 le « rétro-DREADD ».....	175

Liste des abréviations

5-HT	sérotonine
Ac	anticorps
ACh	acétylcholine
AChE	acétylcholine estérase
Ag	antigène
Amg	amygdale
AMG _{BLA}	amygdale basolatérale
AMPA	Récepteur glutamatergique de type α -amino-3hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
APOL	aire préoptique latérale
ATV	aire tegmentale ventrale
BDA	dextran amine biotinylé
CNO	clozapine-N-oxyde
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CO	champ ouvert
CORT	corticostérone
CPF	cortex préfrontal
CPF(PrL)	cortex préfrontal, sous-région prélimbique
CPFdl	cortex préfrontal dorso-latéral
CPFm	cortex préfrontal médian
CPP	conditionnement de préférence de place
CTb	sous-unité β de la toxine cholérique
CxHb	complexe habénulaire
DA	dopamine
DILD	dyskinésie induite par le traitement à la levodopa
DLT	dépression à long terme
DREADD	Designer receptor especially activated by designer drug
fr	<i>fasciculus retroflexus</i>
GABA	acide γ -aminobutyrique
GABA _A	récepteurs GABAergiques de type A
GABA _B	récepteurs GABAergiques de type B

GAD	glutamate décarboxylase
GB	ganglions de la base
GPI	partie interne du globus pallidus
Hb	habénula
HbL	habénula latérale
HBLI	partie latérale de l'habénula latérale
HbLm	partie médiane de l'habénula latérale
HbM	habnéula médiane
HHS	(axe) hypothalamo-hypophysaire surrénalien
HL	hypothalamus latéral
HPCd	hippocampe dorsal
HPCv	hippocampe ventral
IP	(injection) intra-péritonéale
IRMf	imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
LCRa	liquide céphalo rachidien artificiel
L-dopa	levodopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)
MCT	mémoire à court terme
MdT	mémoire de travail
mGluR	récepteur métabortopique au glutamate
MLT	mémoire à long terme
MRS	mémoire de référence spatiale
NA	noradrénaline
Nac	Nyau accumbens
NaCl	chlorure de sodium
NADP	non appariement différé à la position
NE	noyau entopédonculaire
NMDA	Récepteur glutamatergique de type N-méthyl-D-aspartate
NSC	noyau suprachiasmatique
PAF	paraformaldéhyde
PAG	substance grise périaqueducale
PLT	potentialisation à long terme
PV	pallidum ventral
q ATV	queue de l'aire tegmentale ventrale

RF(n)	ratio fixe (nombre d'action à faire pour obtenir une récompense)
RIA	(méthode de dosage) radio-immunologique
SCDD	système de conduction diencéphalique dorsal
Sm	strie médullaire
SN	substance noire
SP	sommeil paradoxal
TH	tyrosine hydroxylase
VachT	transporteur vésiculaire à l'acétylcholine
VgluT	transporteur vésiculaire du glutamate

Avant-propos

1. Cadre générale de la recherche

L'habénula latérale (HbL) est une structure diencephalique, conservée au cours de l'évolution, appartenant au système de conduction diencephalique dorsal.

Différentes études ont permis de décrire de nombreuses projections en provenance de structures limbiques mais aussi pallidales vers l'HbL. Sa connectivité lui confère la capacité de moduler différents systèmes de neurotransmission, comme notamment les centres dopaminergiques et sérotoninergiques mésencéphaliques.

Cette description a longtemps fait de l'Hbl un simple relai d'informations télencéphaliques vers le mésencéphale. Néanmoins, peu d'études ont décrit comment l'intégration de telles informations se fait au sein de l'HbL.

Ce n'est que récemment que les recherches ciblant les fonctions de l'HbL ont pris leur essor. En effet, des travaux de Matsumoto et Hikosaka ont démontré que l'HbL était un lien entre le globus pallidus et l'aire tegmentale ventrale permettant de coder un signal de « non récompense » au sein du système nerveux central. Ces travaux princeps ont ainsi placé l'HbL au centre de différentes thématiques de recherche concernant les comportements récompensés. Récemment, différents travaux ont également montré, à l'aide de l'outil optogénétique que, suite à la modulation de l'activité de différentes populations de neurones de l'HbL, les comportements d'approche et d'évitement pouvaient être perturbés.

Pour résumer l'état des connaissances actuelles, l'HbL semble être une structure capable d'anticiper et d'intégrer différentes informations corticales, pallidales ou encore hypothalamiques concernant la valence émotionnelle d'une situation donnée et de participer à la sélection du comportement le mieux adapté à cette situation.

Ces rôles et la multiplicité d'informations qu'elle reçoit laissent supposer que plus qu'une structure relai entre le télencéphale et le mésencéphale, l'HbL pourrait être un véritable intégrateur impliqué dans la sélection d'actions appropriées.

Hikosaka proposait en 2010 déjà, que par ce rôle dans la sélection d'actions adaptées, l'HbL aurait évolué pour passer d'une structure nécessaire à la

Avant-propos

suppression motrice à une structure appartenant à un « réseau mnésique » et ainsi capable d'intervenir dans les processus d'apprentissage et de mémoire. En effet, un individu confronté à une situation doit pouvoir évaluer cette dernière mais aussi la confronter à ce qu'il connaît. De ce fait, il est nécessaire d'intégrer de nombreuses informations concernant l'action en cours et tous les souvenirs potentiellement intéressants qui permettraient de déclencher un comportement adapté.

Certains travaux ont déjà supposé un rôle potentiel de l'HbL dans la mémoire. Cependant, son rôle dans les fonctions mnésiques est encore méconnu. Ainsi, cette dernière, grâce à ses fonctions de signal de non récompense et de sélection d'actions adaptées pourrait être intégrée à un réseau d'apprentissage et de mémoire.

C'est sur cette hypothèse de travail d'une implication potentielle de l'HbL dans les processus d'apprentissage et de mémorisation que nos expériences se sont basées. Nous avons ainsi cherché à mettre en évidence l'implication de cette structure dans différents types de processus mnésiques. Suite à ces premiers travaux et aux résultats qu'ils ont engendrés, une partie de ma thèse a ensuite visé à évaluer la conséquence de l'inactivation de l'HbL dans les réactions comportementales et physiologiques face à des situations anxiogènes.

Ainsi, lors de nos différentes études nous avons cherché à mettre en évidence le rôle de l'HbL dans différents processus mnésiques, de l'écarter du simple rôle de relai d'informations mais aussi de la considérer comme une structure se situant à l'interface des processus mnésiques et émotionnels.

2. Objectifs et déroulement des travaux

L'objectif premier de ma thèse a été d'étudier l'implication potentielle de l'HbL dans les différents processus de mise en place et de restitution d'une mémoire de référence spatiale (i.e. l'encodage, la consolidation et le rappel) chez le Rat.

Pour cela les travaux initiaux ont eu pour but d'inactiver de façon réversible l'HbL par instillation d'un agoniste GABAergique, le muscimol, lors d'un test de mémoire de référence spatiale (la piscine de Morris). Au vu de nos résultats, nous avons également utilisé, dans la même tâche comportementale, un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type AMPA/Kaïnate, le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), afin de bloquer spécifiquement ce type d'entrée neurochimique.

Ces expériences ont montré que l'HbL est impliquée dans l'encodage et le rappel, mais pas la consolidation, d'une mémoire spatiale. Ce premier résultat a donc placé l'HbL comme une structure impliquée uniquement dans les phases de mémoire dites actives ou « processus online », durant lesquels les animaux sont confrontés à une situation comportementale. L'utilisation de deux composés différents a également permis de mettre en évidence que la neurotransmission glutamatergique semblait être impliquée uniquement dans les processus mnésiques étudiés alors qu'une perturbation plus globale de l'HbL par le muscimol provoquait des déficits mnésiques, mais également émotionnels dans d'autres tests comportementaux.

Ces résultats, suggérant des perturbations qui ne seraient pas uniquement d'ordre mnésique, nous ont conduit à d'étudier de potentiels effets insoupçonnés de l'inactivation de l'HbL difficiles à mettre en évidence lors du test de piscine de Morris. Ainsi, l'inactivation de l'HbL semble également perturber la capacité des rats à répondre de façon adaptée à une situation stressante (le labyrinthe en croix surélevé) sans perturber leur comportement locomoteur ou leur coordination motrice.

L'ensemble des déficits observés suggère que l'HbL est une structure impliquée dans des processus mnésiques « online » visant à adapter la réponse comportementale des animaux dans d'une situation donnée.

De cette manière nos résultats, détaillés dans la publication 1, sont apparus cohérents avec l'hypothèse plaçant l'HbL à l'interface des processus mnésiques et émotionnels.

Avant-propos

Nous avons ensuite cherché à approfondir l'implication de l'HbL dans ces processus mnésiques « online ».

Pour cela nous avons décidé d'évaluer les conséquences de l'inactivation de l'HbL lors d'un paradigme de mémoire de travail chez le Rat. Une telle tâche comportementale demande à l'animal d'acquérir, de stocker, d'utiliser et enfin de ne plus tenir compte d'une information.

Dans un premier temps nous avons entraînés les animaux dans un paradigme de non-appariement différé à la position. Ce dernier nous a permis d'évaluer la capacité des animaux à stocker et utiliser une information pendant différents délais (0, 2, 4 et 8 secondes) en vue d'obtenir une récompense. Suite à l'inactivation de l'HbL nous avons pu observer des déficits dépendants des délais utilisés. De cette manière, l'HbL apparait impliquée dans les processus nécessaires à la mémoire de travail.

Afin d'approfondir un peu plus cette implication dans les processus liés à la mémoire de travail, nous avons cherché à évaluer le lien entre le cortex préfrontal médian (CPFm) et l'HbL. Il est largement décrit que la mémoire de travail est dépendante du fonctionnement du CPFm, structure projetant de manière unidirectionnelle et majoritairement ipsilatérale à l'HbL. Nous avons ainsi cherché à évaluer l'importance de la relation CPFm-HbL dans le même paradigme expérimental de non appariement différé à la position. Pour cela nous avons déconnecté pharmacologiquement les deux structures par instillation de muscimol au sein du CPFm d'un hémisphère et de l'HbL controlatérale. Un tel protocole lors de la tâche a induit des déficits encore plus marqués que lors de l'inactivation de l'HbL seule.

Ces résultats ont suggéré une importance fonctionnelle encore insoupçonnée du lien CPFm-HbL dans des processus mnésiques « online ». Ces résultats sont détaillés dans la publication 2.

Par la suite nous avons essayé d'approfondir le lien entre l'inactivation de l'HbL et la gestion d'une situation anxiogène. Pour cela nous avons évalué la réponse comportementale des animaux face à une situation anxiogène lors de différents paradigmes expérimentaux. Ces expériences ont confirmé le rôle de l'HbL dans les comportements anxieux. Nous avons également mesuré la réponse physiologique au stress des animaux par dosage de la corticostérone sanguine circulante, après

Avant-propos

inactivation de l'HbL lors de différents paradigmes expérimentaux. De cette manière nous avons pu observer que les inactivations de l'HbL provoquaient une augmentation des niveaux de corticostérone sanguine en cage d'élevage. Ce premier résultat suggérait une possible modulation de l'axe de réponse au stress [axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (axe HHS)] par l'HbL. Cependant, cet effet de l'inactivation de l'HbL sur l'axe HHS a été beaucoup plus discret lors du test comportemental de piscine de Morris. Ainsi, il semble que l'activité de l'HbL participe à la sélection de réponses comportementales adaptées à une situation stressante et module d'une certaine manière l'axe HHS.

Cependant, cette modulation ne semble pas à elle seule pouvoir expliquer les modifications comportementales observées suite à l'inactivation de l'HbL.

Ces résultats confirment un lien important entre l'HbL et les émotions mais nos expériences ne nous ont pas permis de mettre en évidence des mécanismes possibles par lesquels l'HbL interviendrait dans la gestion de situations anxiogènes.

Pour résumer, nos travaux ont tout d'abord visé à évaluer la place de l'HbL dans les processus mnésiques. Au regard des résultats obtenus, nous avons élargi nos recherches à sa possible implication dans les comportements de gestion du stress. Cette volonté de placer l'HbL à l'interface de la cognition et des émotions est apparue cohérente avec l'évolution des travaux concernant ses circuits internes et les réseaux dans lesquels elle semble s'inscrire. En effet, ces dernières années les hypothèses concernant l'HbL ont évolué pour la considérer comme un véritable centre intégrateur cérébral et non plus comme un simple relai télencéphalique.

Nos travaux se sont donc inscrits dans cette hypothèse et ont cherché à décrire l'importance de l'HbL dans la gestion active d'informations mnésiques, mais également son importance dans l'intégration de la valence émotionnelle d'une situation connue ou à acquérir. Un tel rôle permettrait *in fine* de déclencher le comportement le plus adapté pour faire face à cette situation.

Enfin, une partie de ma 3^{ème} année de thèse a consisté à mettre en place au laboratoire l'outil pharmacogénétique (appelé DREADD, pour Designer Receptor Especially Activated by Designer Drug). Ces travaux seront présentés en annexe de ce manuscrit.

Avant-propos

A l'aide de vecteurs viraux, le DREADD permet de cibler des populations spécifiques de neurones et ainsi de pallier certains inconvénients liés aux micro-instillations. Il semble aussi pouvoir mieux répondre aux interrogations qui ont émergées au vu des résultats obtenus lors de nos différentes études, en permettant notamment l'identification précise des neurones inactivés et donc un contrôle neuroanatomique précis de la région ciblée. L'inactivation est basée sur l'infection virale de neurone, permettant l'expression d'un récepteur (dans notre cas un récepteur muscarinique humain modifié) activé par un ligand spécifique (ici la clozapine-N-oxyde (CNO)). L'inactivation des neurones infectés se fait ensuite par administration intrapéritonéale de la CNO.

Concrètement, ce développement technique a essentiellement consisté à acquérir les virus puis à mettre en place les paramètres nécessaires à l'inactivation de l'HbL (choix des volumes et des coordonnées d'injection, temps d'attente pour l'infection virale et enfin dose de ligand optimale) en fonction des informations décrites dans la littérature. Dans un second temps nous avons cherché à valider le DREADD dans nos conditions expérimentales. Pour cela nous avons collaboré avec une équipe strasbourgeoise afin de vérifier que l'infection virale permettait bien le contrôle de l'activité des neurones après injection de la dose de ligand exogène choisie. Nous avons également effectué différents tests comportementaux afin d'évaluer les effets de l'inactivation pharmacogénétique de l'HbL dans les paradigmes que nous avons utilisés.

3. Structure de la thèse

Cette thèse – structurée sur la base d'articles parus - suivra le cheminement suivant : Dans une première partie je décrirai l'habénula latérale. Je développerai son aspect anatomique, neurochimique et électrophysiologique. Je passerai ensuite en revue les différentes fonctions auxquelles elle participe. Une deuxième partie concernera la mémoire, ou plus précisément les mémoires humaines. Je décrirai également les processus mnésiques nécessaires à la mise en place et au rappel d'un souvenir ainsi que la neuroanatomie et la neurochimie de la mémoire. Une telle description nécessiterait plusieurs ouvrages, ainsi ces chapitres seront orientés vers les processus, structures et systèmes de neurotransmission les plus pertinents au regard de nos résultats. Ensuite, une partie « modélisation chez le rongeur » permettra d'accorder les modèles animaux avec la définition faite de la mémoire humaine. Dans la dernière partie j'aborderai les systèmes de mémoire, dans lesquels l'habénula latérale peut prendre place.

Cette introduction générale sera suivie par la description des matériels et méthodes utilisés lors de ma thèse. La présentation des résultats prendra la forme des publications issues des travaux effectués et, le cas échéant, ces publications seront suivies de résultats complémentaires non publiés mais apportant des informations supplémentaires à nos résultats. Ces publications seront suivies des résultats non encore publiés.

La partie « discussion générale et perspectives » permettra d'aborder de manière synthétique les principaux résultats de ces travaux et de les confronter aux données de la littérature. Cette discussion se conclura par la mise en perspective et les pistes de réflexions ouvertes par ces résultats.

Enfin, la partie Annexe comprendra la description de la mise en place de la technique pharmacogénétique. Après une brève introduction, le matériel et méthodes sera suivi des premiers résultats obtenus avec cette technique. Une conclusion sur cette partie me permettra d'évaluer les avancés mais également les problèmes engendrés par cette nouvelle technique innovante ou encore de comparer le DREADD aux micro-instillations.

Introduction

Introduction

1. Le complexe habénulaire

L'habénula (Hb), ou complexe habénulaire (CxHb), est une structure cérébrale paire appartenant à l'épithalamus. Chez l'Homme, comme chez le rongeur, ce complexe se situe dorsalement au thalamus et borde le troisième ventricule (Concha and Wilson 2001; Díaz et al. 2011; Weiss and Veh 2011) (*cf. figure 1a et b*). Sa forme oblongue et sa position anatomique lui donnent l'apparence d'un lien reliant le thalamus à l'épiphyse, autour du troisième ventricule. Ces caractéristiques ont inspiré les neuroanatomistes qui lui donnèrent son nom, signifiant sangle ou petites rênes en latin.

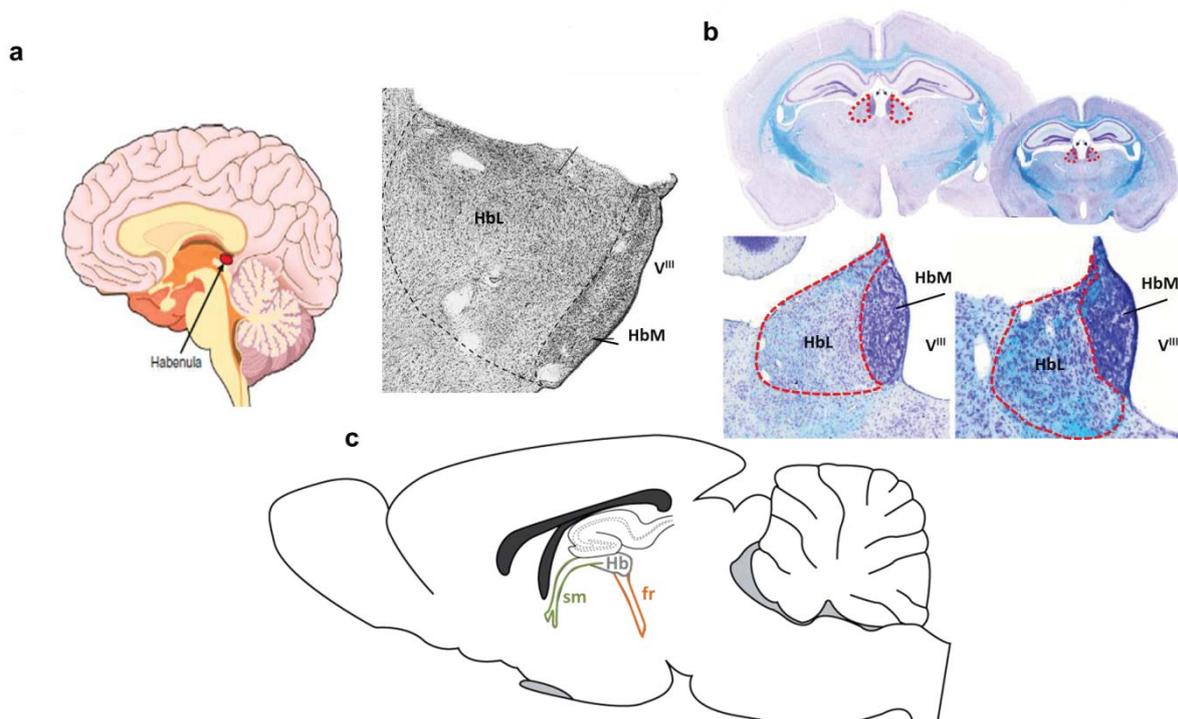


Figure 1 anatomie de l'HbL

Position anatomique de l'Hb chez l'Homme (a) et sur des coupes coronales de Rat (b, gauche) et de Souris (b, droite). Les sous-régions médiane et latérale sont distinguées (pointillés rouges). (c) le système de conduction diencephalique dorsal, représenté sur un schéma d'une coupe sagittale de Rat, avec la strie médullaire (verte), l'Hb (grise) et le fasciculus retroflexus (orange). Figure inspirée de Díaz et al., 2011, Wagner et al., 2014, Namboodiri et al., 2016 et de Paxinos et Watson, 2007.

D'un point de vue phylogénétique, l'Hb se situe au sein du système de conduction diencephalique dorsal (SCDD) (Sutherland, 1982) et est présente chez tous les vertébrés (Aizawa et al., 2011; Concha and Wilson, 2001; Villalón et al., 2012), depuis la lamproie, considérée comme le plus ancien taxon de vertébré connu, jusqu'à l'Homme (Yañez and Anadon, 1994; Díaz et al., 2011). Le SCDD comprend, en plus de l'Hb, la strie médullaire (sm) et le *fasciculus retroflexus* (fr) (Sutherland,

Introduction

1982) et permet d'acheminer des informations depuis le télencéphale jusqu'au mésencéphale (*cf. figure 1c*).

De nombreuses différences anatomiques ont été observées entre les espèces. La première est l'asymétrie de l'Hb (*cf. figure 2*), largement décrite chez différents téléostéens, la classe majoritaire actuelle de poissons (Villalón et al., 2012). Bien que toujours présente chez l'Homme, cette particularité est essentiellement retrouvée chez les espèces inférieures et diminue progressivement au cours de l'évolution (*cf. figure 2*) (Ahumada-Galleguillos et al., 2016). Ainsi, l'Hb est utilisée comme modèle de développement de l'asymétrie cérébrale (Bianco and Wilson, 2009; Concha and Wilson, 2001; Quina et al., 2009; Villalón et al., 2012).

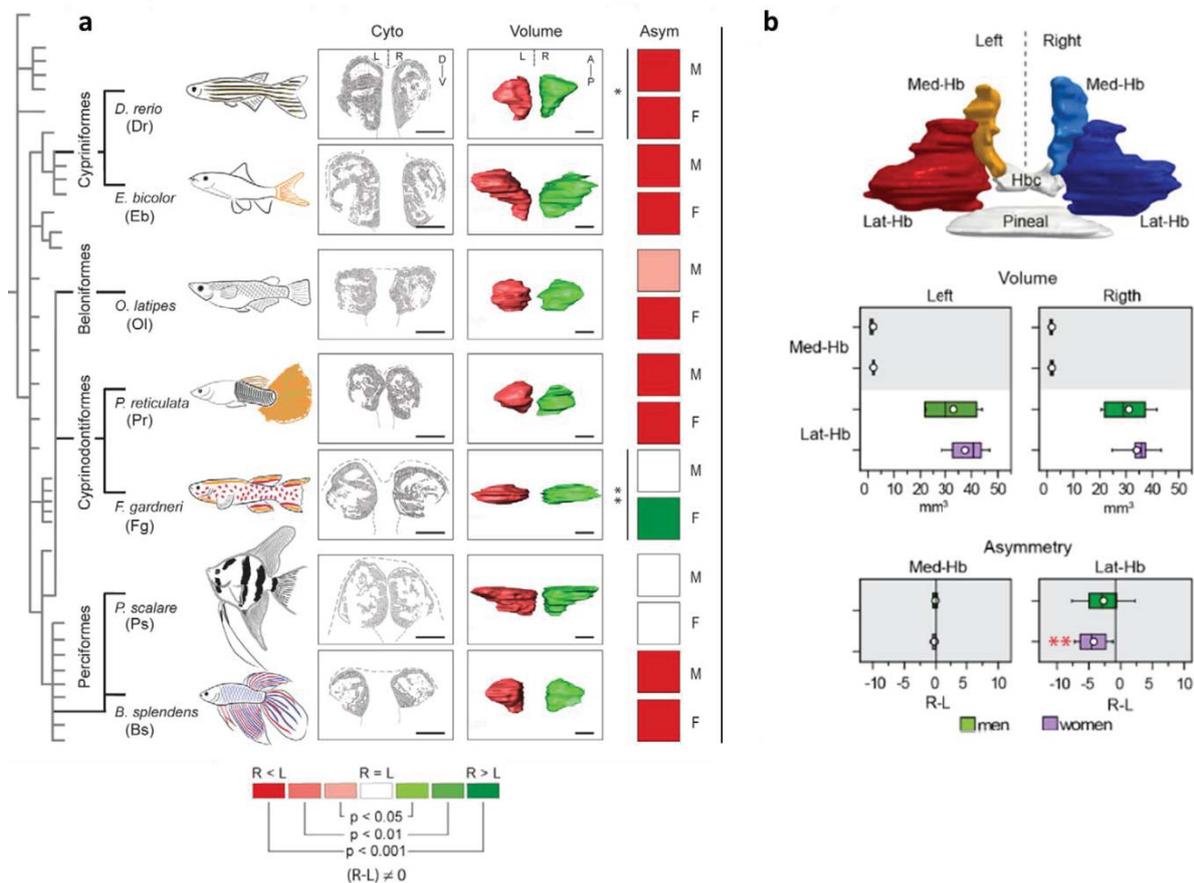


Figure 2 Asymétrie de l'Hb chez les téléostéens et chez l'Homme.

Représentation de la cytoarchitecture, du volume et de l'asymétrie de l'HbL chez différentes espèces de poissons (a) et chez l'Homme (b) (Ahumada-Galleguillos et al., 2016; Villalón et al., 2012).

Cette asymétrie suggère une possible latéralisation des fonctions gérées par l'Hb (Ahumada-Galleguillos et al., 2016; Dreosti et al., 2014; Krishnan et al., 2014). Différentes études ont d'ailleurs démontré une latéralisation de la détection de stimuli lumineux et olfactifs au sein de l'Hb (Dreosti et al., 2014) ; plus précisément l'Hb

Introduction

droite est impliquée dans les comportements d'approche et d'évitement initiés par des odeurs chez le poisson zèbre (Krishnan et al., 2014).

Cependant, à l'heure actuelle, chez l'Homme comme chez le rongeur, aucune étude n'a mis en évidence une latéralisation des fonctions de l'Hb.

Une seconde différence inter-espèce est l'organisation des sous-parties de l'Hb, la scindant en deux grandes sous-régions majeures nommées habénula dorsale et ventrale chez les téléostéens et habénula médiane (HbM) et latérale (HbL) respectivement chez les mammifères (Aizawa et al., 2011; Amo et al., 2010) (*cf. figure 3*). Cette ségrégation interne à l'Hb ne serait apparue que tardivement et aurait évolué suivant les espèces (Yañez and Anadón, 1996).

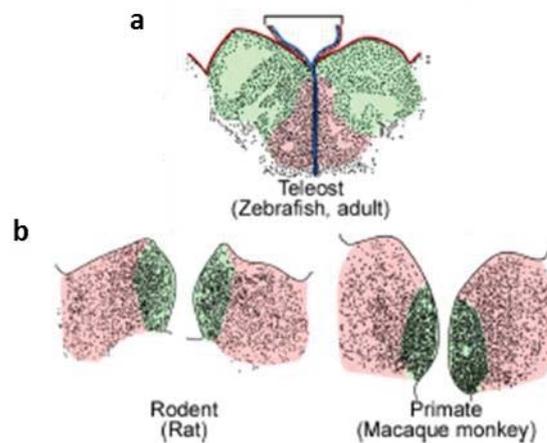


Figure 3 localisation des sous-régions de l'Hb chez les téléostéens et chez les mammifères.

Représentation de la localisation des sous-parties dorsale (vert) et ventrale (rose) chez le poisson zèbre (a) ainsi que leur position médiane et latérale respectivement, chez le rongeur et le primate (b), adapté de Amo et al 2010.

Différents travaux suggèrent que l'HbL, contrairement à l'HbM, ne serait apparue qu'après les téléostéens (Concha and Wilson, 2001; Yañez and Anadon, 1994; Yañez and Anadón, 1996) et serait donc une acquisition évolutive tardive de l'Hb.

Enfin, la taille de l'Hb a augmenté au cours de l'évolution. Chez l'Homme ce phénomène est essentiellement dû à l'augmentation du volume de l'HbL, qui représente 91 % du volume totale de l'Hb, alors qu'il n'est que de 76 % chez le Rat (Díaz et al., 2011). Les auteurs de cette étude supposent que cette augmentation pourrait être proportionnelle à l'augmentation de la taille du cortex et des ganglions de la base (Díaz et al., 2011), qui représentent des afférences majeures de l'HbL chez les mammifères (*cf.2.2.1 Connectivité : les afférences de l'HbL page 6*).

Les modifications morphologiques de l'Hb au cours de l'évolution, comme l'apparition tardive de l'HbL et l'augmentation de son volume suggèrent l'intégration possible de

Introduction

cette dernière dans le développement de circuits cérébraux, impliquant notamment des voies striato-pallidales et corticales (Aizawa et al., 2011; Amo et al., 2010; Concha and Wilson, 2001; Yañez and Anadón, 1996).

2. L'habénula latérale

Nos expériences se sont essentiellement focalisées sur le rôle de l'HbL dans les processus mnésiques. Ainsi, le reste de ce manuscrit portera uniquement sur cette structure. Cependant, quelques informations concernant l'HbM seront ponctuellement données à titre de comparaison. Les paragraphes suivants viseront à décrire au mieux sa connectivité, les types de récepteurs exprimés par ses neurones ainsi que les caractéristiques morphologiques, électrophysiologiques et neurochimiques de ces derniers.

2.1. Anatomie générale

Grâce à des expériences de traçages neuroanatomiques, des études immunohistologiques et des enregistrements électrophysiologiques, 10 sous-régions ont été décrites au sein de l'HbL, chez le Rat comme chez la Souris (Geisler et al., 2003; Wagner et al., 2014, 2016; Weiss and Veh, 2011) (*cf. figure 4a*). L'impossibilité de transposer ces critères d'identification à l'HbL humaine, a empêché une description aussi précise chez l'Homme, où seulement 5 sous-régions ont été observées sur la base d'une coloration de Nissl (Díaz et al., 2011) (*cf. figure 4b*).

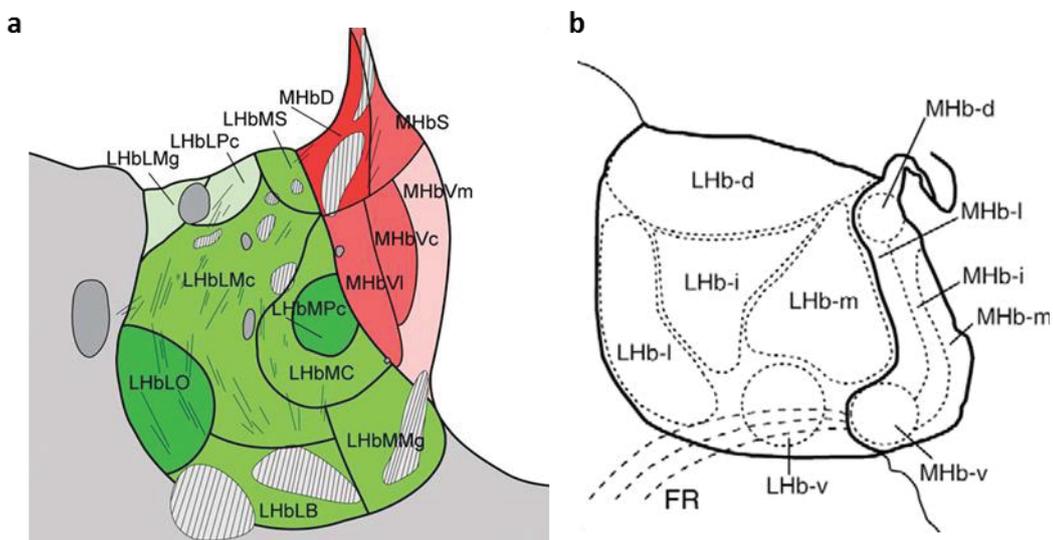


Figure 4 Organisation des sous-régions de l'HbL et de l'HbM

Schémas des 10 sous-régions de l'HbL chez le rongeur (a) et des 5 sous-régions chez l'Homme (b). Ces schémas présentent également les sous-régions de l'HbM (adapté de Díaz et al 2011 et Wagner et al 2014). Abréviations : rongeur : LHbLB : noyau basal de l'HbL latérale, LHbLMc : noyau magnocellulaire de l'HbL latérale, LHbLMg : noyau marginal de l'HbL latérale, LHbLO : noyau oval de l'HbL latérale, LHbLPC : noyau parvocellulaire de l'HbL latérale, LHbMC : noyau central de l'HbL médiane, LHbMMg : noyau marginal de l'HbL médiane, LHbMPc : noyau parvocellulaire de l'HbL médiane, LHbMS : noyau supérieur de l'HbL médiane (seule la sous-région antérieure de l'HbL n'est pas visible sur ce schéma). Homme : LHb-d : noyau dorsal de l'HbL, LHb-m : noyau médian de l'HbL, LHb-v : noyau ventral de l'HbL, LHb-l : noyau latéral de l'HbL, LHb-i : noyau intermédiaire de l'HbL.

Introduction : l'habénula latérale

2.2. Connectivité de l'HbL

2.2.1 *Connectivité : les afférences de l'HbL*

Herkenham et Nauta ont étudié la cartographie des afférences et des efférences de l'Hb (Herkenham and Nauta, 1977, 1979; Nauta, 1974) et ont ainsi pu mettre en évidence que l'HbM et l'HbL ne présentaient presque aucune afférence commune. Seuls les neurones de la bande diagonale de Broca et du raphé médian projettent aux deux sous-régions de l'habénula.

L'une des afférences principales de l'HbL provient du globus pallidus interne (GPi) (le noyau entopédonculaire chez le Rat) (*cf. figure 5*), ce qui fait d'elle une des voies de sortie principales des ganglions de la base (GB) (Herkenham and Nauta, 1977; Rajakumar et al., 1993). Différentes études ont essayé de distinguer et de préciser l'organisation de ces afférences du noyau entopédonculaire (NE) et ont estimé qu'elles ciblaient la partie latérale de l'HbL (HbLI) (Nauta, 1974; Parent et al., 1981, 2001; Rajakumar et al., 1993; Zhang and Oorschot, 2006). Plus précisément, la partie latérale du NE, considérée comme limbique, projetterait spécifiquement sur l'HbLI (Parent et al., 1981, 2001). Des comptages stéréologiques de neurones menés chez le rat ont permis d'estimer qu'environ 1000 à 2000 neurones du NE pouvaient projeter sur environ 6500 des 13 000 neurones de l'HbL (Oorschot, 1996; Zhang and Oorschot, 2006). Ainsi, une voie de projection depuis le NE vers l'HbLI pourrait relayer des informations limbiques, plutôt que motrices, en provenance des GB (Parent et al., 2001).

D'autres régions cérébrales, comme l'hypothalamus latéral (HL) et l'aire préoptique latérale (APOL) ont été décrites comme voies afférentes majeures de l'HbL (Herkenham and Nauta, 1977; Parent et al., 2001) (*cf. figure 5*).

L'HbL reçoit également des afférences, dans une moindre mesure, depuis le pallidum ventral (PV), le noyau accumbens (NAc), le bulbe olfactif, la rétine, le noyau suprachiasmatique (NSC), le septum, la bande diagonale de Broca, le cortex préfrontal (CPF, les régions insulaire, prélimbique, infralimbique, et cingulaire), la substance grise périaqueducule (PAG), le noyau du lit de la strie terminale et la lamina I de la corne dorsale de la moelle épinière (Craig, 2003; Geisler and Trimble, 2008; Golden et al., 2016; Greatrex and Phillipson, 1982; Herkenham and Nauta, 1977, 1979; Hikosaka, 2010; Hikosaka et al., 2008; Kim and Lee, 2012; Lammel et

Introduction : l'habénula latérale

al., 2012; Powell, 1968; Proulx et al., 2014). Une projection non réciproque de l'HbM vers l'HbL a aussi été décrite (Kim and Chang, 2005; Sutherland, 1982).

Enfin, d'autres afférences proviennent des structures cibles de l'HbL telles que le raphé ou l'aire tegmentale ventrale (ATV) (Herkenham and Nauta, 1977,1979).

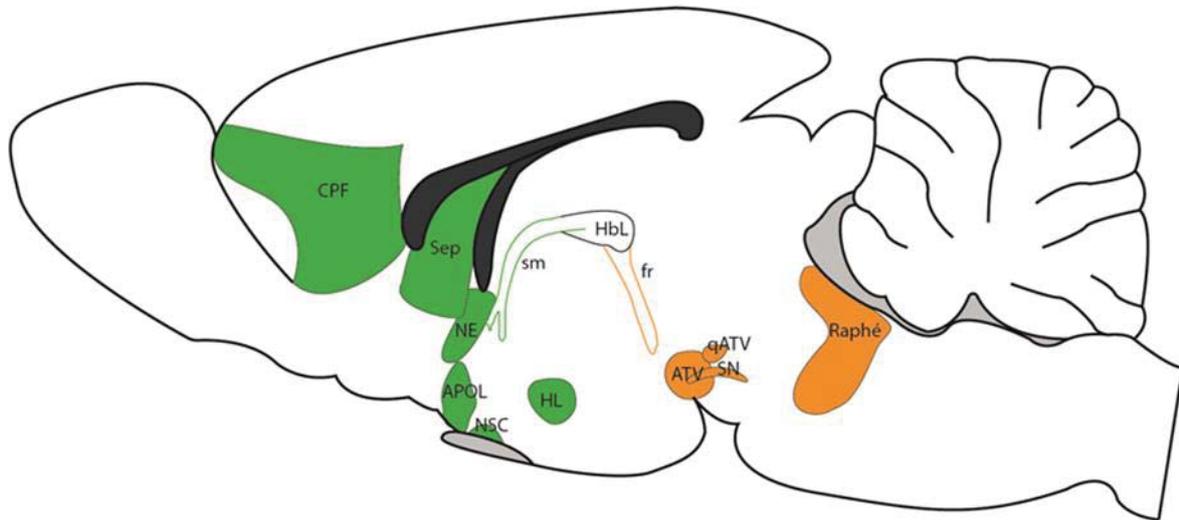


Figure 5 Les afférences et efférences principales de l'HbL chez le Rat

Schéma d'une coupe sagittale de Rat représentant les structures afférentes et efférentes principales de l'HbL (en vert). Les afférences rejoignent l'HbL majoritairement via la strie médullaire (sm) et ses efférences quittent celle-ci majoritairement via le fasciculus retroflexus (fr). Abréviations : CPF : cortex préfrontal médian ; Sep : septum ; NE : Noyau entopédonculaire ; APOL : aire préoptique latérale ; NSC : noyau suprachiasmatique ; HL : hypothalamus latéral ; HbL : habénula latérale ; ATV : aire tegmentale ventrale ; qATV : queue de l'aire tegmentale ventrale ; SN : substance noire ; raphé : noyaux du raphé médian et dorsal.

2.2.2 Connectivité : les efférences

Les efférences principales de l'HbL aboutissent aux centres sérotoninergiques du raphé médian et dorsal, et dopaminergiques de la substance noire (SN) et de l'ATV, ainsi qu'à la région inhibitrice de ces dernières, à savoir la queue de l'aire tegmentale ventrale (qATV) (Aghajanian and Wang, 1977; Araki et al., 1984; Brinschwitz et al., 2010; Herkenham and Nauta, 1979; Wang and Aghajanian, 1977) (*cf. figure 5*).

D'autres efférences incluent les noyaux supramammillaires (Kiss et al 2002), divers noyaux thalamiques (centro-médian, médio-dorsal, ventro-médian, reuniens et parafasciculaire), ou encore le colliculus supérieur, la zona incerta, le pallidum ventral et la région dorsale du tegmentum (Araki et al., 1984; Herkenham and Nauta, 1979; Semba and Fibiger, 1992).

Introduction : l'habénula latérale

Une telle connectivité en fait un point de convergence de structures appartenant au système limbique et aux GB, voire à la moelle épinière, et un relai clé vers les centres monoaminergiques mésencéphaliques (*cf.figure 5*).

2.2.3 La connectivité interne de l'HbL

À la vue de sa connectivité avec les GB, qui projettent essentiellement sur l' HbLI, cette dernière a longtemps été considérée comme « pallidale », alors que sa partie médiane (HbLm), connectée avec des régions telles que le septum, l'APOL ou la bande diagonale de Broca a reçu le qualificatif de « limbique » (Parent et al., 1981, 2001; Proulx et al., 2014; Zhang and Oorschot, 2006) suggérant une ségrégation anatomo-fonctionnelle (*cf.figure 6a*).

Cependant, cette description a largement évolué aujourd'hui. En effet, les afférences du CPF médian (CPFm), structure considérée comme limbique, atteignent essentiellement les régions ventro-latérales de l'HbL (Kim and Lee, 2012) (*cf.figure 6b*). De plus, certains neurones de l'HbL possèdent de longues dendrites formant des « boutons en passant » qui parcourent l'ensemble des axes médio-latéral et dorso-ventral de la structure (Kim and Chang, 2005) (*cf.figure 6c*).

Ainsi, certaines afférences limbiques et pallidales semblent converger vers les mêmes régions de l'HbL, qui semble posséder une circuiterie interne permettant de connecter entre elles toutes ces différentes sous-régions. Ces caractéristiques suggèrent un haut niveau de convergence d'informations au sein de l'HbL, et donc la possibilité pour un même neurone d'intégrer des informations en provenance de nombreuses régions cérébrales, pallidales et limbiques. Geisler et collaborateurs ont d'ailleurs proposé que cette position particulière tout comme ses caractéristiques internes puisse la placer comme une voie de sortie de macro-systèmes (2008 ; *cf.figure 6d*).

De tels macro-systèmes serviraient de substrats pour l'intégration d'informations corticales par des réseaux multiples permettant la gestion rapide d'informations et favorisant la flexibilité motrice et cognitive (Zahm, 2006). Ainsi, cette position comme voie de sortie suggère un rôle particulier pour l'HbL dans des fonctions liées à la flexibilité comportementale.

Introduction : l'habénula latérale

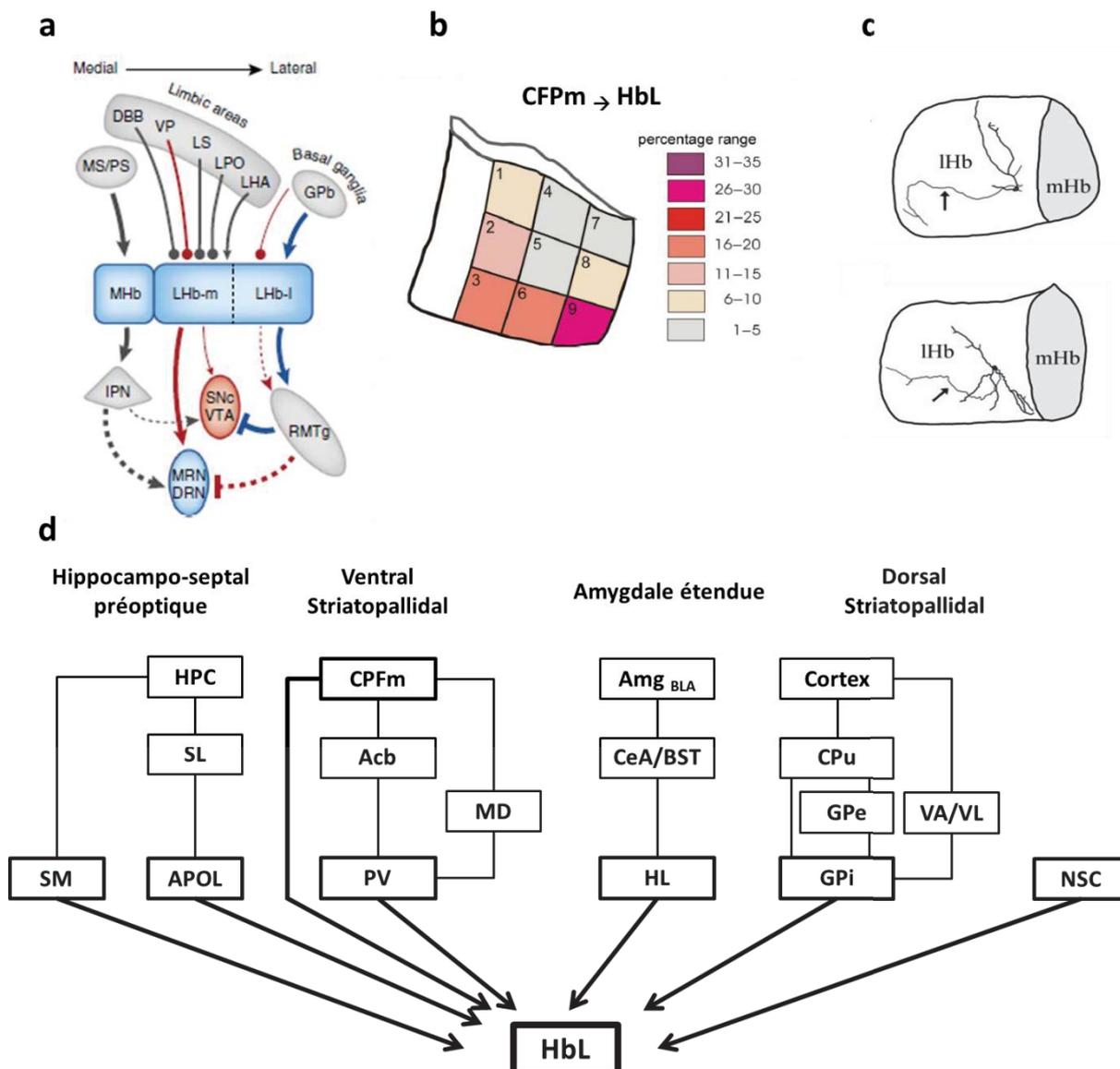


Figure 6 L'HbL un centre intégrateur cérébral

Schéma de la ségrégation des afférences de l'HbL au sein de l'HbLm et de l'HbLI (d'après Proulx et al., 2014). Représentation de la localisation et du pourcentage des afférences du CPFm connectant l'HbL (Kim et Lee 2012) (b). Représentation schématique de deux neurones de l'HbL possédant des axones formant des boutons en passant au sein de cette structure (Kim et Chang, 2005) (c) et de sa position comme relai de macrosystèmes télencéphaliques (schéma inspiré de Gisler et Trimble 2008) (d). Abréviations : SM : septum médian ; HPC : hippocampe ; SL : spetum latéral ; APOL : aire préoptique latérale ; CPFm : cortex préfrontal médian ; Acb : noyau accumbens ; PV : pallidum ventral ; MD : noyau médio-dorsal du thalamus ; Amg_{BLA} : amygdale basolatérale ; CeA : noyau central de l'amygdale ; BST : noyau du lit de la strie terminale ; HL : hypothalamus latéral ; CPu : noyau caudé/putamen ; GPe : globus pallidus externe ; GPI : globus pallidus interne ; VA/VL : noyaux ventrolatéral et ventro-antérieur du thalamus ; NSC : noyau suprachiasmatique ; HbL : habnéula latérale

2.3. Les récepteurs présents au sein de l'HbL

Toutes les afférences décrites précédemment peuvent impliquer différents systèmes de neurotransmission, notamment glutamatergiques, GABAergiques, monoaminergiques, cholinergiques, mais aussi neuropeptidergiques, dont on peut trouver les récepteurs au sein de l'HbL. La description de cette multitude de

Introduction : l'habénula latérale

récepteurs différents au sein de l'HbL a également contribué à modifier la vision que l'on avait de cette structure. Plus qu'un relai télencéphalo-mésencéphalique, elle pourrait être un centre intégrateur d'informations variées. Dans les paragraphes suivants nous décrivons les différents types de récepteurs observés au sein de l'HbL même si leurs rôles respectifs ne sont pas encore bien définis.

L'HbL comporte des récepteurs glutamatergiques de type α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate (AMPA) et N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Khan et al., 2000), avec une proportion de récepteurs AMPA bien plus importante que celle des récepteurs NMDA (Li et al., 2011; Maroteaux and Mameli, 2012; Meye et al., 2013). Des récepteurs métabotropiques (mGluR) sont également présents au sein de l'HbL, et plus précisément les récepteurs mGluR 1, 3 et 5 (Petralia et al., 1996; Valentinova and Mameli, 2016; Wagner et al., 2016).

La présence de récepteurs GABAergiques de type A ($GABA_A$) et B ($GABA_B$) a également été notée (Hörtnagl et al., 2013; Meshul et al., 1998; Meye et al., 2013; Pirker et al., 2000; Wang et al., 2006).

Concernant le récepteur $GABA_A$, les différentes études effectuées chez le Rat et la Souris ont essentiellement démontré la présence des sous-unités α_1 , β_2 et γ_3 (Hörtnagl et al., 2013; Pirker et al., 2000).

Une différence majeure entre l'HbL et l'HbM est à préciser ici. En effet, au sein de l'HbL, les neurones possédant des récepteurs $GABA_A$ présentent le transporteur KCC2, ce qui n'est pas le cas des neurones de l'HbM (Wagner et al., 2016). Cette présence concomitante permet aux récepteurs $GABA_A$ d'induire un signal inhibiteur (Rivera et al., 1999), expliquant l'observation de réponse inhibitrice de type $GABA_A$ dans l'HbL, mais pas dans l'HbM (Wang et al., 2006). Cette particularité a été d'une importance particulière lors de nos choix des composés pharmacologiques à utiliser pour inactiver l'HbL.

En ce qui concerne les récepteurs $GABA_B$, bien que l'HbM comme l'HbL représentent l'une des régions du système nerveux central où ils sont le plus abondants (Liang et al., 2000; Margeta-Mitrovic et al., 1999), leur rôle dans ces structures reste peu connu. Seule une étude récente semble démontrer qu'au sein

Introduction : l'habénula latérale

de l'HbM ces récepteurs peuvent être impliqués dans l'expression d'un souvenir lors d'un conditionnement de peur (Zhang et al., 2016a).

L'HbL contient également des récepteurs dopaminergiques de type D1, D2, D4 et D5 ainsi que des récepteurs à la sérotonine (5-HT), 1b, 2c, 3a, 4 et 5b (Bouthenet et al., 1991; Root et al., 2015; Wagner et al., 2016). Curieusement, les récepteurs D4 semblent être activés par la présence de noradrénaline (NA) et non par la dopamine (DA) (Root et al., 2015) et semblent impliqués dans des boucles de rétro-contrôle de l'activité de l'HbL (Good et al., 2013).

Différents récepteurs nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine (ACh) ont aussi été observés au sein de l'HbL (Aizawa et al., 2012). Enfin, des récepteurs de la mélatonine y sont présents, tout comme des fibres contenant de la substance P ou de la vasopressine (Evely et al., 2016; Wagner et al., 2016; Weaver et al., 1989;).

2.4. Caractérisation des neurones de l'HbL

De nombreuses études démontrent une hétérogénéité importante autant du point de vue des marqueurs biochimiques, des profils électrophysiologiques que de la morphologie des neurones au sein des 10 sous-régions de l'HbL.

2.4.1 Morphologie neuronale

Les neurones de l'HbL peuvent être classés selon cinq types morphologiques chez le Rat (*cf. figure 7*): sphériques, fusiformes, verticaux, polymorphes, ou encore possédant une forme de neuroglie avec une arborisation dendritique importante. Weiss et collaborateur proposent que ces derniers pourraient être des interneurones (Weiss and Veh, 2011).

Ces différents types de morphologie se retrouvent dans l'ensemble de l'HbL rendant caduque la distinction de sous-régions basée sur ce paramètre. A ces différents types de morphologie s'ajoutent les neurones dont les dendrites parcourent l'ensemble des axes médio-latéral et dorso-ventral de la structure (*cf. plus haut, figure 6c*, Kim and Chang, 2005).

Introduction : l'habénula latérale

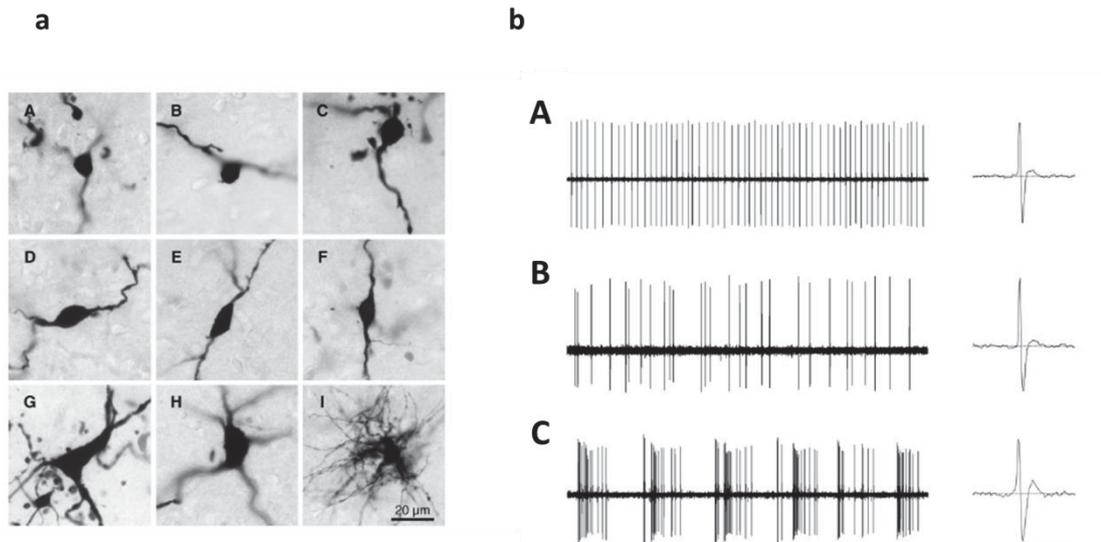


Figure 7 Morphologie et profils électrophysiologiques des neurones de l'HbL

Représentation des différentes morphologies neuronales (de A à I) observées au sein de l'HbL [(a), Weiss and Veh, 2011]. Représentation de 3 profils d'activité électrique spontanée de neurone de l'HbL (b) avec à chaque fois un exemple de potentiel d'action (à droite); (a) un neurone régulier tonique et la représentation d'un des potentiels d'action, (b) un neurone tonique irrégulier et la représentation d'un des potentiels d'action, (c) un neurone déchargeant en bouffé et l'un des potentiels d'action.

2.4.2 Profils électrophysiologiques

Différents profils d'activité électrique spontanée ont pu être enregistrés au sein de chacun des sous-types morphologiques des neurones de l'HbL chez le Rat, donnant la caractérisation des profils de décharge suivante : des neurones toniques réguliers, irréguliers, en bouffée, ou encore des neurones silencieux (*cf. figure 7*) (Kim and Chang, 2005; Kowski et al., 2009). A ces profils, Sakhi et collaborateurs ont récemment ajouté deux types électrophysiologiques chez la Souris : des neurones bistables et des neurones dépolarisés-silencieux (Sakhi et al., 2014a).

L'ensemble de ces caractérisations confirme l'importante hétérogénéité des neurones de l'HbL.

2.4.3 Neurochimie et marqueurs moléculaires

L'hétérogénéité des neurones de l'HbL se retrouve également au niveau moléculaire. Chez le rongeur, de nombreux marqueurs neuronaux ont été identifiés et sont le reflet de la présence de transmissions excitatrice, inhibitrice, ou encore modulatrice (Geisler et al., 2003; Wagner et al., 2014, 2016).

Introduction : l'habénula latérale

Les marqueurs glutamatergiques

Historiquement, l'HbL a été décrite comme exclusivement glutamatergique. Cette description a été confortée par des études neurochimiques (Aizawa et al., 2012; Brinschwitz et al., 2010; Omelchenko et al., 2009; Wagner et al., 2016), décrivant notamment la présence du transporteur vésiculaire du glutamate 2 (VgluT 2), comme dans la plupart des neurones excitateurs du diencephale (Herzog et al., 2004).

Cependant, d'autres marqueurs ont progressivement été observés, tels que le marqueur VgluT 3 (Wagner et al., 2016). Ce dernier ne semble pas être uniquement exprimé par des neurones glutamatergiques, mais aussi par d'autres types cellulaires comme certains neurones GABAergiques ou encore des neurones capables de co-libération (Herzog et al., 2004; Ren et al., 2011), suggérant que des neurones de l'HbL sont capables de co-libérer certains neurotransmetteurs voire d'être inhibiteurs. Ces phénomènes de co-libération, impliquant notamment le glutamate et le GABA, sont de plus en plus étudiés et semblent être une caractéristique de différents circuits impliquant l'HbL.

La co-libération

Récemment, différentes études ont permis de mettre en évidence que des neurones de projection, depuis l'ATV et le NE vers l'HbL, co-libéraient à la fois du GABA et du glutamate (Root et al., 2014; Shabel et al., 2014). Ces études n'ont cependant pas encore permis de comprendre les mécanismes de ces co-libérations, mais suggèrent que l'altération de ce phénomène pourrait être impliquée dans la dépression (Proulx et al., 2014; Shabel et al., 2014).

Les marqueurs GABAergiques

Parce qu'elle a longtemps été considérée comme uniquement glutamatergique, les marqueurs de la transmission GABAergique ont été peu étudiés dans l'HbL.

Néanmoins, de récents travaux ont suggéré la présence de neurones GABAergiques au sein de l'HbL. Ils rapportent la présence d'ARNm de l'isoforme 67 de l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamate décarboxylase (GAD), l'isoforme 65 ne semblant pas être présente au sein l'HbL (Brinschwitz et al., 2010; Wagner et al., 2016; Zhang et al., 2016b). Néanmoins il semble que ces neurones GABAergiques soient peu nombreux et plutôt dispersés (Brinschwitz et al., 2010; Zhang et al., 2016b).

Introduction : l'habénula latérale

Les autres marqueurs :

Monoamines

De manière cohérente avec la présence de projections depuis les aires monoaminergiques mésencéphaliques, une importante concentration de tyrosine hydroxylase (TH), enzyme de synthèse de la DA, NA et adrénaline a été observée dans l'HbL (Geisler et al., 2003; Good et al., 2013; Wagner et al., 2016). En ce qui concerne la 5-HT, peu d'expériences ont permis d'évaluer son importance au sein de l'HbL, néanmoins, la présence de différents 5HTR ([cf.2.3.Les récepteurs présents au sein de l'HbL, page 9](#)) tout comme le fait que la 5-HT soit capable de diminuer la réponse des neurones de l'HbL suite à une stimulation de la voie NEP-HbL (Shabel et al., 2012) suggèrent un rôle important de ce neurotransmetteur au sein de l'HbL.

Acétylcholine

On trouve aussi, et ce dans différentes sous-régions de l'HbL, les marqueurs de l'enzyme de dégradation de l'ACh et son transporteur vésiculaire, [l'acétylcholine estérase (AChE) et VachT, respectivement] (Aizawa et al., 2012; Wagner et al., 2016). Cependant, le rôle de l'ACh au sein de l'HbL reste encore méconnu.

Aujourd'hui, c'est essentiellement la transmission cholinergique de l'HbM qui est étudiée, néanmoins, certaines sous-régions de l'HbL comme le noyau central de l'HbLm et le noyau parvocellulaire de l'HbLI semblent posséder une concentration importante de VachT et d'AChE (Wagner et al., 2016).

Neuropeptides

La présence de neuropeptides impliqués dans les comportements de prise de boisson, comme la vasopressine et la substance P, ou dans les rythmes biologiques, comme la mélatonine ont été observés dans l'HbL (Geisler et al., 2003; Salaberry and Mendoza, 2016; Shinoda et al., 1984; Wagner et al., 2016; Zhang et al., 2016b). Plus précisément, des axones contenant de la substance P proviennent du NE et rejoignent les neurones de l'HbLm, qui elle-même projette sur l'HbLI, suggérant un réseau interne particulier concernant ce système neurochimique (Shinoda et al., 1984).

Si la présence de ces neuropeptides et leur rôle au sein de l'HbL sont pour le moment peu décrits, ils suggèrent, par les fonctions qui leurs sont généralement

Introduction : l'habénula latérale

associées, qu'ils permettent l'intégration d'informations liées à l'état interne (physiologique) d'un individu.

En conclusion, les études concernant la variété morphologique, biochimique et électrophysiologique des neurones de l'HbL suggèrent que cette structure est capable d'intégrer des informations variées, qu'elles soient limbiques, pallidales ou concernant l'état interne de l'individu. De plus, la circuiterie interne de l'HbL, encore peu connue, semble lui permettre, plus que de relayer ces informations, de les intégrer, et ainsi de peut-être prendre part à l'élaboration de comportements initiés par le NE, l'HL ou encore le CPFm

2.5. L'HbL, une structure idéalement positionnée au centre du cerveau

L'HbL semble donc être une structure intégratrice de plusieurs macro-systèmes, formant un pont entre eux et les centres modulateurs mésencéphaliques (Geisler and Trimble, 2008), lui conférant une place de choix pour moduler la neurochimie cérébrale, et donc de nombreuses fonctions.

L'idée générale concernant ce contrôle neurochimique de l'HbL est qu'elle inhibe de manière tonique la libération de DA et de 5-HT (*cf. figure 8*) (Aghajanian and Wang, 1977; Brinschwitz et al., 2010; Christoph et al., 1986; Ji and Shepard, 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007). Ce contrôle inhibiteur se fait probablement par l'intermédiaire de voies directes et indirectes vers l'ATV, la SN et le raphé et indirecte vers la qATV (*cf. 2.2.2 Connectivité : les efférences, page 7*), Brinschwitz et al., 2010; Jhou et al., 2009; Ji and Shepard, 2007; Kaufling et al., 2010).

Ainsi, l'inhibition ou la lésion de l'HbL provoquerait, par un phénomène de levée d'inhibition, la libération de dopamine, notamment dans le CPF, le Nac et le striatum (Lecourtier et al., 2008; Lisoprawski et al., 1980). L'HbL module également la libération d'ACh et de NA. Une stimulation électrique de l'HbL chez le Rat engendre une augmentation des niveaux d'ACh dans l'HPC mais également une augmentation de la libération de NA dans le CPFm, le Nac, le caudé-putamen et l'HPC (Cenci et al., 1992; Kalén et al., 1989a, 1989b, 1989c). Cependant, les voies par lesquelles l'HbL peut engendrer ces augmentations ne sont pas encore bien décrites (*cf. figure 8*).

Introduction : l'habénula latérale

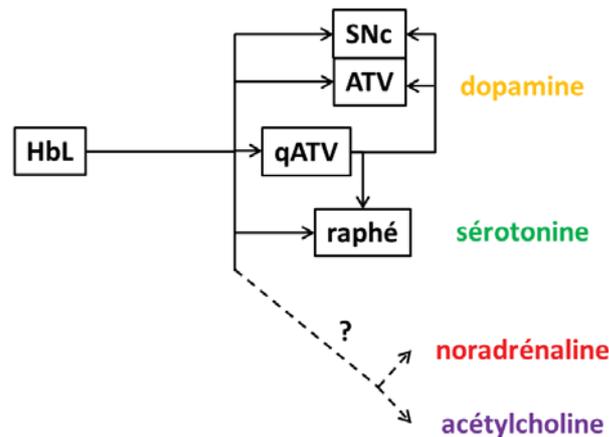


Figure 8 Le contrôle de l'HbL sur les différents systèmes de neurotransmission

Représentation des connexions permettant à l'HbL de contrôler les systèmes de neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique via des connexions directes vers l'ATV, la SNc et le raphé ou indirectes via la qATV (flèches pleines). Elle semble également pouvoir moduler la libération de NA et d'ACh au sein de différentes régions cérébrales via des connexions encore mal connues aujourd'hui (flèches en pointillées). Abréviations : HbL : habénula latérale ; SNc : substance noire compacte ; ATV : aire tegmentale ventrale ; qATV : queue de l'aire tegmentale ventrale.

Via ses connexions, directes ou indirectes, l'HbL semble donc pouvoir contrôler la neurochimie cérébrale.

2.6. Fonctions

2.6.1 Comportements liés à la récompense

La majorité des études de ces 10 dernières années concernant l'HbL ont permis de décrire précisément son rôle dans le signal de « non récompense » (Matsumoto and Hikosaka, 2007). A ce jour, cette fonction de l'HbL est la mieux décrite et a permis l'émergence de nombreuses hypothèses de travail quant aux mécanismes impliqués et à l'importance d'une telle fonction cérébrale.

Le groupe de recherche d'Hikosaka a enregistré l'activité électrophysiologique de l'HbL, du GPi et des neurones dopaminergiques mésencéphaliques lors de différentes expériences de saccades oculaires, récompensées ou punies, chez le primate (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011; Bromberg-Martin et al., 2010; Hong and Hikosaka, 2008; Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009). Ces études ont permis de mettre en évidence un circuit reliant le GPi à l'HbL et impliqué dans le contrôle de la libération de DA en fonction de la survenue ou non d'une récompense.

Plus précisément, l'activité de l'HbL augmente lors de la non survenue d'une récompense, de son omission ou de la survenue d'une punition, alors que son activité diminue lors de la survenue d'une récompense, attendue ou non (Kimura et al., 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009).

Introduction : l'habénula latérale

De plus, l'activité de l'HbL est corrélée à la probabilité de recevoir ou non une récompense ou une punition. Si l'indice prédictif annonce un risque de 100% de recevoir une punition, l'HbL présentera son activité la plus forte, et inversement si l'indice indique une chance de 100% d'obtenir une récompense. En d'autres termes, l'HbL semble coder la survenue ou l'annonce du « pire » (cf. figure 9).

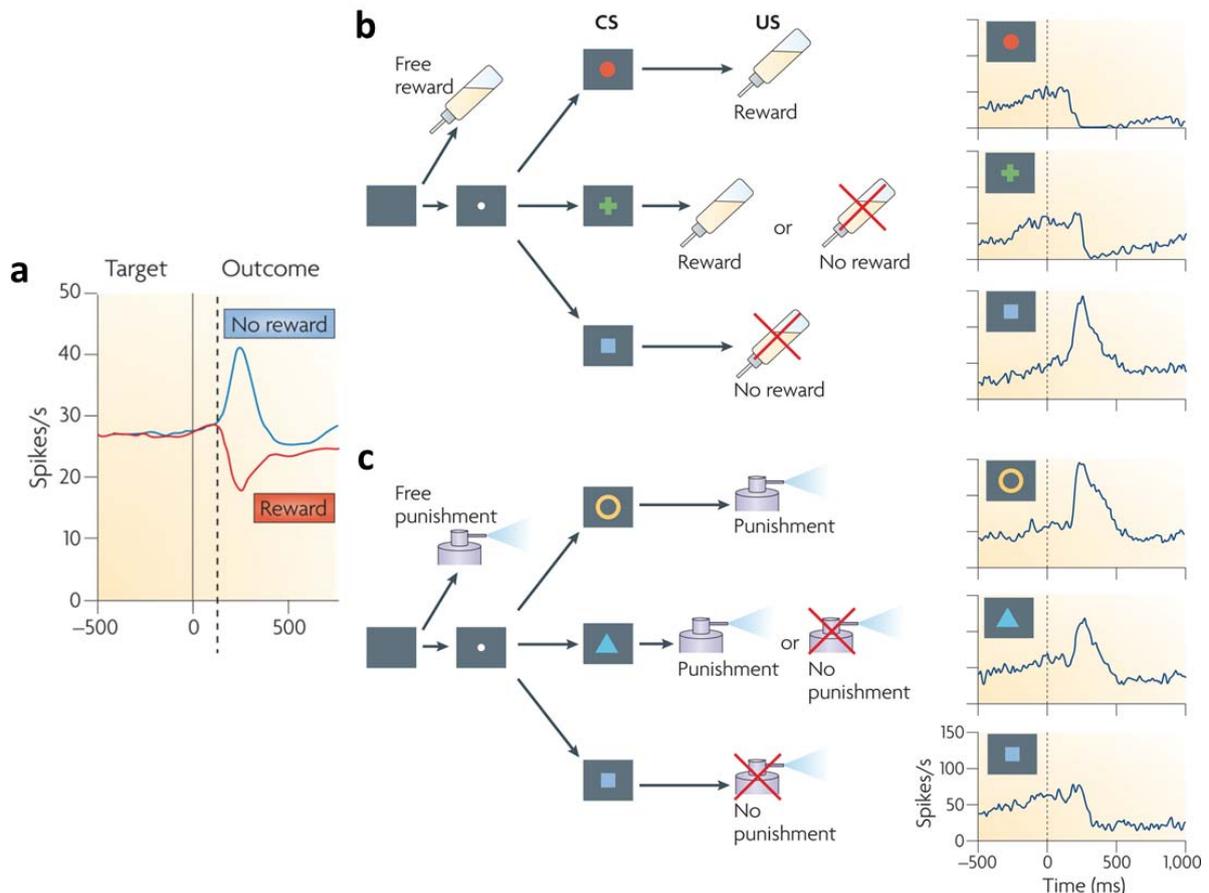


Figure 9 L'HbL code la « non-récompense »

Représentation de l'activité électrique (nombre de potentiel d'action/seconde) des neurones de l'HbL lors d'expérience de saccades oculaires récompensées ou punies chez le primate (Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009). (a) L'activité de l'HbL augmente lorsqu'un essai n'est pas récompensé (no reward, trait bleu) et diminue si l'essai est récompensé (reward, trait rouge). (b) et (c) activité électrique (nombre de potentiel d'action/seconde) des neurones de l'HbL lorsqu'un indice (différents symboles colorés) annonce avec différentes probabilités (100%, 50% ou 0%) la survenue d'une récompense (b) ou d'une punition (c).

Une étude menée chez l'Homme a également démontré l'activation de l'HbL lors de la non survenue d'une récompense et son inhibition lors de la survenue de celle-ci (Salas et al., 2010).

Le groupe d'Hikosaka a démontré que ce signal de l'HbL, concernant l'absence de récompense, semble être déterminé par des neurones excitateurs du GPI (Hong and Hikosaka, 2008) et que l'activité des neurones dopaminergiques mésencéphaliques

Introduction : l'habénula latérale

était inversement corrélée à celle de l'HbL (Bromberg-Martin et al., 2010; Kimura et al., 2007; Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009) .

Ces travaux ont démontré que le GPi active l'HbL pour que cette dernière inhibe la transmission dopaminergique lors de situation non récompensante (*cf. figure 10*).

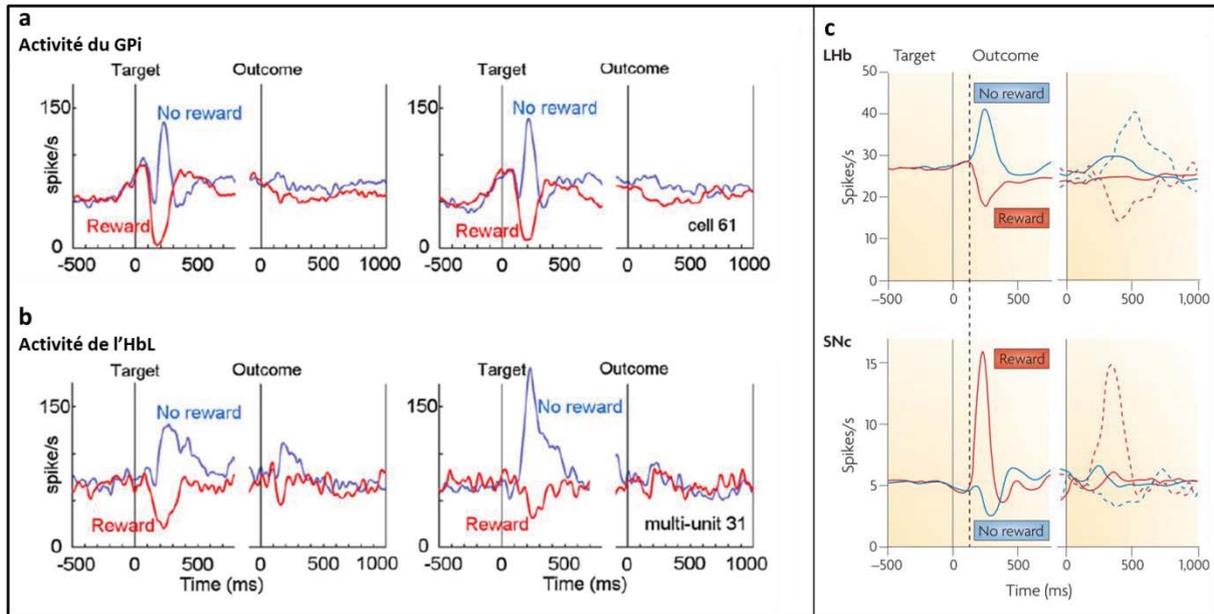


Figure 10 Activité électrique du réseau reliant le GPi, l'HbL et les neurones dopaminergiques lors d'une situation non récompensante.

Représentation de l'activité électrique (nombre de potentiel d'action/seconde) des neurones du GPi (a), de l'HbL (b) et (c; graphique du haut) et des neurones dopaminergiques de la SNc (c; graphique du bas) lors d'expériences de saccades oculaires récompensées ou punies chez le primate (Hikosaka, 2010; Hong and Hikosaka, 2008). L'activité de des neurones du GPi (a) et de l'HbL (b et c graphique du haut) augmentent lorsqu'un essai n'est pas récompensé (no reward, trait bleu) et diminue si l'essai est récompensé (reward, trait rouge). Le profil inverse est observé pour les neurones de la SNc (c; graphique du bas).

Ainsi, lors de la survenue d'une récompense, l'activité de l'HbL diminue et celle des neurones dopaminergiques augmente. A l'inverse, si une récompense n'est pas obtenue ou si une punition est reçue, l'activité de l'HbL augmente et celle des neurones dopaminergiques diminue. Cette capacité de codage par l'HbL de la finalité d'une action a permis à différents auteurs de proposer un circuit mettant en jeu le GPi, l'HbL et l'ATV impliqué dans l'évaluation et le codage de la conséquence de nos actions (Bromberg-Martin et al., 2010; Hong and Hikosaka, 2008; Stephenson-Jones et al., 2016). Ce circuit serait principalement mis en jeu afin de déterminer si le résultat de l'action engagé est meilleur ou pire que ce qui était prévu. Ainsi l'HbL semble participer à la comparaison entre ce que nous attendions et le résultat d'un comportement récompensé ou puni et l'anticipation que l'on avait préalablement faite (Stephenson-Jones et al., 2016).

Introduction : l'habénula latérale

Ce réseau permettrait donc à un individu de coder l'erreur de prédiction de la récompense, (Hikosaka, 2010; Hu, 2016; Matsumoto and Hikosaka, 2009). Finalement, ce signal de « non récompense » pourrait servir de « critique » de l'action en cours afin que l'individu puisse adapter son comportement à la situation expérimentée (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011; Stephenson-Jones et al., 2016).

En conclusion, Hikosaka et ses collègues suggèrent que l'HbL est nécessaire au codage de comportements récompensés, donc à la prise de décision, au sein d'un réseau d'apprentissage et de mémoire (pour revue Hikosaka, 2010).

2.6.2 Feedback d'information

Une étude d'imagerie fonctionnelle (IRMf) réalisée chez l'Homme a montré que l'HbL était activée lorsqu'un individu était informé que sa réponse était incorrecte (Shepard et al., 2005). De cette manière, elle apparaît impliquée dans le jugement rétroactif de nos comportements.

De plus, l'HbL atteint son maximum d'activité lorsqu'une action attendue ne se produit pas. De cette manière elle semble coder que le comportement engagé ne correspond pas ou plus à la situation en cours (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011). Des résultats obtenus par Stopper et Floresco ont suggéré que l'HbL pourrait intervenir dans la sélection de comportements lorsque des règles sont modifiées lors de tests de "*delay discounting*" menés chez le Rat (Stopper and Floresco, 2013).

Enfin, toujours chez le Rat, des travaux de Baker et Mizumori ont montré une possible implication de l'HbL dans les comportements de flexibilité et d'intégration proactive et rétroactive d'informations dans un paradigme de labyrinthe radial modifié (Baker et al., 2015, 2016). Ces auteurs ont décrit que l'inactivation de l'HbL chez le Rat, par instillation d'un mélange muscimol/baclofène, provoquait l'incapacité des animaux à mettre en lien leur choix avec une récompense. Plus précisément, l'inactivation de l'HbL semble empêcher les rats de prendre en compte un indice qui peut leur permettre d'obtenir une récompense (proactif). De la même manière, les animaux ne semblent plus parvenir à prendre en compte leur propre comportement lors d'un premier essai dans le labyrinthe afin de le modifier pour obtenir une récompense lors d'un second essai (retroactif).

Tous ces travaux chez le rongeur, comme d'ailleurs chez le primate et l'Humain, suggèrent que l'HbL semble pouvoir participer à la comparaison du résultat obtenu

Introduction : l'habénula latérale

lors d'une action engagée dans une situation expérimentale avec ce qui était attendu.

Ces travaux sont cohérents avec l'idée que l'HbL peut servir de centre critique en direct des actions qu'un individu effectue. Cette fonction permettrait d'évaluer notre propre comportement durant une action et de tenter de le modifier si nécessaire, notamment si ce qui est obtenu n'est pas ce qui était attendu.

2.6.3 Activité circadienne et cycle Veille / Sommeil

Différentes hypothèses ont été proposées concernant le rôle de l'HbL dans le sommeil. La première suggère que ses connexions vers le noyau supramammillaire lui permettent de générer et moduler l'activité thêta (Kiss et al., 2002). Une autre propose que l'HbL puisse intervenir dans le maintien de ce rythme via son contrôle de la libération de 5-HT au sein de l'HPC (Aizawa et al., 2013b).

Ainsi, les caractéristiques internes de l'HbL (gènes horloges et activité circadienne), sa connectivité et la possibilité qu'elle puisse moduler les oscillations thêta de l'HPC suggèrent l'existence d'un rôle encore méconnu dans les cycles circadiens et les fonctions de veille/sommeil. Certains auteurs proposent d'ailleurs qu'une altération de l'HbL pourrait, par l'intermédiaire d'une perturbation de l'activité au cours du cycle circadien, conduire à des comportements de prise de drogue et d'addiction (Salaberry and Mendoza, 2016).

2.6.4 Nociception, stress et anxiété

Par définition, *la nociception* est l'ensemble des phénomènes permettant l'intégration au niveau central de stimulations douloureuses via l'activation de nocicepteurs (Elman and Borsook, 2016; Julius and Basbaum, 2001). Il est important de rappeler que la notion de douleur ressentie n'est pas prise en compte dans cette définition.

Le stress, quant à lui, est un ensemble de réponses physiologiques de l'organisme face à un événement positif comme négatif (Franklin et al., 2012; Hollon et al., 2015).

Enfin, *l'anxiété* est l'émotion ressentie lors de l'attente plus ou moins consciente d'un potentiel danger à venir (Davis et al., 2009; Jesuthasan, 2012).

Bien entendu, ces trois notions sont fortement liées. Une stimulation nociceptive est considérée comme stressante pour l'organisme et, lorsque celle-ci est répétée, elle

Introduction : l'habénula latérale

peut conduire à des comportements anxieux vis à vis de la situation dans laquelle l'individu a subi cette stimulation douloureuse.

L'HbL possède une connectivité lui permettant d'intégrer des informations de structures impliquées dans la douleur et dans sa modulation, comme la lamina I de la corne dorsale de la moelle épinière ou encore la PAG et l'hypothalamus, [cf. 1.1. Connectivité de l'HbL, page 6, (Craig, 2003; Herkenham and Nauta, 1977)].

Différentes études d'imagerie (majoritairement du marqueur C-fos) et d'enregistrements électrophysiologiques chez le Rat ont décrit une augmentation de l'activité de l'HbL suite à un stress de contention, à restriction alimentaire ou encore à stimulation nociceptive (Benabid and Jeaugey, 1989; Carr et al., 1998; Chastrette et al., 1991; Wirtshafter et al., 1994) . Cette activation semble restreinte aux régions caudale et médiane de l'HbL (Brown and Shepard, 2013; Wirtshafter et al., 1994) (cf. figure 11).

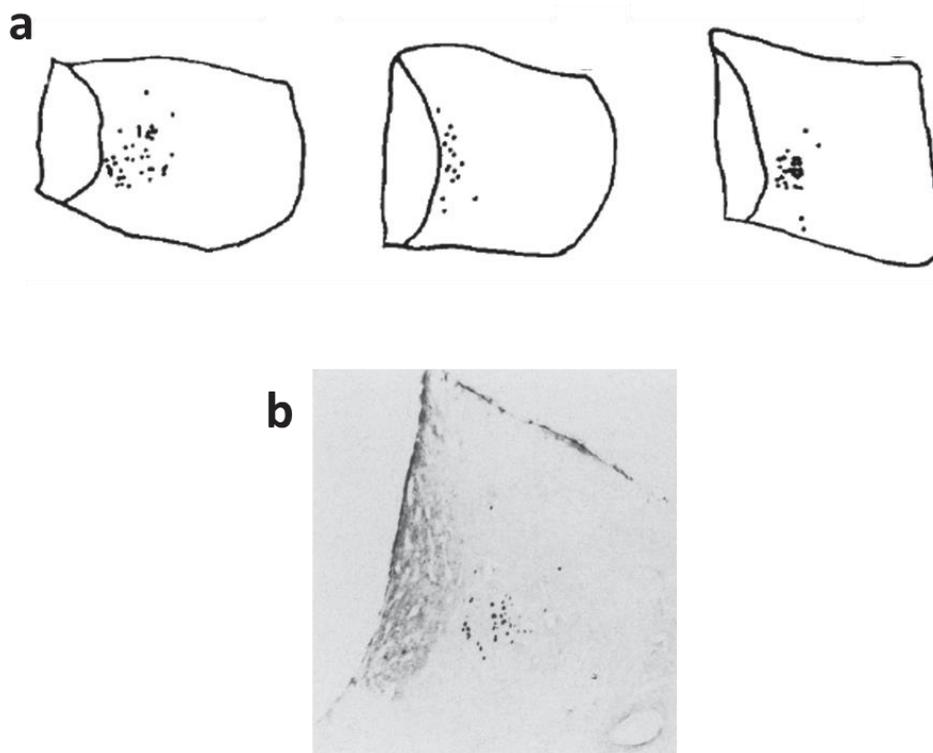


Figure 11 Immunomarquage C-Fos dans l'HbL suite à différents stress chez le Rat.

(a) Représentation schématique de la distribution des neurones de Rat positifs à l'immunomarquage C-Fos après une immobilisation (gauche), l'injection de chlorure de lithium (centre) et placement dans un nouvel environnement (droite). (b) Photographie correspondant à l'illustration du panel (a) lors du placement d'un rat dans un nouvel environnement (Wirtshafter et al., 1994).

De plus, la stimulation pharmacologique de l'HbL chez le Rat anesthésié provoque des réponses physiologiques identiques à celles d'un stress dit émotionnel (vasoconstriction, augmentation du rythme cardiaque et hyperthermie) (Ootsuka and

Introduction : l'habénula latérale

Mohammed, 2015). Plus récemment, une étude a suggéré que l'HbL appartenait à un circuit impliqué dans des comportements de fuite lors de situations nécessitant la gestion du stress, notamment après une restriction hydrique (Zhang et al., 2016b).

Enfin, une étude menée chez le poisson zèbre a démontré l'importance de la voie connectant l'habénula et le raphé dans les comportements de réponse à un danger (Amo et al., 2014). Les auteurs de cette étude proposent que cette voie est activée lorsque l'individu est confronté à une situation dangereuse, et que cette activité serait comparée à ce que l'individu a réellement subi. En outre, l'inactivation de cette voie conduit les poissons à déclencher des comportements inadaptés lors de la présentation d'un stimulus annonçant un danger. Ainsi, chez le poisson zèbre, l'HbL jouerait un rôle dans la représentation d'un danger à venir et du comportement à adopter face à cette situation (Amo et al., 2014).

L'ensemble de ces travaux suggère que l'HbL joue un rôle important dans l'intégration de stimuli stressants et nociceptifs, et qu'elle pourrait moduler les réponses comportementales et physiologiques en réponse à ces stimuli.

Ce rôle dans la réponse comportementale face à une situation stressante suggère aussi que l'HbL pourrait intervenir dans les comportements anxieux.

Des études lésionnelles, pharmacologiques ou encore optogénétiques chez des modèles murins ont montré qu'une perturbation de l'HbL engendrait une modification des comportements anxieux dans différents paradigmes expérimentaux (champ ouvert, conditionnement de place, comportement d'évitement) (Casarrubea et al., 2015; Thornton et al., 1985, 1994).

Par exemple, l'association d'un contexte donné à la stimulation des neurones de l'HbL projetant à l'ATV (HbL_→ATV) a conduit à des comportements d'aversion chez des souris lors d'un paradigme de conditionnement de préférence de place (CPP) (Lammel et al., 2012). Ce type de comportement d'aversion a également été démontré suite à la stimulation des neurones de l'HbL projetant à la qATV (HbL_→qATV) dans des paradigmes d'évitement actif ou passif (Stamatakis and Stuber, 2012). Ces travaux ont donc décrit que des voies de projections différentes depuis l'HbL directement vers l'ATV ou indirectement via la qATV peuvent *in fine* conduire à un même comportement. Ce constat apparaît paradoxal si l'on considère que les projections de l'HbL sont glutamatergiques. En effet, l'activation de l'ATV et

Introduction : l'habénula latérale

de la qATV par l'HbL devrait induire une réponse des neurones dopaminergiques diamétralement opposée (respectivement activation de la libération de la dopamine ou son inhibition), or le comportement des animaux est le même. Ainsi, l'implication de l'HbL dans les comportements étudiés lors de ces expériences suggère des voies anatomiques distinctes et encore mal caractérisées.

Le même type de paradigme a permis de démontrer la mise en place d'une aversion suite à la stimulation des neurones du NE qui projettent à l'HbL (NE_→HbL) (Shabel et al., 2012). Cependant, la stimulation d'une sous-population GABAergique de neurones de la ATV projetant sur l'HbL (ATV_{GABA→}HbL) a conduit à des comportements inverses, et a engendré une préférence pour le compartiment associé à cette stimulation lors d'une expérience de conditionnement de préférence de place (Stamatakis et al., 2013).

Une fois de plus, cette voie impliquant le NE, l'HbL et l'ATV/qATV semble jouer un rôle majeur dans les comportements liés à la récompense, la punition et l'aversion.

Ces travaux suggèrent que l'HbL peut intégrer des informations concernant la valence émotionnelle, notamment l'aspect stressant, qu'une situation peut engendrer (l'influence de l'environnement). De plus, elle semble capable de participer à la réponse physiologique et comportementale que ce stress déclenche. Ces fonctions apparaissent cohérentes avec la capacité de l'HbL à anticiper des événements récompensés ou non, et à en dégager une information critique vis à vis du comportement en cours. Ces fonctions semblent nécessiter un circuit constitué du GPi et de l'ATV mais le rôle précis de chacun de ces acteurs reste à définir précisément.

2.6.5 Les pathologies liées à une altération du fonctionnement de l'HbL

Considérant les fonctions dans lesquelles l'HbL est impliquée, sa connectivité et son contrôle important de différents systèmes de neurotransmission, différentes études ont essayé de comprendre son rôle dans des pathologies qui incluent une altération de ses fonctions.

Dépression

De nombreux modèles animaux de symptômes dépressifs incluent une hyperactivité ainsi que des modifications moléculaires au sein de l'HbL (Christensen et al., 2013;

Introduction : l'habénula latérale

Gass et al., 2014; Lecca et al., 2014; Li et al., 2013; Winter et al., 2011). Cette hyperactivité est corrélée aux symptômes dépressifs modélisables chez l'animal, comme l'anhédonie ou encore la perte de motivation par exemple (Li et al., 2011, 2013; Winter et al., 2011), et la diminution de cette hyperactivité est suffisante pour atténuer ces symptômes (Li et al., 2013).

Chez l'Homme, une étude a montré une augmentation importante de l'activité de l'HbL suite à l'induction d'une rechute de symptômes dépressifs par déplétion du tryptophane sanguin (précurseur de la 5-HT), chez des patients volontaires (Morris et al., 1999). Une autre étude clinique a confirmé cette implication de l'HbL dans la dépression chez l'Homme. Considérant que l'hyperactivité de l'HbL était responsable de la diminution de DA et 5-HT, responsables des symptômes dépressifs, les auteurs de cette étude ont cherché à inactiver l'HbL de patients dépressifs. Un tel protocole devait conduire à la levée d'inhibition des neurotransmetteurs cités ci-dessus et engendrer une diminution des symptômes dépressifs. L'utilisation de stimulations transcrâniennes profondes de l'HbL (induisant son inactivation) s'est alors avérée efficace comme traitement antidépresseur chez un patient résistant aux traitements usuels de la dépression (Cleary et al., 2015; Kiening and Sartorius, 2013; Sartorius et al., 2010) .

Schizophrénie

Une première étude chez l'Homme a proposé que la calcification de l'HbL et de la glande pinéale, observées chez des patients schizophrènes, pourrait entraîner un dysfonctionnement de l'habénula et contribuer à la survenue de certains symptômes schizophréniques (Sandyk, 1992).

Plus récemment, une étude d'IRMf menée chez l'Homme suggère que les déficits d'intégration du rétrocontrôle négatif d'informations, décrits comme déficitaires chez les patients schizophrènes, seraient dus à un défaut d'activation de l'HbL (Shepard et al., 2005). Cependant, une étude histologique *post mortem* plus récente (Ranft et al., 2010) n'a démontré aucune altération morphologique au niveau de l'Hb chez des patients schizophrènes. Il semble donc que son implication dans cette pathologie ne soit pas complètement avérée et de nouvelles investigations sont nécessaires.

Comportements d'addiction

Introduction : l'habénula latérale

De récents travaux d'un même groupe avancent l'implication de l'HbL dans les comportements liés à l'addiction (Lecca et al., 2014; Meye et al., 2016a; Velasquez et al., 2014). Les auteurs ont observé une modification des neurotransmissions excitatrices et inhibitrices au sein de l'HbL de souris durant des comportements de prise de drogue (Lecca et al., 2014; Maroteaux and Mameli, 2012; Meye et al., 2016a). Ces recherches ont notamment démontré que la prise de drogue peut modifier la balance excitation/inhibition au sein de l'HbL en faveur de l'excitation, et pourrait participer aux aspects négatifs engendrés par la prise de drogue comme l'anxiété ou la dépression (Koob and Le Moal, 2008) lors de période de manque (Lecca et al., 2014; Valentinova and Mameli, 2016).

Ce déséquilibre induit par la prise de drogue pourrait participer aux symptômes observés lors du sevrage aux drogues et aux comportements de rechute après sevrage (Meye et al., 2016a). Ainsi, la dérégulation de l'activité de l'HbL semble être un facteur commun à plusieurs pathologies comme la dépression et les comportements d'addiction.

De plus, comme mentionné plus haut ([cf. page 21](#)) Sallaberry et Mendoza proposent que la dérégulation de l'activité cyclique de l'HbL puisse engendrer une perturbation des comportements d'un individu et ainsi conduire à des comportements d'addiction (Salaberry and Mendoza, 2016).

Tous ces travaux démontrent que la modulation de l'activité de l'HbL est complexe et que son altération peut engendrer une perturbation importante pouvant conduire à des comportements pathologiques graves.

Maladie de Parkinson

Des études ont démontré une altération de l'activité de l'HbL dans des modèles de la maladie de Parkinson chez le Rat et le primate (Bastide et al., 2014, 2016; Pelled et al., 2007). L'évaluation de l'activité cérébrale suite à des lésions unilatérales de la SN chez le Rat a notamment mis en évidence une augmentation de l'utilisation du glucose dans l'HbL (Kozlowski and Marshall, 1980; Wooten and Collins, 1981). Une autre étude a montré que l'utilisation d'un traitement à la levodopa (L-dopa) permet d'atténuer une telle augmentation d'activité (Trugman and Wooten, 1986).

Ces études suggèrent que les perturbations dopaminergiques observées dans ces modèles de maladie de Parkinson, tout comme les traitements utilisés peuvent modifier l'activité de l'HbL.

Introduction : l'habénula latérale

Des études récentes ont plus précisément décrit que l'HbL est impliquée dans les phénomènes de dyskinésie induite par le traitement à la L-dopa (DILD) (Bastide et al., 2016). Cette étude a montré que l'activité de certains neurones de l'HbL est augmentée chez des animaux présentant des DILD et que l'inactivation de ces neurones conduisait à la diminution de ces symptômes. De plus, ces phénomènes semblent impliquer l'augmentation d'expression de récepteurs dopaminergiques D1 dans l'HbL. Ainsi la perturbation de la neurotransmission dopaminergique au sein de cette structure semble jouer un rôle important, mais encore méconnu, dans les DILD (Bastide et al., 2016).

Enfin, une étude récente a démontré que la stimulation profonde du noyau sous-thalamique, technique largement utilisée dans le traitement de patients parkinsoniens, provoquait des modifications d'activité de la voie connectant l'HbL et le raphé (Hartung et al., 2016). Ces travaux apportent des explications concernant les effets secondaires de certains traitements utilisés chez des patients parkinsoniens, comme les symptômes dépressifs.

L'HbL : un point commun à plusieurs pathologies

Le rôle que semble jouer l'HbL dans ces pathologies aux étiologies différentes se base essentiellement sur sa capacité à moduler la DA et la 5-HT, neurotransmetteurs dont les importantes variations de concentration sont largement décrites dans plusieurs troubles psychiatriques et maladies neurodégénératives (Bezard and Carta, 2015; Bezard et al., 2001; Brown and Marsden, 1990; Palmer, 1996). Différents auteurs ayant suggéré que l'HbL était potentiellement responsable de la comorbidité entre addiction et dépression, certaines études semblent indiquer que l'HbL puisse être une structure responsable de l'apparition des symptômes dépressifs dans des modèles animaux de syndromes parkinsoniens (Hartung et al., 2016; Luo et al., 2015; Sourani et al., 2012). Ainsi, la dérégulation de l'activité de l'HbL semble pouvoir être la cause ou la conséquence de nombreuses pathologies.

2.6.6 Vers une théorie unifiée des fonctions de l'HbL

Au cours de l'évolution, l'HbL semble avoir pris une place importante au sein de plusieurs réseaux cérébraux, voire de macro-systèmes, et être impliquée dans de multiples fonctions.

Introduction : l'habénula latérale

Bien plus qu'une structure-relai d'informations télencéphaliques comme elle a pu être décrite un temps, l'HbL apparaît aujourd'hui comme un véritable centre intégrateur. Les informations qu'elle semble capable d'intégrer peuvent concerner autant l'état interne d'un individu (stress, anxiété ressentie, rythme circadien) que l'influence de l'environnement (récompense, punition, conséquence d'un comportement).

Ainsi, il semble que l'HbL puisse participer à la sélection d'un comportement adapté à une situation donnée, et peut-être aussi à la modification d'un comportement qui s'avérerait inadéquat.

Cette hypothèse a déjà été suggérée par Hikosaka (2010) qui propose que cette structure a évolué d'une fonction de simple suppresseur moteur pour intégrer un réseau d'apprentissage et de mémoire concernant les actions à entreprendre selon la situation à laquelle un sujet est confronté.

De cette manière, l'HbL apparaît capable de moduler le comportement, peut-être en fonction de la valence émotionnelle de la situation et serait une interface entre cognition et émotion (*cf. figure 12*). Cependant, à l'heure actuelle, son rôle dans la cognition est encore peu décrit.

Enfin, l'étude plus approfondie des fonctions de l'HbL et surtout de ses dérégulations permettrait une meilleure compréhension de différentes pathologies et de certaines comorbidités pathologiques.

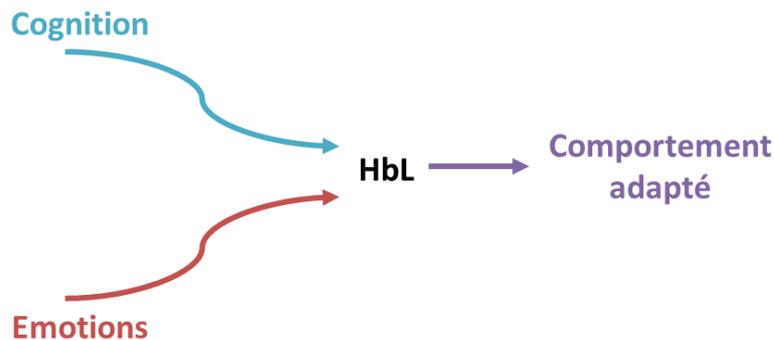


Figure 12 L'HbL comme interface entre émotions et cognition

Schéma de la position de l'HbL comme centre intégrateur d'informations cognitives et émotionnelles permettant la mise en place d'un comportement adapté.

3. La mémoire

Cette fonction, a fait et fait toujours l'objet de nombreuses recherches, d'abord chez l'Homme puis chez l'animal. Le chapitre suivant décrira les différentes mémoires humaines ainsi que des découvertes issues de l'expérimentation animale. Après cela, les mécanismes nécessaires à la mise en place d'un souvenir seront détaillés, tout comme les structures cérébrales et les systèmes de neurotransmissions impliqués dans la mémoire. Pour ces derniers aspects, mon propos portera essentiellement sur les types de mémoires étudiées au cours de mon travail expérimental, c'est-à-dire la mémoire de travail et la mémoire épisodique.

3.1. Généralités et classification des mémoires

De nombreux philosophes et scientifiques ont essayé de comprendre comment les expériences de la vie étaient intégrées par un individu, voire comment celles-ci pouvaient participer à la modification de ses comportements et à ses capacités d'adaptation. En effet, comment se fait-il que d'un événement ou d'un apprentissage puissent finalement se former des souvenirs qui font de nous ce que nous sommes et des aptitudes qui définissent ce que nous sommes capables de faire ?

Ces questionnements et les recherches qui en ont découlé ont permis de mettre en évidence que l'Homme et l'animal possèdent plusieurs types de mémoire, soutendus par différentes régions cérébrales (Ben-Yakov et al., 2015; Frankland and Bontempi, 2005; Henke, 2010; Kandel et al., 2014; Squire and Zola-Morgan, 2015; Squire et al., 2001).

Nous pouvons décrire les mémoires en fonction de leur déroulement temporel (à court ou long terme), du registre sensoriel impliqué (visuel, auditif, etc.), de leur contenu (épisodique, sémantique ou procédurale), ou encore du niveau de conscience que l'on en a lors de leur rappel (implicite ou explicite) (*cf. figure 13*).

Introduction : la mémoire

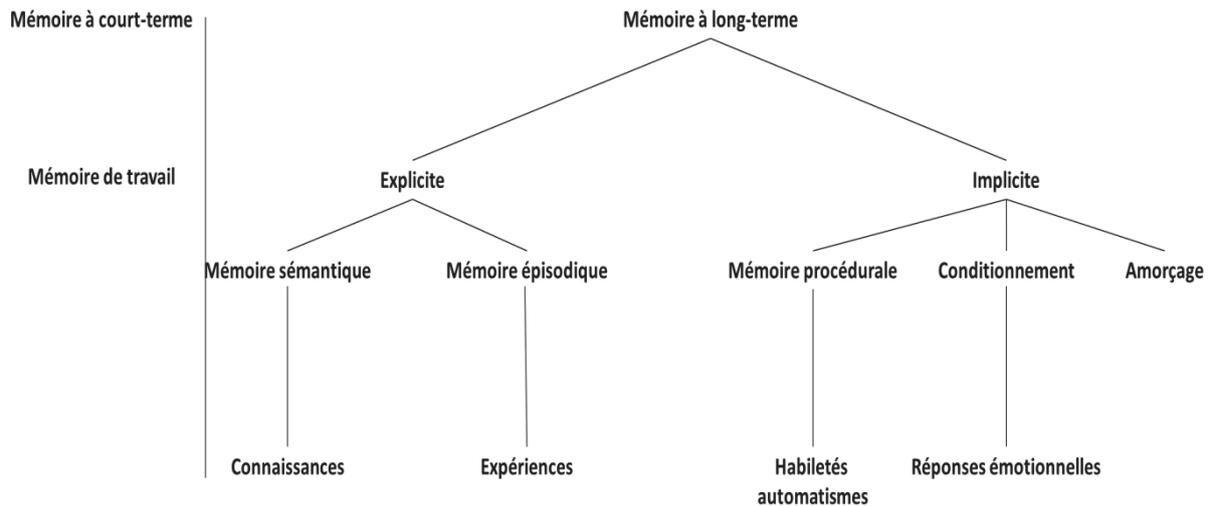


Figure 13 Représentation schématique des différentes mémoires humaines, adaptée de Squire et Dede, 2015.

3.2. La classification des mémoires

Une des manières de caractériser la mémoire est de la rapporter au décours temporel d'une représentation mémorisée. En effet, il est convenu qu'il existe deux formes de mémoire basées sur une échelle de temps : la mémoire à court terme et la mémoire à long terme (Frankland and Bontempi, 2005; Izquierdo et al., 1999; Kandel et al., 2014; Squire and Dede, 2015).

3.3. Mémoire à court terme

La mémoire à court terme (MCT) est une mémoire consciente des événements proches du présent. Elle est considérée comme labile et vulnérable aux interférences, et permet le traitement d'informations durant un délai allant de la seconde à quelques minutes (Izquierdo et al., 1999; Larocque et al., 2014; Merlo et al., 2015; Peterson and Peterson, 1959).

De nombreuses études en neuropsychologie ont démontré, notamment à l'aide de tâches de restitution différée de listes de mots, que cette mémoire a une capacité limitée permettant le maintien de 7 ± 2 informations en moyenne (Miller, 1956). Cette capacité est appelée empan mnésique. Ces expériences ont également démontré des effets dits de primauté et de récence qui impactent cette MCT et expliquent pourquoi les premiers ou les derniers mots d'une liste sont plus facilement rappelés que les autres (Castro and Larsen, 1992; Murdock, 1962).

Introduction : la mémoire

La MCT est donc une mémoire permettant le stockage très bref, et le rappel, d'un nombre limité d'informations. Un exemple très simple est celui du numéro de téléphone à retenir pendant le court instant qui sera nécessaire pour le composer.

Cet exemple illustre aussi une notion importante de la MCT qui est qu'elle n'a pas forcément pour but d'être conservée à plus long terme. En effet, son utilité est de permettre un rappel immédiat d'informations.

3.3.1 Le cas particulier de la mémoire de travail

Le concept de « mémoire de travail », proposé pour la première fois par Miller, Galanter et Pribram, décrit une mémoire à accès rapide permettant l'exécution de « plans » (Miller, 1960). Ainsi, en plus de la fonction de stockage, cette mémoire permet la manipulation, et le traitement des informations, qui, une fois utilisées, ne seront plus prises en compte car elles auront perdu leur pertinence face au déroulement des événements (Baddeley, 2003; Eriksson et al., 2015; Eustache and Desgranges, 2008). Par exemple, considérons une partie de cartes (tarot, belote, bridge, etc...) : les informations concernant les cartes déjà jouées doivent être maintenues et utilisées durant un temps précis et court (la manche, ou « mène ») afin d'adapter son jeu ; ensuite, lorsque la manche est terminée, ces informations doivent être éliminées car devenues inutiles pour la manche suivante.

Ainsi, nous possédons deux « types » distincts de MCT nous permettant un rappel immédiat d'informations. L'une de ces mémoires nous permet la manipulation « en direct » de ces informations pour adapter notre comportement.

Cependant, tous nos souvenirs n'ont heureusement pas une « espérance de vie » aussi courte que le temps d'une partie de cartes ou de la rétention d'un numéro de téléphone. En effet, nous possédons tous des souvenirs de toute notre vie, dont des souvenirs anciens, de notre enfance par exemple. Cette mémoire dite à long terme (MLT) correspond d'ailleurs plus à la définition assez générale, donnée plus haut en introduction, de la mémoire de nos expériences de vie.

3.4. La mémoire à long terme

Une telle mémoire est le substrat de tous nos souvenirs, de ce que nous sommes, connaissons et savons faire. Son importance et les conséquences catastrophiques de sa perte ont largement été décrites grâce à des études cliniques de personnes

Introduction : la mémoire

atteintes d'amnésie, comme par exemple le cas du patient H.M. (Scoville and Milner, 1957). Suite à une résection chirurgicale bilatérale de la partie médiane des lobes temporaux afin de remédier à une épilepsie sévère, résistante à toute pharmacopée. Suite à cette opération, H.M. a présenté une amnésie rétrograde temporellement graduée et antérograde sévère. Il était devenu incapable de se rappeler les 11 années précédant l'intervention tout comme de se forger de nouveaux souvenirs. Une particularité de son amnésie fut la conservation de ses capacités de MCT ainsi que d'apprentissages d'automatismes (Squire, 2009).

Depuis, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence que nous ne possédons pas une, mais plusieurs formes de MLT. En effet, nous conservons en mémoire des souvenirs personnellement vécus, dits *autobiographiques*, mais également des habiletés, notamment motrices, les *souvenirs procéduraux*, ainsi que des connaissances plus générales que nous partageons avec notre communauté, ou espèce, les *souvenirs sémantiques* (Squire and Dede, 2015).

Ce sont toutes ces mémoires qui, grâce à nos expériences et apprentissages, sont le fondement de notre identité, de ce que nous savons de nous-même et sur le monde, mais aussi de ce que nous sommes capables de faire.

3.4.1 Les mémoires épisodique et sémantique : des mémoires déclaratives ou explicites

Au sein de la MLT, nous pouvons distinguer nos souvenirs selon le format de leur représentation : déclaratif (« ce que je sais dire ») et non déclaratif (*cf figure 13, plus haut*). Les mémoires déclaratives sont aussi dites *explicites* car elles sont encodées et rappelées de manière consciente : il s'agit des mémoires *épisodique* et *sémantique*.

3.4.2 La mémoire épisodique

La mémoire épisodique, qui englobe la mémoire autobiographique, concerne la mémoire des souvenirs personnellement vécus (« je me souviens »).

Ces souvenirs d'« épisodes » de vie possèdent un contexte spatio-temporel bien défini, bien que le niveau de détail contextuel du souvenir puisse diminuer avec le temps. Ce type de souvenir permettra à l'individu de rappeler quel événement (« quoi ?») a eu lieu, à quel endroit (« ou ?») et enfin à quelle période de sa vie (« quand ?»). (Conway, 2009; Eustache and Desgranges, 2008; Tulving, 2001;

Introduction : la mémoire

Tulving and Markowitsch, 1998). Pour reprendre l'exemple du jeu de cartes, un tel souvenir serait par exemple celui qui concerne l'épisode de vie lors duquel nous avons appris les règles d'un jeu de cartes avec quelqu'un de proche.

Ces caractéristiques contextuelles, si importantes à la mémoire épisodique, la distinguent d'autres types de MLT et notamment de la mémoire sémantique.

3.4.3 La mémoire sémantique

La mémoire sémantique est souvent décrite comme l'ensemble de nos souvenirs concernant nos connaissances générales sur le monde. Néanmoins, nous possédons également des souvenirs sémantiques personnels concernant nos connaissances sur nous-mêmes (notre nom, date de naissance, adresse, par exemple). Ce type de mémoire est, comme la mémoire épisodique, rappelé consciemment, mais elle ne nécessite pas de rappeler en même temps les détails concernant les conditions de l'apprentissage, ces derniers étant le plus souvent oubliés. Ainsi, un individu rappellera la connaissance, le « quoi », mais pas forcément le contexte d'apprentissage, le « où » et le « quand ».

Cette mémoire représente le savoir d'un individu (« je sais ») et est partagée avec d'autres personnes de notre communauté. (Eustache and Desgranges, 2008; Tulving and Markowitsch, 1998). Pour reprendre l'exemple du jeu de cartes, un tel souvenir concernerait notre connaissance de la règle de différents jeux de cartes auxquels nous savons jouer.

3.4.4 La mémoire procédurale : une mémoire implicite

Certaines mémoires ne nécessitent pas d'être rappelées consciemment. Elles sont dites *implicites* ou *non déclaratives*. Il s'agit notamment de la mémoire *procédurale* ou mémoire des habiletés motrices et cognitives (« ce que je sais faire ») et des conditionnements (Squire and Zola-Morgan, 2015).

La mémoire procédurale permet la mise en place de nos habitudes, nos automatismes. Une de ses caractéristiques est qu'elle permet à un individu de rappeler un souvenir sans mettre en jeu beaucoup de ressources attentionnelles. Ceci lui permet d'effectuer d'autres tâches, en parallèle, sans qu'il n'ait besoin de focaliser son attention sur une procédure qu'il exécute.

Un exemple commun est la capacité de faire du vélo. En effet, nous sommes capables d'effectuer tous les mouvements nécessaires pour avancer à vélo, sans

Introduction : la mémoire

tomber, sans qu'un rappel conscient de cet apprentissage ne soit nécessaire. Ce rappel procédural nous permet alors de focaliser notre attention ailleurs, comme par exemple sur les conditions de circulation.

3.4.5 Des mémoires interactives

La description de différents types de mémoire fait apparaître une compartimentation de nos capacités mnésiques. Or, toutes nos mémoires ne sont pas des fonctions unitaires, indépendantes les unes des autres.

Lors de nos apprentissages, il n'est pas possible d'acquérir une information sans que cela soit fait dans un contexte spatio-temporel donné, qui peut conduire à un souvenir épisodique. Pourtant, l'existence de la mémoire sémantique montre que nous sommes capables d'extraire une information pour la séparer de son contexte d'apprentissage, phénomène que l'on appelle sémantisation (Habermas et al., 2013; Lechevalier et al., 2008).

De la même manière, un phénomène de procéduralisation, de formation d'habitudes ou d'habiletés motrices, peut avoir lieu sans pour autant que le contexte spatio-temporel de cet apprentissage ne nécessite d'être mémorisé (RéMillard et al., 2010; Rose, 2004).

Cependant, tout individu peut aussi, si nécessaire, mémoriser, et donc plus tard se remémorer le contexte d'apprentissage des souvenirs « sémantiques » et « procéduraux ».

Ces différents rappels suggèrent qu'un souvenir peut être encodé de différentes manières voire en parallèle par des systèmes mnésiques spécialisés (Packard and Goodman, 2013; White and McDonald, 2002), ou encore qu'il peut subir *a posteriori* des modifications importantes dans son contenu (Dudai et al., 2015; Nadel et al., 2012).

Afin d'unifier nos capacités mnésiques, plutôt que des mémoires différentes, certains auteurs proposent que l'Homme, comme l'animal, possède des « systèmes » de mémoire multiples (Packard and Goodman, 2013; Packard et al., 1989; Poldrack and Packard, 2003). Ces systèmes seraient activés simultanément dans une situation d'apprentissage donnée, permettant l'acquisition de l'information de différentes manières, en parallèle au sein de plusieurs systèmes. Les premiers travaux, effectués chez le Rat, ont essentiellement distingué deux systèmes. Le premier dit

Introduction : la mémoire

« cognitif » et le second, plus procédural, basé sur des comportements de type « stimulus – réponse » (Packard and Goodman, 2013).

Ces expériences montrent que lors du rappel du souvenir ces systèmes peuvent tous les deux être utilisés et vont chacun conduire à un comportement donné. Néanmoins chaque situation nécessitant le rappel d'une information est unique et la sélection d'une réponse comportementale adaptée peut être primordiale pour l'individu confronté à cette situation.

L'existence de ces multiples systèmes de mémoires et la capacité d'en utiliser un plutôt qu'un autre apparaît donc nécessaire à l'adaptation comportementale qui peut être indispensable à la survie d'un individu. Cependant, les conditions de sélection d'un système plutôt qu'un autre sont encore méconnues. Certaines hypothèses considèrent que les conditions d'apprentissage (par exemple la répétition de l'information ou non) déterminent déjà la manière dont un souvenir sera rappelé, alors que d'autres estiment que ce sont les conditions de rappel (notamment le niveau de stress de l'individu) qui vont influencer cette sélection (Packard et Goodman 2013 ; Squire et Dede 2015).

Toutes ces facultés mnésiques permettent donc à un individu de se forger une identité propre et un registre comportemental basé entre autre sur des expériences vécues permettant l'adaptation à son environnement. Enfin, toutes ces mémoires interactives vont nécessiter différents processus complexes avant de pouvoir être utilisées efficacement.

3.5. Les processus mnésiques

Comme mentionné plus haut, la création d'un souvenir et son intégration en MLT mettent en jeu différents processus au cours du temps (Josselyn et al., 2015; Nadel et al., 2012; Takeuchi et al., 2013). Trois étapes sont nécessaires et indispensables à la mise en place d'un souvenir à long terme et à sa restitution: l'encodage, la consolidation et le rappel (*cf. figure 14*).



Figure 14 Schéma des trois étapes nécessaires à la formation et au rappel d'un souvenir.

Introduction : la mémoire

Au cours de ces différentes étapes, le souvenir en formation va passer par différents états dépendants du niveau de vigilance et d'activité de l'individu (Josselyn et al., 2015). On considèrera notamment des processus *online*, comme l'encodage et le rappel du souvenir, lorsque l'individu est éveillé et actif vis-à-vis de l'expérience à encoder ou à rappeler (*cf. figure 15*). La consolidation est quant à elle considérée comme un processus *offline* s'opérant pendant des périodes de veille calme ou de sommeil (Carr et al., 2011; Genzel and Robertson, 2015; Josselyn et al., 2015; Maquet et al., 2000; Sutherland and McNaughton, 2000; Wamsley, 2014).

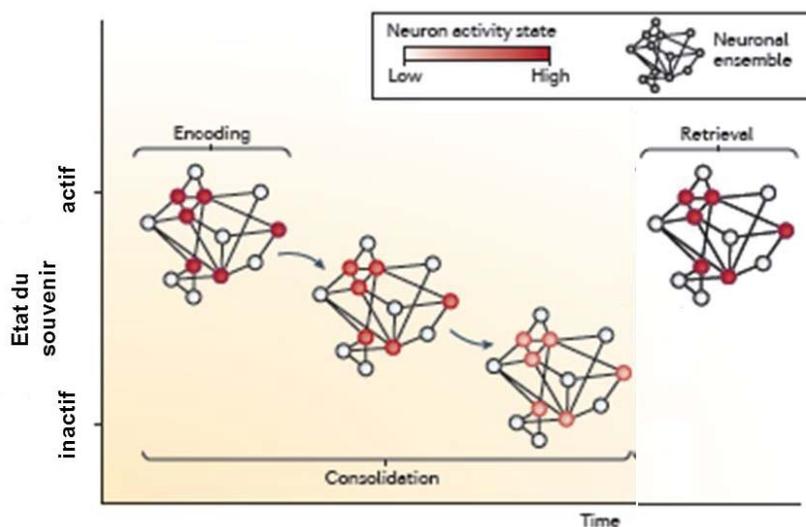


Figure 15 « États » du souvenir en fonction du temps

Représentation de l'état du réseau neuronal, substrat du souvenir, durant les différents processus mnésiques selon Josselyn et collaborateurs. Le souvenir passe par différents états « d'activité » au cours du temps. On distingue un état actif pour l'encodage (*encoding*) et le rappel (*retrieval*) d'un état inactif lors de la consolidation (*schéma adapté de Josselyn et al., 2015*).

Les résultats obtenus nous ont orienté vers les processus online de mémorisation, c'est pourquoi la partie consolidation de la mémoire ne sera que peu documenté par la suite.

3.5.1 L'encodage

Lors d'une expérience, l'organisme est soumis à différentes stimulations internes et externes. Toutes ces informations peuvent être prises en compte et traitées en parallèle au sein de registres sensoriels (tactile, auditif, visuel ou encore olfactif), moteurs et intéroceptifs et elles concernent toutes les mémoires. Ce sont donc tous ces mécanismes de transduction d'informations en message nerveux qui correspondent aux phénomènes d'encodage. Cette étape ne s'opère que durant un temps très court, de l'ordre de la milliseconde.

Introduction : la mémoire

Cet aspect fugace rend ce processus difficile à isoler et son étude très complexe (Cohen et al., 2015). La plupart des études sur les processus mnésiques ciblent essentiellement la consolidation (précoce et/ou tardive) et le rappel. En effet, les processus d'encodage sont difficilement dissociables de ceux de consolidation mis en place immédiatement après l'acquisition de l'information, voire durant l'acquisition elle-même (Eichenbaum and Cohen, 2014; Josselyn et al., 2015; Takeuchi et al., 2013). Certains auteurs précisent même que l'encodage se produit de manière continue (Eichenbaum and Cohen, 2014), tout individu étant constamment soumis à différentes stimulations qu'il encode. Certaines études suggèrent que si ces stimulations sont familières, des schémas mnésiques préexistants peuvent être mis en jeu (Cohen et al., 2015; Dragoi and Tonegawa, 2013; Tse et al., 2007). De tels schémas permettent d'accélérer et de faciliter les processus d'apprentissage d'informations liées à des connaissances déjà acquises (Dragoi and Tonegawa, 2013).

D'un point de vue fonctionnel, l'encodage d'un souvenir va conduire au recrutement des neurones activés lors d'une expérience vécue (Liu et al., 2014; Neves et al., 2008). La nature du souvenir va conditionner les structures cérébrales qui vont s'activer lors de l'encodage. Différents travaux chez le rongeur ont montré l'implication prépondérante de l'HPC dans des apprentissages de type épisodique (Frankland and Bontempi, 2005; Squire, 2009), alors que le striatum interviendrait dans l'encodage de séquences motrices (Barnes et al., 2005).

Ainsi, l'encodage correspond à la mise en place de nouvelles connexions neuronales, voire au renforcement de connexions déjà existantes entre neurones au sein de différentes régions cérébrales (*cf. figure 16*).

Introduction : la mémoire

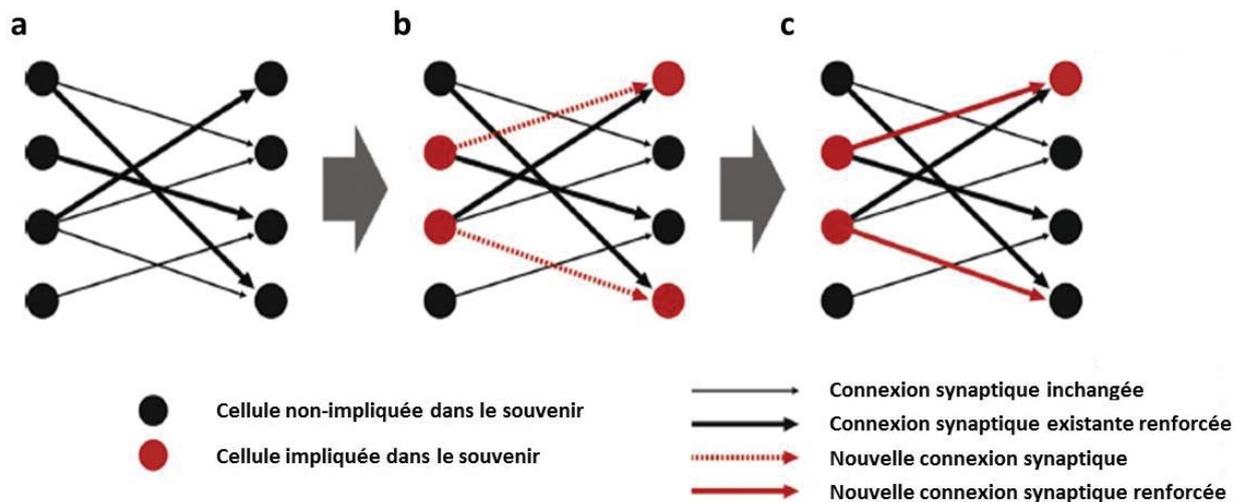


Figure 16 Formation d'assemblée de neurones impliqués dans un souvenir

Représentation de réseaux de neurones (ronds) pour lesquels les connexions vont pouvoir se mettre en place et se renforcer. (a) un réseau de neurones interconnectés au sein duquel des connexions synaptiques sont déjà existantes; (b) au sein du même réseau, des connexions peuvent se créer puis se renforcer suite à l'apprentissage (en rouge) (c). Tout ce réseau renforcé sera ensuite considéré comme le substrat biologique du souvenir. Schéma adapté de Tonegawa et al, 2015.

Comme Hebb (1949) l'a d'abord décrit, suivi en cela par Bliss et Lomo (1973), de tels mécanismes vont mettre en jeu des processus de potentialisation à long terme (PLT) ou de dépression à long terme (DLT), de recrutement de récepteurs ou encore d'activation de cascades intracellulaires.

De cette manière, des réseaux de neurones impliqués dans la prise en compte d'informations lors d'un évènement peuvent engendrer la formation d'assemblées neuronales. Ce réseau de neurones nouvellement formé peut être considéré comme le substrat biologique de la trace mnésique, ou engramme (Liu et al., 2014; Poo et al., 2016; Sakaguchi and Hayashi, 2012).

Ces opérations initiées lors de l'encodage vont se poursuivre lors de la consolidation, notamment synaptique, qui démarre immédiatement après l'encodage (Kandel et al., 2014) et qui a pour but la stabilisation de la trace mnésique.

3.5.2 La consolidation

Immédiatement après l'encodage ou lors d'expériences itératives, différents processus peuvent être mis en œuvre afin de consolider les réseaux neuronaux impliqués et sélectionnés durant l'encodage. L'ensemble de ces processus offline

Introduction : la mémoire

s'opère à différents niveaux (de la synapse aux réseaux de structures cérébrales) pour conduire à la stabilisation à long terme d'un souvenir (Dudai et al., 2015).

Différents travaux distinguent des phases précoces et des phases plus tardives de consolidation, durant lesquelles les mécanismes mis en jeu vont différer (Dudai, 2004; Kandel et al., 2014).

La consolidation synaptique

Les mécanismes initiés lors de l'encodage vont pouvoir se poursuivre dans une phase précoce de consolidation, appelée *consolidation synaptique*, et perdurer pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours (Dudai, 2004). Lors de cette étape, de nombreux mécanismes de plasticité initiés par les phénomènes de PLT et DLT vont s'opérer au niveau de la synapse.

Différents auteurs suggèrent que pour les mémoires déclaratives (épisode et sémantique) toutes les informations concernant ces souvenirs vont tout d'abord être prises en charge par l'HPC (Eichenbaum and Cohen, 2014). Ainsi, toutes les étapes de consolidation synaptique de ces souvenirs vont se dérouler au sein de ce dernier, (Dudai, 2004; Dudai et al., 2015; Kandel et al., 2014; Neves et al., 2008; Takeuchi et al., 2013). Cependant, d'autres études ont suggéré un étiquetage précoce, reflet de la mise en place rapide voire immédiate, au moment de l'encodage, d'un réseau de neurones activés par la représentation à mémoriser (Lesburgueres et al., 2011). Ces travaux suggèrent finalement que les processus de consolidation peuvent être mis en jeu dans plusieurs régions cérébrales distinctes et vont concerner différents réseaux de neurones sélectionnés pendant l'encodage.

Ainsi, les informations encodées et organisées en une trace mnésique localisée vont déclencher des cascades de signaux intracellulaires conduisant à des modifications synaptiques au niveau des neurones activés lors d'un apprentissage.

Comme précisé un peu plus haut, les résultats de nos travaux ne nous ont pas orienté vers l'étude des processus offline de consolidation, ainsi l'ensemble des processus mis en jeu ne sera décrit que succinctement.

L'excitabilité synaptique sera alors modifiée, notamment par l'activation et l'augmentation d'expression de récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique, mais aussi par l'activation de récepteurs NMDA (Korte and Schmitz, 2016; Wang and Peng, 2016).

Introduction : la mémoire

Différents facteurs de transcription et des voies de signalisation intracellulaires vont également être mis en jeu (CREB et ERK, par exemple), conduisant à la modulation de l'expression de nombreux gènes (précoces ou plus tardifs), tels que *zif 268*, *c-fos*, *c-jun* ou encore *arc* (Wang and Peng, 2016). *In fine*, ces mécanismes conduiront à une modification de l'arborisation dendritique des neurones et une modification morphologique des boutons synaptiques (Gipson and Olive, 2016; Oe et al., 2013). A cela s'ajoutent des mécanismes épigénétiques permettant la régulation de tous ces phénomènes et impactant l'expression génomique induite par l'activation des neurones (Zovkic et al., 2013). Toutes ces modifications vont finalement conduire à une synthèse protéique permettant le renforcement de l'excitabilité synaptique et des connexions neuronales activées lors de l'encodage (Dudai, 2004; Korte and Schmitz, 2016; Tonegawa et al., 2015; Wang and Peng, 2016).

La consolidation systémique

La consolidation synaptique semble s'effectuer localement, au sein du réseau de neurones activés lors de l'encodage. Cependant, différentes expériences ont suggéré qu'une région cérébrale initialement impliquée dans l'expression d'un souvenir pouvait progressivement se désengager de celui-ci au profit d'autres régions (Frankland and Bontempi, 2005; Scoville and Milner, 1957; Squire, 2009). Un tel processus pourrait participer aux phénomènes de sémantisation et de procéduralisation mentionnés plus haut ([cf. page 34](#)).

Ces travaux ont alors conduit à différentes hypothèses concernant la consolidation dite systémique, telle que la *théorie standard* (Marr, 1971), la *théorie de la trace multiple* (Nadel and Moscovitch, 1997) ou encore la *théorie de la transformation de la trace* qui dérive de la théorie standard (Winocur et al., 2010).

Ces différentes théories de la consolidation concernent essentiellement des travaux menés chez des modèles murins de mémoire épisodique ou spatiale, impliquant l'HPC et des modules corticaux. Elles ont comme point commun le postulat que l'engagement de ces régions cérébrales impliquées dans le rappel peut évoluer selon l'âge du souvenir, et que les détails de ce dernier ne seront pas les mêmes selon la structure impliquée ([cf. figure 17](#)).

Introduction : la mémoire

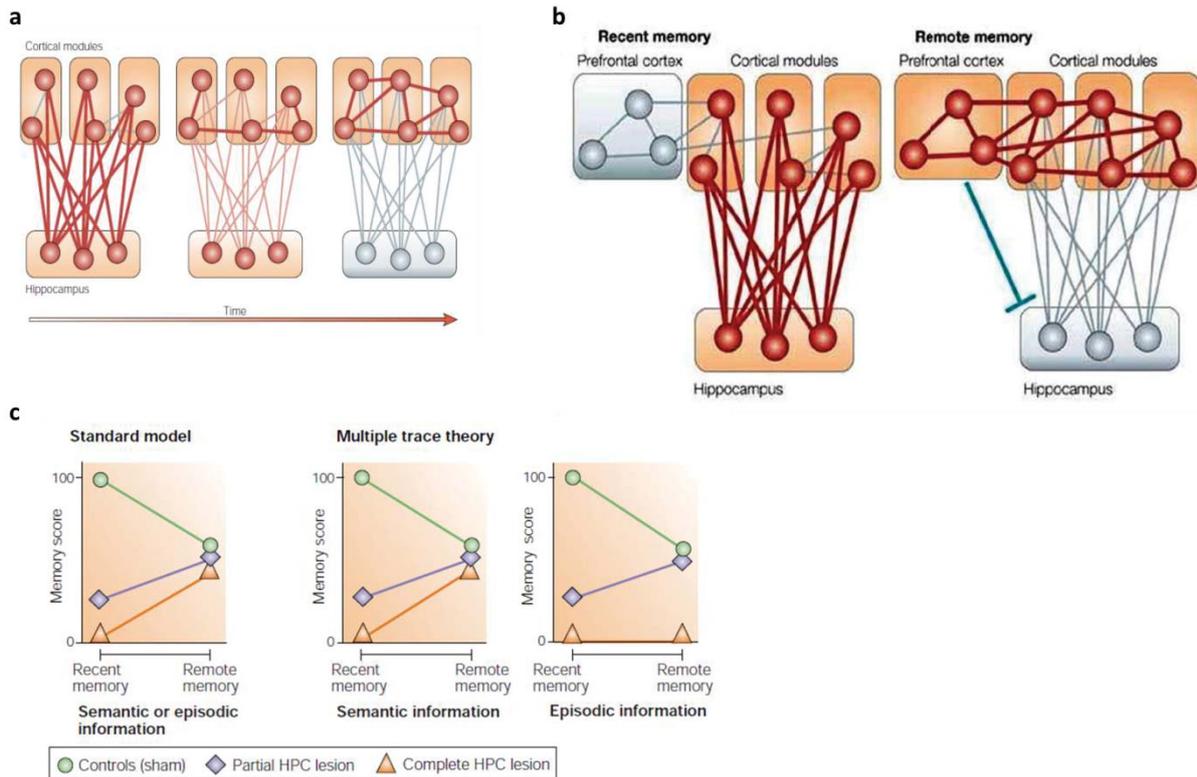


Figure 17 Les principales théories de la consolidation systémiques

Représentation des trois grandes théories de la consolidation à l'échelle des systèmes. (a) la consolidation standard pour laquelle l'HPC est impliqué dans la prise en charge d'un souvenir récent mais ne l'est plus à long terme au profit de modules corticaux. (b) la théorie de la transformation, inspirée de la théorie standard, l'HPC est toujours impliqué dans les souvenirs contextualisés mais peut être inhibé par le CPF laissant ainsi des modules corticaux prendre en charge le souvenir dépourvu de son contexte. (c) La théorie de la trace multiple pour laquelle l'implication de l'HPC est conservée à long terme dans le cas de souvenirs épisodiques, c'est pourquoi sa lésion conduirait à des amnésies même pour des souvenirs anciens. Figure inspiré de (Frankland and Bontempi, 2005)

Les différences entre ces théories résident dans le délai de recrutement des régions ainsi que dans le principe de leur désengagement ou non à long terme (Frankland and Bontempi, 2005) .

D'un point de vue fonctionnel, contrairement à la consolidation synaptique, la consolidation de souvenirs distribués au niveau des systèmes nécessite des réactivations de l'ensemble des réseaux neuronaux.

Ces mécanismes offline de consolidation interviendraient toujours lorsque l'individu se trouve dans un état de repos éveillé, voire de sommeil, ou du moins lorsque le souvenir est sous une forme dite « inactive » (Josselyn et al., 2015). L'importance du sommeil dans les processus de consolidation est aujourd'hui bien décrite (Boyce et al., 2016; Siegel, 2005). De nombreuses études menées chez l'Homme comme chez l'animal ont démontré l'existence d'un phénomène de « replay », c'est-à-dire des réactivations d'assemblées de neurones qui ont été activées lors d'un

Introduction : la mémoire

apprentissage préalable ; ces « replay » ont lieu durant les phases de repos ou de sommeil de l'individu (Genzel and Robertson, 2015; Maquet et al., 2000). Aujourd'hui, ces phénomènes de replay sont surtout étudiés chez les rongeurs au sein de l'HPC. Ils démontrent l'importance de l'activité électrophysiologique de ce dernier dans les processus de consolidation (Boyce et al., 2016; Buzsáki and Moser, 2013).

Les mécanismes décrits ci-dessus pour les mémoires explicites seraient similaires pour les mémoires implicites, excepté qu'ils vont mettre en jeu d'autres structures telles que le striatum, le cervelet ou encore l'amygdale (Amg) et le néocortex (Barnes et al., 2005; Graybiel, 2005). Tout comme la mémoire explicite, les souvenirs implicites pourront mettre en jeu plusieurs structures cérébrales.

Des cas cliniques d'amnésies temporellement graduées confirment ces théories, suggérant que selon l'âge d'un souvenir autobiographique l'implication de l'HPC peut diminuer. En effet, le gradient temporel de l'amnésie du patient H.M. a démontré que ses capacités mnésiques concernant les souvenirs explicites anciens (au-delà de 11 ans avant son opération) étaient conservées, contrairement aux souvenirs récents. Ce cas clinique démontre l'importance de l'HPC dans la mémoire explicite récente, mais aussi son désengagement à plus long terme (Squire, 2009).

Ces théories sont également cohérentes avec l'existence de multiples systèmes de mémoire permettant une représentation d'un même souvenir au sein d'un réseau cérébral distribué (White and McDonald, 2002). De cette manière, un souvenir, ou certains aspects de celui-ci peuvent être pris en charge par des régions cérébrales distinctes qui vont interagir lors du rappel (White and McDonald, 2002; White et al., 2013). Plusieurs versions d'une même expérience peuvent donc être prises en charge par différentes régions cérébrales, chacune se spécialisant dans un aspect spécifique du souvenir.

Tous ces travaux suggèrent que les processus de consolidation, effectués de manière offline, permettent le maintien à long terme d'un souvenir dans un réseau cérébral distribué. Cette étape nécessaire à la stabilisation d'un souvenir permet donc le renforcement de plusieurs réseaux neuronaux qui peuvent être distincts et qui sont les substrats biologiques du souvenir. Tous ces systèmes de mémoire vont

Introduction : la mémoire

ensuite pouvoir être activés au moment du rappel et le résultat de cette activation va conduire à l'expression d'un comportement adapté à la situation à laquelle le sujet est confronté.

3.5.3 Le rappel

Le rappel d'un souvenir, souvent induit par la présence d'indices internes et/ou externes, va nécessiter une réactivation du réseau neuronal sous-tendant le souvenir de l'expérience initiale (Ben-Yakov et al., 2015).

Ce rappel de l'information conduit généralement à une sortie comportementale qui va permettre à l'individu d'agir ou de réagir à une situation (Gisquet-Verrier and Riccio, 2012). En effet, lors du rappel de souvenirs, nous sommes soit confronté à une situation qui nous demande directement le rappel d'une information (par ex., une question posée, un problème à résoudre ou une séquence de mouvements à engager), soit dans un contexte qui nous fait nous remémorer un souvenir (par ex., la bien connue madeleine de Proust).

En partant de ce constat, de nombreuses expériences menées chez la Souris par le groupe de recherche de Tonegawa ont suggéré et démontré que la simple réactivation du réseau neuronal formé lors de l'acquisition d'une expérience pouvait être suffisante à l'activation de l'information mémorisée (*cf. figure 18*) (Liu et al., 2014; Ramirez et al., 2013, 2014; Tonegawa et al., 2015). De cette manière l'activation artificielle d'un réseau de neurones mis en jeu lors d'une expérience (de peur conditionnée chez la Souris pour ces travaux) peut conduire à créer de « faux souvenirs » (*cf. figure 18*) (Liu et al., 2014; Ramirez et al., 2013, 2014; Tonegawa et al., 2015). Ces études démontrent qu'une assemblée de neurones activée lors d'une expérience peut être le substrat biologique de l'engramme. Cependant ces travaux ne ciblent en général que des réseaux de neurones situés au sein d'une seule structure, l'HPC, et ne prennent pas en compte toutes les régions cérébrales d'un système de mémoire potentiellement impliquées dans le rappel (Ramirez 2012, Tonegawa 2014).

Introduction : la mémoire

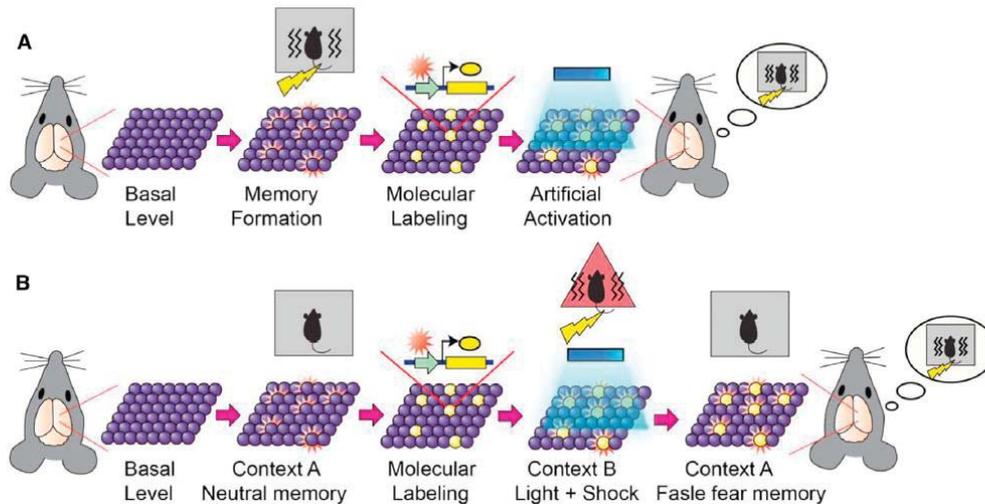


Figure 18 Les neurones mis en jeu lors de l'apprentissage sont nécessaire au rappel d'un souvenir

(a) Lors de l'encodage d'une expérience (un conditionnement de peur ici) certains neurones [d'une souris ici (billes violettes)] sont activés (dans le contexte carré gris). Si expérimentalement ces neurones sont réactivés (artificial activation), un comportement de peur est observé chez cette souris. (b) Selon ce principe il est alors possible, grâce à l'activation de neurones activés dans un contexte neutre (carré gris, « context A »), dans un contexte émotionnellement chargé (triangle rouge, « context B »), de créer un faux souvenir de peur dans le « context A ». Ce type d'expérience a permis de démontrer que l'activation d'un réseau neuronal mis en jeu lors d'une expérience est suffisant pour rappeler tout ou partie du souvenir de cette expérience. Figure de Ramirez et collaborateurs 2014.

Ainsi, de nombreuses études d'imagerie chez le rongeur comme chez l'Homme ont d'ailleurs montré l'activation du CPF, de l'Amg, du thalamus, du striatum ou encore du cervelet lors de l'encodage et du rappel d'informations (Doyon et al., 2003; Herry and Johansen, 2014; Lesburgueres et al., 2011; Maviel, 2004; McDonald and Mott, 2016; Tse et al., 2011). L'activation de ces régions dépend en général de la situation dans laquelle se trouve l'individu qui doit rappeler un souvenir.

Le rappel d'un souvenir semble donc dépendre de l'activation d'un réseau de neurones, voire d'un système mnésique, spécialisé dans un type de mémoire, mis en place dès l'encodage, et qui peut être distribué au sein de différentes régions cérébrales. De plus le réseau neuronal peut avoir évolué, selon l'âge du souvenir ou encore la manière dont il a été encodé pour impliquer d'autres structures cérébrales. En effet, un désengagement hippocampique peut être observé pour certains types de souvenirs anciens (Frankland and Bontempi, 2005; Squire, 2009). Dans d'autres cas, si la situation nécessite le rappel d'un automatisme, un système « moteur » impliquant notamment le striatum sera privilégié, alors que si le rappel porte sur un

Introduction : la mémoire

souvenir épisodique, l'activité d'un système « cognitif » comprenant l'HPC sera prédominante (Henke, 2010).

Ces travaux confirment la multiplicité des structures cérébrales pouvant intervenir dans le rappel d'un souvenir avec un rôle-clé des contextes d'apprentissage. C'est finalement le résultat de l'activité de toutes les structures de chaque système de mémoire qui nous permet d'exprimer un comportement particulier dans une situation donnée, en choisissant une parmi plusieurs des stratégies possibles. Le rappel peut finalement être vu comme une réponse de notre organisme résultant de la réactivation de réseaux neuronaux qui ont déjà fait l'expérience de la situation à laquelle nous sommes confrontés.

Pour résumer, *l'encodage* consiste à recruter des neurones au sein de régions cérébrales, considérées comme des systèmes spécialisés dans le traitement de certains types de souvenirs (épisodiques ou procéduraux par exemple). Ces systèmes sont distribués au sein de notre cerveau. *La consolidation* va ensuite conduire au renforcement des connexions neuronales au sein de ces différents systèmes pour maintenir le souvenir à long terme. Toutes ou partie des régions impliquées dans ce souvenir peuvent finalement être recrutées au moment *du rappel* du souvenir. C'est donc finalement l'activation d'un des systèmes mnésiques qui va permettre le rappel du souvenir. Cependant, la neuroanatomie de chaque type de mémoire semble être spécifique et même pouvoir évoluer, notamment avec le temps, ou encore selon les conditions d'apprentissage et de rappel.

3.6. Neuroanatomie de la mémoire

White et McDonald ont décrit, chez le rongeur, 3 grands types de systèmes, possédant chacun une structure principale, spécialisée dans le traitement d'un type de souvenir, et en interaction avec plusieurs autres régions cérébrales (White and McDonald, 2002; White et al., 2013).

La mise en évidence de ces systèmes s'est basée sur l'étude comportementale de rongeurs soumis à une lésion de la structure principale de ces systèmes. De cette manière, un premier système, dit « *spatial* », dépend du fonctionnement de l'HPC. Il est impliqué dans des réponses dites allocentrées pour la production desquelles l'animal s'appuie sur une représentation de son environnement, autrement dit une carte cognitive. Le second, dit « *automatique* » ou « *pallidal* » dépend du striatum. Il

Introduction : la mémoire

concerne des comportements de type « stimulus – réponse », ou égo-centrés, et fournit un support neuronal à une mémoire dite procédurale. Enfin un système « *émotionnel* » nécessitant le fonctionnement de l'Amg semble pouvoir être recruté lorsque l'animal est confronté à une situation aversive, stressante ou plaisante (*cf.figure 19a*). C'est finalement l'utilisation d'un de ces systèmes qui permet à l'individu d'engager un comportement, que l'on peut considérer comme une stratégie. Pour White et McDonald, ces systèmes sont activés en parallèle lors de chaque apprentissage et nécessitent l'engagement de différentes structures qui vont pouvoir interagir et conduire à un comportement adapté à une situation donnée.

Chez l'Homme, différentes études d'IRMf ou certains cas cliniques ont permis de mettre en évidence une correspondance entre les modèles de mémoire distingués chez les animaux et les systèmes de mémoire humaine (Henke et al 2010).

En effet, nous retrouvons chez l'Homme des structures préférentiellement engagées dans les souvenirs de types épisodiques, procéduraux, ou émotionnels. Ceux-ci correspondraient aux systèmes « spatial », « automatique » et « émotionnel » décrits chez les modèles animaux (*cf.figure 19b*).

A tous ces systèmes, j'aimerais ajouter un système de « mémoire de travail » qui impliquerait le CPFm. En effet, cette mémoire est souvent mise à l'écart des études concernant les systèmes de mémoire, car elle ne concerne pas la MLT et ne met pas en jeu de processus de consolidation. Cependant, son fonctionnement nécessite également un réseau de structures distribuées et en constante interaction (Bergmann et al., 2016).

Introduction : la mémoire

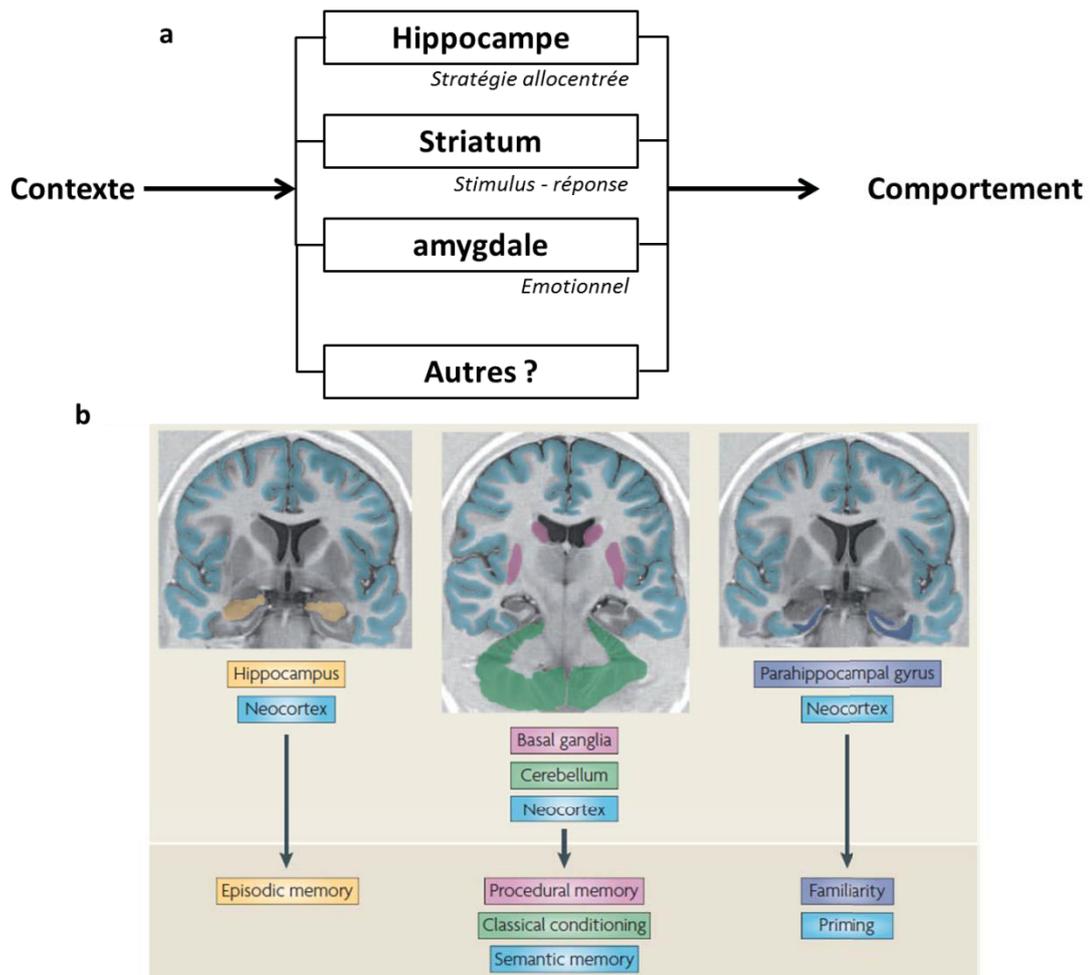


Figure 19 Les différents « systèmes » de mémoire

(a) Représentation schématique des systèmes de mémoire proposés par White et McDonald (2002). Tous ces systèmes de mémoire permettent finalement la mise en place de comportements. (b) Equivalent de ces systèmes de mémoire chez l'Homme (inspiré de Henke et al., 2010).

Finalement, nos différentes mémoires mettent en jeu un grand nombre de structures cérébrales réparties en systèmes spécialisés. Cependant la compréhension des interactions entre ces systèmes et la description précise de toutes les structures impliquées dans la mémoire reste un axe de recherche important en neurosciences.

Les paragraphes suivants viseront à succinctement décrire les régions cérébrales principales impliquées dans ces différents systèmes de mémoire. De nombreuses régions appartenant à plusieurs systèmes de mémoire seront également mentionnées dans la description des structures.

3.6.1 L'HPC, structure principale du système « spatial »

L'implication de l'HPC dans la mémoire explicite chez l'Homme, notamment épisodique, tout comme chez des modèles murins, a été largement décrite (Scoville

Introduction : la mémoire

and Milner, 1957; van Strien et al., 2009; Teng and Squire, 1999). C'est notamment grâce à sa capacité à coder l'environnement (Hartley et al., 2013; Rowland et al., 2016) qu'il intervient dans les processus mnésiques de souvenirs contextualisés (Nadel et al., 2003; Spellman et al., 2015; Squire and Zola-Morgan, 1991).

Chez l'Homme, en plus du très connu patient H.M. (Scoville and Milner, 1957; Squire, 2009), différentes études d'IRMf ont démontré l'importance de l'HPC dans des tâche de navigation spatiale et de mémoire (Burgess et al., 2002; Kumaran and Maguire, 2005; Zeidman and Maguire, 2016). En effet, une étude menée chez des chauffeurs de taxi londoniens a montré que l'HPC droit est recruté lors d'une tâche de navigation, alors que le gauche est recruté lors d'un rappel de souvenir sémantique, dépourvu de contexte (Maguire, 1997; Maguire et al., 1997).

Chez le rongeur, la plupart des expériences ont utilisé des paradigmes expérimentaux de mémoire spatiale, modèle de mémoire épisodique humaine (*cf. Modélisation de la mémoire chez le rongeur, page 59*). La lésion réversible ou permanente, ou encore des perturbations électrophysiologiques de l'HPC dorsal (HPCd) engendrent des déficits de mémoire spatiale chez des modèles murins (McNaughton et al., 2006; Moser and Moser, 1998). Sa partie ventrale (HPCv) (Moser and Moser, 1998), longtemps décrite comme plutôt impliquée dans des processus émotionnels, semble aussi pouvoir intervenir dans de ce type de mémoire chez le rongeur (Loureiro et al., 2012a; Strange et al., 2014).

Chez l'Homme comme chez le rongeur, un rythme électrophysiologique nécessaire à la navigation et aux processus mnésiques, le rythme thêta, a été mis en évidence. Cette activité rythmique, prédominante dans l'HPC, d'une gamme de fréquences allant de 4 à 12 Hz, est observable durant les phases d'éveil et durant une phase particulière de sommeil impliquée dans les phases de consolidation de la mémoire : le sommeil paradoxal (Boyce et al., 2016; Buzsáki, 2002; Buzsáki and Moser, 2013; Hasselmo, 2005).

De nombreuses études ont également démontré l'importance de la voie septo-hippocampique dans la mémoire spatiale chez le rongeur (Eidi et al., 2013; Khakpai et al., 2013; Lecourtier et al., 2011; Niewiadomska et al., 2009). Le septum médian et la bande diagonale de Broca constituent les afférences majeures de l'HPC et il semblerait que les projections glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques

Introduction : la mémoire

du septum vers l'HPC puissent moduler l'activité hippocampique et qu'elles soient un générateur du rythme thêta (Hangya et al., 2009). Ainsi la lésion permanente ou l'inactivation fonctionnelle réversible de ces noyaux ou de la voie septo-hippocampique provoque d'importants déficits dans des tests comportementaux de mémoire spatiale (Kelsey and Landry, 1988; Koenig et al., 2008; McNaughton et al., 2006; Rashidy-Pour et al., 1996a, 1996b).

L'implication de l'HPCd dans la mémoire de travail a également été décrite, notamment via des interactions avec le CPFm chez le rongeur, et en particulier lorsque cette mémoire nécessite le traitement d'informations spatiales (Bergmann et al., 2016; Griffin, 2015; Spellman et al., 2015).

Ainsi, l'HPC apparaît comme la structure principale d'un système « spatial » permettant l'encodage de l'environnement et le maintien d'un souvenir possédant des caractéristiques contextuelles.

3.6.2 Le CPF, structure principale de la mémoire de travail

Il est important de noter ici que la notion de CPF chez le rat et sa comparaison avec celui de l'Homme est particulièrement sujette à controverse (Uylings et al., 2003). Il semble néanmoins possible de comparer fonctionnellement le CPFm des rats avec le CPF dorsolatéral (CPFdl) des primates et de l'Homme (Uylings et al., 2003), leur implication ayant largement été décrite dans les processus de mémoire de travail (Eriksson et al., 2015; Gisquet-Verrier and Delatour, 2006; Goldman-Rakic, 1996; Kesner, 2000).

Fuster et Alexander ont en effet mis en évidence en 1971 que la fréquence de décharge de certains neurones du CPF était augmentée et maintenue durant les délais utilisés lors de tâches de mémoire de travail chez le primate (1971). Cette première expérience a suggéré que le CPF était directement impliqué dans le stockage de l'information. Cependant, aujourd'hui de nombreuses études s'accordent à dire qu'il serait impliqué dans la manipulation et l'utilisation des informations (Gisquet-Verrier and Delatour, 2006; Rowe et al., 2000). Finalement, le CPFm est aujourd'hui décrit comme la structure impliquée dans les fonctions exécutives au sein desquelles de nombreux auteurs placent la mémoire de travail (Kesner and Churchwell, 2011; Lara and Wallis, 2015).

Introduction : la mémoire

De nombreuses études chez le rat ont également montré l'implication de régions corticales préfrontales lors du rappel d'une l'information spatiale (Cholvin et al., 2016; Frankland and Bontempi, 2005; Takehara et al., 2003). En effet, toutes les théories de la consolidation se basent sur une réorganisation des réseaux neuronaux impliqués dans le souvenir et postulent que des modules corticaux, qui peuvent comprendre le CPFm, seraient impliqués dans le rappel ancien d'un souvenir épisodique (Frankland and Bontempi, 2005; Josselyn et al., 2015). Lesburguères et collaborateurs ont notamment démontré un phénomène d'étiquetage précoce au sein du cortex orbito-frontal (2011) dans un modèle de transmission sociale de préférence alimentaire chez des rats. Différentes études chez le Rat ont aussi décrit que l'utilisation de schémas mnésiques facilitant l'acquisition de nouveaux souvenirs épisodiques impliquait le CPFm (Tse et al., 2011).

L'HPC projette au CPFm et cette connexion est unidirectionnelle (Cassel et al., 2013; McKenna and Vertes, 2004). Cette connectivité fait aujourd'hui l'objet de nombreuses investigations, afin de mieux comprendre les interactions entre ces deux structures dans le cadre des fonctions mnésiques. En effet, beaucoup de travaux ont démontré l'importance d'un dialogue hippocampo-préfrontal dans la mémoire de travail spatiale chez le rongeur, notamment via des synchronisations électrophysiologiques (Colgin, 2011; Griffin, 2015; Spellman et al., 2015). De cette manière, le CPFm pourrait intégrer un réseau « spatial » et ainsi intervenir dans des mémoires spatialement contextualisées.

Tous ces travaux suggèrent donc l'importance du CPF dans la MCT, dont il est la structure principale, mais aussi dans la MLT, notamment épisodique.

3.6.3 Le striatum, structure principale du système « automatique »

Longtemps, l'étude des GB a eu pour objet leur implication dans le contrôle moteur (Rothwell, 2011). Or, de nombreux travaux, menés chez l'Homme comme chez le primate non humain et le rongeur, montrent aujourd'hui leur implication dans des processus d'apprentissage et de mémorisation (Fouquet et al., 2013; Packard and Knowlton, 2002; Yin and Knowlton, 2006). Le striatum qui forme la porte d'entrée des GB serait notamment impliqué dans les mémoires implicites et plus précisément dans la mémoire procédurale (Packard and Knowlton, 2002). Il a été démontré que la partie dorso-latérale du striatum soit impliquée dans l'aspect mnésique de la tâche et

Introduction : la mémoire

sa partie dorso-médiane dans le comportement dirigé vers un but (Fouquet et al., 2013; Yin and Knowlton, 2006).

La mémoire procédurale implique également des aires corticales préfrontales et motrices, ainsi que le cervelet (Shadmehr and Holcomb, 1997). De cette manière, ces apprentissages procéduraux mettent en jeu des voies cortico-striatales et cortico-cérébelleuses (Doyon et al., 2003) qui coexisteraient avec des représentations du souvenir prises en charge par l'HPC.

3.6.4 L'Amg, pièce maitresse d'un système « émotionnel »

Tout comme l'HPC est primordial à l'encodage contextuel d'un souvenir, l'Amg est prépondérante dans des processus d'apprentissage et de mémoire, notamment en participant à l'étiquetage émotionnel du souvenir (Janak and Tye, 2015; McDonald and Mott, 2016). Il est clairement établi à l'aide de paradigmes de conditionnement de peur chez le rongeur que l'Amg basolatérale antérieure (Amg_{BLA}) participe à l'encodage, à la consolidation et au rappel de la mémoire d'expériences à forte valence émotionnelle (Izquierdo et al., 2016; McGaugh, 2004). Différents composés pharmacologiques instillés dans cette région cérébrale lors de paradigmes de conditionnement de peur ou d'évitement actif ont démontré l'importance de cette structure dans la mise en place de souvenirs liés à des expériences aversives (Izquierdo et al., 2016; LaLumiere et al., 2003).

Chez l'Homme, l'importance de cette structure dans les processus mnésiques concernant des souvenirs émotionnellement chargés, notamment via des connexions avec l'HPC, a également été décrite (McDonald and Mott, 2016; Phelps and LeDoux, 2005). De plus, le volume de l'Amg de patients atteints du syndrome de stress post-traumatique, notamment les vétérans de différentes guerres, apparaît diminué (Morey et al., 2012), démontrant des modifications importantes de cette structure en réaction à des expériences fortement négatives sur un plan émotionnel.

3.6.5 Le thalamus

Différents cas cliniques, notamment de patients atteints du syndrome de Korsakoff, ont démontré l'importance de certains noyaux diencephaliques dans les processus mnésiques (Kopelman, 1995, 2015). Les dommages cérébraux semblent localisés pour l'essentiel au niveau des noyaux antérieurs, médiodorsaux, intra-laminaires et de la ligne médiane.

Introduction : la mémoire

Des modèles murins, ont également permis de mettre en évidence des déficits de mémoires spatiales ou de conditionnement de peur suite à différentes lésions thalamiques chez le Rat (Dalrymple-Alford et al., 2015; Lopez et al., 2009; Van der Werf et al., 2003; Wolff et al., 2008). De récentes études menées au LNCA ont aussi démontré l'implication des noyaux reuniens et rhomboïde (ReRh) dans la consolidation systémique d'une mémoire spatiale chez le rat (Davoodi et al., 2009; Loureiro et al., 2012b). L'importance de ces noyaux thalamiques lors de tâches de mémoire de travail a également été suggérée par des expériences d'inactivation (Hembrook et al., 2012). Le lien que forment les noyaux ReRh entre l'HPC et le CPF fait aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches, car il semble être un pont entre ces deux structures et ainsi intervenir dans la navigation spatiale ainsi que dans la MLT et la MCT (Cassel and Pereira de Vasconcelos, 2015; Griffin, 2015; Ito et al., 2015; Xu and Sudhof, 2013).

3.6.6 Pourquoi tant de structures impliquées dans la mémoire ?

L'existence de différents systèmes de mémoire spécialisée et le fait qu'ils puissent intégrer un même souvenir en parallèle peut paraître étonnant et surtout redondant. Pour essayer de mieux comprendre cette absence « d'économie cérébrale » concernant nos capacités mnésiques, il faut rappeler que nos souvenirs vont en général nous permettre de rappeler une situation déjà expérimentée souvent afin d'adapter notre comportement en vue de quelque chose. Les buts de chaque rappel d'information peuvent être de tout ordre. Par exemple, pour un animal, rappeler le comportement adapté face à un prédateur ou face à une proie, ou encore la localisation de son habitat. Chez l'Homme les exemples sont infinis. En effet, nous rappelons constamment des informations pour se repérer lors d'un trajet, pour un examen, pour répondre à une question de son directeur de thèse ou encore pour comparer des expériences passées avec un événement tout juste vécu.

Ainsi, la possibilité d'une « sélection » de l'un de nos systèmes de mémoire par rapport à un autre nous permet d'adapter notre comportement aux exigences d'une situation. Cette capacité d'adaptation est primordiale à la survie de tout individu et pour toutes les espèces. Cependant, les processus de sélection de ces systèmes sont pour le moment méconnus.

Introduction : la mémoire

Une hypothèse suggère un contrôle simple par un effet de « qui est arrivé le premier » (McDonald and Hong, 2013). Dans ce modèle, lors d'une expérience, les stimuli intégrés vont naturellement privilégier un système, par exemple la valence émotionnelle de la situation peut favoriser l'implication de l'Amg. Ainsi lors du rappel de cet évènement, le système sélectionné, qui va conduire à l'expression d'un comportement, serait celui qui était le premier impliqué dans l'encodage du souvenir. D'autres hypothèses suggèrent que la répétition de l'apprentissage peut conduire à un changement de système mnésique utilisé.

Des travaux expérimentaux démontrent, par exemple, l'évolution du comportement d'un rat au cours d'un apprentissage répétitif en labyrinthe. Cette évolution suggère que l'animal peut progressivement cesser d'utiliser une stratégie « allocentrée » impliquant plutôt le système hippocampique, pour favoriser une stratégie égocentrée impliquant le système striatal (McDonald and Hong, 2013; White et al., 2013). D'autres auteurs proposent, chez des modèles murins, des comportements « par défaut », engagés rapidement lorsque l'animal est confronté à une situation d'apprentissage (Devan et al., 1999a). Ce comportement par défaut permettrait de rapidement déclencher un comportement, avant de le faire évoluer si l'expérience se répète et que l'apprentissage d'un comportement plus adapté se met en place.

Il semble également que différents facteurs soient capables d'influencer le système mnésique utilisé. Parmi eux, il faut compter le stress (Joëls et al., 2011; Ness and Calabrese, 2016). En effet, le stress ressenti par l'individu semble pouvoir favoriser les systèmes procéduraux par rapport aux systèmes spatiaux (Schwabe, 2013; Schwabe et al., 2007). Il est aussi possible, dans des cas pathologiques, qu'un système soit altéré, et conduise l'individu à présenter un comportement inadapté face à une situation.

Par exemple, un stress répété peut contribuer à une hyperactivité de l'Amg, qui, *in fine*, peut conduire à des syndromes de stress post-traumatiques. Ceux-ci seraient alors le résultat de rappels inadaptés d'une situation stressante (Padival et al., 2013a, 2013b; Rainnie et al., 2004).

Il est important de noter ici que toutes nos actions et toutes les expériences auxquelles nous sommes confrontés ne nécessitent pas forcément un choix entre différents systèmes de mémoire. En effet, ce n'est que lorsqu'une situation peut être

Introduction : la mémoire

résolue de différentes façons que les systèmes de mémoire vont devoir interagir et être sélectionnés d'une manière qui permette la réponse la plus adaptée.

3.7. Neurochimie de la mémoire

Au sein des différents systèmes de mémoire, il existe des mécanismes neurochimiques complexes et des régulations fines. La recherche en neurosciences a depuis longtemps ambitionné de décrire cette neurochimie de la mémoire, avec notamment le rôle de l'ACh, du glutamate, du GABA, ou encore des monoamines. Cependant, il semble que tous les systèmes de neurotransmission puissent intervenir dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire (pour revue Myrher 2003). De plus, leurs possibles interactions ajoutent un niveau de complexité aux fonctions que l'on pourrait associer à chaque système de neurotransmission.

3.7.1 *Les transmissions glutamatergique et GABAergique*

Malgré le développement d'outils optogénétique ou pharmacogénétique, l'une des techniques les plus utilisées pour étudier la mémoire est la lésion réversible ou micro-instillation. De cette manière une multitude d'études a permis de démontrer l'implication d'une région cérébrale dans les processus mnésiques par l'intermédiaire d'activations ou d'inactivations induites par des agonistes glutamatergiques ou GABAergiques (Arolfo et al., 1998; Pierson et al., 2015; Wang and Peng, 2016; Zarrindast et al., 2002). Ainsi, sans directement discuter l'aspect neurochimique de leurs études, les auteurs ont démontré l'importance de ces systèmes de neurotransmission dans la mémoire. Plus précisément, de nombreux travaux ont permis de décrire plus précisément l'implication du glutamate et du GABA dans les processus mnésiques.

En accord avec la théorie de la consolidation synaptique, la transmission glutamatergique, responsable des mécanismes de potentialisation (PLT) et de dépression (DLT) synaptique à long terme, a été décrite comme primordiale à la mise en place d'une mémoire (Kullmann and Lamsa, 2007; Wang and Peng, 2016). L'expression de récepteurs AMPA et NMDA, ainsi que leur ratio semble être une condition indispensable aux mécanismes de renforcement synaptique (Korte and Schmitz, 2016). Il semble donc que durant l'encodage et la consolidation la neurotransmission glutamatergique façonne la mise en place du souvenir.

Introduction : la mémoire

Les techniques génétiques ont également permis une meilleure description de l'importance de ces récepteurs dans la mémoire. En effet, une lignée de souris transgéniques n'exprimant pas de récepteurs NMDA fonctionnels a présenté de très mauvaises performances mnésiques dans différents tests de modèle de mémoire (Brigman et al., 2010).

Concernant la transmission GABAergique, des altérations ou des améliorations de performances mnésiques ont été observées après l'instillation d'antagonistes et d'agonistes GABAergiques, respectivement, au sein de l'HPC chez des rats (Arolfo et al., 1998; Zarrindast et al., 2002). La transmission GABAergique semble participer à la formation d'assemblées cellulaires au sein de l'HPC et de l'Amg (Morrison et al., 2016; Stefanelli et al., 2016). En effet, la présence d'interneurons inhibiteurs au sein de l'HPC apparait primordiale à la formation de réseaux neuronaux nécessaires à la mémoire (Paulsen and Moser, 1998; Stefanelli et al., 2016).

Ainsi, en plus de la transmission glutamatergique qui permet le renforcement de connexions synaptiques, le GABA semble pouvoir sélectionner ou du moins participer à la mise en place des réseaux de neurones qui sous-tendent les processus de mémorisation. Différents travaux ont également démontré l'importance des neurones GABAergiques de la voie septo-hippocampique dans les processus mnésiques (Lecourtier et al., 2011; Roland et al., 2014). Les neurones GABAergiques du septum projetant à l'HPC seraient impliqués dans des tâches mnésiques chez le Rat et pourraient moduler la transmission cholinergique particulièrement impliquée dans les processus mnésiques ([cf. page suivante](#)) (Roland et al., 2014).

En plus de leur rôle dans la mise en place de réseaux cellulaires, les interneurons semblent participer à la genèse de rythmes électrophysiologiques nécessaires à la mémoire. Les interneurons exprimant la parvalbumine seraient notamment impliqués dans la genèse du rythme thêta (Amilhon et al., 2015; Somogyi and Klausberger, 2005; Xu et al., 2016). Il a également été démontré qu'un dysfonctionnement des interneurons à somatostatine hippocampiques pouvait être associé à des troubles de la maladie d'Alzheimer chez un modèle murin (Schmid et al., 2016).

Introduction : la mémoire

Toutes ces études démontrent ainsi l'importance des neurotransmissions glutamatergiques et GABAergiques dans les processus mnésiques.

3.7.2 La transmission cholinergique

L'hypothèse cholinergique a longtemps suggéré que les atteintes spécifiques du système cholinergique, notamment du télencéphale basal, étaient responsables des troubles cognitifs liés à l'âge et à la maladie d'Alzheimer (Bartus et al., 1985; Micheau and Marighetto, 2011). Cependant l'aspect multifactoriel de la pathologie remet en question cette théorie.

De nombreuses études ont néanmoins démontré l'implication de ce système de neurotransmission dans les fonctions mnésiques. A nouveau, l'utilisation d'instillations intra-cérébrales d'agonistes et d'antagonistes cholinergiques chez le rongeur ont démontré des effets sur les capacités mnésiques (Micheau and Marighetto, 2011). Aujourd'hui, différentes études suggèrent que l'ACh intervient préférentiellement lors des phases d'encodage plutôt que dans la consolidation et le rappel d'une mémoire (Micheau and Marighetto, 2011).

Un grand nombre d'expériences a décrit l'importance de la modulation cholinergique au sein de l'HPC, notamment via les afférences en provenance du septum médian et de la bande diagonale de Broca (Lecourtier et al., 2011). En effet, le niveau d'ACh augmente au sein de l'HPC de rats lors d'une tâche d'apprentissage (Chang and Gold, 2003) et cette augmentation serait de plus en plus forte en cas d'entraînement répétés (Fadda et al., 2000). Cette libération d'ACh au sein de l'HPC est d'ailleurs observée lorsqu'une stratégie spatiale est utilisée par les animaux (McIntyre et al., 2003).

L'ACh semble aussi pouvoir moduler les performances mnésiques dépendantes du striatum (Havekes et al., 2011; Satoh et al., 1983). Chang et Gold ont décrit les profils de libération d'ACh au sein de l'HPC et du striatum au cours d'un apprentissage en labyrinthe en croix (2003). Ils ont ainsi démontré que cette libération augmente progressivement dans le striatum au cours de l'apprentissage. De plus, cette augmentation est corrélée à un changement de stratégie des rats, les animaux abandonnant progressivement une stratégie spatiale impliquant l'HPC au profit d'une stratégie procédurale impliquant le striatum. Ainsi, l'ACh pourrait participer à sélection d'un système mnésique.

Introduction : la mémoire

3.7.3 Les transmissions monoaminergiques

Le rôle des monoamines dans les processus mnésiques semble essentiellement modulateur. En effet, toutes les monoamines semblent capables d'intervenir via différents mécanismes dans les processus d'encodage ou encore lors d'étapes de consolidation synaptique. De plus, leur influence sur les rythmes électrophysiologiques est également largement décrite. Cependant, bien que largement étudiés, le rôle et les mécanismes par lesquels ces neurotransmetteurs interviennent dans la mémoire restent à préciser.

De nombreux travaux ont montré l'importance de la DA dans le maintien d'une mémoire à long terme (Chowdhury et al., 2012; Lisman and Grace, 2005; O'Carroll and Morris, 2004), son implication semblant suivre un timing précis (Rossato et al., 2009). En effet, des instillations d'antagonistes et d'agonistes des récepteurs D1 au sein de l'HPC 12h après un apprentissage, chez le Rat, induit respectivement une détérioration ou une amélioration des performances. De plus, aucun effet n'est observable si ces instillations sont faites immédiatement ou 9h après l'apprentissage (Rossato et al., 2009). La DA intervient également dans les processus de plasticité synaptique, notamment lors de la PLT (Li et al., 2003; Lisman et al., 2011). Ce neurotransmetteur semble aussi pouvoir participer, au sein de l'HPC et du striatum, à la synthèse protéique nécessaire à la maturation dendritique (Lisman et al., 2011).

Ainsi, la DA peut intervenir dans les processus de consolidation synaptique et participer à la stabilisation d'un souvenir.

Sa libération peut également dépendre du niveau de motivation de l'individu, de l'aspect récompensant ou de la nouveauté d'une tâche (Lisman and Grace, 2005; Matsumoto and Hikosaka, 2007), autant de processus qui vont pouvoir moduler l'apprentissage. En effet, Lisman et Grace ont montré une augmentation des niveaux de DA, capables de moduler les mécanismes de PLT, au sein de l'HPC lorsqu'un animal est exposé à un nouvel environnement (Lisman and Grace, 2005). Ainsi, elle pourrait intervenir durant l'encodage en « signalant » la nouveauté d'une information. Enfin, la DA a été largement décrite comme primordiale à la mémoire de travail notamment au sein du CPF et du striatum (Clatworthy et al., 2009; Floresco and Magyar, 2006; Goldman-Rakic et al., 2000). En effet, les niveaux de DA préfrontaux semblent être corrélés aux performances en mémoire de travail selon une courbe en U inversé, où les niveaux intermédiaires optimiseraient les performances (Clark and

Introduction : la mémoire

Noudoost, 2014; Floresco, 2013; Murphy et al., 1996). Le rôle de la DA dans la mémoire de travail pourrait être sous l'influence du CPF et de l'HPC. En effet, une synchronisation à 4 Hz des oscillations de champs entre le CPF, l'HPC et l'ATV, a été observée lors d'une tâche de mémoire de travail (Fujisawa and Buzsáki, 2011). Une telle synchronisation pourrait refléter une communication entre ces trois structures (Fries, 2005, 2015) qui seraient ainsi capables d'interagir afin de moduler les niveaux de DA nécessaires aux performances mnésiques impliquant le CPF et l'HPC.

Il a également été démontré chez le primate non humain et le Rat que l'instillation d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques de la classe D1 (D1 et D5) provoque d'importants déficits lors d'une tâche de mémoire de travail (Floresco, 2013; Sawaguchi and Goldman-Rakic, 1991). Par contre, les résultats concernant le rôle des récepteurs D2 (D2, D3 et D4) dans la mémoire de travail semblent moins évidents, montrant parfois des effets contradictoires suite à l'instillation d'agonistes ou d'antagonistes sur les performances mnésiques (Liggins, 2009).

Ainsi, le rôle de la DA, via les récepteurs D1, dans la mémoire de travail est particulièrement bien connu aujourd'hui, tout comme la capacité de ce neurotransmetteur à assurer une modulation des MLT.

L'implication de la 5-HT a également été décrite dans la modulation de différentes mémoires (Haider et al 2007, Meneses 1999). Cependant, la variété de 5HTR rend les études concernant son rôle dans les processus mnésiques fastidieuses.

Son action sur différents types de 5HTR semble pouvoir favoriser la plasticité synaptique au sein de l'HPC et participer à la formation et à la consolidation de la mémoire (Fernandez et al., 2016; Haider et al., 2007; Meneses and Hong, 1999; Meneses et al., 1998; Perez-Garcia and Meneses, 2008). Il semble que l'instillation d'agonistes des récepteurs 5-HT_{2A/2C} et 5-HT₄ et d'antagonistes 5-HT_{1A/1B} ou 5-HT₃ ait un effet bénéfique sur les processus mnésiques. Par contre, l'instillation d'agonistes 5-HT_{1A/1B} ou 5-HT₃ semble provoquer une altération de ces mêmes processus (Buhot et al., 2000).

Il a également été démontré que la stimulation électrique du raphé médian, une des sources de sérotonine cérébrale projetant sur l'HPC (Vertes et al., 1999), provoque

Introduction : la mémoire

une diminution importante de la décharge neuronale hippocampique (Olvera-Cortés et al., 2013; Segal, 1975).

La 5-HT peut aussi intervenir au niveau d'autres structures connectées avec l'HPC comme le noyau supramammillaire ou le septum, et au final moduler l'activité de l'HPC (Gutiérrez-Guzmán et al., 2012).

Ainsi, il semblerait que différentes voies sérotoninergiques puissent jouer un rôle dans la rythmicité de l'HPC et par ce biais intervenir dans les processus mnésiques (Olvera-Cortés et al., 2013). Enfin, d'autres études ont aussi démontré que la sérotonine peut directement moduler le rythme thêta hippocampique et de cette manière participer aux processus mnésiques dépendant de ce rythme (Aizawa et al., 2012 ; Olvera-Cortés et al., 2013).

Ainsi, la mémoire semble nécessiter l'ensemble des systèmes de neurotransmission cérébraux. Toute la neurochimie cérébrale va participer à la mise en place de connexions neuronales et leur maintien en fonction des expériences vécues. La DA semble notamment primordiale à la mémoire de travail ainsi qu'à la détection de la nouveauté et pourrait donc agir lors de processus « online » de mémorisation. De plus, différentes études ont déjà permis de démontrer l'importance de certains systèmes de neurotransmission, notamment cholinergique, lors du passage d'un système de mémoire à un autre. De cette manière, les neurotransmetteurs sont des acteurs majeurs des processus d'apprentissage et de mémoire et participent à la modulation de l'activité des régions impliquées dans les différents systèmes de mémoire.

3.8. Modélisation de la mémoire chez le rongeur

Par définition, un modèle est une version simplifiée du processus étudié et cette définition prend tout son sens lorsque l'on cherche à modéliser chez l'animal une fonction aussi complexe que la mémoire humaine, qui de surcroît est le plus souvent exprimée de façon verbale.

Concernant la MCT, notamment la mémoire de travail, son existence chez le rongeur est encore controversée. De même, comme évoqué plus haut, la mémoire sémantique, verbale, est impossible à évaluer chez l'animal.

Par des études comportementales, il est néanmoins possible d'évaluer la mémoire qu'un animal a d'un événement qu'il a vécu. Ainsi, différents paradigmes vécus par

Introduction : la mémoire

les animaux peuvent s'apparenter à des modèles de la mémoire épisodique humaine.

Différents modèles visant à évaluer la MCT et la MLT chez le rongeur ont été mis au point depuis plusieurs décennies et ont été validés plus récemment par le développement des études humaines en imagerie cérébrale (IRMf notamment). Ces études ont en effet montré des résultats similaires quant à l'implication des différentes régions cérébrales dans l'encodage, la consolidation et le rappel d'une MLT, ou encore dans la MLT.

Lors de nos travaux, nous avons utilisé chez le Rat des tests modélisant une mémoire dite « de travail » et une mémoire dite « épisodique » (episodic-like), décrites dans les deux paragraphes suivants.

3.8.1 Modèle de mémoire de travail chez le rat.

Plusieurs capacités liées entre elles constituent la MdT humaine et vont permettre d'adapter un comportement à une situation en cours (*cf. Le cas particulier de la mémoire de travail, page 31*). En effet, en plus de stocker une information pendant un délai court, il est nécessaire de manipuler l'information et de ne plus la prendre en compte une fois la réponse comportementale déclenchée.

Toutes ces particularités de la MdT rendent son étude et sa modélisation difficiles chez le rongeur. En effet, évaluer la capacité des animaux à manipuler une information ou encore à ne plus la prendre en compte est compliqué. Néanmoins, quelques modèles ont été développés (Castner et al., 2004; Dudchenko, 2004), se basant tous sur le rôle du CPFm des rongeurs (CPFdl chez le primate et l'Homme) dans la MdT.

Chez le Rat, les premiers travaux qui ont permis de démontrer l'existence d'une mémoire proche d'une MdT humaine sont les travaux de Olton et Samuelson (1976) avec l'utilisation d'un labyrinthe radial à huit bras. Ce dispositif, composé de huit bras rayonnant depuis une plateforme centrale, et que l'on peut appâter (on y place une récompense alimentaire), permet d'évaluer à la fois la mémoire de référence spatiale et la mémoire de travail des rongeurs selon le protocole choisi (*cf. figure 20 a*).

Introduction : la mémoire

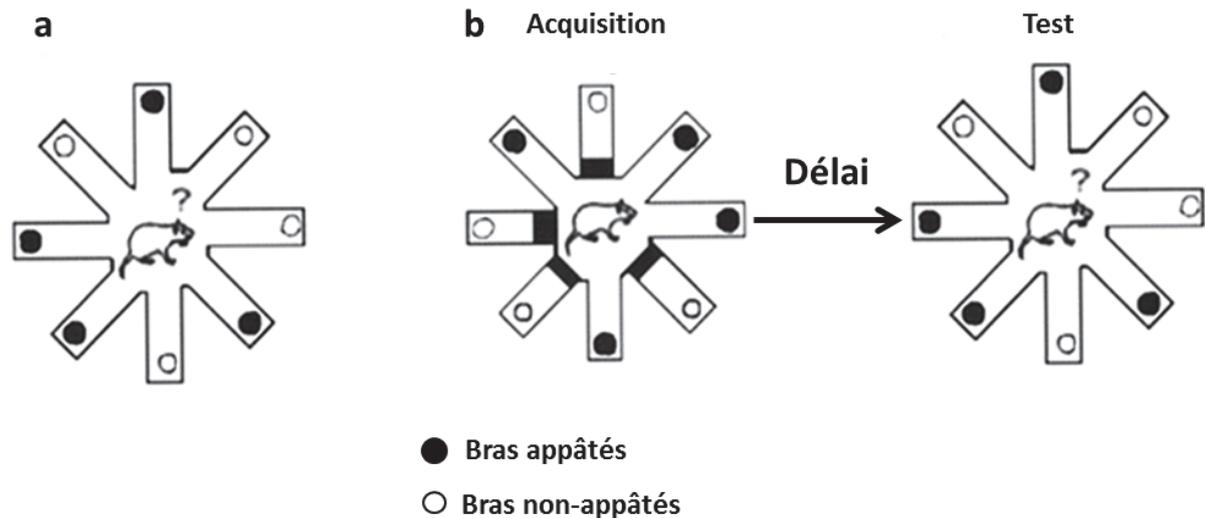


Figure 20 Le labyrinthe radial à huit bras

(a) Schéma d'un labyrinthe radial à 8 bras. (b) schéma d'une séance d'acquisition durant laquelle l'animal a accès à quatre bras appâtés. Après un délai variable, une séance de test dans une configuration de non-appariement à la position est effectuée. Durant cette session, ce sont les bras qui n'étaient pas ouverts précédemment qui sont appâtés.

Différents auteurs ont ensuite modifié ce test afin d'étudier plus précisément la capacité de stockage d'une information par les rongeurs (Dudchenko, 2004).

L'animal va être confronté à une situation lors de laquelle il va pouvoir récupérer des récompenses placées au bout de certains bras (session d'acquisition) (*cf. figure 20 b*). Ensuite, après un délai variable, l'animal sera replacé dans le même dispositif et va pouvoir à nouveau récupérer les récompenses alimentaires (session de test). Lors de cette réexposition, l'emplacement des récompenses peut être la même (appariement) ou non (non-appariement) que lors de la première exploration du dispositif. Un tel protocole permet à l'expérimentateur d'évaluer le comportement intra- et inter-session, et le rôle du CPFm dans les réponses comportementales des animaux. A partir de là, il pourra évaluer la MdT et la mémoire de référence spatiale (Floresco and Ghods-Sharifi, 2006; Floresco and Phillips, 2001). La mémoire « de travail », lors de ce test, correspond à la mémoire permettant à l'animal de ne pas retourner dans un bras qu'il a déjà visité au cours d'une même session (Olton et al., 1977).

De tels paradigmes d'appariement ou de non-appariement ont été adaptés à l'utilisation de cages de conditionnement. Ces cages permettent la mise en œuvre d'autres types de protocoles ; ainsi, les animaux devront prendre en compte une stimulation lumineuse ou encore la position d'un levier pour répondre et peut-être

Introduction : la mémoire

obtenir une récompense (*cf. Évaluation de la mémoire de travail en cage de conditionnement opérant, page 83*) (Chudasama and Robbins, 2004; Dudchenko, 2004; Pontecorvo et al., 1996).

A nouveau, il est possible d'utiliser des protocoles d'appariement ou de non-appariement à la position (du stimulus) et, après des délais variables, évaluer la réponse comportementale de l'animal qui cherchera à récupérer une récompense.

Ce genre de tâche a également été développé pour le primate en utilisant des écrans tactiles sur lesquels les animaux peuvent répondre à des stimulations, par exemple visuelles, pour obtenir des récompenses (Fizet et al., 2016).

L'ensemble de ces paradigmes a permis de mieux décrire l'importance du CPFdl chez le primate non humain et du CPFm chez le Rat (Castner et al., 2004; D'Esposito and Postle, 2015; Uylings et al., 2003; Zanto et al., 2011). Plus précisément, le CPFm serait même impliqué directement dans la manipulation et le traitement de l'information mise en mémoire de travail (Gisquet-Verrier and Delatour, 2006), suggérant qu'il participe à l'élaboration des actions à engager en fonction des informations préalablement obtenues. Ainsi, ces travaux confortent l'existence d'une mémoire de travail chez le rongeur et précisent le rôle du CPFm dans cette mémoire. De plus, les modèles utilisés chez le rongeur ont également démontré l'importance de la DA préfrontale au cours de tâche de mémoire de travail (Arnsten et al., 2015; Clark and Noudoost, 2014; D'Esposito and Postle, 2015; Floresco, 2013).

3.8.2 Modèles de mémoire episodic-like chez le Rat

Comme cité en introduction de ce chapitre, l'absence de verbalisation chez les rongeurs a nécessité le développement de paradigmes expérimentaux modélisant une mémoire « épisodic-like ». Ces paradigmes visent à placer un animal dans un contexte dans lequel il « vivra » une expérience dont il va pouvoir encoder et consolider certaines des informations accessibles. Il pourra ensuite rappeler cette situation et ainsi présenter un comportement particulier, observable et mesurable, lors d'un test de rappel. Pour cela, des paradigmes impliquant généralement l'HPC, de conditionnement de peur ou d'apprentissage en labyrinthe ont été mis en place (Binder et al., 2015; Izquierdo et al., 2016; Morris, 1984). Cependant, aucun de ces modèles ne permet d'étudier en détail tous les systèmes de mémoire et leurs interactions.

Introduction : la mémoire

Lors de notre étude concernant la mémoire de référence spatiale (MRS), j'ai utilisé le paradigme de Piscine de Morris. Ce test, développé par Richard Morris en 1984, met en jeu les capacités de navigation et de mémoire spatiale des rats. Cette mémoire, également appelée mémoire topographique, nécessite l'implication de l'HPC.

Plus précisément, ce test se base sur la capacité des rats à se représenter l'environnement dans lequel ils évoluent en créant une « carte cognitive » (Tolman, 1948) qui leur permettra de localiser, prendre en compte et retrouver une échappatoire dans un environnement expérimental donné. Ainsi, tout au long d'un apprentissage itératif effectué sur plusieurs jours, les animaux vont progressivement pouvoir apprendre et retenir la localisation d'une plateforme non visible dans une enceinte remplie d'eau afin de se soustraire à la situation (*cf. figure 21*).

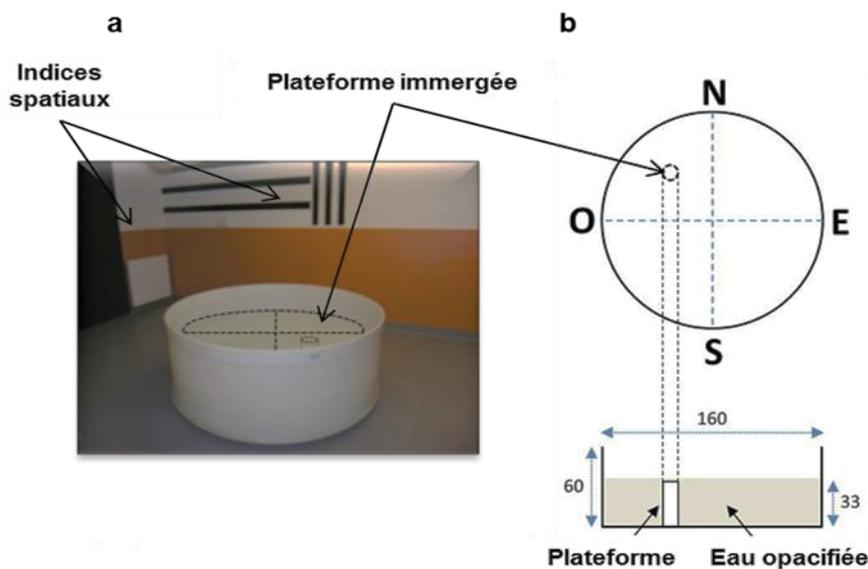


Figure 21 Le test de la piscine de Morris

(a) Photo et (b) schéma du dispositif de piscine de Morris au LNCA.

En plus de l'HPC, le CPF et différents noyaux thalamiques sont impliqués dans ce paradigme (Cholvin et al., 2016; Leon et al., 2010; Loureiro et al., 2012b; Wolff et al., 2008).

Finalement, une telle tâche demande à l'animal de rappeler la localisation de la plateforme, modélisant le « quoi » et le « où » de la mémoire épisodique humaine.

Ainsi, bien que l'aspect temporel « quand » ne soit pas modélisé, cette tâche apparaît comme un bon modèle de deux des trois composantes de la mémoire

Introduction : la mémoire

épisode humaine ; lorsqu'il y est confronté, un rongeur mettra en œuvre une mémoire qualifiée de mémoire de référence spatiale.

D'autres modèles de mémoire épisodique ont été mis au point, notamment le conditionnement de peur (Izquierdo et al., 2016; Kim and Jung, 2006; Raybuck and Lattal, 2014).

Dans ce modèle, un stimulus conditionnel (SC) émotionnellement neutre (un son, un contexte, ou une odeur, par exemple) sera associé à un stimulus inconditionnel (SI) qui, lui, sera émotionnellement chargé (en général des chocs électriques délivrés au niveau des pattes ou de la queue de l'animal) (Johansen et al 2011). Ainsi, un animal placé dans un contexte va pouvoir associer le SC à l'application d'une série de chocs électriques, le SI, durant une session unique (Josselyn et al., 2015 ; Izquierdo et al., 2016).

Une telle expérience va produire chez l'animal une peur associée au SC. Il sera ensuite possible d'évaluer le temps passé par les animaux en « freezing » (arrêt comportemental complet où seuls les mouvements dus à la respiration sont encore visibles), reflétant le souvenir de cette peur lors de réexpositions aux différents stimuli utilisés au moment du conditionnement (*cf. figure 22*).

Les régions cérébrales impliquées dans ce type de paradigme sont bien décrites. En effet, il est aujourd'hui largement admis que l'Amg, notamment l'Amg_{BLA}, permet l'association du SC au SI (Kim and Jung, 2006 ; Izquierdo et al., 2016). La prise en compte du contexte dans lequel l'animal reçoit les chocs électriques implique quant à elle l'HPC.

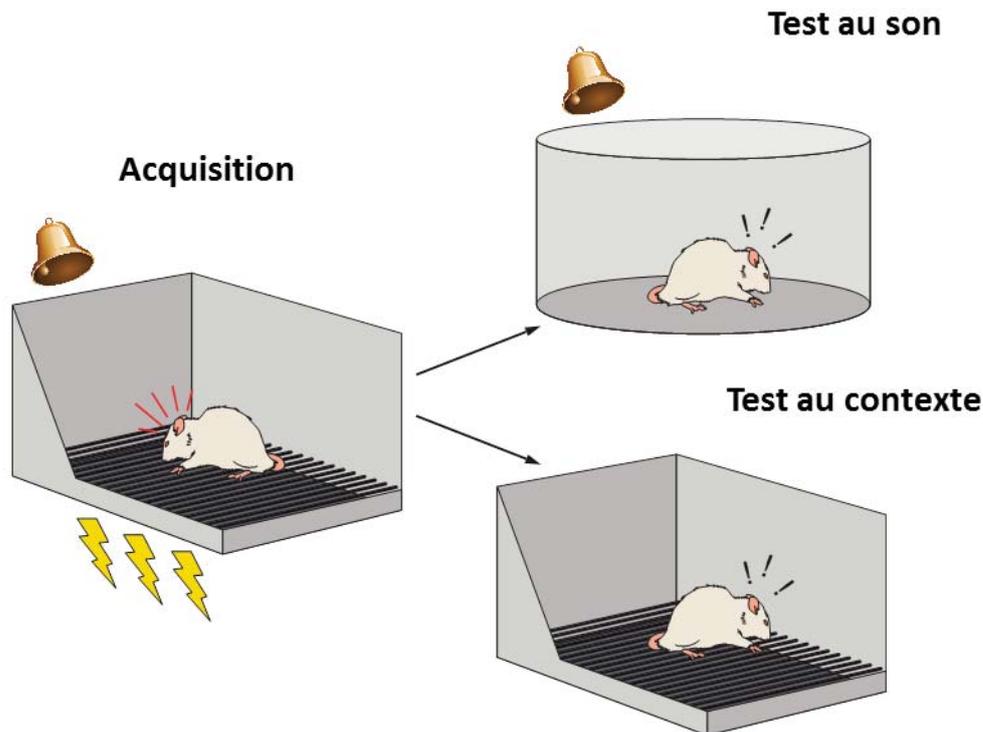


Figure 22 Schéma d'un protocole de conditionnement de peur chez le rongeur.

Lors d'une séance d'acquisition, les animaux reçoivent des chocs électriques associés à un son dans un contexte précis (rectangulaire ici). Ensuite, le temps de freezing sera évalué dans : soit un contexte différent de celui de l'acquisition (en haut à droite) mais avec la présentation du son associé aux chocs, soit dans le même contexte que lors de l'acquisition mais sans le son (en bas à droite)(Johansen et al., 2011).

Selon les protocoles utilisés, le rôle des régions préfrontales telles que les régions infralimbique et prélimbique du CPFm a été décrit dans les processus d'apprentissage de conditionnements de peur (Kim and Jung, 2006 ; Izquierdo et al., 2016). Ces régions semblent surtout impliquées lors d'utilisation de délais, lors de l'association SC-SI par exemple, ou lors de comportements d'extinction, quand l'animal est soumis au SC alors que le SI n'est plus présent (Kim and Jung, 2006 ; Izquierdo et al., 2016). Plus précisément, le CPFm semble pouvoir moduler l'activité de l'Amg lors des phases d'extinction (Rosenkranz and Grace, 2001). L'existence de ces protocoles alternatifs est particulièrement pertinent lors d'études visant à étudier les réseaux cérébraux impliqués dans la mémoire.

4. Habénula et mémoire

4.1. La connectivité de l'HbL au service des processus mnésiques ?

Aujourd'hui, l'HbL est décrite comme une voie de sortie de macrosystèmes (Geisler et Trimble 2008) (*cf. Connectivité de l'HbL, page 6*) et peut être vue comme un centre intégrateur de nombreuses informations télencéphaliques.

Si l'on s'intéresse de plus près à ses connexions, l'HbL est connectée directement ou indirectement à tous les systèmes de mémoire. En effet, elle reçoit des afférences directes du CPFm et du NE (voie de sortie des ganglions de la base). Certains auteurs estiment même que l'HbL est un point de convergence entre des structures limbiques et striatale (Nauta., 1974). Des expériences de stimulations électriques menées par Mok et Mogenson ont également montré que la stimulation de l'HPC et de l'Amg permettait l'enregistrement de réponses électrophysiologiques au sein de mêmes neurones de l'HbL (Mok and Mogenson, 1974), confortant le rôle d'intégration d'informations. Toujours d'un point de vue électrophysiologique, la présence d'une cohérence au rythme thêta entre l'HbL et l'HPC lors de périodes de sommeil paradoxal (Aizawa et al., 2013) comme lors d'une tâche de mémoire contextuelle (Goutagny et al., 2013,) renforce l'idée que ces deux régions peuvent communiquer (Fries et al., 2005 ; 2015), notamment durant une tâche mnésique.

De cette manière l'HbL semble pouvoir interagir, de façon directe ou indirecte, avec des régions cérébrales appartenant à différents systèmes de mémoire (*cf. figure 23*). De plus, ses afférences lui permettent de moduler différents systèmes de neurotransmission impliqués dans la mémoire (*cf. L'HbL, une structure idéalement positionnée au centre du cerveau, cf. page 15*). Plus précisément, elle peut moduler directement les niveaux de DA dans le CPFm (Kalén et al., 1990; Lecourtier et al., 2008), particulièrement impliqués dans les mécanismes mis en jeu lors de tâche de mémoire de travail. Le contrôle inhibiteur qu'elle exerce sur la DA peut également lui permettre d'intervenir durant toutes les étapes nécessaires à la mémoire durant lesquelles ce neurotransmetteur est impliqué, comme par exemple la détection de la nouveauté (Lisman et Grace, 2005).

Introduction : Habénula et mémoire

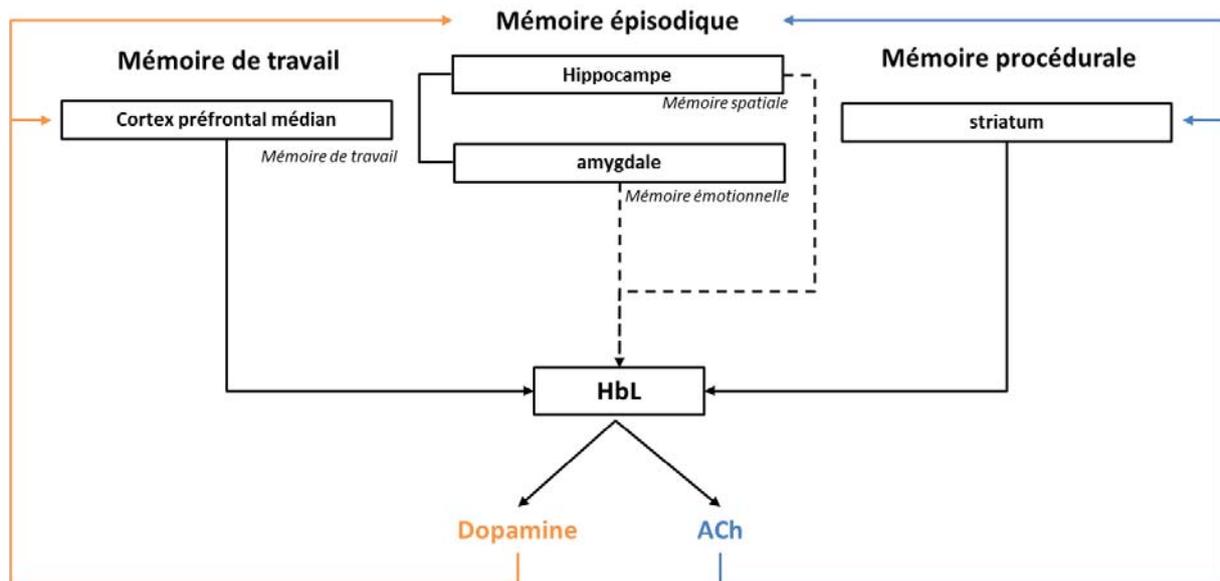


Figure 23 Liens de l'HbL avec les systèmes de mémoire et les centres neuromodulateurs

L'HbL présente des connexions directes (flèches pleines) avec des structures impliquées dans la MdT et la mémoire procédurale ou indirectes (flèches pointillées) avec des structures impliquées dans la mémoire épisodique. De plus, elle peut moduler les systèmes de neurotransmission dopaminergique et cholinergique, tous deux impliqués dans les processus mnésiques.

La stimulation électrique de l'HbL chez le Rat engendre également une augmentation des niveaux d'ACh dans l'HPC ou encore au sein du striatum (Kalén et al., 1990; Nilsson et al., 1990), phénomènes mis en jeu lors de l'encodage d'informations (Chang and Gold, 2003; McIntyre et al., 2003). La libération d'ACh semble même augmenter à chaque répétition d'un apprentissage au sein de ces deux structures (Fadda et al., 2000). Un tel phénomène pourrait participer à la sélection d'un système mnésique spatial ou automatique (Chang and Gold, 2003). De cette manière, l'HbL peut potentiellement intervenir dans ces modulations cholinergiques au sein des régions principales des systèmes de mémoire et ainsi participer à la sélection du système mnésique à utiliser.

Ses connexions et son contrôle de la neurochimie démontrent que l'HbL possède de nombreux atouts lui permettant de participer aux processus d'apprentissage et de mémoire (*cf. figure 23*).

4.2. L'HbL, est-elle impliquée dans les processus mnésiques à travers les autres fonctions auxquelles elle participe ?

Le rôle de l'HbL dans les processus d'apprentissage et de mémoire a déjà été proposé par Hikosaka en 2010. Ce dernier a suggéré que le premier rôle de l'HbL

Introduction : Habénula et mémoire

serait la suppression motrice (*cf. figure 24*). Cette structure aurait ensuite évolué pour intégrer un système d'apprentissage et de mémoire (Hikosaka, 2010).

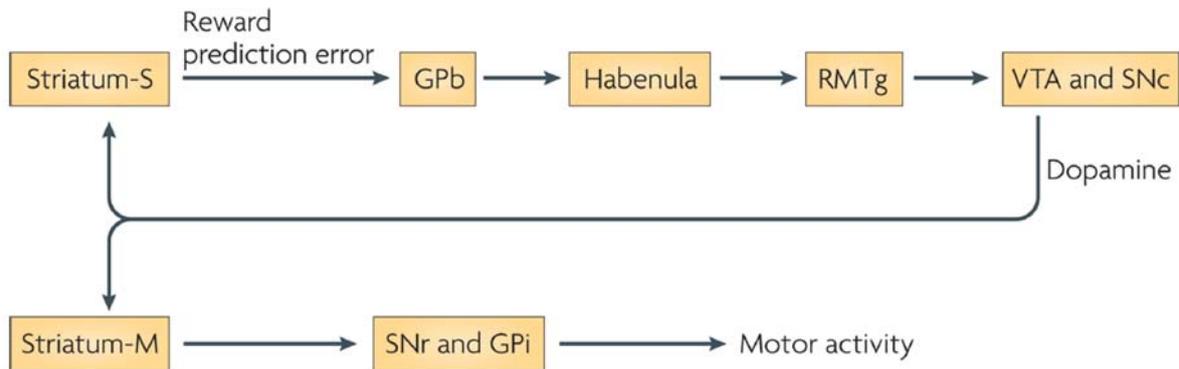


Figure 24 l'HbL une structure responsable de la suppression motrice

Schéma du circuit proposé par Hikosaka concernant le rôle de l'HbL dans la suppression motrice en fonction de l'aspect récompensant d'une situation (Hikosaka, 2010).

Les différents travaux menés par son groupe de recherche ont démontré chez le primate non humain que le signal de « non récompense » émis par l'HbL pouvait servir de « critique » sur l'action en cours afin d'adapter son comportement à la situation expérimentée (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011). Ainsi, l'activité tonique de l'HbL évolue lors de tâches de saccades oculaires (*cf. Comportements liés à la récompense, page 16*). Cette modulation d'activité semble correspondre à l'intervalle de temps séparant la présentation des indices annonçant la récompense de la survenue de cette dernière (Bromberg-Martin et al., 2010). De plus, le maximum d'activité des neurones de l'HbL n'intervient pas au moment où l'indice annonce le début de l'essai, ou la récompense elle-même, mais est plutôt observé lorsque l'un de ces événements est omis ou différé. De cette manière, l'HbL semble pouvoir participer à l'encodage et au rappel de la survenue – ou non – d'une récompense ou d'une punition.

Une autre étude du même groupe de recherche a montré que suite à des stimulations électriques de l'HbL, le comportement des primates, lors d'une tâche de saccades oculaires, était ralenti, suggérant une altération de l'apprentissage (Matsumoto and Hikosaka, 2011).

Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle l'HbL pourrait intervenir dans des processus d'apprentissage.

Différentes études effectuées chez le Rat ont suggéré l'implication de l'HbL dans des modèles de mémoire épisodique-like.

Introduction : Habénula et mémoire

En effet deux études ont démontré des retards d'apprentissage lors d'un test en piscine de Morris suite à la lésion électrolytique (Lecourtier et al., 2004) ou thermique (thermocoagulation, Wang et al., 2013) de l'ensemble de l'Hb (*cf. figure 25*).

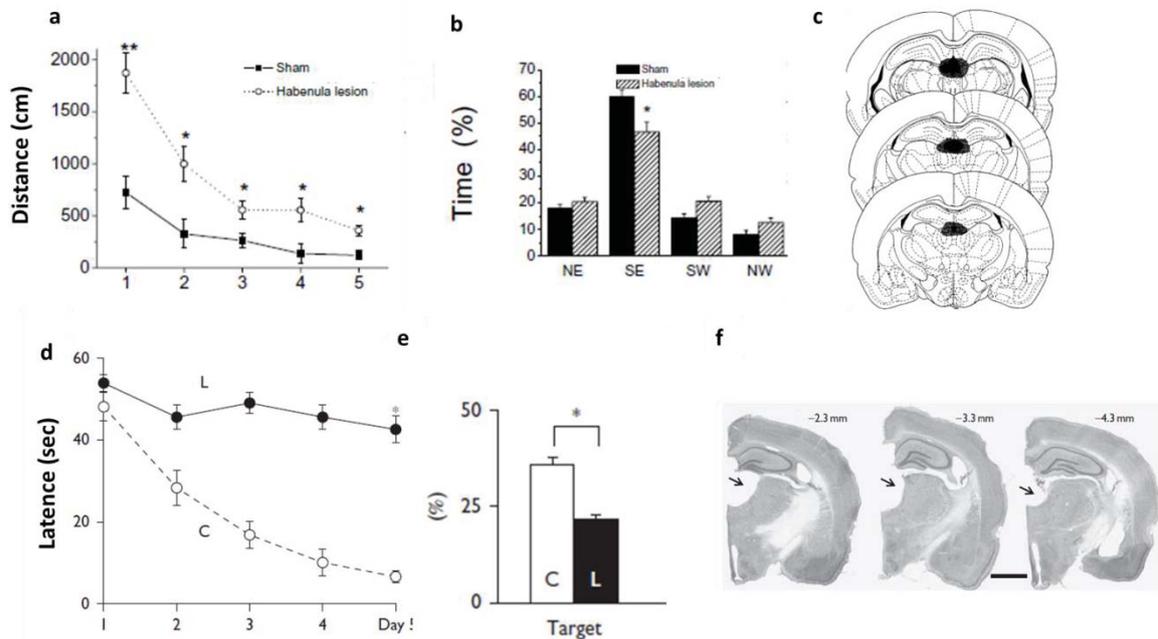


Figure 25 Etudes du rôle de l'HbL dans une mémoire épisodi-like chez le Rat.

(a) Représentation de la distance parcourue pour rejoindre une plateforme immergée en piscine de Morris par des rats pseudo-lésés et des rats ayant subi une lésion de l'Hb. Ces résultats montrent un ralentissement des performances d'apprentissage pour les animaux habénulo-lésés ainsi que de moins bonnes performances que les rats témoins lors du test de rétention (b). (c) Représentation des lésions de l'HbL lors de cette étude (Lecourtier et al., 2004). (d) Représentation de la distance parcourue par des rats ayant subi une lésion de l'HbL dans un paradigme de piscine de Morris lors d'une autre étude (Wang et al., 2013). Les rats habénulo-lésés de cette étude présentent des déficits d'apprentissage très importants ainsi que des performances suggérant qu'ils ne se souviennent pas de la localisation de la plateforme lors du test de rétention (e). Il est à noter que les lésions de cette seconde étude semblent plus étendues (f) que celles de l'étude précédente (c).

L'étude menée par Wang et collaborateurs a également montré des déficits d'apprentissage très importants mais également des déficits lors du rappel de l'information chez les animaux lésés, ce que ne décrivait pas l'étude de Lecourtier et collaborateurs. Cette différence peut s'expliquer par la différence de taille des lésions (*cf. figure 25*).

Ces études n'ont cependant pas permis de conclure quant à un rôle spécifique de l'HbL dans une des étapes de mise en place d'une mémoire (encodage, consolidation ou rappel) puisque les lésions ont été faites avant le début de l'apprentissage. De plus, ces lésions ont touché l'ensemble de l'Hb, sans distinction de l'HbM et de l'HbL. Ainsi, le rôle spécifique de l'HbL, ou de l'HbM, dans le paradigme de piscine de Morris n'est à ma connaissance pas encore décrit.

Introduction : Habénula et mémoire

Cependant, une étude effectuée à l'aide d'une lignée de souris transgéniques empêchant le développement de l'HbM n'a pas montré de déficit d'apprentissage dans ce même paradigme, suggérant que les déficits observés suite à une lésion complète de l'Hb sont plutôt dus à l'atteinte de l'HbL.

Une autre étude, effectuée au LNCA a évalué chez le Rat l'effet de l'inactivation de l'HbL durant une autre tâche de reconnaissance spatiale (Goutagny et al., 2013). Lors de cette expérience, après une habituation à l'enceinte de test et l'apprentissage d'une configuration spatiale d'objets, les rats ont effectué un test de reconnaissance spatiale après l'instillation de muscimol ou de son excipient, au sein de l'HbL. Lors de ce test, la configuration des objets a été modifiée et le temps d'exploration de chaque objet a été mesuré (*cf. figure 26*).

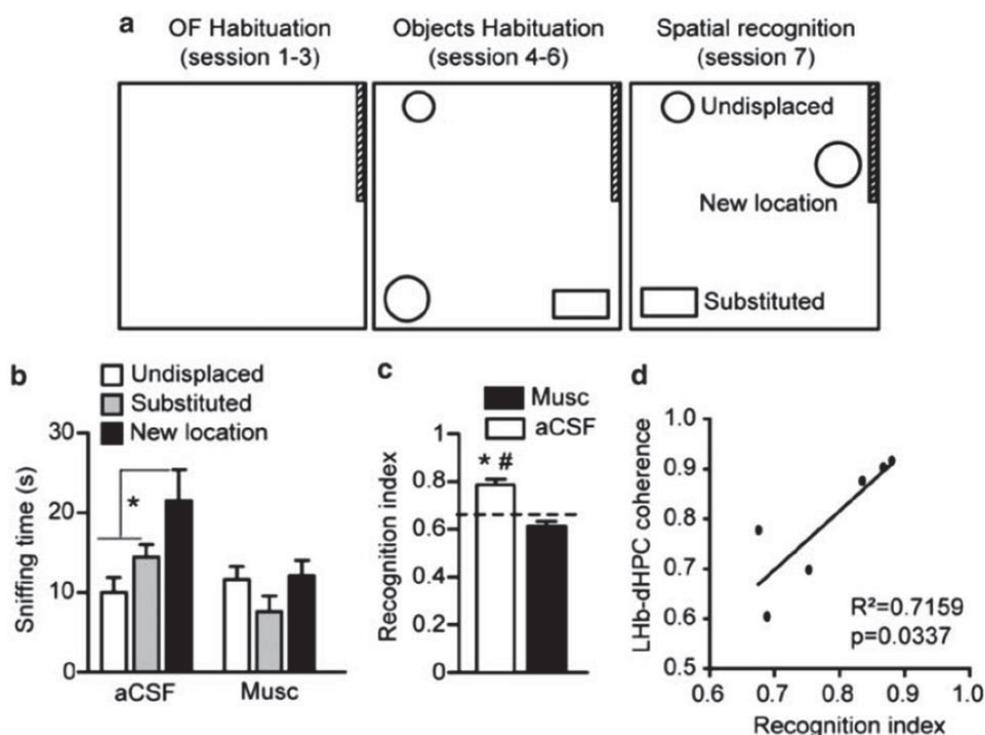


Figure 26 Etude de l'inactivation de l'HbL sur les performances mnésiques ainsi que des cohérences d'activité au rythme thêta entre l'HbL et l'HPC lors d'une tâche de reconnaissance spatiale chez le rat.

(a) Schéma du protocole expérimental, après trois sessions d'habituation (session 1-3) à un champ ouvert (open-field, OF) et deux sessions d'apprentissage de la configuration d'objets dans le dispositif (session 4-6), une séance de reconnaissance a été effectuée (session 7). Lors de cette séance le temps d'exploration de chaque objet par les animaux a été relevé (b) afin de calculer un indice de reconnaissance (c). Les animaux témoins, ont remarqué les modifications de configuration et ont donc plus exploré l'objet déplacé que les autres (c). par contre, les animaux pour lesquels l'HbL a été inactivée au muscimol présentent une absence de reconnaissance. De plus, l'indice de reconnaissance de la modification de configuration est corrélé à la cohérence d'activité au rythme thêta entre l'HbL et l'HPC (d) (Goutagny et al., 2013).

Introduction : Habénula et mémoire

L'inactivation de l'HbL a empêché la détection du changement de configuration spatiale par les rats, suggérant une altération des processus mnésiques. De plus, le niveau de performance des animaux était corrélé à la cohérence d'activité à la fréquence thêta entre l'HPC et l'HbL, reflet de communications potentielles entre ces deux structures lors de la tâche (Fries et al., 2005, 2015).

Cette étude suggère donc que l'HbL est impliquée, via une communication avec l'HPC, dans le processus de rappel d'une information spatiale.

D'autres études, toujours chez le Rat, utilisant un paradigme d'évitement actif associé à des stimulations de l'HbL, ont également suggéré son implication dans les processus mnésiques (Ilango et al., 2013; Shumake et al., 2010). Cependant les résultats dépendaient des conditions expérimentales.

Ainsi, Shumake et collaborateurs ont observé des déficits d'apprentissage de la tâche d'évitement actif, suite aux stimulations électriques de l'HbL effectuées lors de l'acquisition de la tâche (Shumake et al 2010, Ilango et al 2013). Cependant, la même stimulation effectuée sur des animaux entraînés n'a provoqué aucune différence de comportement comparativement aux rats témoins, suggérant l'implication de l'HbL uniquement dans l'encodage d'une telle tâche et non dans son rappel.

Les auteurs d'une autre étude ont suggéré l'implication de l'HbL dans le stockage à long terme d'une mémoire aversive chez le Rat (Tomaiuolo et al., 2014). Pour leurs expériences, ils ont utilisé une tâche d'inhibition de l'évitement durant laquelle les animaux devaient apprendre à ne pas descendre d'une plateforme pour éviter un choc électrique. L'inactivation de l'HbL à l'aide de muscimol durant l'apprentissage de la tâche a entraîné, 7 jours après l'acquisition, un raccourcissement des latences lors du rappel suggérant l'oubli de l'expérience vécue. Cependant, cette amnésie a uniquement été observée lorsque les chocs utilisés lors de l'apprentissage étaient de forte intensité. Ainsi, l'implication de l'HbL dans le stockage à long terme d'une mémoire semble dépendante de la valence émotionnelle de l'expérience vécue. Ces résultats suggèrent donc que l'HbL peut également être à l'interface des émotions et de la cognition.

De plus, l'instillation d'un agoniste des récepteurs dopaminergiques D1/D5 dans l'HPC a permis de contrecarrer l'amnésie induite par l'inactivation de l'HbL. Les

Introduction : Habénula et mémoire

auteurs ont proposé que l'implication de l'HbL dans la mémoire à long terme se fait par l'intermédiaire de la modulation dopaminergique de l'HPC.

Enfin, à ma connaissance, une seule étude s'est intéressée à l'implication possible de l'HbL dans la MdT chez le Rat (Sanders et al., 2010).

Lors de cette étude, les auteurs ont instillé de manière chronique un antagoniste partiel des récepteurs nicotiques (la mécamylamine) au sein de l'HbL et ont administré de la nicotine par injection intra-péritonéale (IP) à des rats, lors d'une tâche de labyrinthe radial. Les différentes conditions expérimentales (instillation chronique et IP) utilisées ont induit des déficits à la fois de MRS et de MdT. Cependant, l'interprétation des résultats ne permet pas de conclure de manière précise sur le rôle de l'HbL dans la MdT. L'effet observé sur les performances de mémoire de travail n'intervient que lorsque les animaux ont subi à la fois l'injection IP de la dose la plus importante de nicotine et l'instillation de mécamylamine. Ainsi, l'importance de l'HbL dans les processus de mémoire de travail est encore méconnue.

Tous les travaux évoqués ci-dessus suggèrent l'implication de l'HbL dans les processus mnésiques. Il semblerait que différentes hypothèses quant aux mécanismes mis en jeu émergent de certaines études, tels que le lien électrophysiologique de l'HbL avec l'HPC (Goutagny et al., 2013), ou encore la modulation des transmissions dopaminergique et cholinergique au sein de différentes régions des systèmes de mémoire (HPC, striatum, CPFm Amg).

Nous avons vu plus haut que les études menées chez le Rat, notamment celles utilisant des lésions totales de l'Hb, n'avaient pas permis de décrire précisément le rôle de l'HbL dans les processus mnésiques, que ces derniers soient de travail ou de référence spatiale. En pratiquant des inactivations réversibles de l'HbL, mes travaux ont tenté de préciser d'avantage le rôle de cette dernière dans la MdT et la MRS et, au niveau de cette dernière, dans les différentes phases évoquées ci-dessus (encodage, consolidation, rappel).

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

Tous les protocoles expérimentaux et procédures décrits dans cette partie « Matériels et méthodes » ont été effectués en accord avec la directive européenne 86/609/EEC; n° d'autorisation 67-215 attribué à Jean-Christophe Cassel, et ont fait l'objet d'une validation par un comité d'éthique (CREMEAS, autorisation no. H 67-482-13).

1. Souche utilisée

Toutes les expériences présentées dans cette thèse ont été réalisées avec des rats mâles de souche Long-Evans (provenance, centre d'élevage Janvier, France). Cette souche consanguine a été créée en 1915 par les docteurs Long et Evans en croisant des femelles Wistar et des mâles sauvages gris (*cf. figure 27*).

Elle est décrite comme possédant de bonnes capacités visuelles, d'apprentissage et de mémoire spatiale, comparativement à des souches albinos telles que Wistar ou Sprague-Dawley couramment utilisées en comportement (D'Hooge and De Deyn, 2001, 2001; Harker and Whishaw, 2002). L'utilisation de cette souche est donc apparue idéale pour évaluer l'implication de l'HbL dans des fonctions mnésiques.



Figure 27 : Photo d'un rat Long-Evans

2. Conditions d'élevage

Dès leur arrivée au laboratoire tous les animaux étaient hébergés dans des cages individuelles transparentes (46 X 26 X 15 cm). Ce choix a été fait en raison des procédures chirurgicales auxquelles ils devaient plus tard être soumis. En effet, suite à ces opérations, les animaux étaient pourvus soit d'implants en ciment dentaire permettant le maintien des guides canules, dans le cadre d'expériences d'instillations, soit de points de suture (*cf. Interventions chirurgicales, page 75*). Ces

Matériels et méthodes

dispositifs auraient pu être endommagés par des congénères, avec un risque de plaies et d'infections consécutives, si les rats avaient été stabulés à plusieurs.

Les animaux disposaient d'eau et de nourriture *ad libitum* sauf cas exceptionnels (voir plus loin la description de l'expérience de mémoire de travail (*cf. Evaluation de la mémoire de travail en cage de conditionnement opérant, page 83*). Les conditions d'hébergement en salles de stabulation et de tests comportementaux étaient constantes ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ d'humidité) et la lumière dans l'ensemble des pièces était cyclée (période de 12h d'obscurité / 12h de lumière, la phase diurne débutant à 7h et finissant à 19h). Pour l'ensemble de nos expériences, les rats étaient âgés de deux mois et pesaient entre 220 et 230 grammes à leur arrivée au laboratoire.

Après une semaine d'acclimatation à leurs nouvelles conditions d'hébergement, les animaux étaient habitués aux manipulateurs et à la manipulation pendant quelques jours avant de subir les interventions chirurgicales (excepté dans le cas de l'étude sur la mémoire de travail lors de laquelle la procédure chirurgicale a été effectuée à la fin de la phase d'apprentissage (*cf. Evaluation de la mémoire de travail en cage de conditionnement opérant, page 83*). Les tests comportementaux débutaient au moins 10 jours après ces interventions. Enfin, toutes nos expériences ont été effectuées durant la période diurne des rats.

3. Interventions chirurgicales

3.1 Implantation de guides canules

Dans une première grande partie de nos expériences notre but était d'intervenir pharmacologiquement au sein de l'HbL. Pour cela nous avons procédé, à l'aide de la technique de chirurgie stéréotaxique, à l'implantation à demeure de guides canules [longueur, 12 mm, diamètre de 26 gauges (0.40 mm)], un mm au-dessus des structures d'intérêt.

Cette implantation nous permettait ensuite, à l'aide d'une canule d'instillation [diamètre de 29 gauges (0.28 mm)] d'instiller les différents composés pharmacologiques. Les canules d'instillation étaient plus longues que les guides canules d'un mm, de sorte qu'une fois mises en place elles étaient situées dans les régions cibles (*cf. figure 28*).

Matériels et méthodes

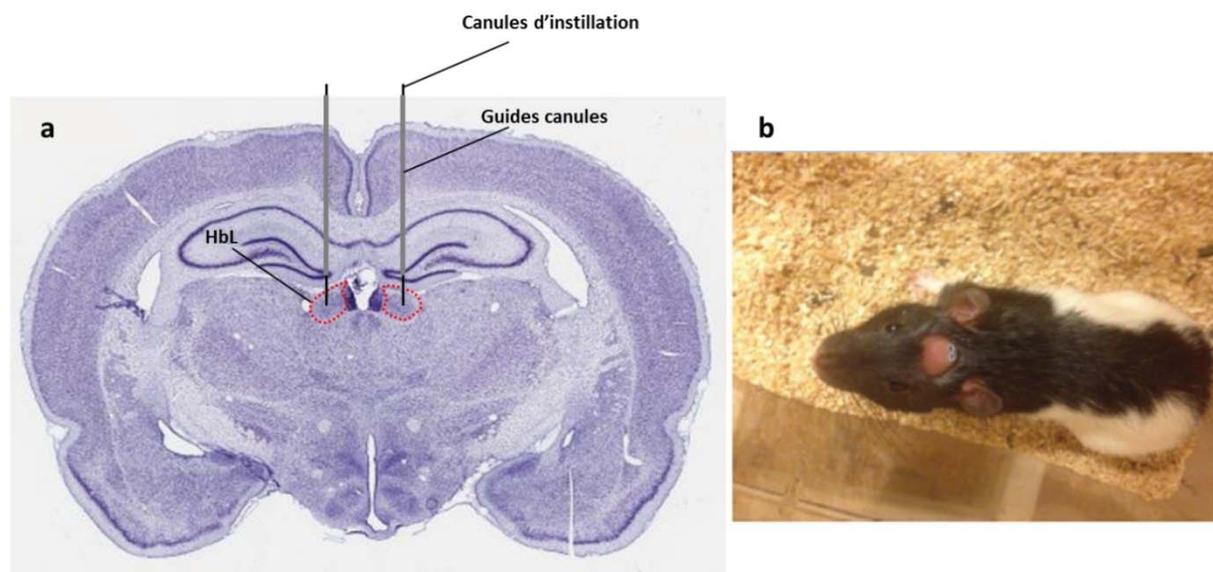


Figure 28 : Implantation de guides canules chez le Rat

(a) schéma du dispositif sur une coupe coronale de Rat (Paxinos and Watson, 2006), (b) photo d'un rat implanté bilatéralement (photo du laboratoire).

Ce type d'approche technique est couramment utilisé en Neurosciences comportementales, y compris dans notre laboratoire (Cholvin et al., 2016; Goutagny et al., 2013; Loureiro et al., 2012a).

Pour effectuer ces implantations, les rats étaient anesthésiés à l'aide d'un mélange de kétamine (82,5 mg/kg, Imalgène 500, Centravet, Nancy, France) et de xylazine (11 mg /kg, Rompun, 2 %, Centravet, Nancy, France). L'état d'endormissement des animaux était ensuite vérifié manuellement en constatant l'absence de réflexe suite à une stimulation nociceptive légère (pincement de la queue et d'une patte) ; le rythme respiratoire était également vérifié tout au long de la chirurgie et la température de l'animal était maintenue à l'aide d'une couverture de survie l'enveloppant durant tout le temps de l'intervention chirurgicale.

Leur tête était ensuite soigneusement rasée, en évitant de sectionner les vibrisses, puis ils étaient placés dans un cadre stéréotaxique (Stoelting®) et leurs yeux étaient immédiatement recouverts d'un gel ophtalmique (Lacrigel®) afin de prévenir tout risque d'assèchement de la cornée.

Afin de limiter le stress et la douleur ressentis par les rats ainsi que le risque d'infection, nous avons pratiqué une injection sous-cutanée, au niveau de la zone d'incision du scalp, d'un anesthésique local (xylocaïne®, Xylovet CEVA santé animale, France, 0,2 mL / rat) et une injection intra-musculaire, au niveau de la cuisse, d'un antibiotique à large spectre (extencilline, Duphamox®, Pfizer, 0,1 mL /

Matériels et méthodes

100 g). Une fois ces étapes pré- et péri-opératoires effectuées débutait l'implantation des guides canules. Pour cela, ces derniers étaient placés sur un portoir fixé au descendeur du cadre stéréotaxique. Ils étaient ensuite placés un mm au dessus de la structure cible, selon les coordonnées désirées, lors d'une descente très lente afin de ne pas trop endommager les tissus traversés.

Une fois en place, l'ensemble du dispositif était stabilisé à l'aide de trois vis d'ancrage péalablement insérées dans l'os du crâne, et sécurisé avec du ciment dentaire (PALADUR®, Kulzer & co). Une fois sec, ce ciment permettait le maintien à long terme des guides canules sur la tête de l'animal.

A la fin de la chirurgie, nous introduisons des mandrins dans les guides canules afin d'empêcher une remontée de tissu et donc leur obstruction. Ces mandrins permettaient également de réduire le risque de contamination extérieure.

Enfin, nous effectuons une injection sous-cutanée, au niveau de la nuque, d'un antidouleur (Meloxicam, METACAM®, Boehringer Ingelheim Vetmedica) avant de laisser les animaux se réveiller sous une lampe chauffante. Une fois réveillés, ils étaient replacés dans une cage individuelle propre avec une litière fraîche. Ils bénéficiaient ensuite d'au moins dix jours de récupération, durant lesquels leur bien-être était évalué (évaluation de la prise de poids et de l'état général de l'animal), avant le début des manipulations expérimentales.

Préalablement à toute étude, les coordonnées des différentes structures ciblées ont été déterminées et/ou ajustées à l'aide de l'instillation préalable d'un colorant bleu chez quelques rats tests. Toutes les coordonnées utilisées lors des expériences nécessitant une canulation sont référencées dans le tableau suivant :

Structure	Antéro-postériorité (Depuis le bregma)	Médio-latéralité (Depuis le sinus veineux)	Dorso-ventralité (Depuis la dure-mère)	Volumes injectés en µL (muscimol et CNQX)
HbL	-3,9	+/-0,7	-3,6	0,3 ou 0,2
CPF (PrL)	+3,3	+/-0,7	-2,2	0,4
HPCd	-3,9	+/-0,8	-4,3	0,3
Thalamus	-3,7	+/-0,7	-4,9	0,3
3 ^{ème} ventricule	-4	+/-0,7	-2,2	0,3

Tableau 1 : Coordonnées stéréotaxiques d'implantation de guides canules. Abréviations : Habénula latérale (HbL), cortex préfrontal (CPF) sous-région prélimbique (PrL), hippocampe dorsal (HPCd)

Matériels et méthodes

3.2. Traceurs rétrogrades et antérogrades

Toutes nos expériences de traçage ont eu pour but de mettre en évidence un réseau formé par l'HbL, le cortex préfrontal médian (CPFm) et le système dopaminergique (ici l'aire tegmentale ventrale, ATV). Ainsi nous avons utilisé un traceur rétrograde [la sous-unité β de la toxine cholérique (CTb)] (Conte et al., 2009) et un traceur antérograde [un dextran amine biotinylé (BDA)] (Lanciego and Wouterlood, 2011; Reiner et al., 2000). Les procédures pré-, péri- et post-opératoires utilisées étaient les mêmes que celles décrites dans le chapitre « [Implantation de guides canules, page 75](#) ». Cependant, au lieu d'implanter à demeure des guides-canules, il s'agissait ici de descendre une pipette de verre (diamètre environ 0.05mm) dans les régions ciblées afin d'y injecter les différents traceurs. Ces injections ont été effectuées à l'aide d'un système comprenant une pompe de micro-instillations dans laquelle était placée une seringue Hamilton de 10 μ L reliée à la canule d'injection par un cathéter en polyéthylène (*cf. figure 29*).

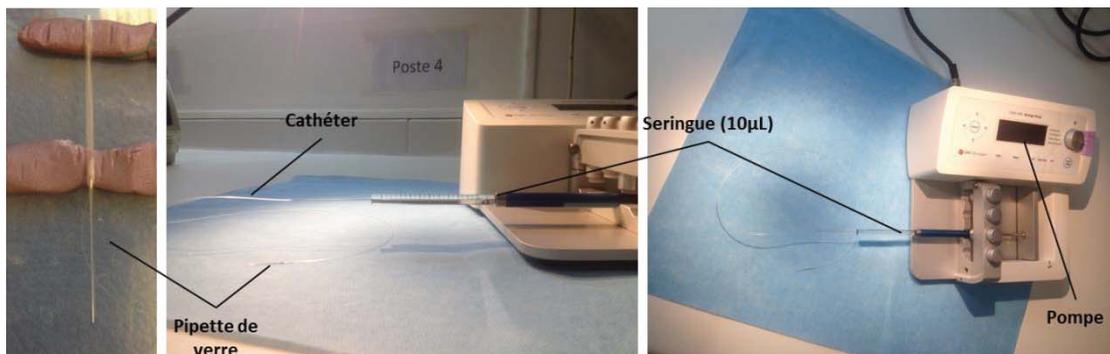


Figure 29 : Dispositif de micro-instillation

Photos du dispositif d'instillation comprenant la pompe pousse seringue reliée à une pipette de verre par un cathéter en polyéthylène (photos du laboratoire).

L'ensemble du système était rempli d'eau ultra-pure et son étanchéité était vérifiée. La solution contenant le traceur à injecter était ensuite aspirée depuis la pipette en prenant soin d'intercaler une petite bulle d'air entre l'eau et cette solution. Cette bulle était marquée et nous permettait de suivre la progression de l'instillation.

Après les instillations, la pipette était laissée en place durant 10 minutes pour diminuer le risque de reflux lors de son extraction. Une fois la chirurgie terminée, les animaux étaient replacés dans une cage propre et mis à mort après une période de sept jours.

Le prélèvement des cerveaux était effectué selon la procédure décrite ci-dessous « [Mise à mort des animaux et prélèvement des cerveaux \(page 109\)](#) ».

Matériels et méthodes

Les coordonnées et les volumes utilisés pour ces expériences de traçage sont référencés dans le tableau suivant :

Structure	Antéro-postériorité (Depuis le bregma)	Médio-latéralité (Depuis le sinus veineux)	Dorso-ventralité (Depuis la dure-mère)	Volume de CTB injecté en μL	Volume de BDA injecté en μL
HbL	-3,9	+/-0,8	-4.6	0,2	
CPF (PrL)	+3,3	+/-0,7	-3,2		0,8
ATV	-5,5	+/-0,8	-7,5		0.2

Tableau 2 : Coordonnées et volumes utilisés lors des expériences de traçage. Abréviations : HbL : Habénula latérale ; CPF (PrL): cortex préfrontal, sous-région prélimbique ; ATV :aire tegmentale ventrale .

3.3. Procédure de micro-instillation

3.3.1 Habituation

L'ensemble de la procédure d'instillation (retrait des mandrins, instillation des composés pharmacologiques puis remise des mandrins) nécessitait environ deux minutes. Surtout, elle requérait le maintien des rats dans une position adéquate, c'est-à-dire, immobiles avec la tête accessible à la manipulation (*cf. figure 30*).

Afin de limiter le stress causé par cette procédure d'instillation, nous avons habitué les rats à être maintenus avant de débuter les tests comportementaux. Pour cela, une semaine avant le début des tests, nous avons effectué des contentions de durées croissantes dans les mêmes conditions que celles des instillations à venir, à raison d'une contention par jour.

Le premier jour d'habituation les rats étaient maintenus pendant 30 secondes, la tête coincée entre l'index et le majeur d'une main (*cf. figure 30*). Ensuite, à chaque contention les mandrins étaient retirés et placés dans une solution d'éthanol à 70% puis remis en place à la fin de la contention, après séchage sur un papier absorbant. La durée de contention augmentait progressivement, pour atteindre 2 minutes à la fin de l'habituation.

Un jour avant le début des expériences, les rats subissaient une instillation de liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) avec un débit et un volume identique à celui utilisé pour les drogues. Cette étape permettait de vérifier qu'aucun guide n'était bouché et favorisait les instillations à venir.

Matériels et méthodes

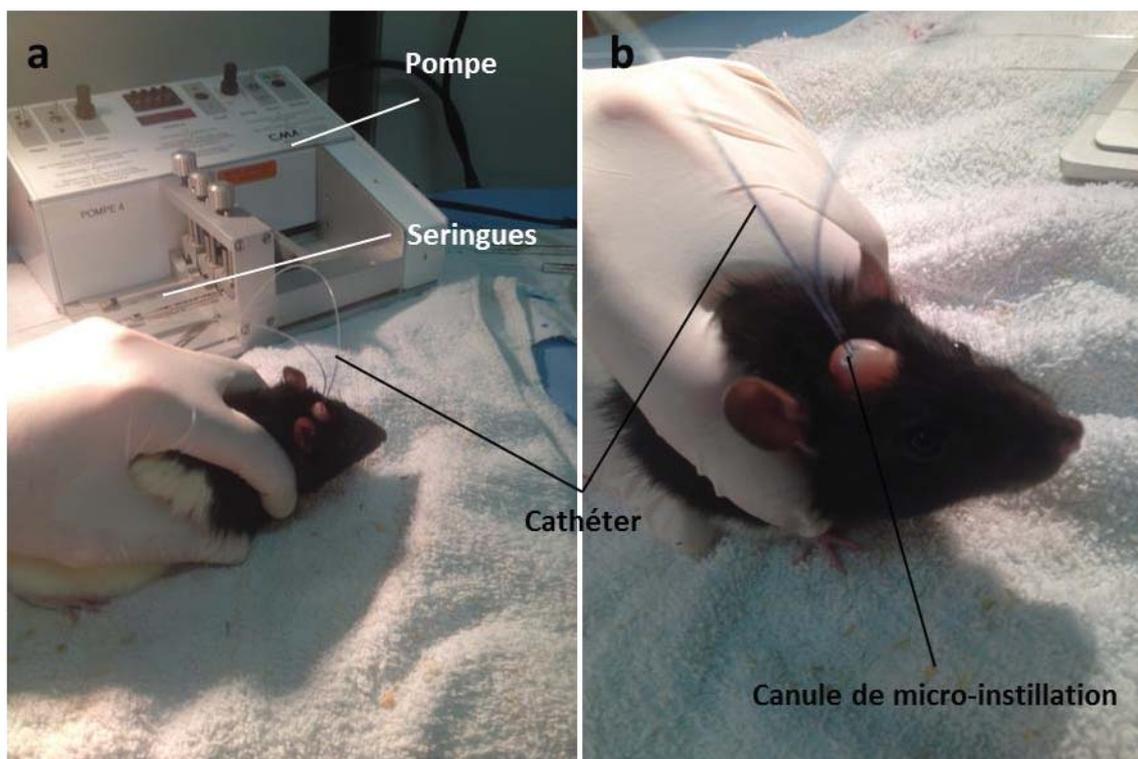


Figure 30 : Procédure de micro-instillation

Photographies illustrant la contention nécessaire à la micro-instillation. Le dispositif d'instillation composé d'une pompe, de seringues reliées par des cathéters aux canules de micro-instillation permet l'instillation intra parenchymateuse de composés pharmacologiques chez le Rat.

3.3.2 Composés pharmacologiques instillés

Dans le but d'inhiber temporairement l'HbL nous avons choisi dans un premier temps d'agir sur le système inhibiteur GABAergique (acide gamma-aminobutyrique) en instillant bilatéralement du muscimol. Ce composé est un agoniste des récepteurs GABA_A et est couramment utilisé pour inhiber des régions cérébrales (Cholvin et al., 2016; Majchrzak and Di Scala, 2000; Martin and Ghez, 1999).

L'activation de ces récepteurs va permettre l'ouverture de canaux chlorure et induire l'hyperpolarisation du neurone. Ce phénomène va alors diminuer la probabilité de déclenchement de potentiels d'action en diminuant le seuil d'excitabilité du neurone.

De plus, le muscimol nous permet d'agir sur l'activité neuronale sans affecter l'excitabilité des fibres de passages (van Duuren et al., 2007; Edeline et al., 2002; Lomber, 1999), à la différence de composés tels que la lidocaïne ou la tetrodotoxine. Ainsi, l'action induite par le muscimol est restreinte aux neurones de l'HbL (sous réserve de non-diffusion aux régions adjacentes).

Matériels et méthodes

Lors de nos instillations, nous avons uniquement utilisé du muscimol et non pas un mélange de muscimol et de baclofène (agoniste des récepteurs GABA_B) comme couramment observé dans la littérature (Baker et al., 2015; St. Onge et al., 2012; Stopper and Floresco, 2013). Ce choix avait pour principal objectif d'éviter toute action possible sur l'activité de l'HbM, cette dernière étant une des régions cérébrales les plus denses en récepteurs GABA_B (Durkin et al., 1999; Liang et al., 2000; Margeta-Mitrovic et al., 1999). De plus, Wang et collaborateurs ont montré que l'HbM ne présente pas de réponse électrophysiologique correspondant au récepteur GABA_A (Wang et al., 2006). L'utilisation de muscimol nous permettait donc d'obtenir une sélectivité spatiale très intéressante pour limiter nos effets à l'HbL sans perturber l'HbM.

Cependant, les résultats expérimentaux obtenus nous ont poussé à utiliser une seconde stratégie d'inactivation de l'HbL. En effet, l'instillation de muscimol au sein de l'HbL a semblé perturber le comportement des rats en piscine de Morris au-delà de simples déficits mnésiques (augmentation importante du comportement de thigmotaxie, diminution de la vitesse de nage, *cf. Résultats, page 113*).

Afin de vérifier si ces perturbations comportementales n'étaient pas un effet secondaire de la perturbation de la neurotransmission inhibitrice au sein du diencephale, nous avons choisi d'utiliser un second composé.

Toujours dans le but d'éviter une action sur des fibres de passages, nous avons choisi comme alternative, plutôt que la lidocaine, un composé qui cible la transmission excitatrice de l'HbL. Nous avons ainsi instillé un antagoniste compétitif des récepteurs glutamatergiques ionotropiques AMPA, le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX). Cette stratégie nous permettait de bloquer spécifiquement les entrées glutamatergiques de l'HbL (Honoré et al., 1988) plutôt que d'inhiber massivement la structure comme avec le muscimol. Ce composé, couramment utilisé lors d'expériences de micro-instillation (Honoré et al., 1988; Wang et al., 2012), a déjà été utilisé dans le cadre d'étude de l'HbL démontrant que son instillation au sein de cette région provoque une libération de dopamine dans le CPFm et le noyau accumbens (Lecourtier et al., 2008).

3.3.3 Dispositifs et procédures d'instillation

Comme pour les injections de traceurs, les différents composés pharmacologiques ont été instillés à l'aide d'un système comprenant une pompe de micro-instillation

Matériels et méthodes

dans laquelle était placée une seringue Hamilton de 10 μ L reliée à une canule de micro-instillation en acier inoxydable par un cathéter en polyéthylène. L'ensemble du système était rempli d'eau ultra-pure et son étanchéité était vérifiée. La solution contenant le composé à instiller était ensuite aspirée depuis la canule en prenant soin d'intercaler une petite bulle d'air entre l'eau et cette solution. Cette bulle était marquée et nous permettait de suivre la progression de l'instillation (*cf. figure 30, page 80*). Entre chaque instillation, nous vérifiions que les canules n'étaient pas obstruées suite à l'instillation précédente par le déclenchement de l'écoulement d'un petit volume de solution.

Les solutions de muscimol et CNQX étaient préparées, avant chaque jour d'expérience, à partir de poudres. Pour le muscimol la poudre était diluée dans du liquide céphalo rachidien artificiel (LCRa ; composition : 145 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,2 mM CaCl₂, 2,3 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄, pH = 7,4) qui servait de solution contrôle. Pour le CNQX, la poudre était diluée dans la même solution de LCRa à laquelle était ajoutée du DMSO à raison de 5%. La solution contrôle était alors le même mélange dépourvu de CNQX. Pour plus de clarté, dans le reste de ce manuscrit je parlerai de solution de LCRa pour les deux solutions contrôles ou alors d'excipients. La concentration finale des solutions obtenues était de 0.08 μ g/ μ L pour le muscimol et de 1 μ g/ μ L pour le CNQX.

Lors des tests concernant l'implication de l'HbL dans la mémoire spatiale (publication 2), le volume instillé dans l'HbL était de 0,3 μ L à un débit de 0,3 μ L/min pour les deux drogues afin d'obtenir une dose finale de 24 ng/côté pour le muscimol, et de 300 ng/côté pour le CNQX.

Les mêmes solutions de muscimol ont été utilisées lors des expériences concernant le rôle de l'HbL dans la mémoire de travail (publication 1), cependant le volume choisi était de 0.2 μ L dans l'HbL et de 0.4 μ L dans le CPF (PrL) correspondant à des doses de 16ng/côté et 32ng /côté respectivement.

Cette différence de volume a fait suite à différentes expériences contrôles demandées par les comités de révision afin de vérifier que nos paramètres d'instillation n'induisaient pas une diffusion des composés dans les régions avoisinantes (*cf. publication 2*). Nous avons également décidé de mettre en place une technique plus précise de vérification de la zone touchée (*cf. Annexes, page 160*).

Matériels et méthodes

Nous avons donc choisi, pour des raisons éthiques, de diminuer les volumes instillés, afin de réduire considérablement le risque de débordement aux régions avoisinante, afin d'éviter cette utilisation d'animaux consacrés aux contrôles neuroanatomiques.

De tels concentrations, volumes et débits ont déjà été utilisés lors de plusieurs travaux (Cholvin et al., 2016; Goutagny et al., 2013; Lecourtier et al., 2008; Loureiro et al., 2012a; Majchrzak and Di Scala, 2000; Wang et al., 2012). Le temps d'attente entre l'instillation et le début des tests comportementaux a également été inspiré de ces mêmes travaux. Ainsi, les tests débutaient 15 min et 30 min après l'instillation de CNQX et de muscimol respectivement (*cf. figure 31*). Les animaux témoins recevaient une instillation du même volume d'excipients et effectuaient les tests comportementaux suivant le même déroulé temporel que les rats inactivés.

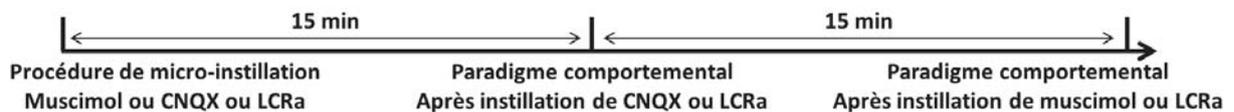


Figure 31 : Déroulé temporel des micro-instillations précédant les tests comportementaux.

4. Évaluation de la mémoire de travail en cage de conditionnement opérant

Comme discuté dans l'introduction générale, le terme de MdT chez le rongeur est encore controversé (Castner et al., 2004; Dudchenko, 2004; Dudchenko et al., 2013) (*Modèle de mémoire de travail chez le rat, page 60*). Néanmoins différents protocoles ont été mis au point afin de modéliser au mieux la MCT chez le rongeur dans des paradigmes nécessitant l'utilisation d'information (Dudchenko, 2004; Dudchenko et al., 2013).

Notre protocole, développé au laboratoire par les docteurs Alexandra Barbelivien et Monique Majchrzak, a largement été inspiré de différents travaux utilisant des protocoles de non appariement différé à la position (NADP) en cage de conditionnement (Gutnikov et al., 1994; McAlonan et al., 1995; Warburton et al., 1997).

Matériels et méthodes

4.1. Principe de la tâche

Cette tâche a pour but d'évaluer la capacité des animaux à stocker une information durant un bref délai et la manipuler afin de recevoir une récompense alimentaire.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser des boîtes de conditionnement comprenant des trous (*cf. figure 32, page 85*) dans lesquels les animaux pouvaient placer leur museau (nose-poke en anglais et dans la suite du manuscrit).

De telles boîtes nous ont permis d'utiliser plusieurs paires de trous, et donc plusieurs configurations de réponses, à la différence d'autres protocoles effectués dans des boîtes de conditionnement, comportant deux leviers, ou encore dans des labyrinthes en T ou Y ne comportant que deux choix de direction à prendre (Chudasama and Muir, 1997; Dudchenko, 2004; St. Onge et al., 2012).

En effet, des expériences utilisant des leviers ont révélé chez les rongeurs des stratégies visant à récupérer leur récompense en même temps qu'ils appuyaient sur un des leviers (Chudasama and Muir, 1997; Stanhope et al., 1995). De plus, le fait de n'avoir que deux choix (deux leviers ou deux directions possibles) rend l'ensemble de la tâche plus simple et peut induire des stratégies de positionnement du corps ou d'orientation de la tête pour répondre sans prendre en compte certaines stimulations (Chudasama and Muir, 1997; Stanhope et al., 1995).

La possibilité de la survenue de telles stratégies est non seulement fortement réduite grâce à l'utilisation de plusieurs paires de trous, mais également par le positionnement de la mangeoire à l'opposé du mur sur lequel le rat doit répondre pour obtenir la récompense (*cf. figure 32, page 85*) (Chudasama et al., 2003, 2012; Dudchenko, 2004). La configuration du dispositif les poussait ainsi à se retourner afin de récupérer leur récompense, créant ainsi une discontinuité spatiale entre la réponse aux stimuli et la consommation de la nourriture.

4.2. Restriction alimentaire

Le paradigme de NADP nécessitait de motiver les animaux à obtenir une récompense alimentaire. Avant de débiter la tâche, les animaux étaient donc placés en restriction alimentaire et passaient d'un régime *ad libitum* à un régime comprenant une seule prise de nourriture par jour. Cette ration journalière était calculée afin de maintenir le poids des animaux à hauteur de 90 % de leur poids sans restriction.

Matériels et méthodes

Nous avons pris en compte l'évolution naturelle du poids de rats maintenus en captivité dans des cages individuelles, calculée à partir des données obtenues au laboratoire avec nos lots de rats précédents. La ration quotidienne était alors régulièrement augmentée pour maintenir leur poids à 90% de leur masse théorique.

4.3. Dispositif

La mémoire de travail était évaluée dans des boites de conditionnement (celles généralement utilisées pour des tâches de réactions sérielles à 5 choix). Ces boites étaient placées dans des armoires insonorisées permettant d'isoler les rats de toute perturbation extérieure (*cf. figure 32*). Une des parois de chaque boîte comportait neuf trous contigus contenant chacun une LED. Quatre de ces trous, associés en deux fois deux paires, étaient ouverts et utilisés lors de nos expériences, tous les autres étant obstrués à l'aide d'une plaque métallique. Sur la paroi opposée était positionnée une mangeoire reliée à un distributeur de nourriture (*cf. figure 32*). Les animaux, en poussant le clapet mobile en plexiglas transparent qui obstruait cette mangeoire, pouvaient récupérer la nourriture délivrée par le distributeur.

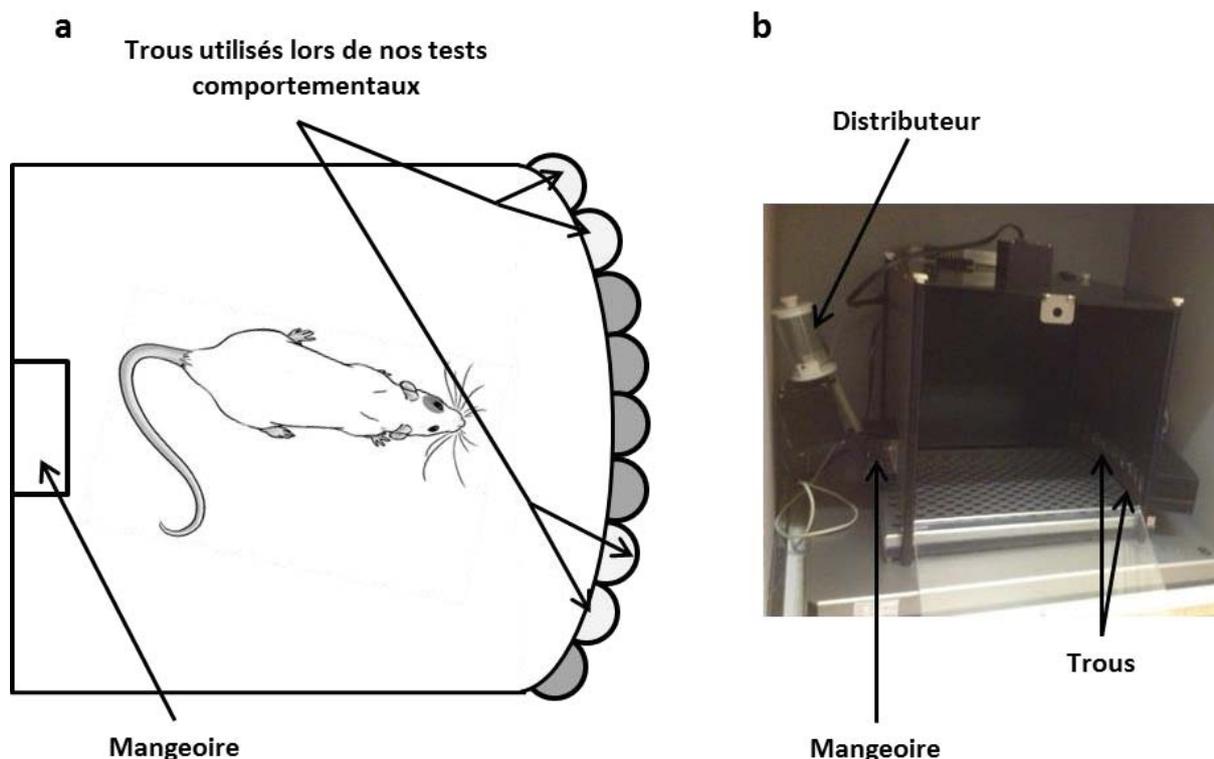


Figure 32 Dispositif de NADP

Schéma (a) et photo (b) de la cage de conditionnement utilisé pour le protocole de NADP, composée de 9 trous lumineux disposés sur une des parois de la cage. Sur la paroi opposée se trouvait une mangeoire dans laquelle pouvait tomber une pastille de nourriture.

Matériels et méthodes

Chacun des quatre trous pouvait être illuminé de l'intérieur et un plafonnier central était fixé dans la boîte. L'allumage des lumières et la délivrance de nourriture étaient contrôlés par un logiciel (Packwin®, Panlab S.P., Cornellà, Barcelona, Spain). Des cellules photoélectriques permettaient de signaler les différentes réponses (nose-poke, ouverture et fermeture de la mangeoire) qui étaient comptabilisées par le logiciel pilote.

Durant les différents protocoles (*cf. plus bas*), les étapes nécessaires à la tâche (allumage des différentes lumières, délivrance de la nourriture) pouvaient être dépendantes des étapes ou dépendantes des délais si nécessaire (intervalle inter-essai ou punition après omission ou mauvaise réponse). *A posteriori*, les latences de réponse aux stimuli lumineux et de recherche de la nourriture pouvaient être récupérées par ce même logiciel.

4.4. Protocole d'acquisition

Il a été nécessaire d'effectuer un apprentissage comprenant plusieurs étapes.

***Habituat*ion à la nourriture**

Dans un premier temps les animaux ont été habitués à la nourriture utilisée comme récompense durant le test, des pastilles de 45mg de nourriture (TSE-system, 3,62 calories/mg). Pour cela, quelques pastilles étaient placées dans la cage d'élevage des animaux et leur consommation était vérifiée par simple observation.

4.4.1 *Habituat*ion aux boîtes de conditionnement

Les rats ont été habitués à la boîte de conditionnement ; pour cela ils étaient placés dans la boîte et 20 pastilles de nourriture étaient automatiquement délivrées par le distributeur. Chaque rat a ensuite systématiquement été testé dans la même boîte que celle utilisée lors de cette habituation.

Lors de la première séance d'habituation, pour que les rats comprennent que la nourriture tombait et devait être récupérée dans le réceptacle, le clapet de la mangeoire était retiré afin de faciliter l'accès aux pastilles. Lors de la séance suivante, le lendemain, la même procédure était effectuée mais cette fois-ci en présence du clapet de la mangeoire, afin d'habituer les rats à le pousser pour accéder aux pastilles de nourriture. Après cette habituation, les différentes étapes d'acquisition de la tâche de NADP ont commencé.

Matériels et méthodes

4.4.2 Habituation au conditionnement

Nous avons d'abord utilisé un protocole dit de ratio fixe 1 (RF1). L'un des quatre trous s'allumait et si l'animal effectuait un nose-poke dans le trou correspondant, une pastille de nourriture était délivrée. Une fois que la pastille de nourriture était délivrée, un délai de 10 secondes était enclenché avant qu'un nouvel essai ne débute. Chaque séance en RF1 se terminait après la délivrance de 50 pastilles ou après 1800 secondes. Lors de ce protocole nous avons d'abord utilisé un seul trou actif (qui s'allumait et conduisait à la délivrance d'une pastille), puis trois.

L'utilisation de trois trous avait pour but d'entraîner les animaux à bien prendre en compte la stimulation lumineuse et éviter qu'ils ne répondent systématiquement dans le même trou en utilisant une stratégie de position du corps, voire à ne plus retirer leur museau du trou actif pour récupérer plusieurs pastilles.

Lors de cette phase le comportement d'alternance des animaux était analysé. L'alternance était considérée correcte quand les rats enchaînaient leurs actions de la manière suivante : nose-poke dans le trou allumé, suivi de la recherche de la nourriture délivrée puis à nouveau nose-poke et ainsi de suite. Cette étape permettait aux rats de bien intégrer qu'après le nose-poke ils devaient aller chercher la nourriture avant de recommencer un nouvel essai. Les étapes suivantes de l'apprentissage, consistant à introduire la condition de non-appariement à la position puis les délais, n'étaient franchies que si les rats présentaient ce comportement d'alternance lors de cette étape de RF1.

4.4.3 Acquisition de la règle de NADP

Pour cela, les rats ont d'abord été entraînés dans une version simplifiée de la tâche finale. Celle-ci consistait alors en 48 essais consécutifs d'une séquence répétée de deux phases. A partir de ces étapes, les mêmes quatre trous ont été utilisés par paire (les trous 1 - 7 et 2 - 8) (*cf. figure 33*). Durant la première phase, dite d'échantillonnage, un trou d'une des deux paires s'allumait et l'animal pouvait effectuer, dans un intervalle de temps de 10 secondes, un nose-poke qui conduisait à la délivrance d'une pastille de nourriture. Immédiatement après la récupération de la pastille de nourriture par le rat, la deuxième phase, dite phase de test, débutait (*cf. figure 33*). Lors de ce test, les deux trous de la paire s'allumaient et l'animal devait effectuer, à nouveau dans un intervalle de 10 secondes, un « nose-poke » dans le trou qui n'était pas allumé durant l'échantillonnage. Ce paradigme correspond à un

Matériels et méthodes

« non-appariement » à la position. Ces deux phases étaient donc répétées 48 fois avec l'utilisation pseudo-randomisée de chaque trou durant la phase d'échantillonnage. Ainsi, chaque trou était utilisé 12 fois lors de la phase d'échantillonnage et de ce fait 12 fois lors de la phase de test. De cette manière, les paires étaient utilisées 24 fois chacune de manière pseudo-aléatoire.

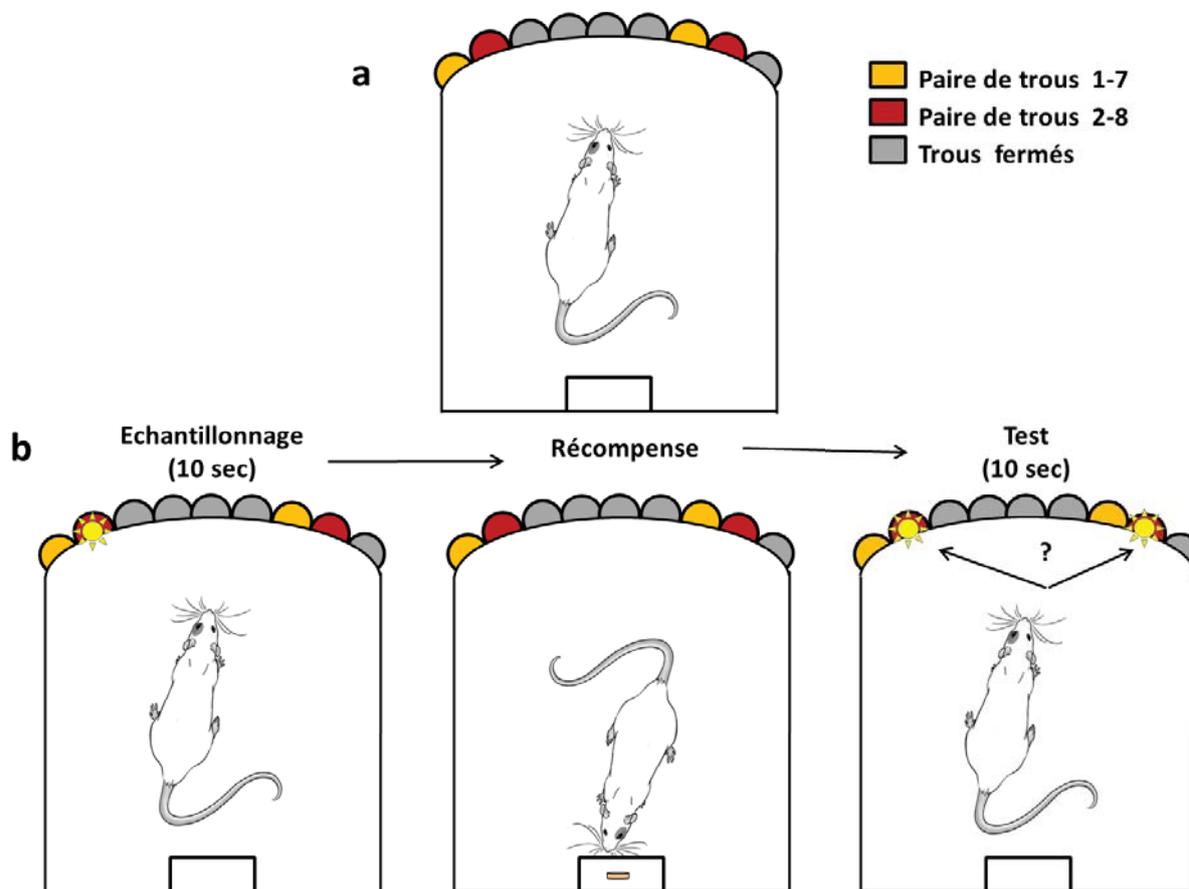


Figure 33 : Protocole d'acquisition de la règle de NADP

Schéma du dispositif et des paires de trous utilisées (a) ; schéma du déroulement d'un essai du protocole de NADP sans les délais, utilisant la paire 2-8 (b), durant lequel le rat doit effectuer un nose-poke dans le trou 2 à l'échantillonnage pour obtenir une première récompense et au trou 8 pour obtenir la seconde récompense.

Notre protocole ne comportait pas d'étape limitante pouvant empêcher l'enchaînement des différentes phases, mais seulement les intervalles de temps de 10 secondes pour répondre. De cette manière tous les animaux effectuaient les 48 essais. S'ils ne répondaient pas à une des étapes dans le temps imparti, une omission était comptabilisée. On pouvait ainsi distinguer les omissions à l'échantillonnage et les omissions au test (*cf. figure 34c*).

A partir de cette étape, les performances étaient analysées en tant que pourcentage de bonnes réponses. C'est-à-dire :

$$\% \text{ de réponse correcte} = \frac{\text{nombre de réponse correcte}}{\text{nombre total de réponse au test}}$$

Matériels et méthodes

Cette variable nous permettait d'estimer un niveau de performance équivalent au hasard. En effet, un animal qui n'était pas capable de maintenir et utiliser l'information pour répondre correctement à la phase de test répondait de manière aléatoire à l'un des deux trous allumés lors de cette phase et présentait ainsi un pourcentage de réponses correctes égal à 50%.

Dès lors que les rats obtenaient des performances stables et supérieures à 65 % pendant 7 jours consécutifs nous avons ajouté des délais entre la phase d'échantillonnage et la phase de test, dernière étape d'acquisition du protocole de NADP. Ces délais étaient déclenchés par l'ouverture du clapet de la mangeoire suite à la phase d'échantillonnage. Nous avons utilisé les délais suivant : 0, 2, 4 et 8 secondes. Ce choix nous permettait d'obtenir des performances qui se dégradent avec l'augmentation des délais (*cf figure 34d*).

Une telle courbe de performances était particulièrement intéressante car différentes interprétations sont décrites dans la littérature quant à l'apparition de déficits dépendant des délais utilisés ou non. En effet, il a été décrit dans ce type de tâche que les animaux peuvent présenter des déficits dépendants du délai, suggérant une perturbation des processus mnésiques. Cependant, ils peuvent également présenter des déficits indépendants du délai, qui suggèrent eux, des altérations qui ne seraient pas que mnésiques mais potentiellement attentionnelles ou encore motivationnelles (Chudasama and Muir, 1997; Dunnett et al., 1999). De tels protocoles, utilisant plusieurs délais, peuvent permettre ainsi de dissocier différentes altérations de traitement et/ou de stockage de l'information (Chudasama and Muir, 1997; Gisquet-Verrier and Delatour, 2006).

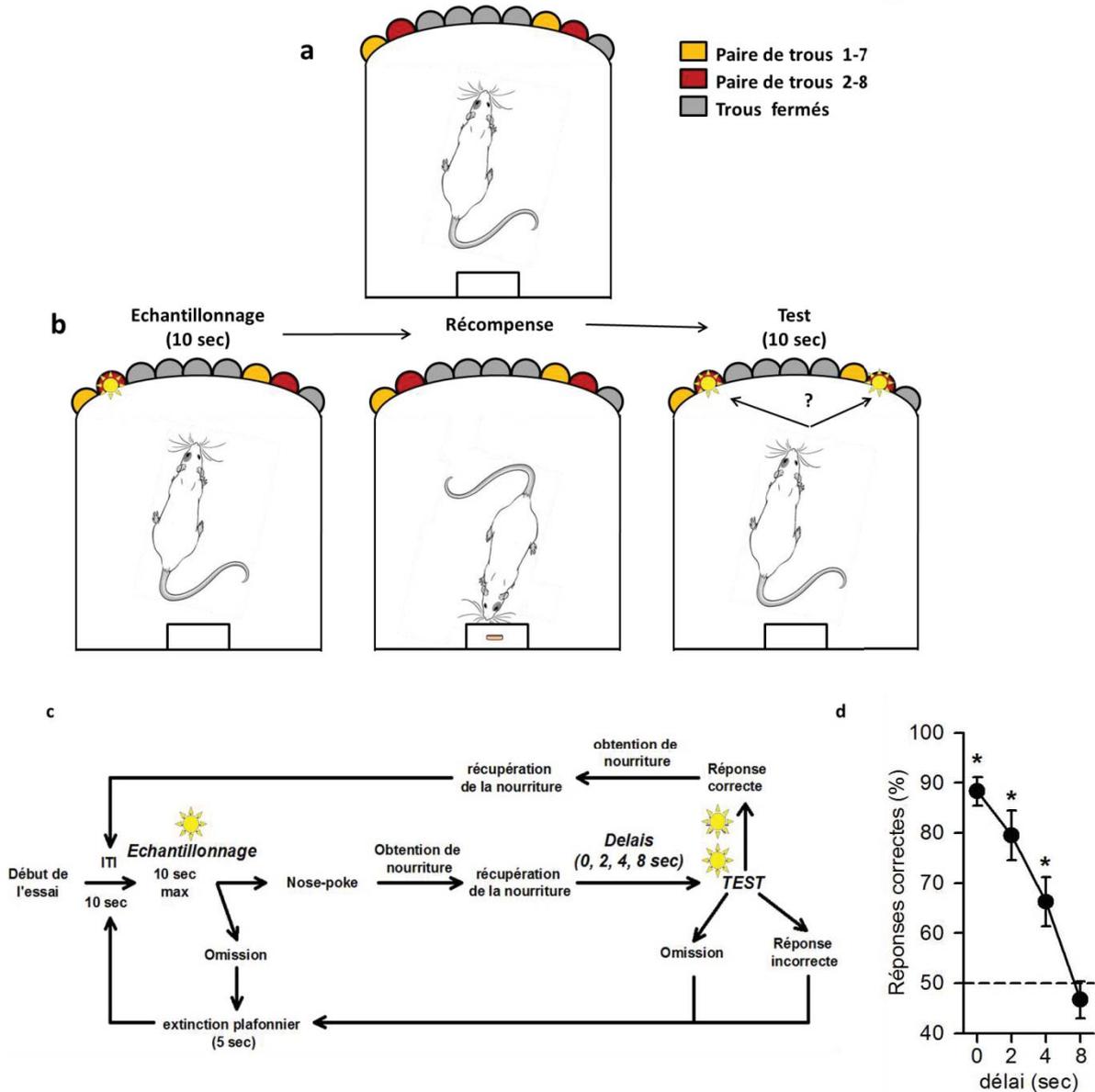


Figure 34 : La tâche de NADP

Schéma du dispositif et des paires de trous utilisées (a) ; schéma du déroulement d'un essai du protocole final de NADP utilisant la paire 2-8 et un délai (b), durant lequel le rat doit effectuer un nose-poke dans le trou 2 à l'échantillonnage pour obtenir une première récompense et au trou 8 pour obtenir la seconde récompense. Schéma de la séquence d'un essai (c) ainsi que les résultats obtenus par les rats à la fin de l'entraînement avec délais (d) Statistiques : * : $p < 0,05$ comparé au hasard (50%).

En fin d'entraînement, les rats présentaient des performances significativement supérieures à 50% pour les trois premiers délais et au niveau du hasard pour le dernier délai (cf. figure 34d).

4.4.4 Chirurgie post-entraînement

Une fois l'entraînement terminé, nous avons procédé à la chirurgie stéréotaxique visant à implanter des guides-canules à demeure au-dessus de l'HbL et le CPF(PrL). Cette chirurgie (*Implantation de guides canules, page 75*) a été effectuée après trois

Matériels et méthodes

jours de retour à un régime alimentaire *ad libitum* et a été suivie d'une période de repos de 10 jours. Après cette période post-chirurgicale, la restriction alimentaire a repris, tout comme l'entraînement des animaux.

Une fois que leurs performances étaient à nouveau stables pendant 7 jours, nous avons commencé les expériences d'inactivation. L'ensemble du protocole d'inactivation suivi pour ces expériences est décrit dans le matériel et méthode de la publication 2.

4.5. Variables analysées

Pour chacune des sessions le nombre de réponses correctes, le nombre d'omission à l'échantillonnage et au test, le temps mis pour finir la session ainsi que le nombre de pastilles de nourriture obtenues étaient relevés à l'aide du logiciel pilote. Pour les séances faisant suite aux protocoles d'inactivation, les latences pour répondre lors de la phase d'échantillonnage et pour récupérer la nourriture ont également été relevées.

5. Évaluation de la mémoire de référence spatiale en piscine de Morris

5.1. Principe du test

Ce test, développé puis amélioré par R. Morris (Morris, 1984), permet de modéliser la mémoire de référence spatiale (MRS) des rats et est sans doute le test le plus utilisé pour étudier la navigation spatiale et la mémoire chez le Rat, y compris dans notre laboratoire (Cholvin et al., 2016; Loureiro et al., 2012b).

Il se base sur la motivation naturelle des rats à se soustraire à une situation aversive, c'est-à-dire, dans ce cas précis, nager dans de l'eau froide sans échappatoire visible. Les rats vont pouvoir apprendre la localisation d'une plateforme immergée en ayant la possibilité de prendre en compte des indices spatiaux disséminés dans la pièce. Cette intégration de l'environnement va permettre aux animaux de se forger une carte dite cognitive (Dudchenko and Wood, 2015; O'Keefe and Dostrovsky, 1971; Tolman, 1948) leur permettant de se créer une représentation spatiale de leur environnement. Dans ce cas la « carte » est dite allocentrée car elle prend en compte des indices externes, contrairement à une représentation égocentrée qui se

Matériels et méthodes

focaliserait sur l'individu et par exemple une séquence de mouvements pour rejoindre l'échappatoire (Rudy et al., 1987; Vorhees and Williams, 2014).

5.2. Dispositif

La piscine de Morris utilisée était une enceinte circulaire opaque, de 160 cm de diamètre et 60 cm de hauteur (cf. figure 35). Elle était placée au centre d'une pièce dont les murs présentaient de forts contrastes de couleurs et dont la configuration des objets (présence de pilier, d'une fenêtre, d'un chauffe-eau) pouvait servir d'indices spatiaux (cf. figure 35).

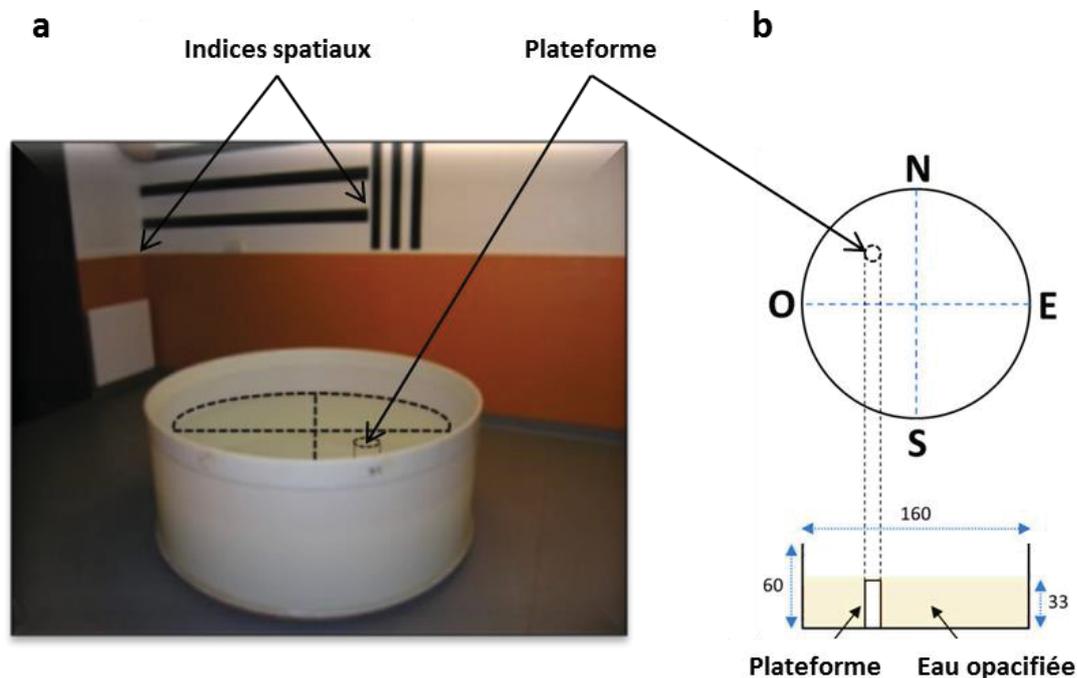


Figure 35 : La piscine de Morris

Photo (a) et schéma (b) de la piscine de Morris au sein de la pièce d'expérience. Abréviations : nord (N), sud (S) ; est (E) et ouest (O) (photo du laboratoire et schéma inspiré de la thèse de M. Loureiro).

Lors des tests, la piscine était remplie au deux tiers (40 cm environ) d'eau à $21 \pm 1^\circ\text{C}$, rendue opaque par ajout de lait en poudre. Une plateforme en plastique transparent de 33 cm de haut, représentant la seule échappatoire et invisible pour les rats, était placée à un endroit fixe dans l'enceinte (dans le quadrant NO, cf. figure 35). Au-dessus de l'enceinte était fixée une caméra permettant de suivre le parcours de l'animal dans la piscine et d'enregistrer les différentes variables.

5.3. Protocole expérimental

Le protocole utilisé fut le même lors de toutes les expériences (cf. figure 36).

Matériels et méthodes

5.3.1 Habituation

Ce protocole comprenait un premier jour d'habituation permettant aux rats de se familiariser avec le principe de la tâche (nager et trouver une échappatoire).

Le protocole comprenait une première session de 4 essais consécutifs avec une plateforme visible, indiquée à l'aide d'un ballon (*cf. figure 36a*). Ainsi, ils pouvaient nager vers cette dernière et intégrer l'un des principes du test, qui était la nécessité d'y rester 10 secondes avant d'être retirés de l'enceinte par l'expérimentateur. Lors de ces 4 essais des rideaux entouraient la piscine afin de masquer les indices spatiaux de la pièce et la plateforme indiquée était placée dans un autre quadrant que celui où se situait la plateforme non visible durant le protocole d'apprentissage à venir. Ces deux précautions avaient pour but de ne pas interférer avec le futur apprentissage.

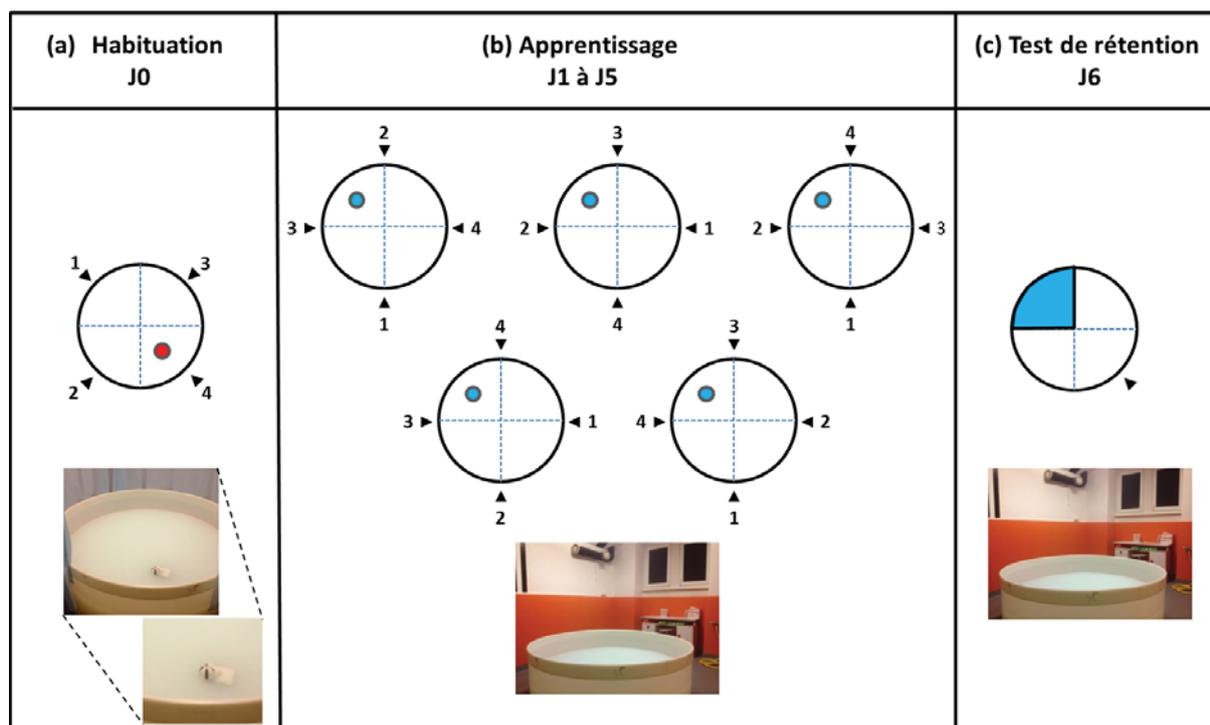


Figure 36 : Protocole de piscine de Morris

Schéma du protocole utilisé en piscine de Morris, composé d'un jour d'habituation à la tâche (a) lors d'un essai avec plateforme visible (matérialisée par le rond rouge) et des rideaux entourant la piscine (photo a). Cette habituation a été suivie de 5 jours d'apprentissage (b) avec une plateforme immergée (matérialisée par des ronds bleus) Durant l'apprentissage les rats avaient accès à tous les indices de la pièce (photo b). Après l'apprentissage, un test de rétention (c), sans plateforme, était effectué dans la même configuration que lors de l'apprentissage (photo c) et le temps passé dans le quadrant cible (en bleu) était mesuré. L'ordre des départs est présenté sur la figure pour chaque jour de test (flèches et chiffres romains) et était différent chaque jour.

Matériels et méthodes

5.3.2 Apprentissage

Après ce premier jour, nous avons effectué 5 jours d'apprentissage consécutifs avec la plateforme immergée et sans les rideaux. L'animal devait trouver et mémoriser la localisation de la plateforme pour se soustraire à la situation. Chacun des jours d'apprentissage était constitué de 4 essais identiques pour tous les rats, d'une durée maximale de 60 secondes, dont l'ordre des départs était pseudo-randomisés et différent chaque jour (*cf figure 36*).

La pseudo-randomisation des départs permettait d'éviter que les rats n'automatisent une série de mouvements, ce qui aurait pu leur permettre de rejoindre la plateforme sans pour autant se représenter ni utiliser les indices de l'environnement (D'Hooge and De Deyn, 2001) Avec ce protocole, la meilleure stratégie d'apprentissage consistait à se forger une représentation de la localisation de la plateforme dans la piscine en prenant en compte la configuration de la pièce grâce aux indices distaux. Pour chaque essai, si l'animal ne trouvait pas la plateforme au bout de 60 secondes, l'expérimentateur attirait celui-ci vers la plateforme. Une fois dessus, l'animal y était laissé pendant 10 secondes afin de lui laisser la possibilité d'appréhender et d'intégrer l'espace environnant.

5.3.3 Test de rétention

Le test de rétention, effectué un jour après la fin de l'apprentissage, avait pour but d'évaluer la capacité des animaux à rappeler l'information spatiale.

Ce test de rétention durait 60 secondes, la plateforme était retirée de l'enceinte et les animaux effectuaient leur départ depuis un point de lâcher encore jamais utilisé lors de l'apprentissage (*cf.figure 36*). La piscine était virtuellement découpée en quatre quadrants identiques et nous analysions le temps passé par les rats dans le quadrant où se situait la plateforme durant l'apprentissage, considéré comme le *quadrant cible*, ainsi que différentes variables de nage. Un rat qui n'avait pas bien appris l'emplacement de la plateforme effectuait une visite aléatoire, dite au hasard, de la piscine, ce qui se traduisait par un pourcentage identique de temps de visite dans chacun des quadrants (25%). Par contre, un rat qui avait correctement appris l'emplacement de la plateforme focalisait sa recherche dans le quadrant cible et passait donc significativement plus de 25% de son temps dans ce dernier.

Matériels et méthodes

5.4. Variables analysées

Les variables analysées lors de l'apprentissage étaient : la distance parcourue jusqu'à la plateforme ou dans les différentes zones de la piscine, la latence pour arriver sur la plateforme, la vitesse de nage, le temps d'immobilité (temps durant lequel l'animal flotte) et enfin le temps passé à nager contre les parois, dans un corridor virtuel de 10 cm de large (comportement dit de thigmotaxie, *cf. figure 37*).

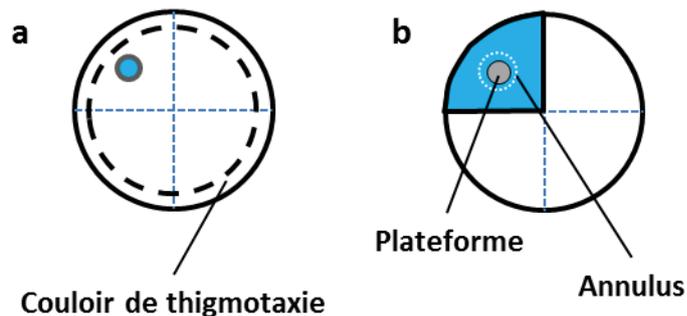


Figure 37 : Schéma (a) du couloir de thigmotaxie dans la piscine de Morris et (b) de l'annulus autour de la plateforme.

L'ensemble de ces variables permettait d'évaluer l'apprentissage de la localisation de la plateforme par les animaux mais également de mettre en évidence de possibles perturbations motrices ou même la mise en place de stratégies particulières.

Un animal qui apprend la localisation de la plateforme va présenter une diminution de la latence et de la distance nécessaire pour rejoindre la plateforme. Il va également présenter naturellement un comportement de thigmotaxie qui peut être interprété de différentes manières (Devan et al., 1999a, 1999b; Simon et al., 1994; Topic et al., 2005; Treit and Fundytus, 1988). Certains auteurs estiment que ce comportement est un comportement « par défaut » des animaux lorsqu'ils n'ont pas encore intégré et compris la tâche à effectuer (Devan et al., 1999a, 1999b; Topic et al., 2005). Ainsi, lorsque l'animal commence à chercher la plateforme dans l'ensemble du dispositif (en général après le premier jour d'acquisition), ce comportement diminue (Dolleman-van der Weel et al., 2009; Topic et al., 2005).

D'autres auteurs estiment qu'un tel comportement est le reflet d'un stress ou d'une anxiété importante (Devan et al., 1999a, 1999b; Topic et al., 2005). En effet, dans des tâches comportementales, comme le champ ouvert, cette variable est utilisée comme indice du niveau d'anxiété des animaux (Barnett, 2007; Treit and Fundytus, 1988). Selon cette hypothèse, plus les animaux sont anxieux, plus ce comportement

Matériels et méthodes

est observé. Pour conforter cette hypothèse, ce comportement apparaît atténué par l'utilisation de substances anxiolytiques (Treit and Fundytus, 1988).

Lorsque cette variable ne diminue pas au cours de l'apprentissage, deux interprétations sont possibles : soit les animaux ne parviennent pas à apprendre la tâche ou encore à modifier un comportement de nage « par défaut », soit ils présentent une anxiété exacerbée dès qu'ils sont confrontés à la situation expérimentale.

Dans la piscine, la vitesse de nage et le temps d'immobilité des animaux peuvent renseigner, comme la thigmotaxie, sur la présence de déficits autres que cognitifs, notamment sensori-moteurs et motivationnels. Ces comportements peuvent différer d'une souche à une autre, notamment au cours du vieillissement (D'Hooge and De Deyn, 2001)

Lors du test de rétention nous avons analysé le temps passé dans le quadrant cible ainsi que le pourcentage de temps passé en thigmotaxie, la vitesse de nage, la distance totale parcourue et le temps d'immobilité. Nous avons également analysé, comme indice de précision du souvenir spatial, le nombre de croisements sur une zone qui représente la plateforme élargie de 10 cm, nommée annulus (*cf. figure 37*).

5.5. Protocoles d'inactivation

Afin de distinguer les différentes étapes nécessaires à la mise en place d'une mémoire spatiale chez le Rat (*i.e.* encodage, consolidation et rappel), nous avons utilisé différents protocoles d'inactivation. Ces protocoles sont explicités dans la publication 2 (*cf. page 117*).

6. Evaluation du niveau d'anxiété à l'aide du labyrinthe en croix surélevé

Nous avons utilisé ce test comportemental comme complément des expériences de piscine de Morris, afin de mieux évaluer les altérations comportementales induites par les micro-instillations de muscimol et de CNQX. Ce test nous a permis d'évaluer si nos déficits en piscine de Morris n'étaient pas dus à une anxiété exacerbée.

6.1. Principe du test

C'est l'un des tests comportementaux les plus couramment utilisés pour évaluer le niveau d'anxiété chez le Rat et a l'avantage de se baser sur un comportement

Matériels et méthodes

naturel des rongeurs (Pellow and File, 1986; Pellow et al., 1985; Treit et al., 1993; Walf and Frye, 2007). En effet, ce paradigme permet de placer les animaux face à leur appréhension des espaces ouverts et lumineux tout en les confrontant à leur propension naturelle à vouloir explorer tout environnement inconnu. Il est reconnu que ce test remplit tous les critères de validité d'un modèle (Pellow et al., 1985; Walf and Frye, 2007) et a déjà été validé au laboratoire (Cosquer et al., 2005; Loureiro et al., 2012a).

6.2. Dispositif

Le labyrinthe, surélevé de 73 cm par rapport au sol, était constitué de 4 bras (50 cm de long, 10 cm de large) disposés en croix, reliés par une zone centrale (*cf. figure 38*). Deux bras opposés comprenaient des parois de 40 cm de haut, représentant un milieu sûr – peu anxiogène –, les deux autres bras opposés ne comprenaient pas de parois, mais uniquement des rebords de 1,5 cm de haut, représentant cette fois un milieu anxiogène. Le labyrinthe était placé au centre d'une pièce dans laquelle l'éclairage pouvait être finement réglé à l'aide d'halogènes disposés dans les quatre coins de la pièce. Les expériences en labyrinthe en croix surélevé ont été effectuées dans la pénombre, avec une luminosité de 2 lux dans les bras fermés, 7,5 lux au niveau des bras ouverts et 5 lux au centre. Ces intensités ont été choisies en accord avec différentes études menées au laboratoire (Cosquer et al., 2005; Loureiro et al., 2012a).

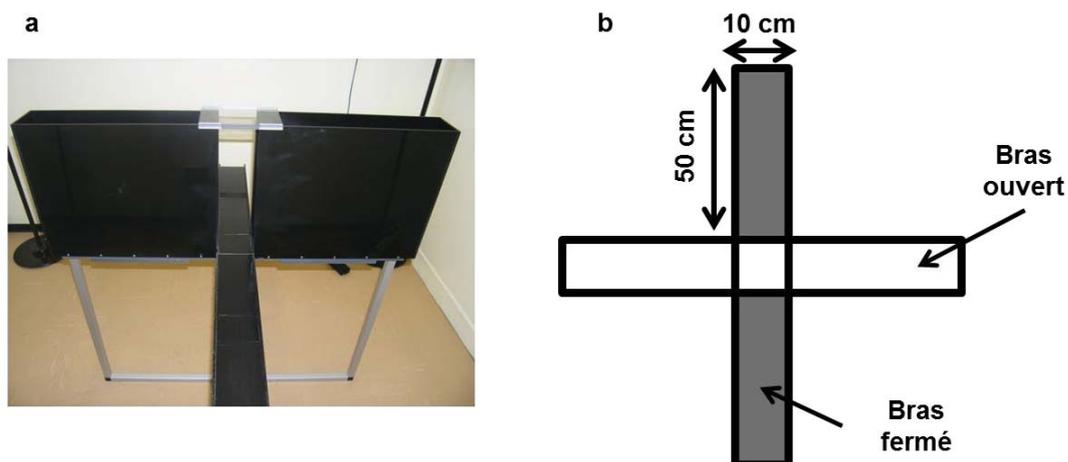


Figure 38 : photographie (a) et schéma (b) du dispositif du labyrinthe en croix surélevé.

Matériels et méthodes

L'ensemble du dispositif était filmé par une caméra fixée 200 cm au-dessus du labyrinthe reliée à un écran caché derrière une paroi. Ce système d'acquisition permettait l'évaluation du comportement des animaux en direct sans les perturber.

6.3. Conditions de test

Les résultats obtenus dans ce test peuvent dépendre de la manipulation et du cycle journalier des animaux (Andrade et al., 2003; Walf and Frye, 2007). Afin d'éviter tout biais, les rats étaient manipulés de façon identique et nous avons choisis d'effectuer les expériences lors d'une période d'activité locomotrice stable des animaux, entre 9h00 et 13h00 (Honma et al., 1987; Yassenkov and Deboer, 2012). La période de test que nous avons choisie est également celle durant laquelle les concentrations de corticostérone, hormone de réponse au stress chez le Rat, sont stables et faibles (Atkinson and Waddell, 1997; De Boer et al., 1990).

6.4. Déroulement du test

Une heure avant l'évaluation comportementale, les rats étaient amenés dans une pièce, adjacente à la salle de test, dans laquelle se déroulaient également les instillations. Le protocole d'instillation est décrit dans la publication 2 ([cf page 117](#)).

Cinq minutes avant le début de l'expérience, les rats étaient mis dans une boîte de transport vide (sans sciure, ni nourriture et boisson), laquelle était placée dans la pièce de test. Le test débutait avec le placement des rats au centre du labyrinthe avec la tête dirigée vers l'un des bras fermés ; le bras fermé choisi variait aléatoirement d'un animal à l'autre. Aucun départ n'était effectué avec la tête tournée vers un bras ouvert afin d'éviter la comptabilisation d'une visite dans un bras ouvert qui ne serait pas due au «choix » du rat mais plutôt à un comportement de fuite vis-à-vis du manipulateur.

Le test durait cinq minutes et le nombre d'entrées ainsi que le temps passé dans les différents bras étaient comptabilisés en direct à l'aide d'un logiciel (Chronos®).

Chaque rat n'effectuait ce test qu'une seule fois car différentes études ont montré que la répétition de celui-ci pouvait engendrer une modification, en général une diminution, du comportement de visite de l'ensemble du dispositif et plus particulièrement des bras ouverts (Bertoglio and Carobrez, 2000; Carobrez and Bertoglio, 2005; de Sousa Almeida et al., 2016; Walf and Frye, 2007).

Matériels et méthodes

Après chaque rat, le labyrinthe et la cage de transport étaient nettoyés à l'eau puis à l'alcool à 70% afin de neutraliser au maximum les odeurs.

7. Evaluation du niveau d'anxiété en champ ouvert

7.1. Principe du test

Ce test est couramment utilisé dans la littérature pour évaluer chez le rongeur le comportement naturel induit par le placement dans un nouvel environnement (Milot and Plamondon, 2008; Walsh and Cummins, 1976). Comme pour le labyrinthe en croix surélevé, l'espace ouvert rend ce test enxiogène pour les animaux. Ainsi, ce test permet d'évaluer l'activité générale des animaux et leur comportement de thigmotaxie mais également le comportement d'habituation des animaux durant une séance ou à travers plusieurs séances dans le même environnement.

7.2. Dispositif

Le champ ouvert (CO) était constitué de quatre parois en bois de 43,5 cm de hauteur. Le fond du CO était une surface de 65X65cm, divisée en 25 carreaux égaux. Ce dispositif était placé sur une table dans la piscine de Morris, afin de bénéficier du système de video-tracking situé au-dessus, avec des rideaux tirés autour de l'enceinte (*cf.figure 39*). L'éclairage du dispositif a volontairement était intense, allant de 104 à 111 Lux sur l'ensemble du CO.

Au sein du CO, nous avons virtuellement défini 4 zones, allant du centre vers la périphérie. Ainsi, le dispositif était constitué d'une première zone, l'hypercentre, de 15 cm de large, intégré à la seconde, un centre élargi mesurant 45 cm de côté lui-même intégré à l'ensemble du dispositif de 75 cm de côté. De plus, nous avons délimité une zone dite de thigmotaxie de 15 cm de largeur depuis les parois. (*cf.figure 39*).

Matériels et méthodes

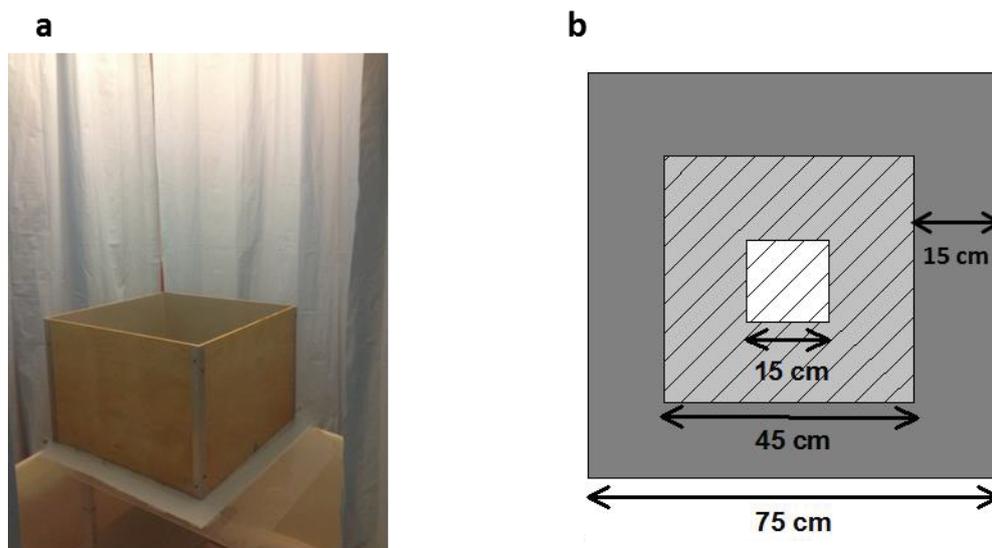


Figure 39 Ledispositif du champ ouvert

Photographie (a) et schéma (b) du dispositif du champ ouvert, virtuellement délimité en 3 zones, dont un hyper-centre (carré rayé blanc), un centre élargi (carré rayé gris clair) et une zone de thigmotaxie, contre les parois (zone grise foncée).

7.3. Déroulement du test

Les rats ont reçu leur instillation 15 ou 30 minutes avant le début du test à l'aide de CNQX, de muscimol ou d'excipients, dans une autre pièce que la salle de test. Ensuite, chaque rat a effectué une série de trois expositions consécutives de six minutes au CO espacées de trois minutes (cf. figure 40). Entre chaque session le CO était nettoyé à l'eau et entre chaque rat, à l'eau et à l'alcool afin de neutraliser au maximum les odeurs.

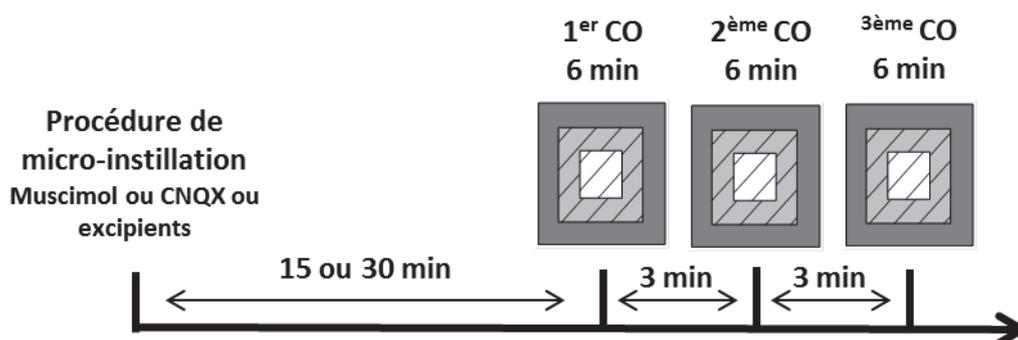


Figure 40 : Déroulement du test en CO

Schéma du déroulement du test en CO. Quinze ou trente minutes après la procédure de micro-instillation pour les rats traités au CNQX ou au muscimol respectivement, les animaux ont été exposés trois fois au CO durant six minutes, avec trois minutes entre chaque exposition.

Matériels et méthodes

7.4. Variables analysées

La caméra fixée au-dessus du dispositif permettait, pour chaque séance, d'enregistrer la distance totale parcourue, ainsi que la distance parcourue dans différentes zones définies ci-dessus ainsi que la vitesse de déplacement des animaux.

8. Mesure de l'activité locomotrice en cage d'élevage

Tout comme le labyrinthe en croix surélevé, ce test a été utilisé afin d'évaluer les conséquences des instillations intra-HbL de muscimol de CNQX et de leur excipient respectif. Dans ce cas, nous cherchions à évaluer si ces instillations n'affectaient pas le comportement moteur général des animaux.

8.1. Dispositif

La mesure de l'activité locomotrice des rats s'est effectuée dans des cages d'élevage identiques à celles utilisées pour l'hébergement des animaux. La seule différence était la quantité moindre de sciure sur le fond de la cage afin de permettre la détection des mouvements des animaux par des faisceaux infra-rouge situés au niveau de la partie inférieure de la cage (*cf. figure 41*).

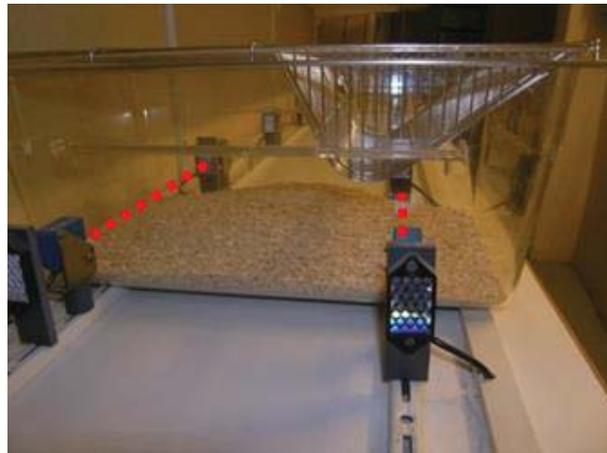


Figure 40 Photographie d'une cage d'élevage dans le système d'actographie

A chaque fois que les rats coupent successivement les deux faisceaux, un programme informatique décomptait une traversée. Nous pouvions ainsi évaluer l'activité locomotrice horizontale générale des rats dans leur cage suite aux différents traitements.

Matériels et méthodes

8.2. Déroulement de la mesure

Nous avons systématiquement placé les cages contenant les animaux dans la salle d'enregistrement deux jours avant le jour de test. Après 24 heures d'acclimatation, nous avons placé les rats dans des nouvelles cages possédant moins de sciure, pour une nouvelle période de 24 heures. Après cette deuxième phase d'acclimatation, nous avons lancé la mesure de l'activité locomotrice. Après une heure d'enregistrement de l'activité basale de nos animaux, nous avons procédé aux différentes instillations de CNQX, muscimol ou des excipients (*cf publication 2, page 117*) et enregistré l'activité des rats durant les trois heures suivant ces instillations. Les données analysées étaient le nombre de traversées de cage durant toute la durée de la scrutation.

9. Evaluation de la coordination motrice

Comme pour l'activité motrice en cage d'élevage, ce test a été effectué dans le but d'évaluer si les instillations de muscimol, de CNQX ou de leur excipient respectif n'affectaient pas le comportement moteur des animaux.

9.1. Principe du test

Ce test se base sur la motivation des animaux à rejoindre leur cage d'élevage en déambulant sur une barre de faible largeur. Il comporte une phase d'apprentissage durant laquelle les rats vont pouvoir apprendre à déambuler de manière optimale sur la barre, en développant leur coordination motrice, leur permettant de rejoindre leur cage de plus en plus rapidement. Un tel test ne permet pas de mettre en évidence des déficits moteurs fins et précis mais plutôt d'avoir une idée générale concernant les habiletés motrices de nos animaux.

9.2. Dispositif

La barre de deux mètres de long et quatre centimètres de large était surélevée de 50 cm par rapport au sol et placée au centre de la pièce de test (*cf. figure 42*).

Matériels et méthodes

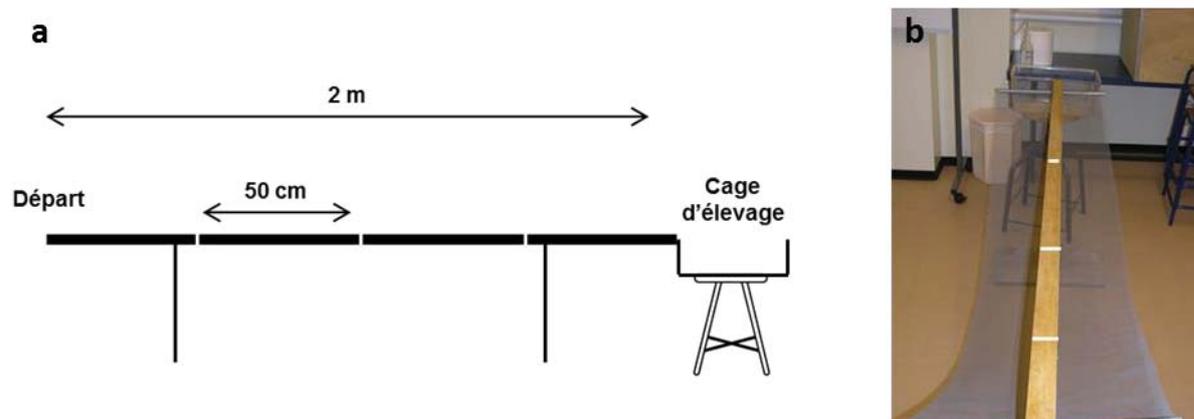


Figure 4241 Test de la barre

Schéma (a) et photographie (b) du dispositif de la barre permettant d'évaluer la déambulation des rats sur une distance de deux mètres, découpés en quatre segments de 50 cm jusqu'à leur cage d'élevage.

9.3. Déroulement de l'expérience

Cette expérience a nécessité un apprentissage de quatre jours. Une heure avant chaque session, les rats étaient placés dans une pièce adjacente à la salle de test. Cette salle servait également aux micro-instillations effectuées avant la session de test, le cinquième jour.

Le premier jour les animaux étaient placés, lors de cinq essais consécutifs, à quelques centimètres de leur cage. Cette première phase permettait aux rats de comprendre qu'il leur était possible de retourner dans leur cage en se déplaçant sur la barre.

Le lendemain les animaux effectuaient quatre essais. Le départ du premier essai était effectué à 50 cm de la cage, puis la distance de départ des trois essais suivants était augmentée de 50 cm à chaque fois (100 puis 150 puis 200 cm). Le troisième jour les rats effectuaient deux essais de 100 cm puis deux essais de 200 cm. Enfin, le dernier jour d'apprentissage, les rats effectuaient trois essais de 200 cm.

Le cinquième jour nous avons évalué la coordination motrice des animaux faisant suite à l'apprentissage. Lors de ce test, après le protocole d'inactivation (*cf. publication 2, page 117*) les animaux effectuaient quatre départs à deux mètres de la cage dont seuls les trois derniers conduisaient à l'attribution d'un score, évalué de la manière suivante : la barre était divisée en quatre segments de 50 cm et l'expérimentateur observait la déambulation des rats sur chacun des segments. Si un animal s'agrippait aux côtés de la barre, ou glissait, le score attribué sur le segment correspondant était de 0. Par contre, si l'animal présentait une démarche avec les

Matériels et méthodes

quatre pattes correctement posées sur la barre tout le long du segment, le score attribué était de 1. Ainsi, puisque nous effectuions trois essais scorés sur quatre segments, le score maximal possible pour un rat était de 12.

10. Prélèvements sanguins et dosages de corticostérone

Une des hypothèses proposée suites à nos expériences a été que l'HbL puisse se placer à l'interface des émotions et de la cognition. En effet, nos résultats ont suggéré que l'inactivation de l'HbL pouvait perturber les réactions comportementales face à un stress. L'ensemble des expériences décrites ci-dessous visait ainsi à évaluer si une modification de la réponse au stress, potentiellement induite par l'inactivation de l'HbL, pouvait être responsable des déficits observés en piscine de Morris.

Dans ce cadre, nous avons effectué des dosages de corticostérone (CORT) plasmatique, équivalent du cortisol humain, chez le Rat. Cela nous a permis d'évaluer la réaction physiologique des rats lors d'un événement stressant. Il est important de noter que dans notre cas, le stress était occasionné par les paradigmes expérimentaux utilisés (les protocoles de micro-instillations, la piscine de Morris et le labyrinthe en croix surélevé). Il a été démontré que de telles situations provoquaient une réponse physiologique caractérisée par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS), conduisant à la sécrétion de CORT (*cf. figure 43*) (Akirav, 2004; Engelmann et al., 2006; de Kloet et al., 1999). Cette réponse physiologique va permettre de placer l'organisme dans un état d'alerte et de mobilisation de l'énergie permettant à l'individu de faire face à la situation.

Dans un premier temps nous avons dosé la CORT plasmatique en cage d'élevage, uniquement suite aux procédures d'instillation de muscimol, de CNQX et de leurs excipients respectifs, sans aucun test comportemental. Cette première expérience visait à observer les effets des protocoles d'inactivation de l'HbL sur la réponse de l'axe HHS. Nous avons ensuite mesuré les niveaux de CORT plasmatique suite au test de rétention en piscine de Morris, sur des animaux inactivés (à l'aide de muscimol ou de CNQX) et sur des animaux témoins. Cette deuxième partie expérimentale avait pour but d'évaluer si l'inactivation de l'HbL induisait une

Matériels et méthodes

modification de la réponse physiologique au stress lors de nos tests comportementaux.

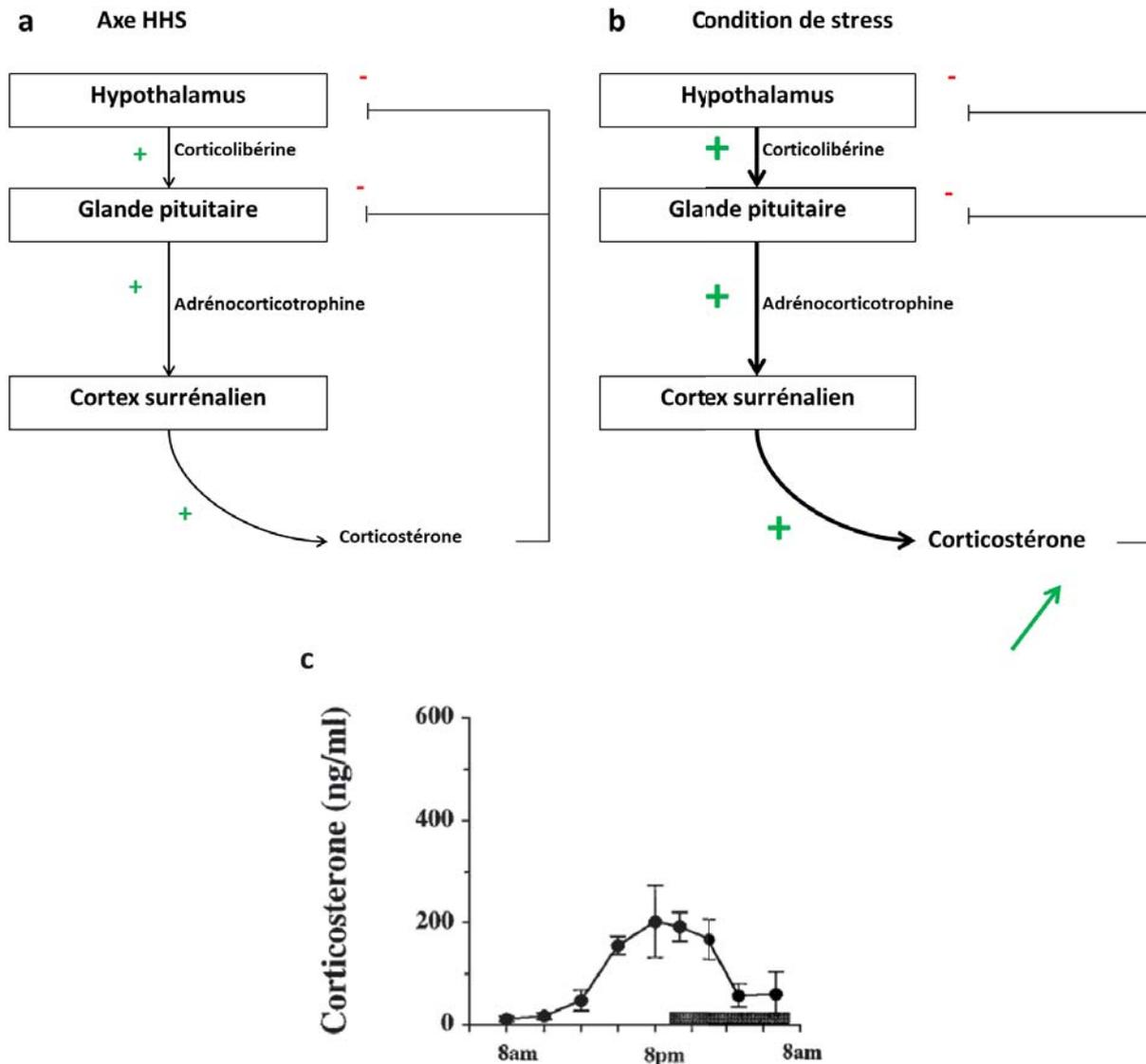


Figure 43 : Axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien

Représentation de l'axe HHS en condition normale (a) et de stress (b), conduisant à la libération de corticostérone chez le Rat. (c) Variation des concentrations sanguines de corticostérone de rats mâles au cours du nyctémère (Atkinson and Waddell, 1997).

10.1. Prélèvements sanguins

Pour effectuer ces dosages nous avons prélevé de petits volumes de sang (environ 150 μ L) au niveau de la veine caudale de nos rats et récupéré le sang à l'aide de capillaires héparinés [inspiré de la méthode de Fluttert,(2000)]. Suite aux prélèvements, les échantillons étaient centrifugés 10 minutes à 3000 rotations par minute dans une enceinte réfrigérée à 4°C afin de récupérer le plasma. Une fois récupéré, ce dernier était congelé à -20°C avant d'effectuer les dosages de CORT.

Matériels et méthodes

Les niveaux de CORT circulante varient au cours du nycthémère des animaux. En effet, ces niveaux sont au plus bas et stables au début de la phase diurne des rats puis augmentent progressivement pour atteindre un pic au début de leur phase nocturne (*cf. figure 43c*) (Atkinson and Waddell, 1997; Atkinson et al., 2006; De Boer and Van der Gugten, 1987). Lors de nos expériences, nous avons donc choisi d'effectuer les prélèvements entre 8h00 et 13h00, période où la corticostérone est au plus bas et fluctue le moins. Ce choix correspondait également aux différents protocoles explicités précédemment durant lesquels les animaux ont systématiquement été testés au début de leur phase diurne.

10.1.1 Habituation

Les prélèvements de sang nécessitaient de maintenir l'animal durant l'incision de la queue et le temps du prélèvement de sang, c'est-à-dire à peu près une minute dans nos conditions. Pour limiter au maximum le stress engendré par cette manipulation nous avons habitué les rats à cette procédure. Durant une semaine, nous avons placé chaque rat dans une serviette, sa tête et une partie de son corps étant recouverts par la serviette, laissant seulement sa queue visible et accessible (*cf. figure 44*). Cette dernière était doucement manipulée tout le temps de la contention afin de mimer la future incision.

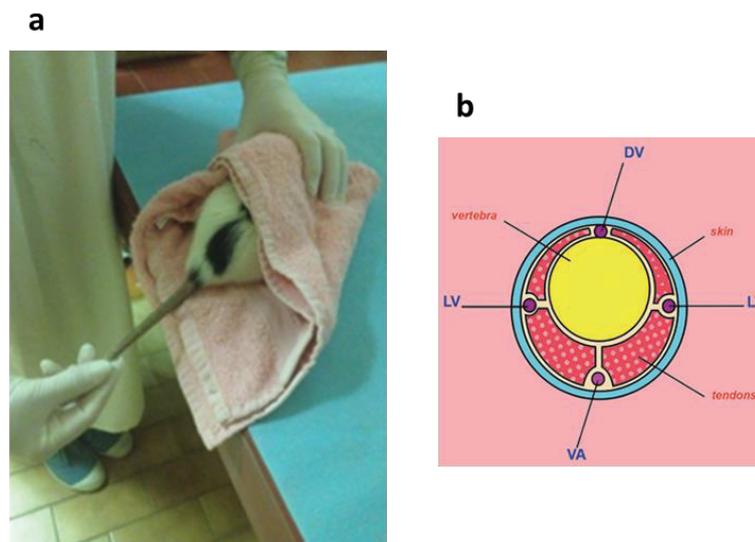


Figure 44 Prélèvements sanguins

(a) Photographie de la contention effectuée sur les rats lors des prélèvements de sang au niveau de la queue. (b) schéma de la disposition des différentes veines de la queue des rats (Brown, 2006). Dans notre protocole nous avons incisé la veine dorsale de la queue des animaux. Abreviations : LV : veine latérale ; VA : artère ventrale ; DV : veine dorsal.

Matériels et méthodes

10.1.2 Prise de sang

Le jour de la prise de sang la même contention était effectuée et cette fois la queue était incisée au niveau de la veine dorsale (*cf.figure 44*) à l'aide d'une lame de rasoir. Une fois la quantité de sang nécessaire collectée, la queue du rat était désinfectée et le saignement était stoppé par une compression légère. Cette procédure était répétée autant de fois que nécessaire aux différentes expériences. Dans un souci éthique, le nombre de prises de sang maximal par animal était limité à trois.

La succession des prélèvements a nécessité la prise en compte de délais. En effet, la concentration maximale de CORT sanguine libérée suite au stress est observée, chez le rat, environ 15 minutes après l'application d'une stimulation stressante. Le retour à un niveau de base après une telle stimulation est observé après 1h30 (Ferland and Schrader, 2011; Koolhaas et al., 2011). Le déroulé temporel des prises de sang est précisé ci-dessous selon le type d'expérience effectuée (*cf.figure 45 et 46*).

10.2. Prélèvements sanguins sans tests comportementaux

Nous avons effectué 3 prises de sang consécutives (*cf.figure 45*).

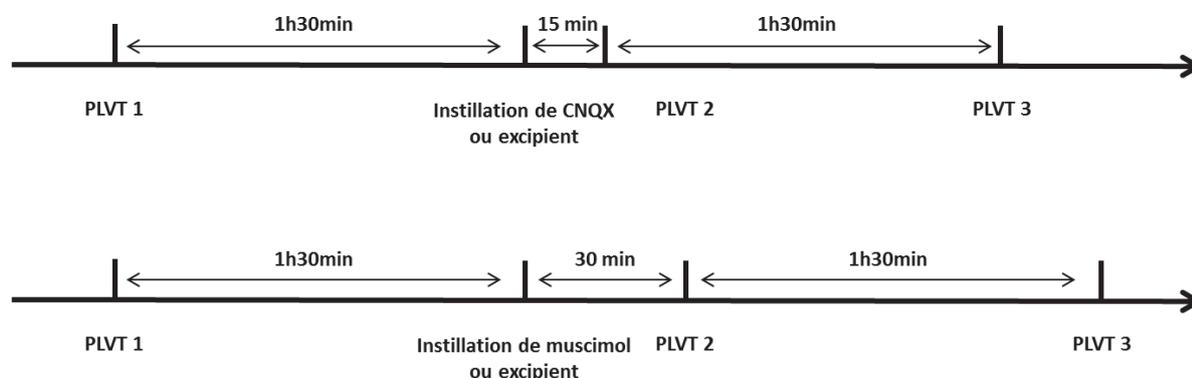


Figure 45 : Déroulé temporel des prélèvements en cage d'élevage

Une heure et 30 minutes après le premier prélèvement les instillations ont été effectuées suivies, 15 minutes plus tard du second. A nouveau, 1h30min plus tard nous avons fait un dernier prélèvement. Abréviations. : PLVT : prélèvements

10.3. Prélèvements sanguins en situation de test comportemental

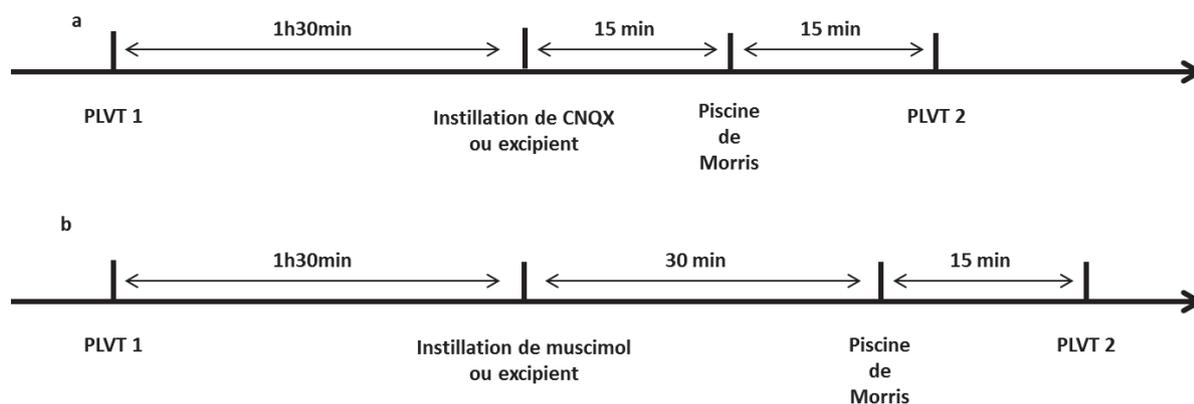


Figure 46 : Schéma du déroulé temporel des prélèvements sanguins lors du test de piscine de Morris.

Une heure et 30 minutes après le premier prélèvement les instillations ont été effectuées suivies du test comportemental. Un quart d'heure plus tard nous avons effectué le second prélèvement. Abréviations. : PLVT : prélèvements

10.4. Dosage de corticostérone

L'ensemble des dosages de CORT a été effectué à l'aide d'une méthode radio-immunologique (RIA) lors d'une collaboration, avec Béatrice Bothorel, Dominique Ciocca et Vincent-Joseph Poirel, à l'institut de Neurosciences Cellulaires et intégratives (INCI) de Strasbourg.

10.4.1 Principe du dosage

Nous avons utilisé des kits (Immuchem™ Double Antibody corticostérone 125I RIA Kit for rats and mice, MP biomedical) nous permettant de faire un dosage RIA à l'aide d'iode 125 (^{125}I) par dosage compétitif. Ce type de dosage se base sur la compétition entre un antigène (Ag) à doser, ici la CORT plasmatique (CORTp) et une quantité connue de CORT radio-marquée (CORT*), vis-à-vis d'un anticorps anti-corticostérone (Ac) en condition saturante. Un tel dosage permet la mesure de la quantité de radioactivité provenant du complexe [CORT*-Ac], plus ce complexe est formé, plus la radioactivité mesurée est importante. Ainsi, si l'échantillon à doser contient de la CORTp, celle-ci va entrer en compétition avec la CORT* et diminuer le nombre de complexe [CORT*Ac] et ainsi réduire la quantité de radioactivité mesurée (*cf. figure 47*). De cette manière, plus il y a de CORT dans nos prélèvements sanguins plus la radioactivité mesurée sera faible.

Matériels et méthodes

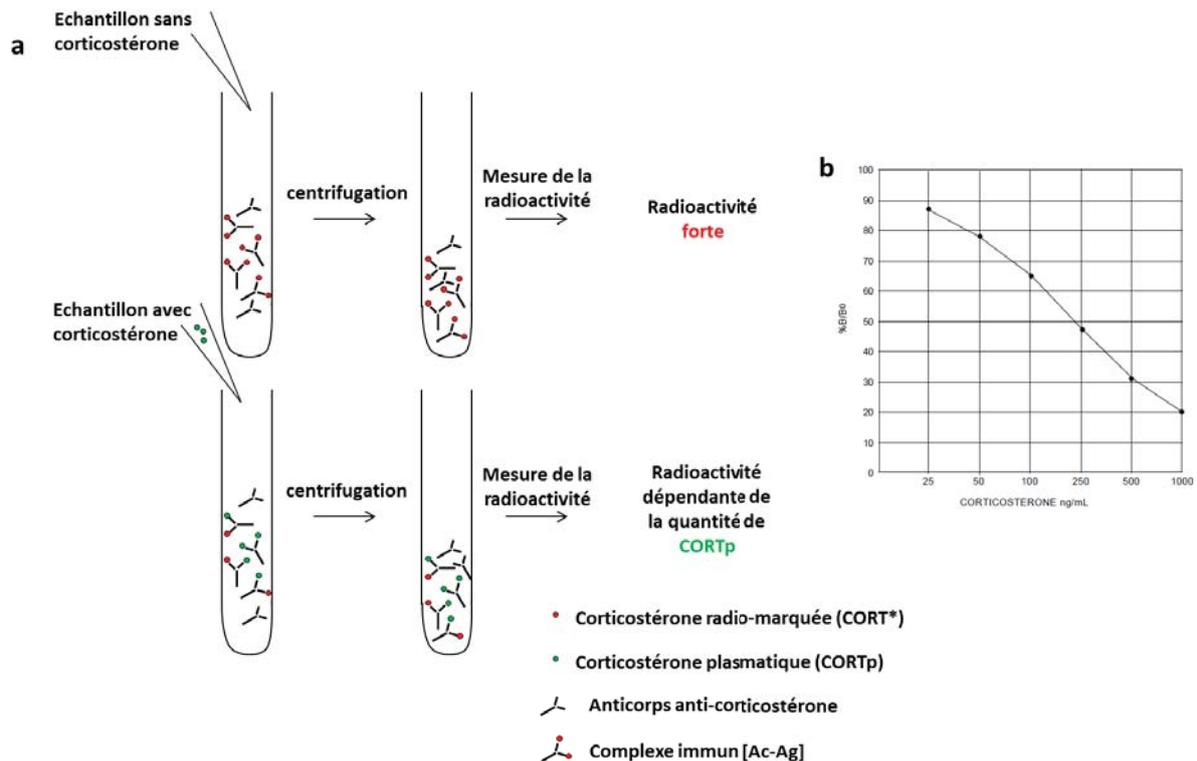


Figure 47 Méthode de dosage RIA

(a) Schéma du principe de dosage compétitif de corticostérone par radio-immunomarquage. (b) exemple de courbe étalon avec des échantillons plasmatiques contenant des concentrations croissantes de corticostérone (tirée de la fiche technique du kit de dosage).

10.4.2 Protocole du dosage

Il a été nécessaire d'effectuer une gamme étalon pour extrapoler les quantités de corticostérone de nos échantillons à partir du signal radioactif obtenu. Cette gamme a été établie à l'aide de standards de concentrations croissantes et connues de corticostérone fournies avec le kit (5, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 et 1000 ng/mL). Le dosage de ces standards a été effectué en triplicat et la courbe étalon a été calculée à l'aide de la valeur moyenne de radioactivité de chacun de ces triplicats. Concernant nos échantillons, le dosage a été effectué en duplicat et la moyenne de la valeur de radioactivité a été utilisée pour calculer la concentration de corticostérone en ng/mL.

11. Techniques histologiques

11.1. Mise à mort des animaux et prélèvement des cerveaux

Avant leur mise à mort, les animaux ont systématiquement reçu des injections de différents composés permettant d'identifier la zone d'instillation. Pour toutes les expériences qui ont conduit à la publication 2 ainsi que les expériences qui n'ont pas

Matériels et méthodes

encore fait l'objet du processus de publication nous avons instillé une solution d'un colorant bleu permettant d'indiquer l'endroit d'instillation.

Comme mentionné dans le paragraphe « Composés pharmacologiques instillés » (*cf. Composés pharmacologiques instillés, page 80*) nous avons modifié nos protocoles d'instillation et de vérification histologique pour la *publication 1* afin de mieux identifier l'étendue de la région instillée et diminuer le nombre d'animaux utilisés pour les contrôles neuro-anatomiques. Ainsi, au lieu d'une solution de colorant, les animaux utilisés pour la *publication 1* ont reçu une instillation de muscimol dilué dans une solution de bleu Evans (0,5% de Bleu Evans dans une solution de muscimol à une dose finale de 16ng/côté). Ce composé, lorsqu'il est excité émet une fluorescence de longueur d'onde d'émission 680nm, correspondant à du rouge (Hed et al., 1983; Saria and Lundberg, 1983). Cette instillation nous permettait, en plus de visualiser la région d'instillation, d'évaluer l'étendue de la diffusion du muscimol (Loureiro et al., 2012a).

Lors de leur mise à mort, les rats étaient injectés à l'aide d'une dose létale de solution de pentobarbital sodique (CEVA santé animale, France). Après endormissement et vérification de l'absence de reflexe suite à une stimulation nociceptive (pincement de la queue et de la patte), les rats ont été perfusés à l'aide d'une solution de NaCl 0.9% (50 mL, 10mL/min) puis d'une solution de paraformaldéhyde à 4% (PAF, 100mL, 10mL/min). Pour cela, après thoracotomie, l'aorte descendante était clampée afin de ne faire circuler le NaCl 0,9% et la solution de PAF 4% que dans la partie supérieure du corps de l'animal. Une aiguille de perfusion était ensuite introduite depuis l'apex cardiaque dans la valve aortique et maintenue à l'aide d'un clamp. Enfin, l'oreillette droite était incisée. L'aiguille de perfusion était reliée à un cathéter permettant la perfusion lente de NaCl et de PAF 4% grâce à une pompe péristaltique. Une fois perfusés, les animaux étaient décapités et le cerveau extrait de la boîte crânienne. Il était ensuite post-fixé durant deux heures dans une solution de PAF 4% à 4°C. Après la post-fixation, la solution de PAF 4% était remplacée par une solution de d-saccharose à 20% durant deux jours à 4°C. Les cerveaux étaient ensuite rapidement congelés dans une solution d'isopentane à -40°C et conservés à -80°C en attendant d'être coupés.

Matériels et méthodes

11.2. Coupes des cerveaux

Les cerveaux ont été coupés à -22°C à l'aide d'un cryostat (Microm HM 560) en sections de 40 µm d'épaisseur. Ces coupes étaient récupérées soit sur lames gélatinées - et laissées à sécher à température ambiante avant d'être montées entre lame et lamelles -, soit dans des puits contenant une solution cryoprotectante et conservées à -20°C en vue de traitements immunohistologiques.

11.3. Vérifications histologiques

11.3.1 Coloration au violet de crésyl

Toutes les coupes des animaux ayant reçu l'instillation de bleu et non pas de muscimol-Bleu Evans ont été colorées au violet de crésyl. Cette procédure permettait de marquer les composés acides des cellules et ainsi de visualiser la gliose engendrée par l'implantation des guides canules et de mieux délimiter la zone d'instillation. Pour cela, après rinçage à l'eau distillée, les lames étaient placées dans un bain de coloration de violet de crésyl à 55°C pendant 10 minutes. Ensuite, les lames étaient à nouveau rincées à l'eau distillée puis déshydratées dans un bain d'éthanol 70° puis 90°. Une étape de décoloration dans un bain d'alcool-acide acétique (5% d'acide acétique, 95% d'éthanol 95%) était alors effectuée, suivie de nouveaux bains de déshydratation à l'éthanol (un bain à 90° et deux bains à 100°). Enfin les lames étaient plongées dans un dernier bain de xylène (> 99 %, Rotipuran®, Roth) était effectué avant d'être montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage Eukitt (Fluka-Sigma Aldrich®).

11.3.2 Utilisation de marqueurs fluorescents

Lors de l'utilisation de composés fluorescents (traceur ou muscimol-bleu Evans), aucune coloration n'était effectuée, les lames étaient uniquement rincées puis montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage Diamount DAPI (Dapi-Fluoromount-G®, Clinisciences).

Ce milieu contient du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) qui émet une fluorescence de longueur d'onde 450-490 nm correspondant à une couleur bleue. Son affinité de liaison pour les bases adénine et thymine de l'ADN permet de marquer les noyaux des cellules et ainsi mieux délimiter les régions cérébrales.

Matériels et méthodes

Une fois montées, les lames nécessitant l'utilisation de ce milieu de montage étaient stockées à l'abri de la lumière à 4°C.

11.3.3 Acquisition des images

Toutes les images effectuées à partir des coupes ont été acquises à l'aide d'un microscope apotome (apotome.2, Zeiss®) équipé d'une platine motorisée selon des axes tridimensionnels (en X, Y et Z). Le microscope était relié à une caméra (Orca Flash 4.0 LT, Hamamatsu) et à un système d'acquisition (ZEN 2, Zeiss®).

Ces images étaient ensuite comparées à un atlas de Rat (Paxinos and Watson, 2006) afin de vérifier la bonne localisation de nos différentes instillations.

12. Statistiques

Toutes les statistiques utilisées lors de l'analyse des résultats obtenus sont décrites dans les publications 1 et 2 et explicitées dans les parties correspondantes aux résultats non encore publiés. D'une manière général, lors d'expériences nécessitant de comparer une performance à une moyenne, nous avons utilisé un test *t* de student et dans le cas de comparaisons de groupes, une ANOVA à un facteur était effectuée (en général avec le traitement comme facteur). Lors de comparaison à mesures répétées (en général lors de session d'apprentissage) nous avons utilisé une analyse ANOVA à mesures répétées avec, en général, les jours d'apprentissage, les intervalles de temps ou les délais comme mesures répétées.

Résultats

Résultats

L'objectif principal de ma thèse a été d'étudier l'implication de l'HbL dans les processus mnésiques chez le Rat. Pour cela nous avons évalué l'impact d'instillations de muscimol ou de CNQX lors de tâches de mémoire spatiale et de travail. Comme cité dans l'avant-propos de ce manuscrit (paragraphe II « structure de la thèse »), ces résultats seront présentés dans les publications 1 et 2.

Afin de correspondre à l'ordre de présentation des différents types de mémoire de la partie introductive de ce manuscrit, la présentation des résultats ne suivra pas la chronologie du déroulement de mes travaux de thèse. En effet, la première publication concernera l'étude de l'implication de l'HbL et de la voie CPFm-HbL dans la mémoire de travail et sera suivie de la publication concernant le rôle de l'HbL dans les processus d'encodage de consolidation et de rappel d'une information spatiale.

À la suite de cette seconde publication, certains résultats non encore publiés, seront décrits après une courte introduction et un bref récapitulatif des « matériels et méthodes » utilisés. Certains résultats sont issus d'un deuxième test de rétention que nous avons effectué lors de l'expérience ayant consisté à explorer les effets de l'inactivation de l'HbL sur le rappel (dont les résultats ont été publiés); ce test a été effectué le jour suivant le premier test de rétention. D'autres résultats sont issus d'expériences qui ont été effectuées afin de tenter d'expliquer certains comportements observés lors de cette étude ; elles ont concerné le rôle potentiel de l'HbL dans la gestion du stress, et ont eu pour objet l'observation des effets de l'inactivation de l'HbL dans un autre test d'anxiété (le champ ouvert) et sur la libération de corticostérone plasmatique en condition de test comportemental. Enfin des résultats concernent une expérience en piscine de Morris qui a cherché à mettre en évidence la possibilité d'une latéralisation de l'implication fonctionnelle de l'HbL dans la mémoire.

Résultats

1. Publication 1: Etude de l'implication de l'HbL et de la connexion CPFm-HbL dans la mémoire de travail

A la vue des projections du CPFm vers l'HbL et du contrôle que cette dernière exerce sur la libération dopaminergique chez le Rat (*cf. L'HbL, une structure idéalement positionnée au centre du cerveau, page 15*), nous avons choisi d'étudier l'implication potentielle de cette structure dans la MdT. Pour cela, nous avons inactivé l'HbL à l'aide d'instillation de muscimol, durant une tâche de non-appariement différé à la position (NADP) chez le Rat. Lors de cette étude nous avons également cherché à étudier le lien entre l'HbL et le CPFm. Ainsi, en plus de l'inactivation de l'HbL, nous avons déconnecté pharmacologiquement la voie CPFm-HbL, grâce à un protocole d'inactivations réversibles croisées, toujours à l'aide de muscimol. Les résultats publiés sont une réplification partielle d'une expérience préliminaire visant à inactiver uniquement l'HbL lors du paradigme de NADP. Les résultats de cette expérience préliminaire sont similaires à ceux obtenus lors des expériences qui ont conduit à la publication 1 (*cf. figure 48*).

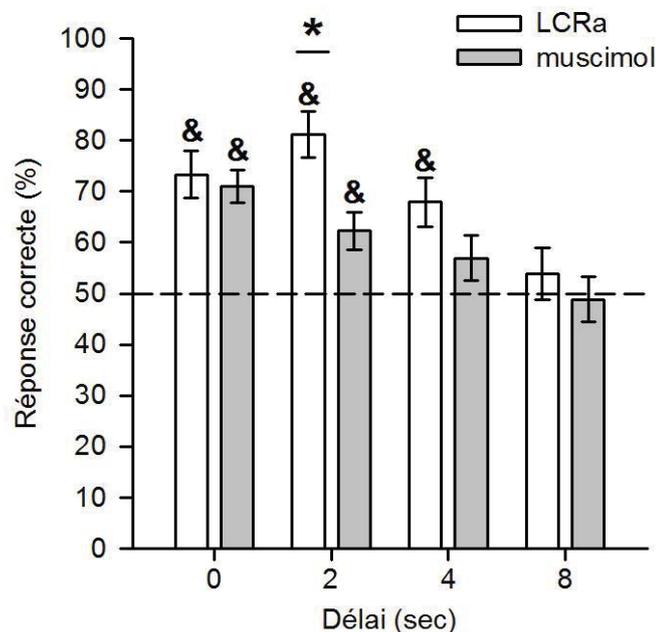


Figure 48 Résultats obtenus suite à l'instillation de muscimol et de LCRa lors d'une expérience préliminaires de MdT

Graphique représentant les performances des rats après instillation de LCRa ou de muscimol au sein de l'HbL. Les animaux témoins présentent une diminution progressive de leurs performances qui atteignent le niveau du hasard pour le délai 8 secondes. Les animaux traités au muscimol présentent des performances significativement moins bonnes que les témoins au délai 2 secondes et des performances au niveau du hasard dès le délai 4 secondes [Statistiques : ANOVA (facteur traitement et délais comme mesurées répétées & : $p < 0,05$ comparé au hasard (50%) et * : $p < 0,05$ comparé aux animaux témoins]

ORIGINAL ARTICLE

The Lateral Habenula as a Relay of Cortical Information to Process Working Memory

Victor Mathis^{1,2}, Alexandra Barbelivien^{1,2}, Monique Majchrzak^{1,2},
Chantal Mathis^{1,2}, Jean-Christophe Cassel^{1,2}, and Lucas Lecourtier^{1,2}

¹Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France and ²LNCA, UMR 7364, CNRS, F-67000 Strasbourg, France

*Address correspondence to Lucas Lecourtier, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364, CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France. Email: l.lecourtier@unistra.fr

Abstract

Working memory is a cognitive ability allowing the temporary storage of information to solve problems or adjust behavior. While working memory is known to mainly depend on the medial prefrontal cortex (mPFC), very few is known about how cortical information are relayed subcortically. By its connectivity, the lateral habenula (lHb) might act as a subcortical relay for cortical information. Indeed, the lHb receives inputs from several mPFC subregions, and recent findings suggest a role for the lHb in online processing of spatial information, a fundamental aspect of working memory. In rats, in a delayed non-matching to position paradigm, using focal microinjections of the GABA_A agonist muscimol we showed that inactivation of the lHb (16 ng in 0.2 μL per side), as well as disconnection between the prelimbic region of the mPFC (mPFC/PrL, 32 ng in 0.4 μL in one hemisphere) and the lHb (16 ng in 0.2 μL in the lHb in the contralateral hemisphere) impaired working memory. The deficits were unlikely to result from motivational or motor deficits as muscimol did not affect reward collection or cue responding latencies, and did not increase the number of omissions. These results show for the first time the implication of the lHb in mPFC-dependent memory processes, likely as a relay of mPFC/PrL information. They also open new perspectives in the understanding of the top-down processing of high-level cognitive functions.

Key words: disconnection, lateral habenula, prefrontal cortex, rat, working memory

Introduction

Working memory permits the temporary storage and manipulation of information in order to adequately adjust behavior (Baddeley 2012). It relies on the online processing of sensory information which, once used, becomes irrelevant and needs to be disregarded. In humans, working memory is mainly subserved by the dorsolateral prefrontal cortex (dlPFC; Zanto et al. 2011). More specifically, in humans it has been shown that during working memory processing distinct and parallel pathways, cortico-cortical and cortico-subcortical—including the thalamus and basal ganglia—contribute to the maintenance of items, the cortico-cortical pathway requiring an update of the memory load, the cortico-subcortical pathway not (Ekman et al. 2016).

Anatomically and functionally, the dlPFC corresponds in rodents to the medial prefrontal cortex (mPFC) (Uylings et al. 2003). Lesion or reversible inactivation of the mPFC, and more particularly of the prelimbic (PrL) region, impairs working memory (Seamans et al. 1995; Ragozzino et al. 1998; Horst and Laubach 2009; Kesner and Churchwell 2011, for a review, Liu et al. 2014). Physiologically, since the seminal demonstration by Fuster and Alexander (1971), sustained neuronal firing within the mPFC is suggested to represent a correlate of working memory (see also Baeg et al. 2003; de Saint Blanquat et al. 2010; Liu et al. 2014; see Curtis and Lee 2010 for a review). However, there is still debate about the role of the mPFC in working memory, some arguing that, rather than being involved in the

short-term maintenance of information, its function is in fact to continuously monitor behavioral outcomes (Gisquet-Verrier and Delatour 2006; Horst and Laubach 2012).

As said above, if the role of the mPFC in working memory has been demonstrated, very few is known about the subcortical circuits subserving such function. The lateral habenula (lHb) appears like a plausible subcortical actor as it receives afferents from the mPFC, including the PrL region, as shown in monkeys (Cavada et al. 2000; Chiba et al. 2001) and rats (Vertes 2006; Kim and Lee 2012). Importantly, it has recently been implicated in spatial working memory through cholinergic mechanisms (Sanders et al. 2010), and in other mPFC-dependent executive functions such as subjective decision making (Stopper and Floresco 2013) and flexibility (Baker et al. 2015, 2016). Also, the lHb represents a main input to mesencephalic dopaminergic regions (Omelchenko et al. 2009) and modulates the activity of the dopaminergic system (Matsumoto and Hikosaka 2007; Lecourtier et al. 2008; Lammel et al. 2012; Stopper et al. 2014). This is particularly relevant as dopamine is crucially involved in working memory (Clark and Noudoost 2014; Arnsten et al. 2015). Finally, we have recently shown the implication of the lHb in encoding and retrieval of spatial information, but not in its consolidation (Mathis et al. 2015), suggesting its key role in online information processing, one of the key aspects of working memory performance.

Based on the above-described literature, we postulated that the lHb was involved in working memory and that one of its possible roles was to relay top-down mPFC information for adjusting behavior to previously acquired information. We therefore investigated in rats the role of the lHb and of the mPFC/PrL-lHb pathway in working memory, using reversible

inactivations through microinfusions of the GABA_A agonist muscimol within the lHb or the mPFC/PrL. The role of the mPFC/PrL-lHb pathway was investigated using a disconnection procedure consisting in the inactivation of the mPFC/PrL in one hemisphere combined to the inactivation of the contralateral lHb (Fig. 1E). Such a procedure enables to explore the role of a specific pathway connecting 2 structures (see for example Chudasama et al. 2003 and Floresco and Ghods-Sharifi 2006). To tax spatial working memory, we used an operant delayed non-matching to position (DNMTP) paradigm (Fig. 1A,B) (adapted from McAlonan et al. 1995 and Warburton et al. 1997). By essence, working memory is transient so that maintained information will be operational on a given trial but not subsequently (Dudchenko 2004). In rodents, a classical way to challenge working memory is to increase the delay between the presentation and the recall of information, with a paradigm such as the DNMTP test used in the current study.

Materials and Methods

Animals

The study was performed with 15 male Long-Evans rats (Janvier Labs). They weighted 220–230 g (2 months old) at their arrival at the laboratory and were 4 months old at the end of the study. They were singly-housed with ad libitum access to food and water and given 7 days to acclimatize to the laboratory in a room with a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 AM) before being habituated to being handled by the experimenter for a week. Food restriction was then started so that the rats' body weight was progressively reduced to approximately 90% of its

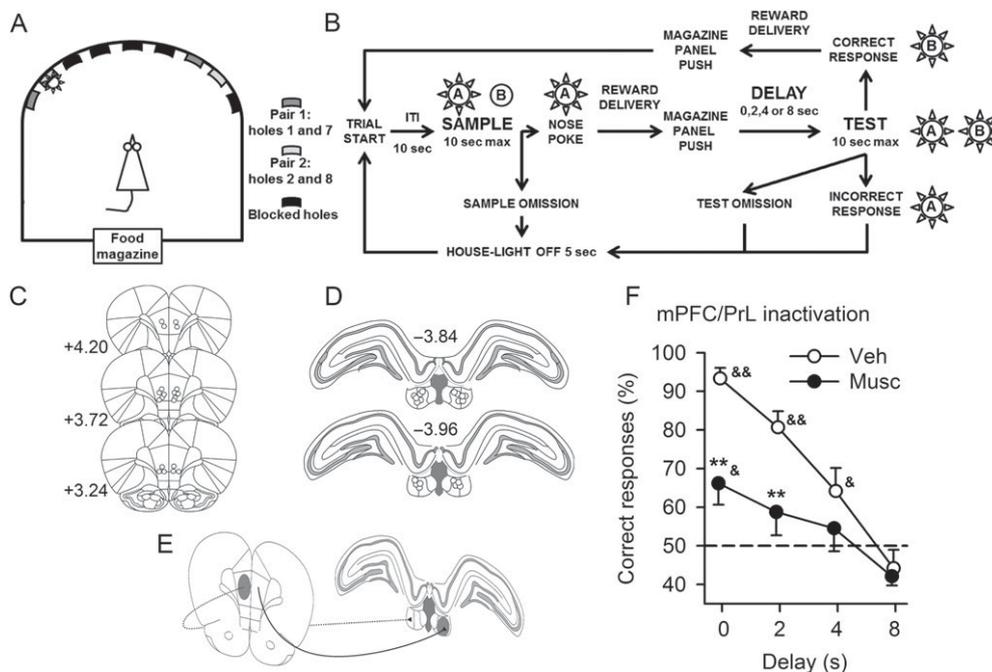


Figure 1. (A) Schematic representation of the apparatus. (B) Schematic representation of the DNMTP paradigm. Representation of infusion sites ($n = 10$; white circles) within the mPFC (C) and the lHb (D); numbers indicate anteroposterior coordinates in mm from Bregma. (E) Schematic representation of the mPFC/PrL-lHb disconnection. In one hemisphere (here the right) the lHb cannot receive information from the inactivated mPFC/PrL, whereas in the other hemisphere (here the left) the mPFC/PrL cannot send information to the inactivated lHb, resulting in a massive decrease of information transfer between the 2 structures. Dark-gray ovals arbitrarily portray the extent of the inactivation whereas dark-gray lines represent intact (continuous) or altered (dashed) mPFC/PrL information flow. (F) Intact mPFC/PrL functions are required for efficient performance of the DNMTP paradigm as mPFC/PrL inactivation induced marked impairments. Results are represented as mean (\pm SEM) percentage of correct responses during the test phase according to the different delays. ** $P < 0.01$ versus Veh; $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$ versus chance (dashed line).

free-feeding value. During the course of the study, the amount of food given to the rats was continuously adjusted in order to follow their natural weight-gain curve. Testing was conducted in compliance with the European Committee Council Directive (2010/63/UE). This study has been approved by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” (reference APAFIS 201).

Apparatus

Six chambers (Bioseb) placed in sound-attenuated and ventilated enclosures were used. Each chamber consisted of an aluminium enclosure (252 [W] × 280 [D] × 240 [H] mm) illuminated by a house-light located on the ceiling. Each chamber comprised 1 curved wall with 9 nose-poke holes, 2 cm above floor level. Each hole was equipped with an infrared photocell beam to detect nose-pokes and could be illuminated for an adjustable duration by a lamp located at the rear of the hole. Food pellets (45 mg, TSE Systems) were delivered automatically into a magazine located at the opposite side of the chamber and equidistant from each hole. Rats collected the food pellets by pushing a Perspex panel covering the magazine. Each chamber was automatically controlled by Packwin software (Panlab S.P., Cornella) and data were collected via a computer.

DNMTP Task

Rats were initially given access to food pellets in their home cage (10 pellets per day during 3 consecutive days) to familiarize them with the future reinforcer. Each rat was placed in the same chamber throughout the experiment and testing always occurred between 09:00 and 12:00 AM. In a first training phase, rats were placed in their chamber for 15 min with the house-light off and the panel of the magazine removed to maintain the food magazine open. This magazine was filled with 15 food pellets. In a second phase, rats received food magazine training sessions (20 min per session) in which 20 food pellets were delivered according to a variable time schedule (mean: 60 s). The house-light was turned on during this phase. On the first session, the panel of the magazine was removed. For all other sessions, rats needed to push away the panel in front of the food magazine to retrieve the food pellets. During these 2 phases, each hole was blocked by a metal cover. In the third phase, the central hole was accessible and illuminated for the whole duration of the session (maximum duration 30 min). Every time the rat made a response (nose-poke) toward the illuminated hole, a food pellet was delivered in the magazine. This training was continued until the rats made 50 nose-pokes in a session.

Then, rats were trained in the DNMTP task. The task was based on a modified version of those performed in similar 9-hole operant chambers (e.g., McAlonan et al. 1995; Warburton et al. 1997). Among the 9 holes, 2 pairs were selected, holes 1 and 7 (pair 1) and holes 2 and 8 (pair 2), all other holes remaining blocked by metal caps during the whole study. Rats received 1 session per day comprising 48 trials. Each trial began (Fig. 1B) with a 10-s interval (intertrial interval [ITI]), after which one hole was illuminated (sample phase). If rats did not respond within 10 s (sample omission), the hole was extinguished and the house-light was turned off for a 5-s period. After this period, the house-light was turned on and the next trial began. A response into the illuminated hole extinguished the sample hole and was rewarded with the delivery of one

food pellet. Rats had to push the panel to collect this pellet and this magazine entry initiated the delay phase. At the termination of the delay, 2 holes were illuminated (including the sample hole) and rats were required to make a response in the other location than that presented in the sample phase (non-matching rule; test phase). A response in the correct hole extinguished the 2 holes and was rewarded, and the next trial began. Response in the wrong hole (incorrect response) or failure to respond during the test phase (10 s; test omission) were followed by a period of darkness (5 s). After this period, the house-light was turned on and the next trial began. Rats were first trained with no delay between the sample and the testing phase. After 3 consecutive days with at least 80% of correct response, the delays were introduced. Rats were trained with the version of the task including delays until they reached stable performances (i.e., 3 consecutive sessions with no significant between-session differences). Four delays were used between the sample phase and the test phase: 0, 2, 4, and 8 s. Among the 48 trials, an equal number of 4 different trials was randomly presented, that is, sample cue in hole 1 or 7 or 2 or 8 and correct response in hole 7 (among 7 and 1) or 1 (among 7 and 1) or 8 (among 8 and 2) or 2 (among 8 and 2) during the test phase, respectively. Therefore, each one of the 4 combinations was presented 12 times, 3 at each delay. An efficient way to successfully perform the task was to, once used to complete a given trial, disregard the information concerning the previous trial; this indeed represented the best way to avoid interferences and perform at a good level during the task. To diminish the effects of the previous trial (proactive interference) and to reduce the attentional load of the task, long ITI and stimulus duration (10 s each) were chosen. With the paradigm used in the present study, the use of a mediating strategy to respond correctly (such as position strategy or body orientation, see for example Chudasama and Muir 1997) was limited by the fact that, after the sample phase, rats were required to turn away and press the magazine panel on the opposite side of the chamber before turning again to face the holes. The following variables were scored and analyzed for each session: the number of sample omissions; the latency to collect the food pellets during the sample phase; at each delay, the number of correct and incorrect responses and the latencies to respond for both correct and incorrect responses. The percentage of correct responses was calculated at each delay as follows: number of correct responses/number of correct and incorrect responses × 100.

Surgical Procedures

When rats had reached steady performance, as described above, they were put back to an ad libitum food regimen for 4 days before being subjected to surgery. Rats were anesthetized by an intraperitoneal administration of a mixture of ketamine (82.5 mg/kg) and xylazine (11 mg/kg) and placed within a stereotaxic apparatus (flat skull). Lidocaine (0.1 mL, subcutaneously) was injected at the incision location. Once the holes were drilled, rats were bilaterally implanted with stainless-steel 26-gauge guide cannulae 1 mm above the lHb (anteroposterior [AP], −3.9 mm from Bregma; mediolateral [ML], ±0.7 mm; dorsoventral [DV], −3.6 mm from dura) and 1 mm above the mPFC/PrL (AP, +3.3 mm from Bregma; ML, ±0.7 mm; DV, −2.2 mm from dura). Guides, in which 29-gauge dummy cannulae were inserted, were secured to the skull and 4 stainless-steel screws with dental cement. Rats were administered an antibiotic (amoxicilline, intramuscularly), a painkiller (meloxicam,

subcutaneously), and given a 10-day recovery period. Following this recovery period, rats were put back under food restriction and after 2 days they were retrained until stable performances were reached.

Drug and Microinfusion Procedures

The GABA_A agonist muscimol was dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) (in mM: NaCl, 145; KCl, 2.7; MgCl₂, 1.0; CaCl₂, 1.2) to a concentration of 0.08 µg/µL. The volumes microinfused were as follows: LHb, 0.2 µL per side; mPFC/PrL, 0.4 µL/side. Control treatments consisted in the microinfusion of the same volume of aCSF (vehicle condition). Therefore, the total amount of muscimol infused was 16 and 32 ng per side within the LHb and the mPFC/PrL, respectively (those doses were used according to previous studies from the laboratory; LHb, Mathis et al. 2015; PrL, Cholvin et al. 2013). Rats were first habituated to being manipulated. They were microinfused either treatment within the LHb (over 60 s, 0.2 µL/min) and/or the mPFC/PrL (over 80 s, 0.3 µL/min). Once the microinfusion terminated, the infusion cannulae were left in place for an additional 30 s before being removed and the dummy cannulae were reinserted. Testing started 30 min after the microinfusion. The introduction of such a delay, allowed by the long duration of action of muscimol (at least 2 h; see for example Arikan et al. 2002 and Edeline et al. 2002) was chosen in order to avoid any detrimental effect of a possible stress consecutive to the microinjection procedure.

Rats performed all the experiments, which were conducted in the following order: 1) mPFC/PrL inactivation; 2) LHb inactivation; 3) mPFC/PrL-LHb disconnection; 4) unilateral mPFC/PrL inactivation; 5) unilateral LHb inactivation and 6) ipsilateral mPFC/PrL-LHb inactivation. For all experiments, we used a within-subject design as follows: following 2 days of treatment-free testing with steady baseline performances, half of the rats received muscimol, while the other half received vehicle as the control condition (the 2 treatment groups were composed so that there were no statistical differences in terms of percentage of correct responses at each delay during the 2 preceding treatment-free testing days; data not shown); on the next 2 days, rats were again tested treatment-free, and on the following day they underwent the second treatment session while treatments were counterbalanced. To minimize the number of microinfusions in each structure, the side of infusion was counterbalanced, when possible, between the 2 treatment sessions. Thus, during the mPFC/PrL-LHb disconnection experiments, if rats received vehicle in the right mPFC/PrL and left LHb, they received muscimol in the left mPFC/PrL and right LHb, and reciprocally. Similarly, during the experiments addressing the effects of unilateral LHb or mPFC/PrL inactivation, and ipsilateral inactivation, rats received vehicle in one hemisphere and muscimol in the other. Such protocol allowed to reliably test our animals with identical baseline performance throughout the whole study (Supplementary Figs 4 and 5).

Histology

Following the last experiment, rats underwent a bilateral microinfusion of an Evans blue-containing muscimol solution in the LHb and the mPFC/PrL (see Supplementary Material). Following intracardiac perfusion of phosphate-buffered saline (PBS, 0.1 M) and then 4% paraformaldehyde-PBS solution (4 °C), brains were removed, postfixed in the same fixative (pH 7.4; 4 °C, 2 h), transferred into a 20% sucrose-PBS solution (4 °C, 48 h) and

subsequently frozen. Serial 40-µm-thick sections were cut in the coronal plane at -22 °C and collected on gelatin-coated slides. Only rats showing Evans blue restricted to both targeted structures were kept ($n = 10$; Fig. 1C,D and Supplementary Fig. 2). The remaining 5 rats had injection sites located ventrally to the LHb, within the thalamic region; they were included in a “thalamus” control group (see Supplementary Fig. 3).

Data Analyses

All data are presented as mean + and/or - SEM. When possible, individual performances are shown, represented by white circles; because of partial or complete overlap, the number of circles visible can be smaller than the total number of rats. All analyses were performed with the Statistica software package (StatSoft Inc - Dell, Tulsa, OK, USA, v12). For each experiment, memory performances (percentage of correct responses) were analyzed by means of 2-way ANOVAs with delay (4 levels) and treatment (2 levels) as the repeated measures. The number of sample omissions and the latencies were analyzed by means of paired *t*-test. The reliability and strength of the within-subject design of our study was tested, first, by comparing the performances of rats under vehicle of all experiments using a 2-way ANOVA with delay (4 levels) and experiments (6 levels) as the repeated measures and, second, by comparing, for each experiment, the performances during the control condition (vehicle) with those during the treatment-free session preceding the first treatment session and the treatment-free session preceding the second treatment session by means of 2-way ANOVAs with delay (4 levels) and session (3 levels) as the repeated measures (see Supplementary Material). Multiple comparisons (Fisher LSD) were performed, even in the absence of a significant interaction when the figure suggested possible differences, as advocated by Howell (1992). At each delay, the percentage of correct responses was compared with chance level (50%) using *t*-tests. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Intact mPFC/PrL Functions Are Required for Efficient Performance of the DNMTTP Paradigm

mPFC/PrL inactivation induced marked impairments as shown by a significant effect of treatment ($F_{1,9} = 16.71, P < 0.01$) and delay ($F_{3,27} = 33.54, P < 0.001$) with no significant treatment \times delay interaction despite a tendency ($F_{3,27} = 2.66, P = 0.067$) (Fig. 1F; see also Supplementary Fig. 6A). Post hoc analyses showed that muscimol decreased performance at the 0-s and 2-s delays ($P < 0.01$ vs. vehicle for each comparison). Performances under vehicle remained above chance level at the 0-s ($t_9 = 15.92, P < 0.01$), 2-s ($t_9 = 7.28, P < 0.01$), and 4-s ($t_9 = 2.37, P < 0.05$) delays, whereas those under muscimol remained above chance level only at the 0-s delay ($t_9 = 2.94, P < 0.01$). mPFC/PrL inactivation did not alter the number of omission to sample cues (Table 1).

LHb Inactivation and mPFC/PrL-LHb Disconnection Impaired Working Memory

LHb inactivation impaired working memory as shown by a significant effect of treatment ($F_{1,9} = 8.11, P < 0.05$; Fig. 2A; see also Supplementary Fig. 6B) and delay ($F_{3,27} = 29.57, P < 0.001$), with no significant treatment \times delay interaction ($F_{3,27} = 0.86, n.s.$). Post hoc analyses showed that muscimol decreased performance at the 2-s ($P < 0.05$ vs. vehicle) delay whereas there was a

tendency for a decrease at the 4-s delay ($P = 0.06$). Performances under vehicle remained above chance at the 0-s ($t_9 = 13.37$, $P < 0.01$), 2-s ($t_9 = 5.26$, $P < 0.01$), and 4-s ($t_9 = 2.76$, $P < 0.05$) delays, whereas those under muscimol remained above chance level at the 0-s ($t_9 = 6.23$, $P < 0.01$) and 2-s ($t_9 = 2.68$, $P < 0.05$) delays. lHb inactivation did not increase the number of omissions to sample cues (Table 1). mPFC/PrL-lHb

Table 1 Mean (SEM) number of sample omissions over 48 trials following vehicle and inactivation

	Vehicle	Muscimol	t	P
mPFC/PrL inactivation	0.5 (0.27)	0.6 (0.22)	0.24	n.s.
lHb inactivation	0.9 (0.41)	1.9 (0.48)	1.5	n.s.
mPFC/PrL-lHb disconnection	0.4 (0.26)	0.6 (0.30)	0.43	n.s.
Unilateral mPFC/PrL inactivation	0.5 (0.22)	0.7 (0.21)	0.61	n.s.
Unilateral lHb inactivation	0.7 (0.26)	0.8 (0.25)	0.36	n.s.
Ipsilateral mPFC/PrL-lHb inactivation	0.7 (0.26)	1.2 (0.53)	1.00	n.s.

Note: n.s., not significant.

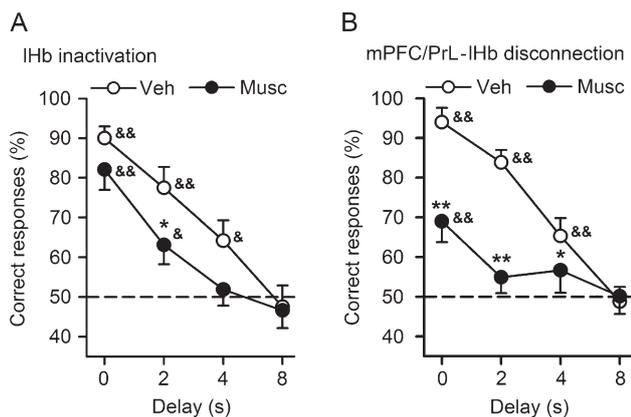


Figure 2. lHb inactivation (A) and mPFC/PrL-lHb disconnection (B) impair working memory. Results are presented as percentage (mean \pm SEM) of correct responses during the test phase according to the different delays. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ versus Veh, && $P < 0.01$, & $P < 0.05$ versus chance (dashed line).

disconnection markedly reduced the temporal capacity to store relevant information as shown by a significant effect of treatment ($F_{1,9} = 9.16$, $P < 0.05$) and delay ($F_{3,27} = 13.78$, $P < 0.001$) and a significant treatment \times delay interaction ($F_{3,27} = 11.28$, $P < 0.001$) (Fig. 2B; see also Supplementary Fig. 6C). Muscimol decreased performance at the 0-s ($P < 0.001$ vs. vehicle), 2-s ($P < 0.001$ vs. vehicle) as well as the 4-s ($P < 0.05$ vs. vehicle) delays. Under vehicle rats performed above chance level at the 0-s ($t_9 = 12.29$, $P < 0.01$), 2-s ($t_9 = 6.15$, $P < 0.001$), and 4-s ($t_9 = 3.43$, $P < 0.01$) delays, whereas under muscimol only at the 0-s ($t_9 = 3.63$, $P < 0.01$) delay. mPFC/PrL-lHb disconnection did not impact on the number of omissions to sample cues (Table 1).

Consequences of Unilateral mPFC/PrL, Unilateral lHb, and Ipsilateral mPFC/PrL-lHb Inactivations

It is important, when using a disconnection design, to investigate the consequences of the unilateral inactivation of each region separately, in order to be able to conclude that the deficits resulting from the disconnection cannot be attributable to any of the unilateral inactivation taken separately. Experiments including unilateral inactivations led to a significant effect of treatment (unilateral mPFC/PrL: $F_{1,9} = 21.02$, $P < 0.01$, Fig. 3A; see also Supplementary Fig. 6D; unilateral lHb: $F_{1,9} = 8.16$, $P < 0.05$, Fig. 3B; see also Supplementary Fig. 6E) and delay (unilateral mPFC/PrL: $F_{3,27} = 31.31$, $P < 0.001$; unilateral lHb: $F_{3,27} = 41.03$, $P < 0.001$) with no significant interaction (unilateral mPFC/PrL: $F_{3,27} = 0.76$; unilateral lHb: $F_{3,27} = 3.27$). Following unilateral mPFC/PrL inactivation, such an effect of treatment was explained by the fact that muscimol decreased performance at the 0-s and 2-s delays ($P < 0.05$ vs. vehicle in each case), whereas following unilateral lHb inactivation, muscimol decreased performance at the 2-s delay ($P < 0.01$ vs. vehicle). Noteworthy, performances under vehicle and muscimol treatments remained above chance level at the 0-s (unilateral mPFC/PrL: $t_9 = 8.00$, $P < 0.01$; unilateral lHb: $t_9 = 20.84$, $P < 0.01$), 2-s (unilateral mPFC/PrL: $t_9 = 4.96$, $P < 0.01$; unilateral lHb: $t_9 = 10.80$, $P < 0.01$), and 4-s (unilateral mPFC/PrL: $t_9 = 2.93$, $P < 0.05$; unilateral lHb: $t_9 = 4.36$, $P < 0.05$) delays.

Ipsilateral mPFC/PrL-lHb inactivation led to a significant effect of treatment ($F_{1,9} = 11.12$, $P < 0.01$, Fig. 3C; see also Supplementary Fig. 6F) and delay ($F_{3,27} = 17.51$, $P < 0.001$) with no significant interaction ($F_{3,27} = 0.40$). Such an effect of treatment was explained by muscimol decreasing performance at

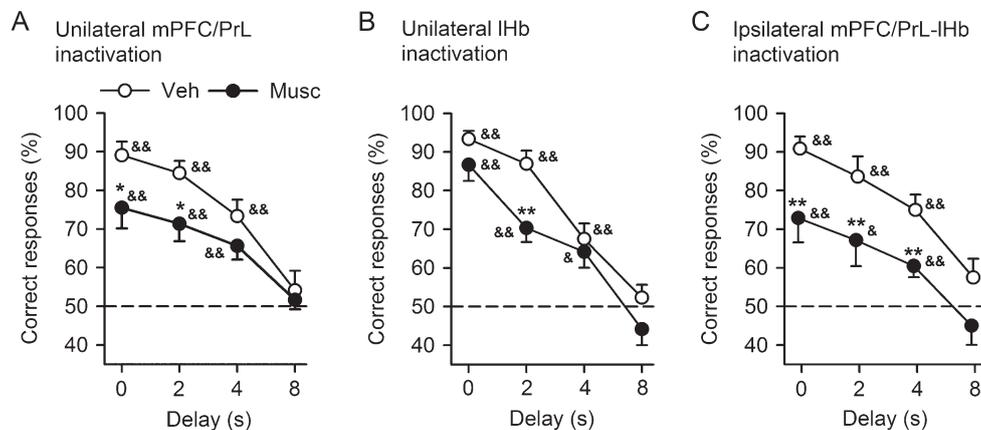


Figure 3. Consequences of unilateral mPFC/PrL (A), unilateral lHb (B), and ipsilateral mPFC/PrL-lHb (C) inactivations. Results are presented as percentage (mean \pm SEM) of correct responses during the test phase according to the different delays. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ versus Veh; && $P < 0.01$, & $P < 0.05$ versus chance (dashed line).

the 0-s ($P < 0.001$ vs. vehicle), 2-s ($P < 0.001$ vs. vehicle), and 4-s ($P < 0.01$ vs. vehicle) delays. Performances differed from chance at all but the 8-s delay under both treatment conditions (at least $P < 0.05$). None of these inactivations impacted on the number of omissions to sample cues (Table 1).

Finally, as said above treatments were counterbalanced between sides during experiments including unilateral or ipsilateral inactivation, so that some rats received muscimol unilaterally in the right or left IHB and mPFC/PrL or ipsilaterally in the right or left hemisphere; when we performed the analysis with side as a factor no significant effect of this factor, and no interaction with the other factors, was found for each experiment.

If impairments were present following unilateral and ipsilateral inactivations, the latter likely representing the cumulative impairments of the unilateral inactivations, it is important to notice that they were not as important as those following mPFC/PrL-IHB disconnection as inactivated rats still were able to perform above chance level at all but the 8-s delay, unlike disconnected rats, revealing preserved working memory capabilities. Comparative analysis of performances under muscimol following both unilateral inactivations and these following mPFC/PrL-IHB disconnection (2-way ANOVA with delay [4 levels] and experiment [3 levels] as the repeated factors) gave a significant effect of delay ($F_{3,27} = 28.73$, $P < 0.001$) and experiment ($F_{2,18} = 4.05$, $P < 0.05$); post hoc analyses showed that performances following each unilateral inactivation were significantly better than those following mPFC/PrL-IHB disconnection ($P < 0.05$ for each comparison) whereas there were no differences between performances following both unilateral inactivations ($P > 0.9$). If the impairments following IHB unilateral inactivation, even given their low magnitude, were quite surprising, those following mPFC/PrL unilateral inactivation were less. It can be seen in Figure 1F that bilateral mPFC/PrL inactivation induced impairments as important as those following mPFC/PrL-IHB disconnection, demonstrating that mPFC/PrL functions are important for the DNMTTP paradigm; the impairments seen following unilateral mPFC/PrL inactivation further suggest that both hemispheres are requested in order to successfully perform a working memory task.

Analyses of Latencies to Collect the Food Pellets and to Respond to the Test Cues

Latencies to collect the food pellets following a response to the sample cues are presented in Table 2 as the mean of all latencies under each treatment condition. There were no statistical differences whatever the experiment. Latencies to respond, either correctly or incorrectly, during the 10 s of test cues

Table 2 Mean (SEM) latencies (s) to collect the pellets after responding to the sample cues, following vehicle and inactivation

	Vehicle	Muscimol	t	P
mPFC/PrL inactivation	1.74 (0.32)	2.94 (0.85)	1.84	n.s.
IHB inactivation	1.54 (0.17)	1.81 (0.32)	1.00	n.s.
mPFC/PrL-IHB disconnection	1.76 (0.35)	1.92 (0.18)	0.39	n.s.
Unilateral mPFC/PrL inactivation	1.61 (0.19)	1.69 (0.24)	0.69	n.s.
Unilateral IHB inactivation	1.44 (0.1)	1.35 (0.07)	0.98	n.s.
Ipsilateral mPFC/PrL-IHB inactivation	1.91 (0.28)	1.99 (0.54)	0.14	n.s.

Note: n.s., not significant.

presentation are shown in Table 3. Latencies were separately analyzed for each delay because some animals did not make either correct or incorrect responses at certain delays and/or under certain treatment conditions, so that it was not possible to perform a 2-way ANOVA with Delay and Treatment as repeated measures. Therefore, the numbers (n) in Table 3 correspond to the number of animals that presented correct or incorrect responses under each treatment condition, so that a comparative analysis could be performed. For each rat, the latency included in the analysis corresponded to the mean of all latencies at a given delay, to make either correct or incorrect response(s). Overall, there was no impact of treatment on the latencies to respond, either correctly or incorrectly, during the test session. The only exception was found during the mPFC/PrL inactivation experiment when muscimol increased latencies to make correct responses at the 0-s and 4-s delays. Also, one can notice in Table 3 that latencies at the 0-s delay were overall longer than those at the longer delays (as already described in a similar paradigm, see Chudasama and Muir 1997; analyses not shown). A plausible explanation for such a fact is that, because the delay was started as soon as rats pushed the magazine panel to collect the reward after they responded to the sample cue (see Fig. 1B), in the case of the 0-s delay the test cues were lit immediately; therefore, the increased latencies likely represent the time taken by the rats to consume the pellet and turn back to face the holes before responding to the test cues. According to the other delays, as the test cues were lit 2, 4, or 8 s later, latencies were shorter likely because rats were already attending to the cues—or had already started to turn back to face the holes—after having searched for and consumed the pellet delivered during the sample phase.

Discussion

The major findings of the present study are that IHB inactivation as well as mPFC/PrL-IHB disconnection disrupted working memory, suggesting the yet unsuspected importance of the IHB and of the mPFC/PrL-IHB pathway in the short-term maintenance of spatial information. Importantly, such deficits were unlikely to reflect motor, motivational, or attentional alterations as muscimol did not impact on parameters such as the number of omissions to the sample cues, and the latencies to collect the food pellets or to respond to the test cues. The deficits were also unlikely to result from a spread of muscimol within surrounding regions (see Supplementary Material).

The DNMTTP Paradigm Depends on the Appropriate Functioning of the mPFC/PrL

The marked deficits following mPFC/PrL inactivation strengthen the view that the rodent mPFC/PrL, which is presented as sharing homologies with the dlPFC of humans or primates (see review Uylings et al. 2003), plays an important role during the short-term storage of information. This result is consistent with the presence of working memory-related cellular activity in the mPFC (e.g., Baeg et al. 2003), as well as the occurrence of working memory deficits in spatial paradigms following its inactivation in rodents (Izaki et al. 2001; Wang and Cai 2006; Horst and Laubach 2009) (see also lesion of the dlPF in monkeys: Funahashi et al. 1993). Importantly, mPFC/PrL inactivation seems to have preserved the memory of task rules as performances remained above chance at the 0-s delay,

Table 3 Mean (SEM) latencies (s) to correctly (left) or incorrectly (right) respond to the test cues, at the different delays, following vehicle and inactivation

	Correct responses					Incorrect responses				
	Vehicle	Muscimol	t	P	n	Vehicle	Muscimol	t	P	n
mPFC/PrL inactivation										
0 s	2.34 (0.18)	3.31 (0.40)*	2.87	0.02	10	2.75 (0.45)	2.79 (0.47)	0.06	n.s.	6
2 s	1.12 (0.10)	1.70 (0.28)	1.74	n.s.	10	1.31 (0.23)	1.45 (0.26)	0.34	n.s.	8
4 s	1.04 (0.12)	1.48 (0.17)*	2.45	0.04	10	1.04 (0.19)	1.19 (0.11)	1.88	n.s.	10
8 s	0.96 (0.11)	1.35 (0.24)	1.62	n.s.	10	1.33 (0.23)	0.94 (0.09)	-1.61	n.s.	10
lHb inactivation										
0 s	2.55 (0.23)	2.64 (0.37)	0.36	n.s.	10	2.51 (0.43)	3.3 (0.83)	0.79	n.s.	4
2 s	1.23 (0.17)	1.39 (0.19)	0.89	n.s.	10	1.45 (0.19)	1.20 (0.21)	-1.03	n.s.	8
4 s	1.57 (0.27)	1.61 (0.25)	0.08	n.s.	10	1.26 (0.18)	1.33 (0.07)	0.37	n.s.	10
8 s	1.42 (0.24)	1.54 (0.21)	0.43	n.s.	10	1.17 (0.14)	1.30 (0.18)	0.65	n.s.	10
mPFC/PrL-lHb disconnection										
0 s	2.42 (0.30)	2.80 (0.25)	1.57	n.s.	10	2.48 (0.94)	2.52 (0.25)	0.044	n.s.	4
2 s	1.16 (0.17)	1.38 (0.19)	1.41	n.s.	10	0.87 (0.14)	1.41 (0.36)	1.30	n.s.	6
4 s	1.17 (0.14)	1.62 (0.20)	1.66	n.s.	10	1.26 (0.11)	1.42 (0.29)	0.51	n.s.	10
8 s	0.92 (0.08)	1.37 (0.21)	2.07	n.s.	10	0.92 (0.06)	1.34 (0.21)	2.09	n.s.	10
Unilateral mPFC/PrL inactivation										
0 s	2.13 (0.22)	2.66 (0.31)	1.92	n.s.	10	3.07 (0.53)	2.30 (0.40)	-1.16	n.s.	6
2 s	0.99 (0.09)	1.42 (0.25)	1.64	n.s.	10	2.69 (1.07)	2.02 (0.63)	-0.41	n.s.	4
4 s	0.96 (0.21)	1.18 (0.18)	0.66	n.s.	10	1.30 (0.21)	1.62 (0.36)	1.20	n.s.	8
8 s	1.07 (0.13)	1.22 (0.20)	1.21	n.s.	10	0.89 (0.12)	1.23 (0.16)	1.95	n.s.	10
Unilateral lHb inactivation										
0 s	2.34 (0.23)	2.51 (0.20)	1.53	n.s.	10	3.43 (0.85)	3.13 (0.58)	-0.46	n.s.	7
2 s	1.08 (0.06)	1.42 (0.26)	1.19	n.s.	10	1.20 (0.24)	1.99 (0.52)	1.14	n.s.	8
4 s	0.93 (0.07)	1.09 (0.11)	1.28	n.s.	9	1.12 (0.1)	1.54 (0.23)	1.91	n.s.	10
8 s	1.08 (0.17)	1.21 (0.25)	0.44	n.s.	10	0.95 (0.08)	1.12 (0.08)	1.48	n.s.	10
Ipsilateral mPFC/PrL-lHb inactivation										
0 s	2.49 (0.24)	3.04 (0.32)	2.03	n.s.	10	2.53 (0.30)	3.23 (0.40)	1.95	n.s.	6
2 s	1.06 (0.12)	1.47 (0.28)	1.40	n.s.	10	1.49 (0.56)	1.44 (0.23)	-0.07	n.s.	9
4 s	0.94 (0.09)	1.33 (0.19)	1.68	n.s.	10	1.05 (0.08)	1.31 (0.14)	1.48	n.s.	10
8 s	0.97 (0.12)	1.39 (0.22)	1.57	n.s.	10	0.76 (0.05)	1.72 (0.33)*	3.14	0.01	10

Note: n.s., not significant.

suggesting that only the working memory aspect of the task was altered following mPFC/PrL inactivation.

The lHb is Involved in Working Memory

The deficits resulting from lHb inactivation confirm its involvement in spatial working memory (Sanders et al. 2010). Importantly, these deficits occurred without obvious alteration of the motivation to search for the reward, a finding similar to previous demonstration that lHb inactivation does not prevent rats from being engaged in the search of a reward (Stopper and Floresco 2013).

It could be argued that, given the well-known role of the lHb in the coding of negative motivational signals (Matsumoto and Hikosaka 2009; Hikosaka 2010), the deficits occurred because rats became insensitive to negative outcomes, that is, the absence of the reward in the case they made an incorrect choice. We believe that this is unlikely because in that case we would have seen, if not a disinterest for the task, at least the occurrence of random choices, so that performances would not be different from chance at all the delays. This is clearly not what happened as performances following lHb inactivation remained above chance level at the 2 first delays (see Fig. 2A). Therefore, although rats made a certain amount of errors, each resulting in the absence of reward, they still were able to adjust their behavior. Also, our paradigm included 2 phases, the first

one (sample phase) being to respond to a single cue in order to initiate the test phase; as this sample phase was also rewarded, it is likely that insensitivity to negative outcome would result in an important increase in the number of omissions. This was not the case as there were no statistical differences in terms of sample omissions between the vehicle and muscimol treatments (see Table 1).

Interestingly, we have recently shown using a water maze paradigm taxing spatial reference memory that the lHb was involved in encoding and retrieval, but not consolidation, of spatial information (Mathis et al. 2015), suggesting its particular involvement in online, as opposed to offline, information processing. Such hypothesis appears strengthened by the present results. One plausible assumption when considering such a cognitive paradigm is that the lHb is involved in working memory through its connection with the dopaminergic system; this is consistent with the well-documented role of dopamine in working memory, especially at the level of the mPFC and the basal ganglia (Murty et al. 2011; Arnsten et al. 2015; Xing et al. 2016). Indeed, the lHb sends direct projections to the ventral tegmental area (VTA) as well as to the GABAergic rostromedial tegmental nucleus, which is a source of inhibitory inputs to VTA dopamine neurons (Omelchenko et al. 2009; Bernard and Veh 2012; Gonçalves et al. 2012; Lecca et al. 2012; Quina et al. 2015). Further, the lHb modulates the activity of dopamine neurons (Ji and Shepard 2007; Matsumoto and Hikosaka 2007;

Lecourtier et al. 2008; Lammel et al. 2012; Stopper et al. 2014), as well as cortical dopamine release (Lecourtier et al. 2008). One can postulate that the lHb, by a fine balance of direct excitation/indirect inhibition, participates in the regulation of dopamine release in the mPFC upon task demand. The lHb could also participate in the tuning of dopamine release toward basal ganglia where dopamine has been shown to act during working memory paradigms (Clatworthy et al. 2009; Landau et al. 2009).

However, other neurotransmitters such as noradrenaline (Ramos and Arnsten 2007) are involved in working memory. Although there is yet no known direct projection from the lHb to the locus coeruleus, the lHb modulates noradrenalin release, including in the mPFC (Cenci et al. 1992). Therefore, it is also possible that the lHb is involved in working memory by finely balancing noradrenaline, in addition to dopamine, in the mPFC (Xing et al. 2016).

Anatomically, besides the mPFC, both the dorsal (Yoon et al. 2008) and intermediate-to-ventral (Floresco et al. 1997; Izaki et al. 2001; Wang and Cai 2006; Spellman et al. 2015) parts of the hippocampus are involved in spatial working memory. Interestingly, we (Goutagny et al. 2013) and others (Aizawa et al. 2013) have shown that the lHb likely communicates with the hippocampus as both structures show coherent oscillatory activities at theta frequency; therefore, it is possible that the lHb participates in working memory processing also by interacting with the hippocampus to process information related to the spatial location of the cues. Finally, the lHb projects to the reuniens nucleus (McKenna and Vertes 2004) whose role in working memory has been demonstrated (Layfield et al. 2015), so that the role of the lHb in working memory might be to modulate thalamic, in addition to mPFC and basal ganglia functions.

Involvement of the mPFC/PrL-lHb Pathway in Working Memory

To address the involvement of the mPFC/PrL-lHb pathway in working memory, we pharmacologically disconnected these 2 structures. Such method allowed to efficiently alter the direct flow of information from the mPFC/PrL to the lHb, at least ipsilaterally, as there remained sparse projections from the mPFC/PrL to the contralateral lHb (Kim and Lee 2012 and see Supplementary Material). The striking finding of the present study is that not only the mPFC/PrL-lHb disconnection induced working memory deficits, but that the latter were of the same magnitude as those following bilateral mPFC/PrL inactivation, revealing the importance of such mPFC/PrL-lHb pathway for working memory performance. Such deficits could not be accounted for by inactivation of the structures taken separately as their unilateral inactivation—as well as the combined ipsilateral inactivation of the mPFC/PrL and the lHb—led to only marginal deficits. These results strongly suggest that during a working memory task the lHb represents a relay of mPFC/PrL information, revealing an unsuspected route for top-down cortical information. Considering that the mPFC is involved in the spatial representation of information during delayed response tasks taxing working memory (Funahashi 2013), a role for the lHb could be to relay mPFC information related to such function, as a previous study from our laboratory suggested that the lHb was particularly involved in the online processing of spatial information.

Such information, as suggested above, might be transmitted to catecholaminergic and/or thalamic structures more particularly needed for efficient short-term storage of information.

It would be interesting, by performing multiple recordings, to assess whether the lHb is included in the network, comprising the mPFC and the VTA, which is synchronized at 4 Hz, suggesting a high level of communication between those structures, during a working memory paradigm (Fujisawa and Buzsáki 2011). However, the need for the mPFC/PrL to use the lHb as a relay toward mesencephalic dopamine neurons could be questioned as mPFC neurons form synapses onto VTA dopamine neurons, including those which project back to the mPFC (Carr and Sesack 2000), suggesting that the mPFC could directly modulate the dopamine system during a working memory task. As previously discussed (e.g., Geisler and Trimble 2008; Hikosaka 2010), the lHb is a node of inputs from both the limbic system and the basal ganglia, and is viewed as an integrative center of numerous cortical information (Geisler and Trimble 2008). The lHb is involved in the coding of the motivational valence of sensory inputs (Matsumoto and Hikosaka 2009) and of reward-prediction error (Bromberg-Martin and Hikosaka 2011) as well as in the anticipation of reward (Bromberg-Martin et al. 2010), mainly by relaying information from the basal ganglia toward the dopamine system. Interestingly, D'Ardenne et al. (2012) have postulated that the role of dopamine in working memory was to concomitantly provide prediction error and gating signals to the mPFC in order to update representations of task context. Although the influence of all these processes has not been systematically tested in DNMTTP paradigms, they are certainly useful to efficiently conduct such a task. For us it is in that respect the lHb appears like a useful integrator of information coming from the mPFC/PrL, but also from the basal ganglia, to participate, once those information are all computed, to the selection of the most adapted behavioral strategy.

Finally, impairments resulting from a disconnection procedure involving 2 structures sharing unidirectional projection are generally attributed to the alteration of this direct pathway; however, the possibility that such deficits were the consequence of the disturbance of a di-synaptic pathway cannot totally be ruled out. This would involve one structure being intercalated between the mPFC/PrL and the lHb and transmitting mPFC/PrL information to the lHb. Such structure(s) could be the ventral pallidum (VP) and/or the nucleus accumbens (NAc), both of which project to the lHb and are involved in working memory (VP: Floresco et al. 1999; Zhang et al. 2005; NAc: Seamans and Phillips 1994).

mPFC/PrL Inactivation and mPFC/PrL-lHb Disconnection Induce Deficits as Early as the 0-s Delay

Noteworthy, deficits following both mPFC/PrL inactivation and mPFC/PrL-lHb disconnection occurred as early as at the 0-s delay, when the memory load is minimal—but still present—, although performances remained above chance at this delay. This deficit could reflect disturbances including non-mnemonic processes such as discussed elsewhere (Dunnett 1985; Chudasama and Muir 1997) and suggest that the mPFC/PrL-lHb pathway is involved in more complex processes than simply working memory. The possibility of non-mnemonic disturbances appears particularly relevant considering the involvement of the mPFC in executive functions in general, which include attention, the representation of goals, behavioral inhibition, planning, or decision making (Dalley et al. 2004; Robbins and Arnsten 2009; D'Esposito and Postle 2015). However, such a global alteration of executive functions seems unlikely in our study as under muscimol rats were engaged in the task and responded to the cues such as they did under vehicle

treatment. Although we have not properly assessed attentional capacities such as others using a different task (Chudasama and Robbins 2004), one possibility is the occurrence of deficits of attention that could have been overcome by the long duration of cues presentation (10 s). However, the fact that not only the number of omissions was not increased under muscimol, but that within the 10 s of test cues presentation, rats responded as fast as under vehicle (in both experiments around 3 s at the 0-s delay and in less than 2 s at the other delays, see Table 2) makes unlikely the presence of attention deficits.

The lHb, and to a larger extent the habenular complex, is an evolutionary conserved structure. Nonetheless, through evolution, while the habenular complex seems in mammals to have lost some features such as asymmetry (Concha and Wilson 2001; Amo et al. 2010), it seems to have acquired a certain degree of complexity, with the presence, at least in rodents, of several distinct subnuclei (Geisler et al. 2003; Andres et al. 1999). Further, Díaz et al. (2011) have noticed that in humans not only the size of the stria medullaris, which is the bundle carrying afferent fibers to the habenular complex, but also the size of the lHb itself had increased, in comparison with lower vertebrates; the authors suggest that this is due, throughout evolution, to the increase in size of habenular complex afferent structures such as the basal ganglia, and also most certainly the PFC, strengthening the view that in mammals the lHb has become a hub for basal ganglia and cortical information. Although most of the studies addressing the role of the lHb in brain functions have focused on its integration of basal ganglia inputs (Hikosaka 2010), the deficits found in the present study following mPFC/PrL-lHb disconnection represent a first behavioral evidence that the lHb is also a relay of cortical information—as previously suggested (Geisler and Trimble 2008) and subserve PFC-dependent memory processes. Such finding opens new perspectives for the understanding of high cognitive functions and top-down cortical control; they also might help better understand pathologies such as depression, schizophrenia, drug addiction, and fronto-temporal dementia, which all include deficits of PFC-related cognitive functions and comprise alterations of the lHb (Aizawa et al. 2013; Lecca et al. 2014; Proulx et al. 2014; Bocchetta et al. 2015; Bernstein et al. 2016).

Supplementary Material

Supplementary material can be found at <http://www.cercor.oxfordjournals.org/>.

Funding

The Centre National de la Recherche Scientifique; the University of Strasbourg; and the French Government (PhD fellowship to V.M.).

Notes

The authors wish to thank Dr Romain Goutagny for the gift of CTB. *Conflict of Interest:* None declared.

References

Aizawa H, Yanagihara S, Kobayashi M, Niisato K, Takekawa T, Harukuni R, McHugh TJ, Fukai T, Isomura Y, Okamoto H. 2013. The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. *J Neurosci.* 33:8909–8921.

Amo R, Aizawa H, Takahoko M, Kobayashi M, Takahashi R, Aoki T, Okamoto H. 2010. Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. *J Neurosci.* 30:1566–1574.

Andres KH, von Düring M, Veh RW. 1999. Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J Comp Neurol.* 407:130–150.

Arikan R, Blake NM, Erinjeri JP, Woolsey TA, Giraud L, Highstein SM. 2002. A method to measure the effective spread of focally injected muscimol into the central nervous system with electrophysiology and light microscopy. *J Neurosci Methods.* 118:51–57.

Arnsten AFT, Wang M, Paspalas CD. 2015. Dopamine's actions in primate prefrontal cortex: challenges for treating cognitive disorders. *Pharmacol Rev.* 67:681–696.

Baddeley A. 2012. Working memory: theories, models, and controversies. *Annu Rev Psychol.* 63:1–29.

Baeg EH, Kim YB, Huh K, Mook-Jung I, Kim HT, Jung MW. 2003. Dynamics of population code for working memory in the prefrontal cortex. *Neuron.* 40:177–188.

Baker PM, Oh SE, Kidder KS, Mizumori SJY. 2015. Ongoing behavioral state information signaled in the lateral habenula guides choice flexibility in freely moving rats. *Front Behav Neurosci.* 9:295.

Baker PM, Raynor SA, Francis NT, Mizumori SJY. 2016. Lateral habenula integration of proactive and retroactive information mediates behavioral flexibility. *Neuroscience.* doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.02.010. [Epub ahead of print].

Bernard R, Veh RW. 2012. Individual neurons in the rat lateral habenular complex project mostly to the dopaminergic ventral tegmental area or to the serotonergic raphe nuclei. *J Comp Neurol.* 520:2545–2558.

Bernstein H-G, Hildebrandt J, Dobrowolny H, Steiner J, Bogerts B, Pahnke J. 2016. Morphometric analysis of the cerebral expression of ATP-binding cassette transporter protein ABCB1 in chronic schizophrenia: circumscribed deficits in the habenula. *Schizophr Res.* doi: 10.1016/j.schres.2016.02.036. [Epub ahead of print].

Bocchetta M, Gordon E, Marshall CR, Slattery CF, Cardoso MJ, Cash DM, Espak M, Modat M, Ourselin S, Frisoni GB, et al. 2015. The habenula: an under-recognised area of importance in frontotemporal dementia? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*

Bromberg-Martin ES, Hikosaka O. 2011. Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nat Neurosci.* 14:1209–1216.

Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. 2010. Distinct tonic and phasic anticipatory activity in lateral habenula and dopamine neurons. *Neuron.* 67:144–155.

Carr DB, Sesack SR. 2000. Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci.* 20:3864–3873.

Cavada C, Compañy T, Tejedor J, Cruz-Rizzolo RJ, Reinoso-Suárez F. 2000. The anatomical connections of the macaque monkey orbitofrontal cortex. A review. *Cereb Cortex.* 10:220–242.

Cenci MA, Kalén P, Mandel RJ, Björklund A. 1992. Regional differences in the regulation of dopamine and noradrenaline release in medial frontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen: a microdialysis study in the rat. *Brain Res.* 581:217–228.

Chiba T, Kayahara T, Nakano K. 2001. Efferent projections of infralimbic and prelimbic areas of the medial prefrontal cortex in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Brain Res.* 888:83–101.

- Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, et al. 2013. The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. *J Neurosci*. 33:8772–8783.
- Chudasama Y, Baunez C, Robbins TW. 2003. Functional disconnection of the medial prefrontal cortex and subthalamic nucleus in attentional performance: evidence for cortico-subthalamic interaction. *J Neurosci*. 23:5477–5485.
- Chudasama Y, Muir JL. 1997. A behavioural analysis of the delayed non-matching to position task: the effects of scopolamine, lesions of the fornix and of the prelimbic region on mediating behaviours by rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 134:73–82.
- Chudasama Y, Robbins TW. 2004. Dopaminergic Modulation of Visual Attention and Working Memory in the Rodent Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*. 29:1628–1636.
- Clark KL, Noudoost B. 2014. The role of prefrontal catecholamines in attention and working memory. *Front Neural Circuits*. 8:33.
- Clatworthy PL, Lewis SJG, Brichard L, Hong YT, Izquierdo D, Clark L, Cools R, Aigbirhio FI, Baron J-C, Fryer TD, et al. 2009. Dopamine release in dissociable striatal subregions predicts the different effects of oral methylphenidate on reversal learning and spatial working memory. *J Neurosci*. 29:4690–4696.
- Concha ML, Wilson SW. 2001. Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat*. 199:63–84.
- Curtis CE, Lee D. 2010. Beyond working memory: the role of persistent activity in decision making. *Trends Cogn Sci*. 14: 216–222.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW. 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev*. 28:771–784.
- D'Ardenne K, Eshel N, Luka J, Lenartowicz A, Nystrom LE, Cohen JD. 2012. Role of prefrontal cortex and the midbrain dopamine system in working memory updating. *Proc Natl Acad Sci*. 109:19900–19909.
- de Saint Blanquat P, Hok V, Alvernhe A, Save E, Poucet B. 2010. Tagging items in spatial working memory: a unit-recording study in the rat medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res*. 209:267–273.
- D'Esposito M, Postle BR. 2015. The cognitive neuroscience of working memory. *Annu Rev Psychol*. 66:115–142.
- Díaz E, Bravo D, Rojas X, Concha ML. 2011. Morphologic and immunohistochemical organization of the human habenular complex. *J Comp Neurol*. 519:3727–3747.
- Dudchenko PA. 2004. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 28: 699–709.
- Dunnett SB. 1985. Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of nucleus basalis or fimbria-fornix on delayed matching in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 87:357–363.
- Edeline J-M, Hars B, Hennevin E, Cotillon N. 2002. Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol Learn Mem*. 78:100–124.
- Ekman M, Fiebach CJ, Melzer C, Tittgemeyer M, Derrfuss J. 2016. Different roles of direct and indirect frontoparietal pathways for individual working memory capacity. *J Neurosci*. 36: 2894–2903.
- Floresco SB, Braaksma DN, Phillips AG. 1999. Involvement of the ventral pallidum in working memory tasks with or without a delay. *Ann NY Acad Sci*. 877:711–716.
- Floresco SB, Ghods-Sharifi S. 2006. Amygdala-prefrontal cortical circuitry regulates effort-based decision making. *Cereb Cortex*. 17:251–260.
- Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG. 1997. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J Neurosci*. 17:1880–1890.
- Fujisawa S, Buzsáki G. 2011. A 4 Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA, and hippocampal activities. *Neuron*. 72:153–165.
- Funahashi S. 2013. Space representation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol*. 103:131–155.
- Funahashi S, Bruce CJ, Goldman-Rakic PS. 1993. Dorsolateral prefrontal lesions and oculomotor delayed-response performance: evidence for mnemonic “scotomas”. *J Neurosci*. 13:1479–1497.
- Fuster JM, Alexander GE. 1971. Neuron activity related to short-term memory. *Science*. 173:652–654.
- Geisler S, Andres KH, Veh RW. 2003. Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. *J Comp Neurol*. 458:78–97.
- Geisler S, Trimble M. 2008. The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr*. 13:484–489.
- Gisquet-Verrier P, Delatour B. 2006. The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: Not involved in the short-term maintenance but in monitoring and processing functions. *Neuroscience*. 141:585–596.
- Gonçalves L, Sego C, Metzger M. 2012. Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol*. 520:1278–1300.
- Goutagny R, Loureiro M, Jackson J, Chaumont J, Williams S, Isope P, Kelche C, Cassel J-C, Lecourtier L. 2013. Interactions between the lateral habenula and the hippocampus: implication for spatial memory processes. *Neuropsychopharmacology*. 38:2418–2426.
- Hikosaka O. 2010. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci*. 11:503–513.
- Horst NK, Laubach M. 2009. The role of rat dorsomedial prefrontal cortex in spatial working memory. *Neuroscience*. 164:444–456.
- Horst NK, Laubach M. 2012. Working with memory: evidence for a role for the medial prefrontal cortex in performance monitoring during spatial delayed alternation. *J Neurophysiol*. 108:3276–3288.
- Howell D. 1992. *Statistical methods for psychology*. Belmont (CA): Duxbury Press. 338 p.
- Izaki Y, Maruki K, Hori K, Nomura M. 2001. Effects of rat medial prefrontal cortex temporal inactivation on a delayed alternation task. *Neurosci Lett*. 315:129–132.
- Ji H, Shepard PD. 2007. Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA_A receptor-mediated mechanism. *J Neurosci*. 27:6923–6930.
- Kesner RP, Churchwell JC. 2011. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem*. 96:417–431.
- Kim U, Lee T. 2012. Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat. *Eur J Neurosci*. 35: 1253–1269.
- Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K, Malenka RC. 2012. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*. 491:212–217.

- Landau SM, Lal R, O'Neil JP, Baker S, Jagust WJ. 2009. Striatal dopamine and working memory. *Cereb Cortex*. 19:445–454.
- Layfield DM, Patel M, Hallock H, Griffin AL. 2015. Inactivation of the nucleus reuniens/rhomboid causes a delay-dependent impairment of spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem*. 125:163–167.
- Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M. 2012. Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*. 37:1164–1176.
- Lecca S, Meye FJ, Mameli M. 2014. The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur J Neurosci*. 39:1170–1178.
- Lecourtier L, Defrancesco A, Moghaddam B. 2008. Differential tonic influence of lateral habenula on prefrontal cortex and nucleus accumbens dopamine release. *Eur J Neurosci*. 27:1755–1762.
- Liu D, Gu X, Zhu J, Zhang X, Han Z, Yan W, Cheng Q, Hao J, Fan H, Hou R, et al. 2014. Medial prefrontal activity during delay period contributes to learning of a working memory task. *Science*. 346:458–463.
- Mathis V, Cosquer B, Avallone M, Cassel J-C, Lecourtier L. 2015. Excitatory transmission to the lateral habenula is critical for encoding and retrieval of spatial memory. *Neuropsychopharmacology*. 40:2843–2851.
- Matsumoto M, Hikosaka O. 2007. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*. 447:1111–1115.
- Matsumoto M, Hikosaka O. 2009. Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci*. 12:77–84.
- McAlonan GM, Dawson GR, Wilkinson LO, Robbins TW, Everitt BJ. 1995. The effects of AMPA-induced lesions of the medial septum and vertical limb nucleus of the diagonal band of Broca on spatial delayed non-matching to sample and spatial learning in the water maze. *Eur J Neurosci*. 7:1034–1049.
- McKenna JT, Vertes RP. 2004. Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J Comp Neurol*. 480:115–142.
- Murty VP, Sambataro F, Radulescu E, Altamura M, Iudicello J, Zolnick B, Weinberger DR, Goldberg TE, Mattay VS. 2011. Selective updating of working memory content modulates meso-cortico-striatal activity. *NeuroImage*. 57:1264–1272.
- Omelchenko N, Bell R, Sesack SR. 2009. Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area: habenula input to VTA cell populations. *Eur J Neurosci*. 30:1239–1250.
- Proulx CD, Hikosaka O, Malinow R. 2014. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neurosci*. 17:1146–1152.
- Quina LA, Tempest L, Ng L, Harris JA, Ferguson S, Zhou TC, Turner EE. 2015. Efferent pathways of the mouse lateral habenula: efferent pathways of the mouse lateral habenula. *J Comp Neurol*. 523:32–60.
- Ragozzino ME, Adams S, Kesner RP. 1998. Differential involvement of the dorsal anterior cingulate and prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial working memory. *Behav Neurosci*. 112:293.
- Ramos BP, Arnsten AFT. 2007. Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther*. 113:523–536.
- Robbins TW, Arnsten AFT. 2009. The Neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci*. 32:267–287.
- Sanders D, Simkiss D, Braddy D, Baccus S, Morton T, Cannady R, Weaver N, Rose JE, Levin ED. 2010. Nicotinic receptors in the habenula: importance for memory. *Neuroscience*. 166:386–390.
- Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG. 1995. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behav Neurosci*. 109:1063.
- Seamans JK, Phillips AG. 1994. Selective memory impairments produced by transient lidocaine-induced lesions of the nucleus accumbens in rats. *Behav Neurosci*. 108:456–468.
- Spellman T, Rigotti M, Ahmari SE, Fusi S, Gogos JA, Gordon JA. 2015. Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature*. 522:309–314.
- Stopper CM, Floresco SB. 2013. What's better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci*. 17:33–35.
- Stopper CM, Tse MTL, Montes DR, Wiedman CR, Floresco SB. 2014. Overriding phasic dopamine signals redirects action selection during risk/reward decision making. *Neuron*. 84:177–189.
- Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B. 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res*. 146:3–17.
- Vertes RP. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*. 142:1–20.
- Wang G-W, Cai J-X. 2006. Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. *Behav Brain Res*. 175:329–336.
- Warburton EC, Harrison AA, Robbins TW, Everitt BJ. 1997. Contrasting effects of systemic and intracerebral infusions of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on spatial short-term working memory in rats. *Behav Brain Res*. 84:247–258.
- Xing B, Li Y-C, Gao W-J. 2016. Norepinephrine versus dopamine and their interaction in modulating synaptic function in the prefrontal cortex. *Brain Res*. 1641:217–233.
- Yoon T, Okada J, Jung MW, Kim JJ. 2008. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learn Mem*. 15:97–105.
- Zanto TP, Rubens MT, Thangavel A, Gazzaley A. 2011. Causal role of the prefrontal cortex in top-down modulation of visual processing and working memory. *Nat Neurosci*. 14:656–661.
- Zhang Y, Bailey KR, Toupin MM, Mair RG. 2005. Involvement of ventral pallidum in prefrontal cortex-dependent aspects of spatial working memory. *Behav Neurosci*. 119:399–409.

2. Conclusion de la publication 1

Ces travaux nous ont permis de démontrer l'implication de l'HbL dans la MdT. De plus cette publication est la première à décrire un lien fonctionnel important entre l'HbL et le CPFm. Les résultats obtenus pointent ainsi l'importance de l'HbL mais aussi de la voie CPFm-HbL dans le traitement online d'informations.

Ces travaux suggèrent que le CPFm, structure principale de la MdT, peut recruter l'HbL lorsque la situation le nécessite, notamment quand la charge en mémoire de travail augmente. Une hypothèse est que ce recrutement de l'HbL pourrait avoir pour but de moduler finement la libération dopaminergique, notamment au sein du CPFm.

1 **Supplementary Material**

2 The presentation of the supplementary material is organized in 5 sections (**A** to **E**) such as
3 described below:

4 In section (**A**) is included the description of a histological study which was designed to
5 illustrate the mPFC/PrL-IHb pathway or, in other words, to illustrate that projections exist
6 between the region of the mPFC/PrL where the muscimol was infused and the IHb.

7 In section (**B**) are presented histological data obtained in order to assess the extent of the
8 diffusion of the muscimol when it was injected in the IHb and in the mPFC/PrL.

9 In section (**C**) are illustrated the behavioral consequences of the infusion of muscimol in the
10 thalamic region underlying the IHb, as well as those of a mPFC/PrL-thalamus disconnection,
11 in 5 rats with misplaced microinfusions.

12 In section (**D**), in order to demonstrate the validity and strength of the within subject design of
13 our study, are presented, i) analyses comparing, for each experiment, performances under
14 vehicle and those during the drug-free testing days preceding each testing day, and, ii)
15 analysis comparing performances under vehicle of all the experiments.

16 In section (**E**) are presented the individual data regarding the percentage of correct responses
17 according to the delays for each experiment.

18

19

20

1 **A. Histological illustration of the mPFC-IHb pathway**

2 **Aim**

3 Although the presence of a mPFC/PrL-IHb projection has already been demonstrated in the
4 Rat (Kim and Lee 2012), we wanted to bring evidence that in our study the region of the
5 mPFC/PrL in which muscimol was infused was indeed connected to the IHb. We therefore
6 conducted a study which consisted in the infusion of a retrograde tracer coupled to a
7 fluorophore [Cholera toxin subunit B (CTB), Alexa Fluor 647] within the IHb, at the same
8 coordinates where the muscimol was injected during our study, and try and identify
9 fluorescent neurons within the mPFC/PrL.

10 **Materials and methods**

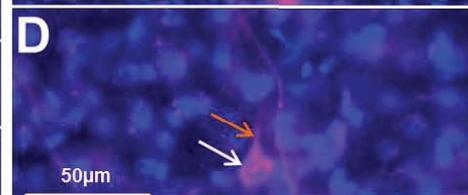
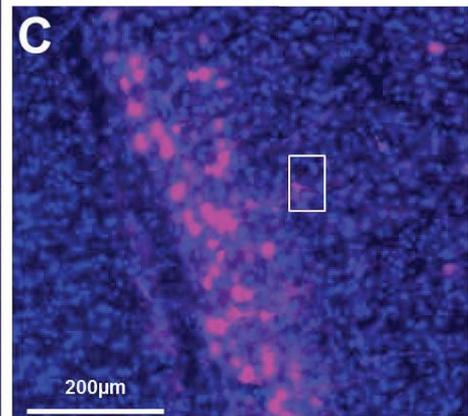
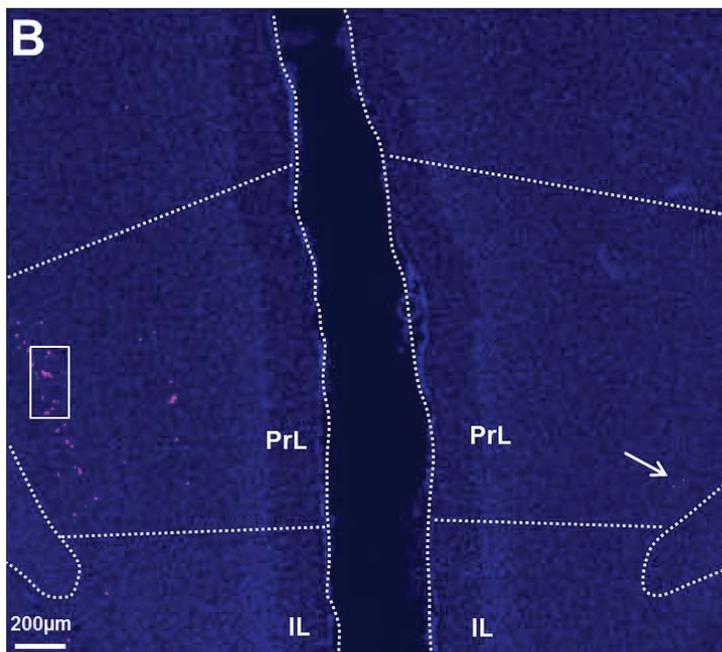
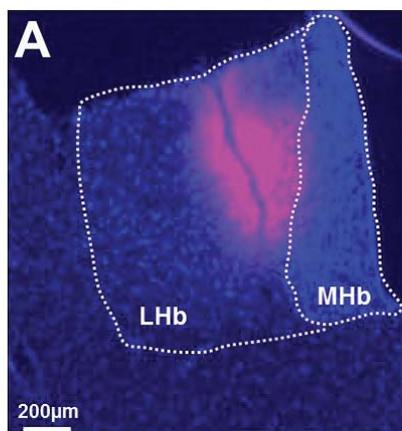
11 Using the same surgical procedures used for the behavioral study, 5 rats were unilaterally
12 microinfused with CTB (0.15 μ L, 0.1 μ L/min) in the IHb at the same coordinates used to
13 implant guides - although 1 mm lower dorsoventrally -, therefore representing the location of
14 the infusion site of muscimol (AP, -3.9 mm from Bregma; ML, + or - 0.7 mm; DV, -4.6 mm
15 from dura). Following termination of the infusion, the microinfusion cannula was left in place
16 for 15 minutes before being retracted. Seven days later rats were killed and brains processed
17 for histological verifications such as described in the manuscript. Coronal brain slices
18 comprising the mPFC/PrL or the IHb were collected on gelatin-coated slides, covered with a
19 mounting medium comprising fluorescent 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), dried and
20 observed the following day under a microscope (apotome2, Zeiss) with the ZEN 2 software
21 (maximum emission wavelengths: Alexa Fluor 647, 665 nm; DAPI, 461 nm).

22

23

1 **Results**

2 In **Supplementary Figure 1** is shown the presence, in one rat, of a site of infusion restricted
3 to the LHb, and the presence of retrogradely labeled neurons within the ipsilateral mPFC/PrL –
4 and a much less dense stained population in the contralateral mPFC/PrL region, such as
5 already observed (Kim and Lee 2012). It can be concluded that the mPFC/PrL region
6 inactivated with muscimol during our study is indeed sending downstream projections to the
7 LHb.



8
9
10

1 **Supplementary Figure 1.** Retrograde labeling of IHb-projecting mPFC/PrL neurons. (A)
2 Photograph (x2) showing an example of the diffusion of the fluorescence at the injection site
3 within the left IHb. (B) Photograph (x2) showing the presence of retrogradely labeled neurons
4 in the ipsilateral mPFC/PrL (left), whereas in the contralateral hemisphere only a few number
5 of neurons could be seen (white arrow). (C) Photograph showing higher magnification (x20)
6 of the region included in the white rectangle in (B), containing fluorescent neurons. (D)
7 Photograph showing a zoom on the region included in the white rectangle in (C), illustrating
8 the presence of fluorescence in mPFC/PrL neurons (white arrow) as well as what is likely to
9 be its axon (orange arrow); *Remark*: the photograph is presented with a counterclockwise 45°
10 rotation to better fit in the figure. Abbreviations: IL, infralimbic cortex; LHb, lateral habenula;
11 MHb, medial habenula; PrL, prelimbic cortex.

12

13

14

1 **B. Investigation of the area of diffusion of the muscimol when it is infused**
2 **in the IHb and mPFC/PrL**

3 **Methodological considerations**

4 In the present study, in order to minimize the risk of muscimol spreading to surrounding
5 structures, we decided to microinfuse within the IHb an amount and a volume of muscimol
6 (16 ng per side in 0.2 μ L) lower than in our previous study (Mathis et al. 2015; 24 ng per side
7 in 0.3 μ L) and lower than previous studies from other laboratories [for example, Stopper and
8 Floresco 2013 and Baker et al. 2015 administered 50 ng per side of both muscimol and the
9 GABA_B agonist baclofen in 0.2 μ L within microinjection locations similar to those of the
10 present study].

11 In order to have an idea of the diffusion of the muscimol when it was infused in the IHb, as
12 well as in the mPFC/PrL, at the end of the study we microinfused in both regions identical
13 volumes of a 0.1 % Evans blue-0.08 μ g/ μ L muscimol solution as described in a previous
14 publication from our laboratory (Loureiro et al. 2012). This allows to delineate the area of
15 diffusion of the muscimol and therefore verify if it spread to surrounding regions during our
16 experiments. We decided not to infuse the widely used florescent muscimol because it has a
17 molecular weight much more important than the non-fluorescent muscimol (607.46 vs 114.1
18 g/mol) and has different diffusion properties and kinetics (Allen et al. 2008). The other
19 advantage of a 0.1 % Evans blue-0.08 μ g/ μ L muscimol solution is that Evans blue emits a red
20 color at 680 nm when excited at 620 nm under a fluorescence microscope (Saria and
21 Lundberg 1983), allowing the precise detection of its presence around the infusion site, as
22 already performed in our laboratory (Loureiro et al. 2012).

23

24

1 **Methods**

2 We first prepared a fresh 0.1 % Evans blue-aCSF solution by adding 15 mg of Evans blue to
3 1.5 mL of aCSF (in mM: NaCl, 145; KCl, 2.7; MgCl₂, 1.0; CaCl₂, 1.2) and filtered it. We
4 then dissolved muscimol in an aliquot of this solution to a final concentration of 0.08 μg/μL.
5 Rats were then bilaterally microinfused with 0.4 μL in the mPFC/PrL and 0.2 μL in the LHb
6 at the same injection rate than during the behavioral experiments. They were killed 30
7 minutes later in order to stick with the timing of the behavioral experiments and have a
8 representation of the diffusion of muscimol at the time of testing. 40-μm thick slices were cut
9 in a cryostat and mounted on gelatin-coated slides. Slices were observed under a fluorescent
10 microscope (apotome2, Zeiss, with the ZEN 2 software).

11 **Results**

12 Using the fluorescence properties of the Evans blue dye we were able to finely detect the
13 spread of the dyed muscimol solution within the mPFC/PrL and the LHb. **Supplementary**
14 **Figure 2** illustrates the presence of fluorescent Evans blue in one rat, within the left LHb and
15 the right mPFC/PrL, in order to give an example of how muscimol diffused during, for
16 example, the disconnection experiment. We decided to keep for statistical analyses data of
17 rats presenting fluorescence only within the boundaries of the mPFC/PrL and of the LHb - and
18 identically in both hemispheres.

19 **Conclusions**

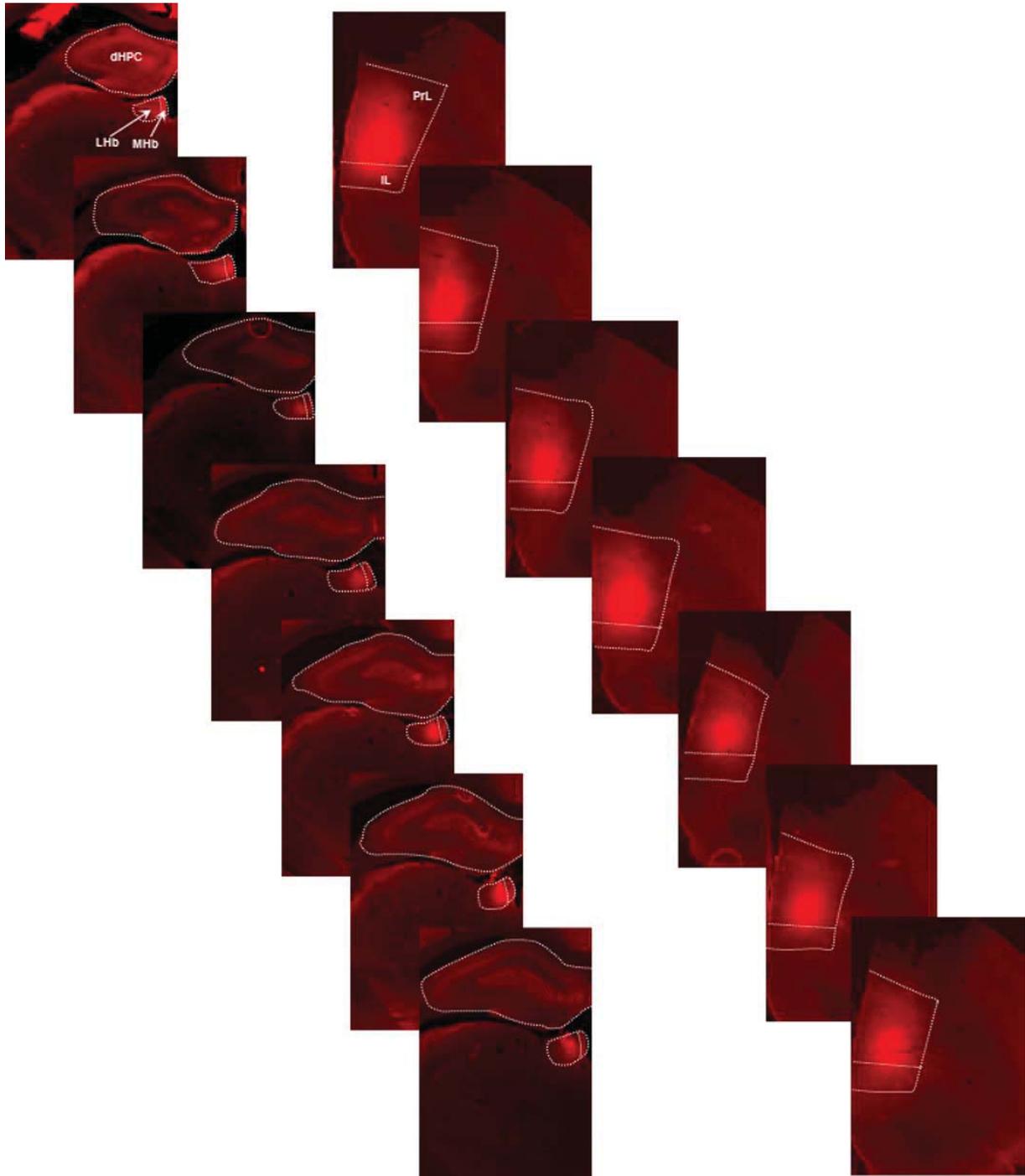
20 In the present study, following the histological analyses, we were able to select rats with
21 infusion sites located within the targeted mPFC/PrL and LHb. Noteworthy, we originally
22 targeted the mPFC/PrL, which has more particularly been implicated in working memory
23 (Seamans et al. 1995; Ragozzino et al. 1998; Horst and Laubach 2009; Liu et al. 2014). It can
24 be seen in **Figure 1B** that in 3 of those rats infusion sites were located at the border between
25 the mPFC/PrL and the infralimbic (IL) regions of the mPFC; this suggests that part of the

1 muscimol likely had spread into the IL in those rats, a fact was confirmed during our
2 histology analysis when fluorescence could also be detected in the IL. Given that the IL,
3 although it is principally involved in response inhibition (Murphy et al. 2005; see review
4 Gourley and Taylor 2016), habit formation (Killcross and Coutureau 2003; see review Barker
5 et al. 2014), as well as in the collection of reward (Burgos-Robles et al. 2013), has also been
6 implicated in working memory (Wall et al. 2001; Ragozzino et al. 2002), and given that
7 performances of those three rats did not differ from the performances of rats with infusion
8 sites and fluorescence restricted to the mPFC/PrL - especially in terms of latencies to collect
9 the rewards -, we decided to include them in the statistical analyses.

10

11

12



1

2 **Supplementary Figure 2.** Photographs illustrating an example of the area of diffusion of the
3 0.1 % Evans blue-0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ muscimol solution into the LHb (left) and the mPFC/PrL (right),
4 in order to illustrate the disconnection. Abbreviations: dHPC, dorsal hippocampus; IL,
5 infralimbic cortex; LHb, lateral habenula; MHb, medial habenula; PrL, prelimbic cortex.

6

1 **C. Behavioral consequences of muscimol infusion in the thalamic region**
2 **underlying the IHb**

3 **Methodological and theoretical considerations**

4 As described above (**Section 2**), when we observed the presence of fluorescence at the level
5 of the IHb, if none could be detected in the overlying hippocampus, in 5 rats fluorescence
6 could be detected within the underlying thalamic region were microinfusions had been
7 misplaced (see **Supplementary Figure 3B**). Therefore, although we discarded those rats,
8 analyzing their performances appeared particularly interesting given the role of many
9 thalamic nuclei in several aspects of high cognitive functions (Wolff et al. 2015), and given
10 the large reciprocal connections between the thalamus and the mPFC and their functional
11 implications (Ketz et al. 2015).

12 **Results**

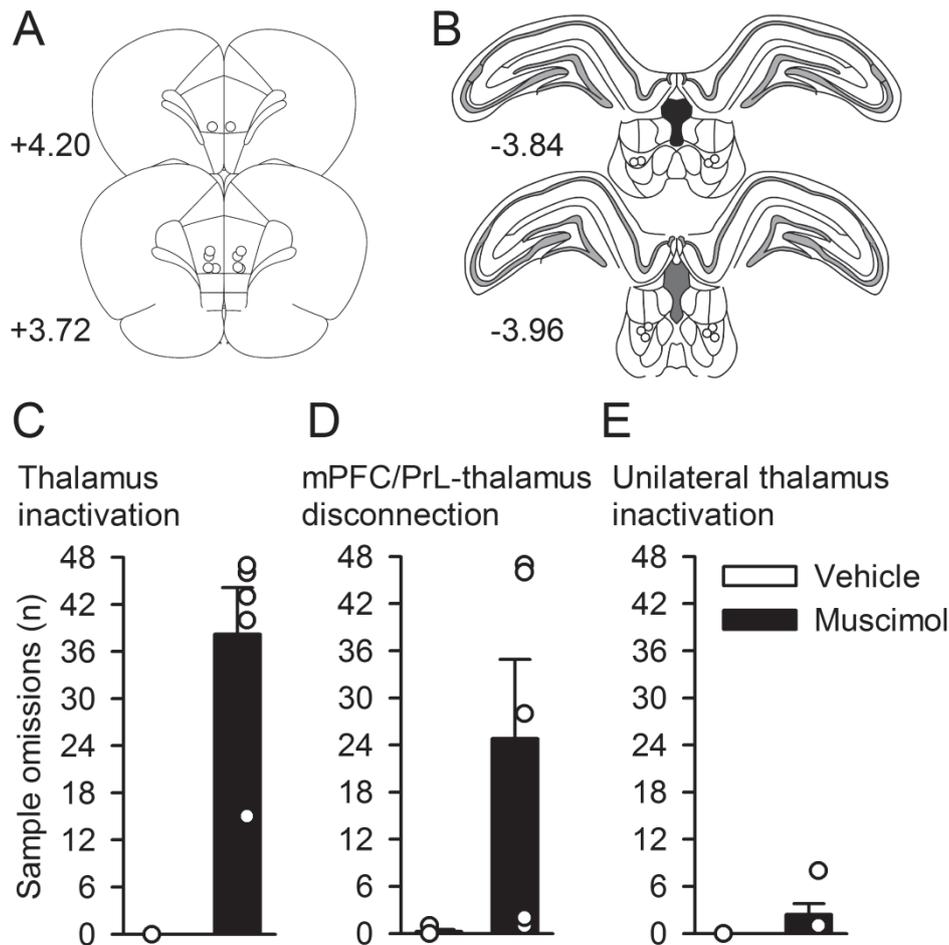
13 In **Supplementary Figure 3C-D** one can see that bilateral thalamic muscimol administration,
14 as well as mPFC/PrL-thalamus disconnection – unlike unilateral thalamic inactivation
15 (**Supplementary Figure 3E**) - prevented rats from performing the task as they omitted to
16 respond to a large number of sample cues.

17 **Conclusion**

18 Such results were helpful for interpreting our data. Indeed, it can be argued that, in the 10 rats
19 kept for the analyses with injection sites located in – and fluorescence restricted to - the IHb,
20 it is unlikely that muscimol has spread to this underlying thalamic region as rats did not make
21 more omissions than when they received vehicle treatment (see **Table 1**).

22

23



1

2 **Supplementary Figure 3.** In 5 rats injection sites (white circles) were correctly located
 3 within the mPFC/PrL (A) but misplaced within the thalamic region underlying the IHb (B);
 4 numbers correspond to anteroposterior coordinates in mm from Bregma. (C) When those rats
 5 were bilaterally microinfused with muscimol (16 ng/side) within this thalamic region, they
 6 could not properly perform the task, omitting to respond to a large number of sample cues
 7 (15, 40, 43, 46 and 47 omissions, out of 48 trials, respectively) as compared to the control
 8 condition (Vehicle, no omission). (D) During the disconnection experiment, 3 out of 5 of
 9 those rats were again markedly inactive as they made 28, 46 and 47 omissions respectively,
 10 while the remaining 2 were correctly engaged in the task, making 1 and 2 omissions
 11 respectively. (E) Unilateral thalamic inactivation did not produce such an effect as muscimol-

1 treated rats made very few omissions (1, 1, 1, 1, and 8) whereas under vehicle they made
2 none. In (C-E) white circles represent individual performances.

3

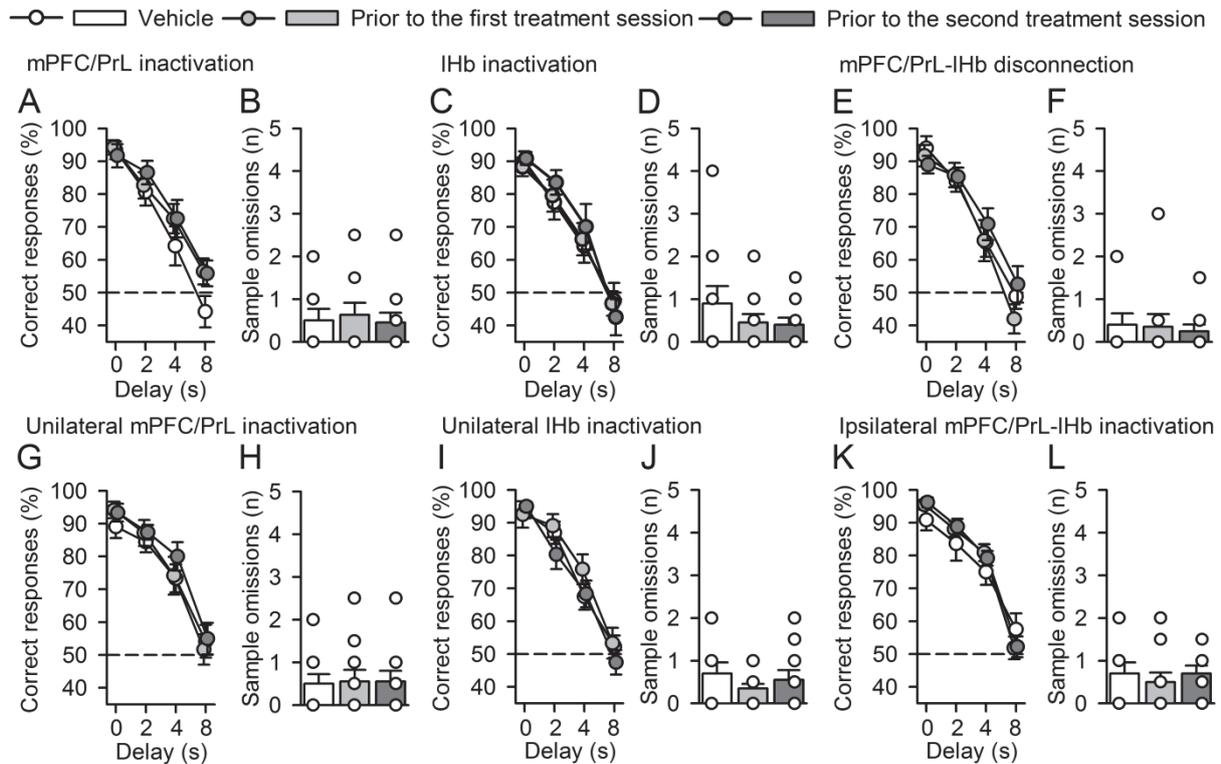
4

1 **D. Complementary analyses to demonstrate the validity of the study design**

2 We compared, for each experiment, memory performances between the vehicle condition, the
3 treatment-free session preceding the first treatment session and the treatment-free session
4 preceding the second treatment session using two-way ANOVAs with delay (4 levels) and
5 session (3 levels) as the repeated measures. These analyses yielded a significant effect of
6 delay ($P < 0.001$ for each experiment) but no significant effect of test session according to the
7 following experiments: *lHb inactivation*, $F_{2,18} = 0.17$, **Supplementary Figure 4C**;
8 *mPFC/PrL-lHb disconnection*, $F_{2,18} = 0.66$, **Supplementary Figure 4E**; *unilateral*
9 *mPFC/PrL inactivation*, $F_{2,18} = 2.30$, **Supplementary Figure 4G**; *unilateral lHb inactivation*,
10 $F_{2,18} = 2.30$, **Supplementary Figure 4I**; *ipsilateral mPFC/PrL-lHb inactivation*, $F_{2,18} = 0.79$,
11 **Supplementary Figure 4K**). However, for the experiment including *mPFC/PrL inactivation*,
12 there was a significant effect of session: $F_{2,18} = 3.84$, $P < 0.05$, **Supplementary Figure 4A**.
13 Post-hoc analysis of the session effect indicated a significant difference between
14 performances under the vehicle treatment and those of the drug-free session preceding the
15 first treatment session (white and light grey symbols in **Supplementary Figure 4A**); further,
16 we conducted one-way ANOVAs at each delay, with test session as the repeated measure, and
17 found no significant difference at the 0-s, 2-s and 4-s delays ($P < 0.1$ for each analysis) and a
18 tendency ($P = 0.079$) at the 8-s delay. According to the number of omissions, one-way
19 ANOVAs with session as the repeated measure showed no significant differences (*mPFC/PrL*
20 *inactivation*: $F_{2,18} = 1.38$, **Supplementary Figure 4B**; *lHb inactivation*: $F_{2,18} = 1.12$,
21 **Supplementary Figure 4D**; *mPFC/PrL-lHb disconnection*: $F_{2,18} = 0.01$, **Supplementary**
22 **Figure 4F**; *unilateral mPFC/PrL inactivation*: $F_{2,18} = 0.02$, **Supplementary Figure 4H**;
23 *unilateral lHb inactivation*: $F_{2,18} = 1.94$, **Supplementary Figure 4J**; *ipsilateral mPFC/PrL-*
24 *lHb inactivation*: $F_{2,18} = 0.46$, **Supplementary Figure 4L**). Overall, those analyzes

1 demonstrate that performances during the second treatment session are unlikely to have been
 2 impacted by a prolonged effect of the treatments received during the first treatment session.

3



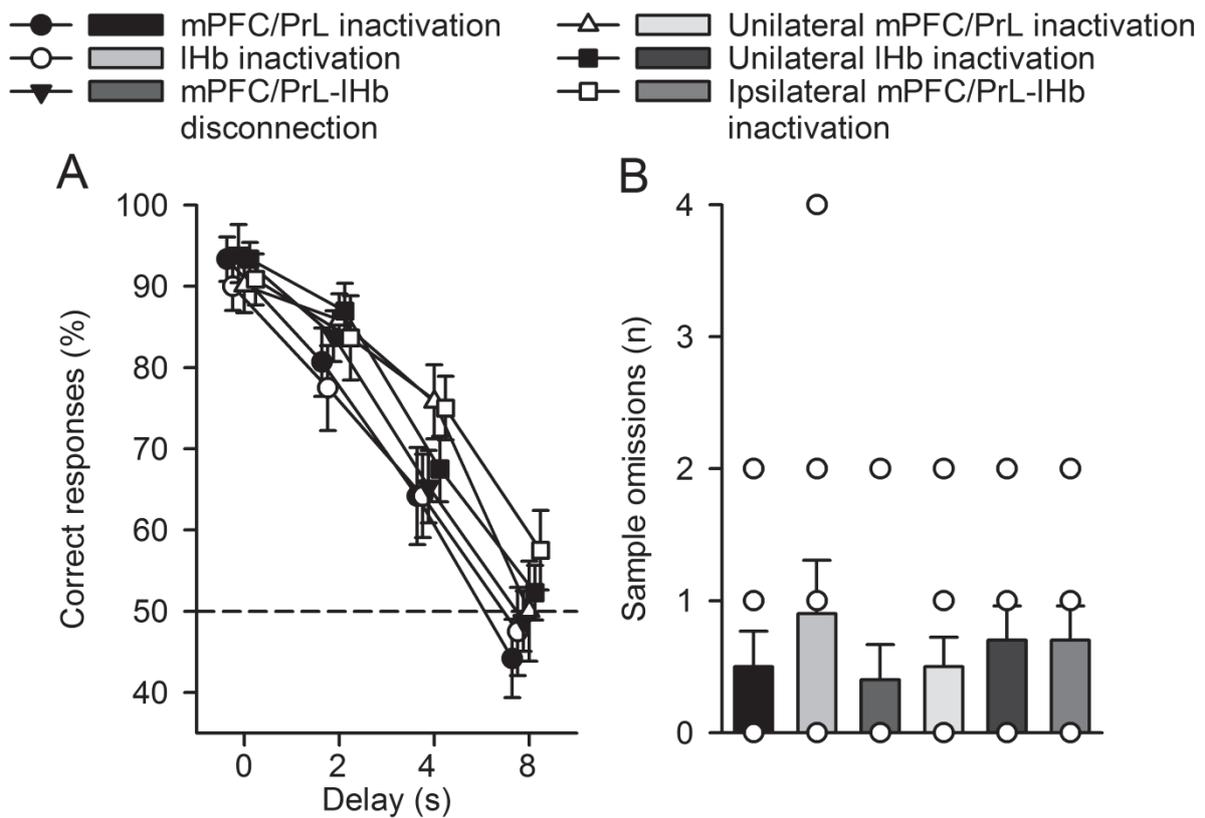
4

5 **Supplementary Figure 4.** Comparisons, for each experiment, of memory performances (A, 6
 C, E, G, H; mean \pm SEM percentage of correct responses) and of the number of omissions 7
 during the sample phase (B, D, F, H, J; mean \pm SEM; white circles represent individual 8
 performances) between the vehicle condition (white), the treatment-free session preceding the 9
 first treatment session (light grey) and the treatment-free session preceding the second 10
 treatment session (dark grey).

11 Comparison of memory performances under the vehicle treatment of all the experiments using 12
 a two-way ANOVA with delay (4 levels) and experiment (6 levels) as the repeated measures 13
 showed a significant effect of delay ($F_{3,27} = 92.87$, $P < 0.001$), no significant effect of 14
 experiment ($F_{5,45} = 1.86$) and no significant interaction ($F_{15,135} = 0.82$) (**Supplementary 15
 Figure 5A**). According to the number of omission, a one-way ANOVA with experiment as

1 the repeated measure showed no significant effect ($F_{5,45} = 0.56$; **Supplementary Figure 5B**).
 2 This analysis demonstrates that throughout the course of the study rats showed similar level of
 3 performances, so that the different deficits observed throughout the study could not be
 4 attributed to variations in baseline levels of performance.

5



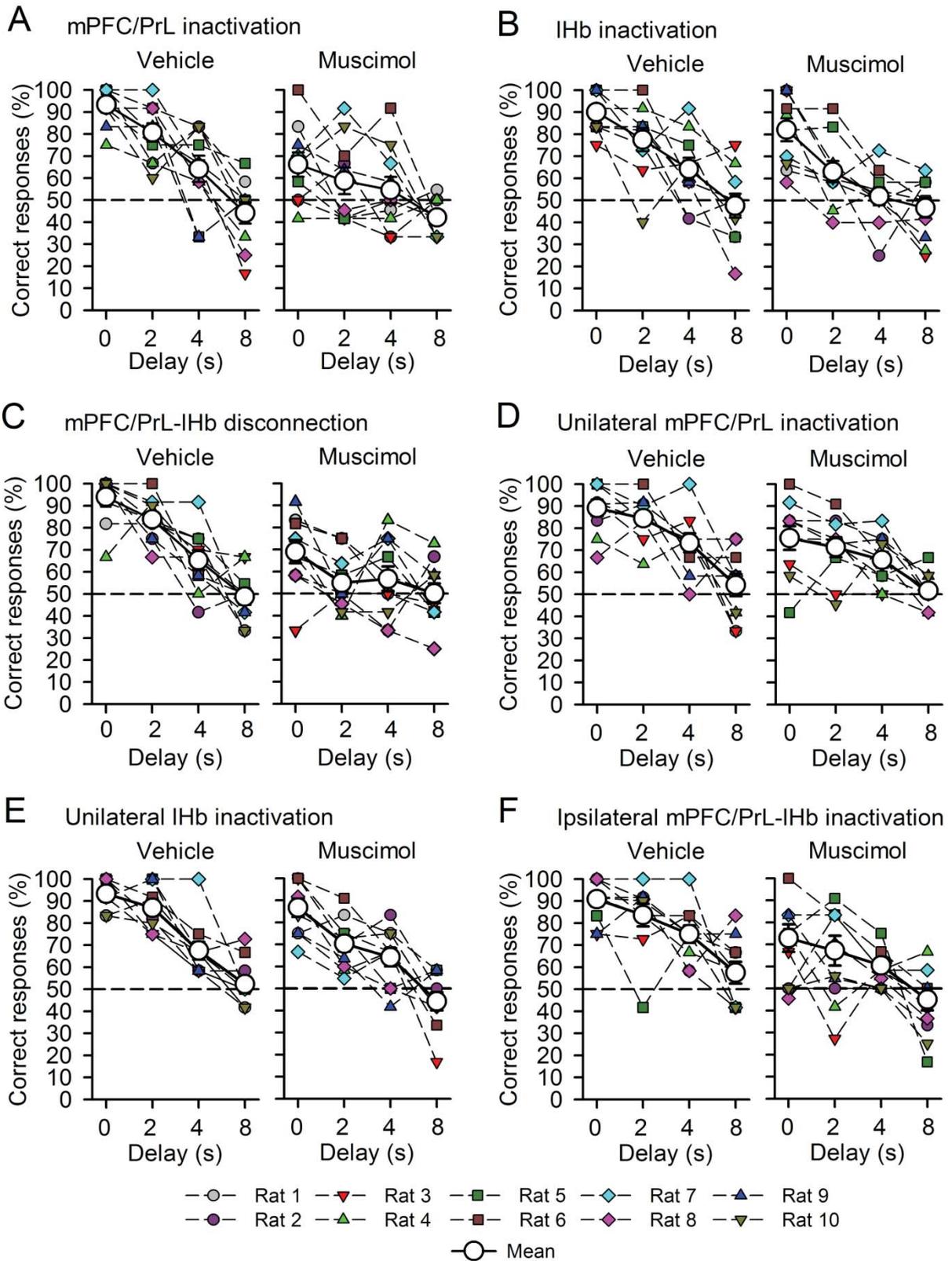
6

7 **Supplementary Figure 5.** Comparison of memory performances (A) and of the number of
 8 omissions (B) of all experiments under the vehicle treatment. In (B) white circles represent
 9 individual performances.

10

11

1 **E. Individual memory performances during each experiment**



2

3

1 **Supplementary Figure 6.** Percentage of correct responses: individual data according to the
2 treatment received by the rats, i.e., vehicle (left) and muscimol (right) for each experiment.
3 Besides chance performance at the 8-s delay, one can see that muscimol bilaterally infused
4 into the mPFC/PrL (A) and IHb (B) led a majority of the rats to respond around chance at the
5 2-s and 4-s delays; this was also the case for disconnected rats (C). Such phenomenon was not
6 observed – or not as much - when muscimol was unilaterally infused into the mPFC/PrL (D)
7 or into the IHb (E) or following ipsilateral inactivations (F).

8

1 **Supplementary references**

- 2 Allen TA, Narayanan NS, Kholodar-Smith DB, Zhao Y, Laubach M, Brown TH. 2008.
3 Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. *J*
4 *Neurosci Methods*. 171:30–38.
- 5 Baker PM, Oh SE, Kidder KS, Mizumori SJY. 2015. Ongoing behavioral state information
6 signaled in the lateral habenula guides choice flexibility in freely moving rats. *Front*
7 *Behav Neurosci*. 9.
- 8 Barker JM, Taylor JR, Chandler LJ. 2014. A unifying model of the role of the infralimbic
9 cortex in extinction and habits. *Learn Mem Cold Spring Harb N*. 21:441–448.
- 10 Burgos-Robles A, Bravo-Rivera H, Quirk GJ. 2013. Prelimbic and infralimbic neurons signal
11 distinct aspects of appetitive instrumental behavior. *PloS One*. 8:e57575.
- 12 Gourley SL, Taylor JR. 2016. Going and stopping: dichotomies in behavioral control by the
13 prefrontal cortex. *Nat Neurosci*. 19:656–664.
- 14 Horst NK, Laubach M. 2009. The role of rat dorsomedial prefrontal cortex in spatial working
15 memory. *Neuroscience*. 164:444–456.
- 16 Ketz NA, Jensen O, O'Reilly RC. 2015. Thalamic pathways underlying prefrontal cortex-
17 medial temporal lobe oscillatory interactions. *Trends Neurosci*. 38:3–12.
- 18 Killcross S, Coutureau E. 2003. Coordination of actions and habits in the medial prefrontal
19 cortex of rats. *Cereb Cortex N Y N 1991*. 13:400–408.
- 20 Kim U, Lee T. 2012. Topography of descending projections from anterior insular and medial
21 prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat. *Eur J Neurosci*.
22 35:1253–1269.
- 23 Liu D, Gu X, Zhu J, Zhang X, Han Z, Yan W, Cheng Q, Hao J, Fan H, Hou R, Chen Z, Chen
24 Y, Li CT. 2014. Medial prefrontal activity during delay period contributes to learning
25 of a working memory task. *Science*. 346:458–463.

- 1 Loureiro M, Lecourtier L, Engeln M, Lopez J, Cosquer B, Geiger K, Kelche C, Cassel J-C,
2 Pereira de Vasconcelos A. 2012. The ventral hippocampus is necessary for expressing
3 a spatial memory. *Brain Struct Funct.* 217:93–106.
- 4 Mathis V, Cosquer B, Avallone M, Cassel J-C, Lecourtier L. 2015. Excitatory Transmission
5 to the Lateral Habenula Is Critical for Encoding and Retrieval of Spatial Memory.
6 *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.*
- 7 Murphy ER, Dalley JW, Robbins TW. 2005. Local glutamate receptor antagonism in the rat
8 prefrontal cortex disrupts response inhibition in a visuospatial attentional task.
9 *Psychopharmacology (Berl).* 179:99–107.
- 10 Ragozzino ME, Adams S, Kesner RP. 1998. Differential involvement of the dorsal anterior
11 cingulate and prelimbic–infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in spatial
12 working memory. *Behav Neurosci.* 112:293.
- 13 Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP. 2002. The effects of prelimbic and infralimbic lesions
14 on working memory for visual objects in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 77:29–43.
- 15 Saria A, Lundberg JM. 1983. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological
16 evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J Neurosci Methods.* 8:41–49.
- 17 Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG. 1995. Functional differences between the prelimbic
18 and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. *Behav Neurosci.* 109:1063.
- 19 Stopper CM, Floresco SB. 2013. What’s better for me? Fundamental role for lateral habenula
20 in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci.* 17:33–35.
- 21 Wall PM, Flinn J, Messier C. 2001. Infralimbic muscarinic M1 receptors modulate anxiety-
22 like behaviour and spontaneous working memory in mice. *Psychopharmacology*
23 *(Berl).* 155:58–68.

1 Wolff M, Alcaraz F, Marchand AR, Coutureau E. 2015. Functional heterogeneity of the
2 limbic thalamus: From hippocampal to cortical functions. *Neurosci Biobehav Rev.*
3 54:120–130.

4

3. Publication 2: Etude de l'implication de l'HbL dans l'encodage et le rappel d'une mémoire spatiale de référence

Les expériences présentées dans cette publication avaient pour but d'évaluer l'implication de l'HbL dans les différentes étapes nécessaires à la mise en place et au rappel d'une mémoire de référence spatiale.

Pour cela nous avons utilisé différents protocoles d'inactivations réversibles à l'aide de muscimol et de CNQX, lors du paradigme comportemental de la piscine de Morris. Ces différents protocoles nous ont permis d'étudier séparément chacune des étapes de mise en place d'une information spatiale, *i.e.* l'encodage, la consolidation et le rappel. De plus, afin d'exclure de possibles effets non-désirés des différents traitements, nous avons évalué les conséquences de l'instillation de ces derniers sur les comportements sensori-moteur et anxieux lors d'expériences complémentaires.

Nous avons également effectué des contrôles neuroanatomiques, exigés par les examinateurs lors de la première soumission de notre manuscrit ; ceux-ci ont consisté à effectuer les mêmes expériences de piscine de Morris en instillant nos composés pharmacologiques dans la région thalamique située ventralement à l'HbL (essentiellement les noyaux paraventriculaire postérieur et médio-dorsal), la région hippocampique située dorsalement à l'HbL et le troisième ventricule, afin d'évaluer si une possible diffusion vers ces régions pouvait expliquer les déficits observés.

Excitatory Transmission to the Lateral Habenula Is Critical for Encoding and Retrieval of Spatial Memory

Victor Mathis¹, Brigitte Cosquer¹, Martino Avallone¹, Jean-Christophe Cassel¹ and Lucas Lecourtier^{*,1}

¹Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), UMR 7364, CNRS, Université de Strasbourg, Neuropôle de Strasbourg, GDR 2905 du CNRS, Faculté de Psychologie, 12 rue Goethe, Strasbourg, France

The lateral habenula (LHb) is viewed as a relay between the limbic system, the basal ganglia (BG), and monoaminergic neurons of the midbrain. If a prominent role has been evidenced in BG-mediated functions such as value-based decision-making, very little is known about the involvement of the LHb in limbic functions such as memory processing. In the present study, we used two pharmacological approaches—LHb reversible inactivation with intra-LHb infusion of muscimol, an agonist of the GABA-A receptor, or blockade of excitatory inputs with intra-LHb infusion of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), an antagonist of the glutamatergic AMPA receptor—to investigate the involvement of the LHb in encoding, consolidation, and retrieval of spatial memory in the water maze (WM) in rats. We found that intra-LHb infusion of muscimol or CNQX prevented encoding and retrieval, but not consolidation of spatial information. In addition, muscimol but not CNQX induced impairments during a cued version of the WM task, and marked anxiety in the elevated plus maze. These results confirm the involvement of the LHb in higher cognitive functions. They further suggest a dichotomy between the role of glutamatergic and other inputs to the LHb in hippocampus-dependent memory processing, as well as in emotional aspects of goal-directed behaviors.

Neuropsychopharmacology (2015) **40**, 2843–2851; doi:10.1038/npp.2015.140; published online 8 July 2015

INTRODUCTION

The lateral habenula (LHb) is described as a structure integrating and relaying striatal and limbic information toward midbrain monoaminergic nuclei (Geisler and Trimble, 2008; Hikosaka *et al*, 2008). A large majority of the studies conducted in the past decade focused on the role of the LHb in basal ganglia-mediated functions. Its fundamental implication has been evidenced in reward and information prediction errors, the coding of negative motivational value, and subjective decision biases (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011; Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009; Stopper and Floresco, 2014). Hikosaka (2010) further proposed that the LHb governs the suppression of motor activity upon the occurrence of negative outcomes.

To date, few studies have investigated the contribution of the LHb to limbic functions such as spatial reference memory, which depends upon hippocampal networks (Winocur *et al*, 2010). This issue appears relevant, regarding the modulatory role of the LHb upon dopaminergic and serotonergic transmissions (Bernard and Veh, 2012; Ji and Shepard, 2007; Wang and Aghajanian, 1977), as well the cholinergic septo-hippocampal pathway (Nilsson *et al*, 1990), which are key systems involved in memory processes. It is

also relevant because dysfunction of the LHb has been evidenced in disorders such as depression (Aizawa *et al*, 2013a; Sartorius and Henn, 2007), which encompasses alterations of hippocampal networks, as well as memory impairments (Trivedi and Greer, 2014; Belzung *et al*, 2015; Lecca *et al*, 2014). In rats, LHb electric stimulation prevented avoidance learning (Shumake *et al*, 2010). We have shown that electrolytic habenular lesion altered hippocampus (HPC)-dependent spatial learning in the water maze (WM) (Lecourtier *et al*, 2004), whereas selective LHb inactivation induced memory deficits in an object-based, HPC-dependent memory task (Goutagny *et al*, 2013). Moreover, a high synchrony between LHb and dorsal HPC (dHPC) theta oscillations has been evidenced (Aizawa *et al*, 2013b; Goutagny *et al*, 2013). On the basis of the well-accepted view that communication between regions involves coherence of their oscillations (Fries, 2005), these data suggest that the LHb and dHPC are functionally connected and are likely to exchange information. With regard to the above-cited literature, one could even further hypothesize that such information relates to memory processing, for which theta oscillations are particularly relevant (Düzel *et al*, 2010).

If the aforementioned studies pointed to an involvement of the LHb in HPC-dependent spatial memory, it has not yet been investigated at which step of spatial memory processing was the LHb involved: ie, encoding, consolidation, or retrieval. To address this question, we assessed the involvement of the LHb in encoding, consolidations, and retrieval of spatial information in the WM. We used two reversible pharmacological strategies: inactivation of the LHb with muscimol, an agonist of the GABA-A receptor, or selective

*Correspondence: Dr L Lecourtier, Laboratoire de neurosciences cognitives et adaptatives, Université de Strasbourg, 12, rue Goethe, CNRS UMR7364, F-67000 Strasbourg, France, Tel: +33 3 68 85 18 96, Fax: +33 3 68 85 19 58, E-mail: l.lecourtier@unistra.fr

Received 5 January 2015; revised 5 May 2015; accepted 6 May 2015; accepted article preview online 14 May 2015

The Netherlands). Training analyses comprised for each trial the distance and latency to reach the platform; the mean swim speed; the resting time, ie, when the rats were floating; and the time in thigmotaxis, ie, when the rats were swimming along the edge of the WM within a 10-cm wide corridor. Retention test analyses comprised the time spent within the target quadrant—ie, the quadrant where the platform was located during training, the number of crossings of the former platform location, the time in thigmotaxis, the mean swim speed, the total distance swum, and the resting time. In addition, to provide a representation of the overall spatial occupancy during the retention tests, all X and Y coordinates (one measure recorded every 0.2 s) of all rats from each group have been concatenated in Matlab and processed using a density plot script. These are shown in Figure 1c and Figure 2c.

Horizontal Locomotor Activity

It was measured in home-cages by means of two infrared light beams perpendicular to the width of the cage, each 4.5 cm above floor level and 28 cm apart along the length of the cage. The number of longitudinal cage crossings, ie, each time a rat consecutively interrupted the two light beams, was monitored and saved in 15-min bins. After a 1-h baseline recording, treatments were administered and recording was continued for 90 min.

Beam-Walking Test

It was performed on a 4-cm-wide, 200-cm-long wooden beam elevated 80 cm above the floor and virtually divided into four 50-cm segments. Home-cages were placed at one extremity of the beam. Training was as follows: day 1, rats were placed on the beam close to their home-cage for 5 consecutive trials; day 2, rats were placed successively 50, 100, and 150 cm from the home-cage (one trial for each distance); day 3, rats were placed twice 100 cm and twice 200 cm from the home-cage; and day 4, rats were placed 200 cm from the home-cage for 3 consecutive runs. Testing under treatments occurred on day 5 with the same protocol as on day 4. For each 50-cm segment of the beam, a score of 1 was attributed when a rat kept all paws on the upper surface, whereas a score of 0 was attributed when the rat slipped or placed its toes on the side surfaces. For each rat, the scores of the 3 consecutive runs were summed (maximum score = 12).

EPM test

The EPM, made of black Plexiglas, was elevated 73 cm above the floor, and it consisted of four arms (50 cm × 10 cm), two comprising 40-cm-high walls (closed) and two comprising 1.5-cm-high borders (open). Light intensity was 10 lux in open arms, 7 lux at the center of the maze, and 4 lux in closed arms. The test lasted 5 min; the number of entries and time spent in each arm were scored. The maze was cleaned with absolute ethanol between each rat.

Histology

Infusion sites were verified by means of Evans blue (0.15 µl, 0.15 µl/min) infusion. Rats were subsequently deeply anesthetized (pentobarbital, 100 mg/kg, ip), and brains were

removed and fixed in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde (pH 7.4; 4 °C, 48 h). Brains were then transferred into a 0.1 M phosphate-buffered 20% sucrose solution (4 °C, 48 h) and subsequently frozen. Serial 40-µm-thick sections were cut in the coronal plane at -22 °C, collected on gelatin-coated slides, and stained with hematoxylin. Only rats with blue marks, in conjunction with gliosis, restricted to both LHb, were kept. Group sizes are indicated in each figure.

Statistical Analyses

All data are represented as mean ± SEM. For all experiments, control groups of each drug, which received different vehicles, have been pooled to simplify iconography, after it was confirmed that their performances were not statistically different (see Supplementary Information). WM training performance and locomotor activity were analyzed with two-way ANOVA, treatment being the between-subject factor, and training day (5) or time (4 or 6 bins) the repeated measure. WM retention tests performance was analyzed with one-way ANOVA (Treatment); average performance was compared with chance level (25%) with a *t*-test. EPM and beam-walking performance was analyzed with one-way ANOVA (treatment). *Post hoc* analyses used the Newman-Keuls multiple range test when appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Intra-LHb Muscimol or CNQX Infusion Prevented Learning

Analysis of distance to platform showed significant effects of group ($F(5,62) = 23.20$; $p < 0.0001$) and training day ($F(4,248) = 39.88$; $p < 0.0001$), and a significant interaction ($F(20,244) = 1.86$; $p < 0.05$). *Post hoc* analysis revealed an alteration of learning performance in Musc-pre and CNQX-pre rats ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ vs the four other groups, respectively) (Figure 1a). This was confirmed during the retention test ($F(5,62) = 8.37$; $p < 0.0001$) (Figure 1b), performance of Musc-pre and CNQX-pre rats being significantly below that of the four other groups ($p < 0.05$ to $p < 0.01$). Musc-pre rats performed below chance level ($t(10) = -2.98$, $p < 0.05$), CNQX-pre rats performed at chance level ($t(10) = -0.10$, $p > 0.1$), whereas all other groups performed above chance level (Veh-pre: ($t(13) = 4.02$, $p < 0.01$); Veh-post: ($t(10) = 4.52$, $p < 0.01$); Musc-post: ($t(9) = 5.67$, $p < 0.001$); CNQX-post: ($t(10) = 3.72$, $p < 0.01$)). In addition, both drugs, when infused before training, also increased thigmotaxis and/or decreased swim speed, whereas they did not affect the amount of resting (see Supplementary Figure S1).

Following a Drug-Free Training, Intra-LHb Muscimol or CNQX Infusion Disrupted Memory Retrieval

Analysis of retention performance showed a significant effect of group ($F(2,30) = 6.83$; $p < 0.01$). *Post hoc* analysis indicated impaired performance in muscimol- and CNQX-treated rats ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ vs vehicle, respectively) (Figure 2b). Whereas controls performed above chance level ($t(12) = 4.25$, $p < 0.01$), muscimol- and CNQX-treated rats did not

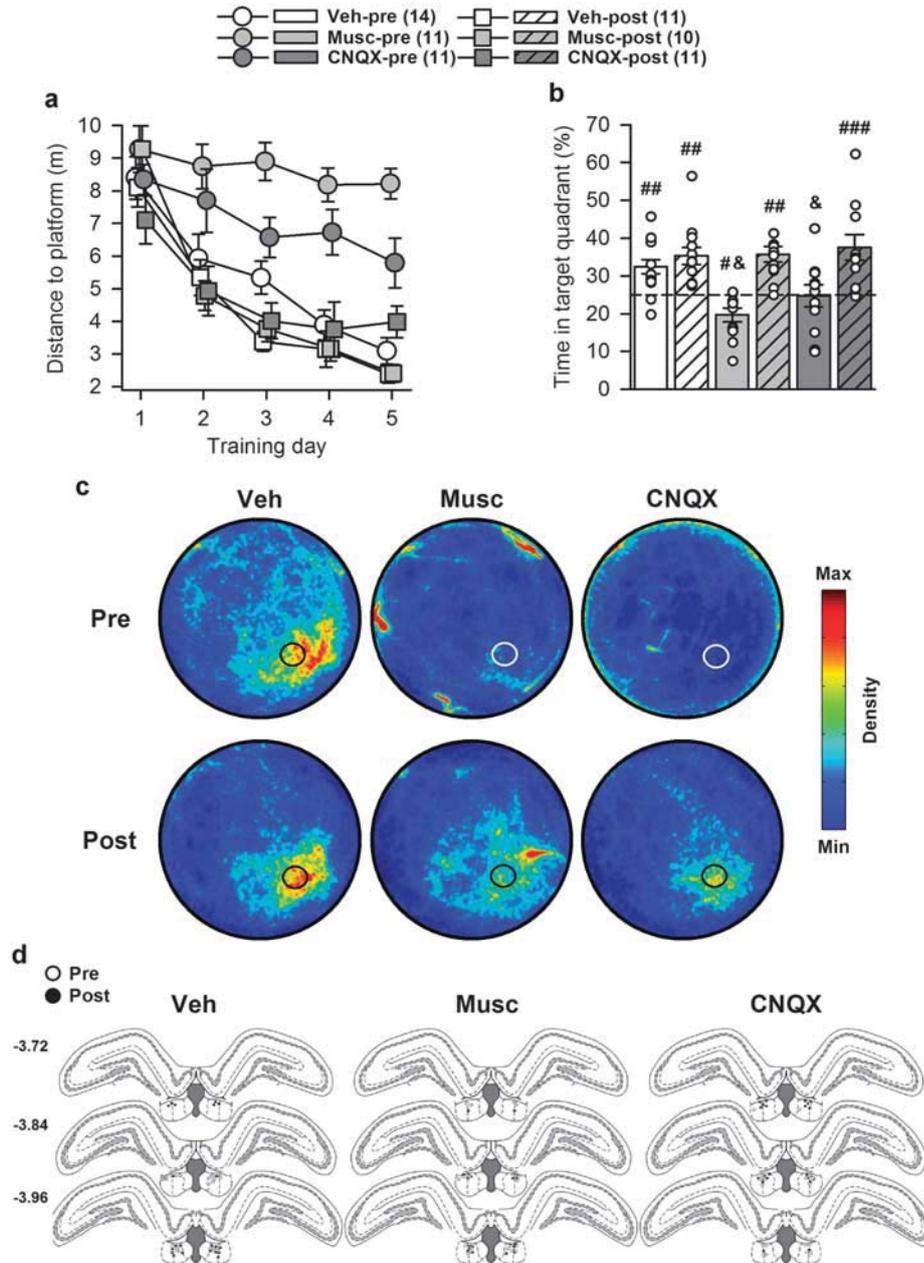


Figure 1 Water maze performance during experiment I. Numbers between brackets indicate group sizes. (a) Muscimol and CNQX impaired learning when injected before ('-pre' groups), but not after ('-post' groups), each training session, as evidenced by longer distance to reach the platform in Musc-pre and CNQX-pre rats. (b) This impaired learning was confirmed during the drug-free retention test, as Musc-pre and CNQX-pre rats performed below and at chance level (25% time spent in the target quadrant), respectively. White dots represent individual performance. Because of partial or complete overlap, the number of dots may be smaller than the total number of rats. (c) Density plots illustrating the water maze occupancy during the 60-sec retention test of all rats in each group. The color scale settings are identical for each group. The black or white circles represent the position of the platform during training. (d) Position of the infusion sites in each group according to treatments received before (Pre; white circle) or after (Post; black circles) each training session. Numbers on the left correspond to anteroposterior coordinates, in mm from Bregma. Statistics: $^{\&}p < 0.05$ vs all other groups; $^{\#}p < 0.05$, $^{##}p < 0.01$, $^{###}p < 0.001$ vs chance level. CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; Musc, muscimol; Veh, vehicle.

($t(8) = -0.72$, $p > 0.1$ and $t(10) = 1.09$, $p > 0.1$, respectively). Both drugs also increased thigmotaxis, whereas muscimol also decreased swim speed, and did not affect the amount of resting (see Supplementary Figure S3).

In summary, these data indicate that the LHb is involved in encoding, but not immediate post-training consolidation, and retrieval of spatial information. As indicated in the

Supplementary Information, microinjections of muscimol or CNQX had no effect on encoding or retrieval of spatial memory when infused into the hippocampal region immediately dorsal to the LHb (Supplementary Figure S4), into the thalamic regions immediately ventral to the LHb (Supplementary Figure S7), or into the adjacent ventricular region (Supplementary Figure S10). Therefore, the deficits

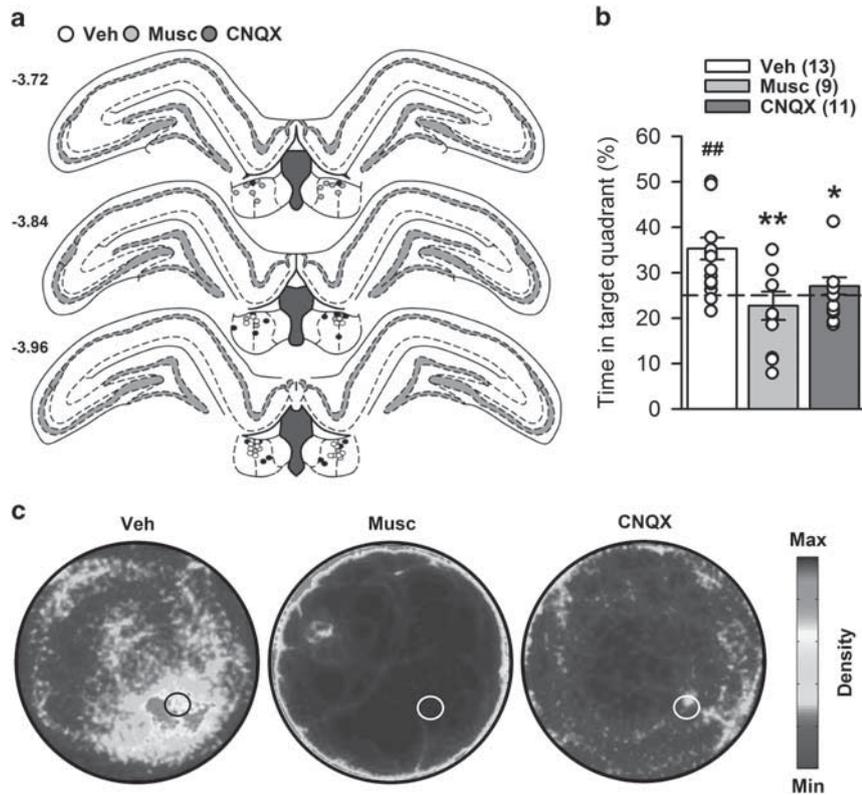


Figure 2 Water maze performance during experiment 2. Numbers between brackets indicate group sizes. (a) Position of the infusion sites in each group according to treatments received before the retention test (Veh, white circles; muscimol, light-gray circles; CNQX, dark-gray circles). Numbers on the left correspond to anteroposterior coordinates, in mm from Bregma. (b) Retention was impaired by both muscimol and CNQX infusion following a training under vehicle treatment. Whereas controls performed above chance level, muscimol- and CNQX-treated rats did not. White dots represent individual performance. Because of partial or complete overlap, the number of dots may be smaller than the total number of rats. (c) Density plots illustrating WM occupancy during the 60-sec retention test of all rats in each group. The color scale settings are identical for each group. The black or white circles represent the position of the platform during training. Statistics: ## $p < 0.01$, vs chance level; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs vehicle. CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; Musc, muscimol; Veh, vehicle.

seen after intra-LHb infusions are unlikely to be the consequences of the possible diffusion of the injected drugs to those surrounding structures.

Intra-LHb Muscimol, but not CNQX, Infusion Altered Performance in a Cued Version of the WM

Analysis of distance to platform showed a significant effect of group ($F(2,30) = 6.29$; $p < 0.01$), but no effect of trial ($F(3,90) = 1.50$; $p > 0.1$), and no interaction ($F(6,90) = 1.38$; $p > 0.1$) (Figure 3b). *Post hoc* analysis indicated that muscimol altered performance ($p < 0.01$ vs vehicle and CNQX), whereas CNQX did not ($p > 0.1$ vs vehicle) (Figure 3b inset). Analysis of the latency yielded identical results (Figure 3c). Analysis of resting time showed no effect of group ($F(2,30) = 1.74$; $p > 0.1$), a significant effect of trial ($F(3,90) = 10.63$; $p < 0.00001$), and no interaction ($F(6,90) = 1.43$; $p > 0.1$), suggesting that muscimol did not alter the motivation to swim (Figure 3d). Analysis of thigmotaxis showed a significant effect of group ($F(2,30) = 5.47$; $p < 0.01$) and trial ($F(3,90) = 3.65$; $p < 0.05$) and a significant interaction ($F(6,90) = 2.22$; $p < 0.05$) (Figure 3e); *post hoc* analysis indicated that muscimol-treated rats did significantly more thigmotaxis than controls ($p < 0.01$), whereas CNQX did not ($p > 0.1$) (Figure 3e inset). Analysis of swim speed showed a significant effect of group ($F(2,30) = 6.34$; $p < 0.01$), no effect of trial ($F(3,90) = 2.23$;

$p > 0.05$), and no interaction ($F(6,90) = 1.38$; $p > 0.1$) (Figure 3f); *post hoc* analysis indicated that both muscimol- and CNQX-treated rats were slower than controls ($p < 0.05$ for each comparison) (Figure 3f inset). Overall, these analyses suggest that although muscimol did not alter the motivation to swim it induced a greater thigmotaxis and a decreased speed; this could explain the increased distance and latency and suggest a decreased motivation to reach for an escape in the WM.

Intra-LHb Muscimol or CNQX Infusion Increased Locomotor Activity

There was no difference between groups during baseline recording ($F(2,35) = 2.67$; $p > 0.05$). Postinfusion analyses showed a significant effect of group ($F(2,35) = 43.88$; $p < 0.0001$) and time ($F(5,175) = 126.24$; $p < 0.0001$) and a significant interaction ($F(10,175) = 6.90$; $p < 0.0001$). *Post hoc* analysis of the group effect indicated that both CNQX and muscimol increased locomotor activity ($p < 0.001$ and $p < 0.001$ vs vehicle, respectively). Moreover, the activation was greater following muscimol ($p < 0.001$ vs CNQX) (Figure 4a). These results suggest that behavioral alterations seen in the WM experiments in muscimol- and CNQX-treated rats are unlikely to be the consequence of reduced behavioral activity.

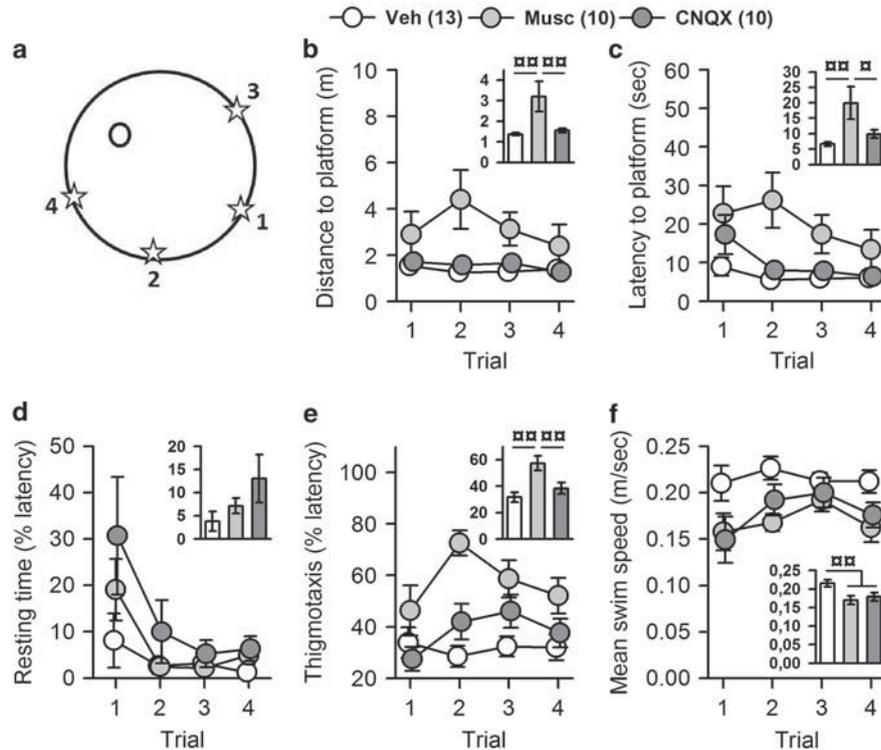


Figure 3 Performance during the cued version of the water maze. One vehicle-, one muscimol-, and one CNQX-treated rat were discarded from the analyses because of excessive resting ($>20\%$ of latency) throughout the session (mean of 22 s, 41.6 s and 20.5 s, respectively). Numbers between brackets indicate group sizes. (a) Representation of the platform position (black circle), and of the 4 start positions (stars) numbered in chronologic order. Only muscimol-treated rats showed deficits, evidenced by increased distance (b) and latency (c) to reach the visible platform. These increased distance and latency are unlikely to be due to a lack of motivation to swim as there were no differences in the amount of resting before reaching the platform (d). However, muscimol increased thigmotaxis (e) and, as also found with CNQX, decreased swim speed (f). Insets represent the mean performance of the 4 trials. Statistics: $\square p < 0.05$, $\square\square p < 0.01$. CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; Musc, muscimol; Veh, vehicle.

Intra-LHb Muscimol or CNQX Infusion Spared Sensorimotor Coordination

In the beam-walking test, both drugs spared sensorimotor coordination ($F(2,24) = 1.57$; $p > 0.1$) (Figure 4b), suggesting that impairments seen during WM experiments were unlikely to be the consequence of sensorimotor coordination deficits.

Intra-LHb Muscimol, but not CNQX, Infusion Produced Marked Anxiety in the EPM

In the EPM, there was a significant effect of group according to the number of visits and time in open arms ($F(2,27) = 8.87$; $p < 0.01$ and $F(2,27) = 7.39$; $p < 0.01$, respectively), and in closed arms ($F(2,27) = 6.55$; $p < 0.01$ and $F(2,27) = 7.15$; $p < 0.01$, respectively) (Figure 4c). *Post hoc* analyses indicated that only muscimol induced anxiety-like behavior, along with an overall decrease of activity ($p < 0.01$ vs vehicle and CNQX for each analysis). It is noteworthy that Gill *et al*, 2013 found no alteration of rats' behavior in the EPM following inactivation of the LHb. This discrepancy could result from the fact that these authors used a mixture of muscimol and baclofen; the latter might have profoundly affected the medial habenula where GABA-B receptors are densely localized (Charles *et al*, 2003). Finally, the consequences of muscimol infusion in the thalamic regions below the LHb have not yet

been investigated; therefore, it is possible that the muscimol-induced increased anxiety observed is partly owing to a diffusion of the drug in such an area. This issue will require further investigation. In conclusion, our results suggest that during WM experiments an increased anxiety could have participated in the induction of impairments following muscimol, but not CNQX, administration.

DISCUSSION

The present study demonstrates an involvement of the LHb in encoding and retrieval of spatial memory. The deficits observed cannot be the consequence of impaired sensorimotor coordination, as beam-walking scores were not affected by CNQX or muscimol, or of failures to produce movements as both drugs stimulated locomotion in the home-cage. Moreover, those deficits are unlikely to be attributed to the possible diffusion of the drugs to surrounding regions (Supplementary Figures S4).

The involvement of the LHb in spatial memory had previously been suggested by the findings that lesions of the habenular complex in rats altered learning and retrieval in the WM (Lecourtier *et al*, 2004). More recently, we showed that intra-LHb muscimol infusion in rats impaired the detection of object displacements in a familiar context, suggesting alterations in spatial configuration processing

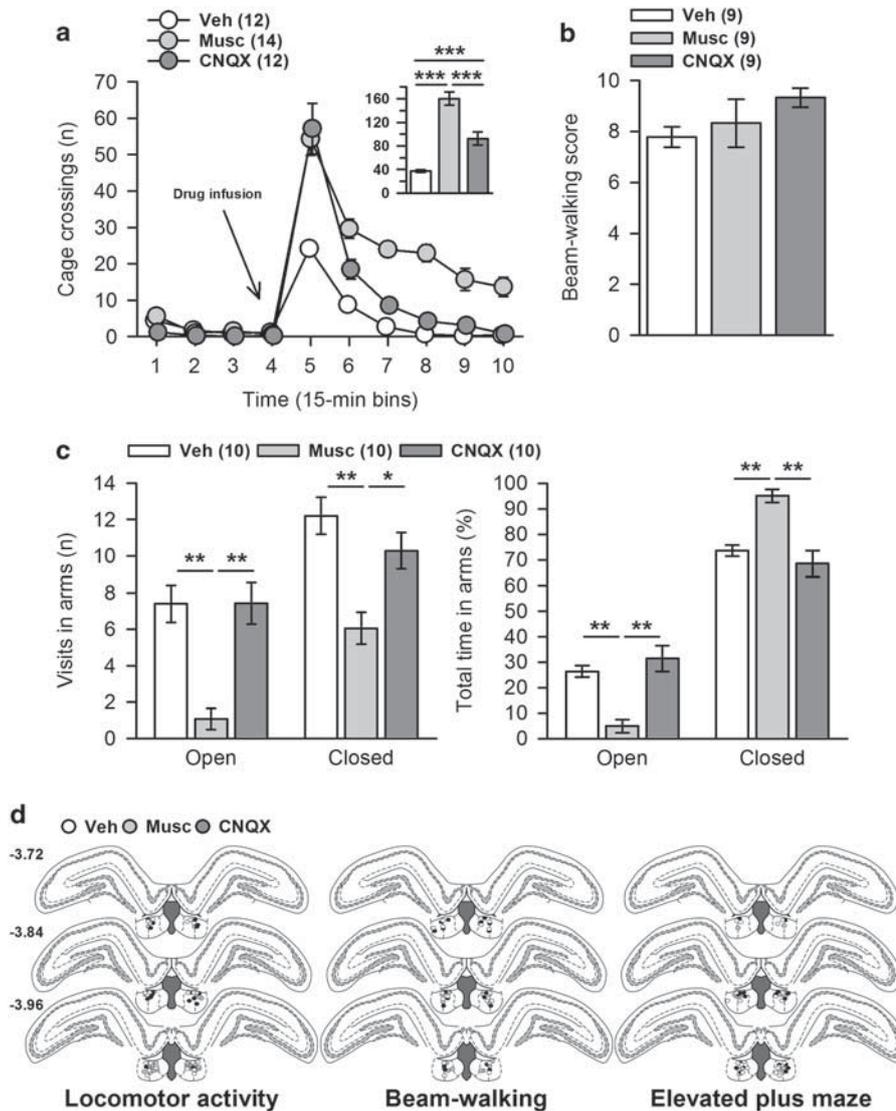


Figure 4 Additional behavioral controls included assessment of horizontal locomotor activity, sensorimotor coordination in the beam-walking test, and anxiety-like behavior in the elevated plus maze. These tests were performed in this order, using a 1-week rest delay between each, in order to progress from the less to the more anxiogenic one, and to limit possible inter-test biases. Each rat performed a maximum of 2 tests, treatment being counterbalanced between tests. Numbers between brackets indicate group sizes. (a) Both muscimol and CNQX induced a marked increase of locomotor activity, which lasted longer following muscimol; CNQX increased locomotion for 30 min ($p < 0.00001$ and $p < 0.05$ vs Veh for Bin5 for Bin6, respectively; $p > 0.1$ vs vehicle for all other Bins), whereas muscimol did so for the entire recording session ($p < 0.0001$ and $p < 0.01$ vs vehicle for Bins5–8 and Bins9–10, respectively). The inset illustrates the total post-infusion locomotor activity. (b) In the beam-walking test, both treatments spared sensorimotor coordination. (c) In the elevated plus-maze test, muscimol induced marked anxiety-like behavior. Whereas CNQX-treated rats behaved like controls, muscimol-treated rats were less active, as they made fewer visits to both arms (left), and spent less time in the open arms and more time in the closed arms (right). (d) Position of the infusion sites in each group according to treatments received before the retention test (vehicle, white circles; muscimol, light gray circles; CNQX, dark-gray circles). Numbers on the left correspond to anteroposterior coordinates, in mm from Bregma. Statistics: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; Musc, muscimol; Veh, vehicle.

(Goutagny *et al*, 2013). Memory formation and retrieval depend upon the HPC (D’Hooge and De Deyn, 2001), and more specifically upon the presence of theta oscillations within the dHPC (Düzel *et al*, 2010). A high degree of synchrony between Lhb and dHPC theta oscillations has recently been demonstrated (Aizawa *et al*, 2013b; Goutagny *et al*, 2013). Moreover, we have shown that spatial memory performance was positively correlated with theta coherence between the Lhb and the dHPC (Goutagny *et al*, 2013). As two regions are likely to exchange information when their oscillatory activity is synchronous (Fries, 2005), we propose that the Lhb and the HPC are specifically communicating during online processing

of spatial information, ie, during encoding, when relevant information is selected to be further memorized, and during retrieval, when an ongoing situation is compared with past experience. This proposal is consistent with a view considering theta oscillations as reflecting the online state of the HPC (Buzsáki, 2002). Thus, once spatial information has been selected by a network comprising the HPC and associated cortical and subcortical regions, it is communicated downstream to the Lhb, which might act as a relay of topdown information to midbrain monoaminergic and cholinergic systems, to further engage early processing of memory encoding and retrieval.

It is noteworthy that CNQX induced an increase in thigmotaxis. Thigmotaxis is the first strategy engaged by rodents when placed in the WM with no knowledge of the platform location (Devan *et al*, 1996). The fact that thigmotaxis is maintained to a high level in CNQX-treated rats strengthens the view that CNQX infusion before training prevented the rats from properly learning the platform location. The learning and memory deficits induced by CNQX strongly suggest that excitatory glutamatergic transmission to the LHb participates in encoding and retrieval of spatial information. One possible origin of glutamatergic inputs to the LHb is the prefrontal cortex, which sends projections to the LHb (Kim and Lee, 2012). Therefore, the hippocampocortical system, whose participation in memory processes has been clearly demonstrated (Winocur *et al*, 2010), could transmit relevant information to the LHb through the prefrontal cortex. Such information would be directly related to memory formation and retrieval (Cholvin *et al*, 2014) but also to other aspects of a spatial memory task, ie, understanding of the rule, behavioral flexibility, or attention (see reviews Dalley *et al*, 2004; Kesner and Churchwell, 2011).

If the consequences of intra-LHb CNQX infusion clearly point to learning and memory deficits, the effects of muscimol are more ambiguous. Muscimol also induced deficits in the cued version of the WM, which engages nonlearning mechanisms as the platform is made visible, as well as anxiety in the EPM. Such high level of anxiety in the EPM is of particular interest and might shed light on the deficits observed in the WM experiments following LHb inactivation, and therefore on the role of this structure during the WM paradigm. The WM paradigm engages rats to find a way to escape from a stressful situation. Therefore, our suggestion is that the LHb is not only involved in cognitive aspects but also emotional aspects of goal-directed behaviors and more particularly stress-coping mechanisms. Such a role for the LHb is consistent with the marked cellular response within the LHb during stressful situations (Chastrette *et al*, 1991; Cullinan *et al*, 1995; Duncan *et al*, 1996). Furthermore, the LHb modulates the monoaminergic systems involved in the stress response (Cabib and Puglisi-Allegra, 2012; Puglisi-Allegra and Andolina, 2014), as already shown for serotonin (Amat *et al*, 2001). One can postulate that the monoaminergic turn-over necessary to face a stressful event might not be efficiently engaged during WM testing upon inactivation of the LHb. The lack of deficits induced by CNQX in the EPM further suggests that the involvement of the LHb in stress-coping does not depend on AMPA-mediated mechanisms. Finally, the deficits induced by muscimol in the visible platform condition might suggest that muscimol-induced learning and memory deficits in the WM could be attributed to a decreased motivation for searching and climbing onto the platform. However, this appears rather unlikely. In our study, muscimol did not increase the amount of resting, suggesting an unaltered motivation to swim. In addition, LHb inactivation in animal models of depression results in an increased motivation to swim in the forced swim paradigm (Li *et al*, 2011; Nair *et al*, 2013).

In conclusion, the present study shows that blockade of LHb glutamatergic inputs impaired encoding and retrieval of spatial memory. Muscimol-induced LHb inactivation additionally produced anxiety in the EPM, deficits in the cued

version of the WM, as well as a marked increase of thigmotaxis. Our findings suggest that the LHb is likely to participate in online memory processes at both encoding and retrieval steps, and that this participation relies upon glutamatergic mechanisms. In addition, the behavioral phenotype induced by LHb inactivation confirms its implication not only in the cognitive aspects but also in the emotional aspects of goaldirected behaviors. This is likely to occur through the integration of topdown information from several macrosystems and its transmission to midbrain monoaminergic and cholinergic nuclei, such as proposed by Geisler and Trimble (2008). The LHb could then be viewed as a key structure involved in the elaboration of adapted cognitive and motor responses under stressful situations, such as that proposed by Okamoto *et al* (2012). Finally, our findings add to the view developed by Stopper and Floresco (2014) that the LHb has a key role in the elaboration of the more relevant behavioral strategy through the course of an action. They are in line with the idea developed by Hikosaka (2010) that the LHb is at the crossroad of cognitive and emotional processes.

FUNDING AND DISCLOSURE

This work was financed through the European community (ERA-NET Neuron SuppHab grant), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of Strasbourg and the French government (PhD fellowship to VM). The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Romain Goutagny for his help with the figures and O Bildstein, D Egesi, and G Edomwonyi for their assistance in animal care.

REFERENCES

- Aizawa H, Cui W, Tanaka K, Okamoto H (2013a). Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front Hum Neurosci* 7: 826.
- Aizawa H, Yanagihara S, Kobayashi M, Niisato K, Takekawa T, Harukuni R *et al* (2013b). The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33: 8909–8921.
- Amat J, Sparks PD, Matus-Amat P, Griggs J, Watkins LR, Maier SF (2001). The role of the habenular complex in the elevation of dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress. *Brain Res* 917: 118–126.
- Bast T, Silva BM, da, Morris RGM (2005). Distinct contributions of hippocampal NMDA and AMPA receptors to encoding and retrieval of one-trial place memory. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 25: 5845–5856.
- Belzung C, Willner P, Philippot P (2015). Depression: from psychopathology to pathophysiology. *Curr Opin Neurobiol* 30: 24–30.
- Bernard R, Veh RW (2012). Individual neurons in the rat lateral habenular complex project mostly to the dopaminergic ventral tegmental area or to the serotonergic raphe nuclei. *J Comp Neurol* 520: 2545–2558.
- Bromberg-Martin ES, Hikosaka O (2011). Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nat Neurosci* 14: 1209–1216.

- Buzsáki G (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* **33**: 325–340.
- Cabib S, Puglisi-Allegra S (2012). The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neurosci Biobehav Rev* **36**: 79–89.
- Charles KJ, Calver AR, Jourdain S, Pangalos MN (2003). Distribution of a GABAB-like receptor protein in the rat central nervous system. *Brain Res* **989**: 135–146.
- Chastrette N, Pfaff DW, Gibbs RB (1991). Effects of daytime and nighttime stress on Fos-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, the habenula, and the posterior paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Res* **563**: 339–344.
- Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Herbeaux K, de Vasconcelos AP et al (2014). Dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex each contribute to the retrieval of a recent spatial memory in rats. *Brain Struct Funct* (in press).
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* **64**: 477–505.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* **28**: 771–784.
- Devan BD, Goad EH, Petri HL (1996). Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem* **66**: 305–323.
- D’Hooge R, De Deyn PP (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* **36**: 60–90.
- Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* **713**: 79–91.
- Düzel E, Penny WD, Burgess N (2010). Brain oscillations and memory. *Curr Opin Neurobiol* **20**: 143–149.
- Fries P (2005). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci* **9**: 474–480.
- Geisler S, Trimble M (2008). The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr* **13**: 484–489.
- Gill MJ, Ghee SM, Harper SM, See RE (2013). Inactivation of the lateral habenula reduces anxiogenic behavior and cocaine seeking under conditions of heightened stress. *Pharmacol Biochem Behav* **111**: 24–29.
- Goutagny R, Loureiro M, Jackson J, Chaumont J, Williams S, Isopé P et al (2013). Interactions between the lateral habenula and the hippocampus: implication for spatial memory processes. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* **38**: 2418–2426.
- Hikosaka O (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* **11**: 503–513.
- Hikosaka O, Sesack SR, Lecourtier L, Shepard PD (2008). Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **28**: 11825–11829.
- Hnasko TS, Hjelmstad GO, Fields HL, Edwards RH (2012). Ventral Tegmental Area Glutamate Neurons: Electrophysiological Properties and Projections. *J Neurosci* **32**: 15076–15085.
- Ji H, Shepard PD (2007). Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **27**: 6923–6930.
- Kesner RP, Churchwell JC (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol Learn Mem* **96**: 417–431.
- Kim U, Lee T (2012). Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat. *Eur J Neurosci* **35**: 1253–1269.
- Lecca S, Meye FJ, Mamei M (2014). The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur J Neurosci* **39**: 1170–1178.
- Lecourtier L, Neijt HC, Kelly PH (2004). Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur J Neurosci* **19**: 2551–2560.
- Lecourtier L, de Vasconcelos AP, Leroux E, Cosquer B, Geiger K, Lithfous S et al (2011). Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: sequential implication of GABAergic and cholinergic neurons. *Hippocampus* **21**: 1277–1289.
- Li B, Piriz J, Mirrione M, Chung C, Proulx CD, Schulz D et al (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* **470**: 535–539.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* **447**: 1111–1115.
- Matsumoto M, Hikosaka O (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat Neurosci* **12**: 77–84.
- Nair SG, Strand NS, Neumaier JF (2013). DREADDing the lateral habenula: a review of methodological approaches for studying lateral habenula function. *Brain Res* **1511**: 93–101.
- Nilsson OG, Kalen P, Rosengren E, Björklund A (1990). Acetylcholine release in the rat hippocampus as studied by microdialysis is dependent on axonal impulse flow and increases during behavioural activation. *Neuroscience* **36**: 325–338.
- Okamoto H, Agetsuma M, Aizawa H (2012). Genetic dissection of the zebrafish habenula, a possible switching board for selection of behavioral strategy to cope with fear and anxiety. *Dev Neurobiol* **72**: 386–394.
- Puglisi-Allegra S, Andolina D (2014). Serotonin and stress coping. *Behav Brain Res* **277**: 58–67.
- Sartorius A, Henn FA (2007). Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. *Med Hypotheses* **69**: 1305–1308.
- Shabel SJ, Proulx CD, Trias A, Murphy RT, Malinow R (2012). Input to the Lateral Habenula from the Basal Ganglia Is Excitatory, Aversive, and Suppressed by Serotonin. *Neuron* **74**: 475–481.
- Shumake J, Ilango A, Scheich H, Wetzel W, Ohl FW (2010). Differential neuromodulation of acquisition and retrieval of avoidance learning by the lateral habenula and ventral tegmental area. *J Neurosci* **30**: 5876–5883.
- Stopper CM, Floresco SB (2014). What’s better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci* **17**: 33–35.
- Trivedi MH, Greer TL (2014). Cognitive dysfunction in unipolar depression: implications for treatment. *J Affect Disord* **152-154**: 19–27.
- Wang RY, Aghajanian GK (1977). Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science* **197**: 89–91.
- Winocur G, Moscovitch M, Bontempi B (2010). Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* **48**: 2339–2356.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

1 **SUPPLEMENTARY INFORMATION**

2 The supplementary information is organized as follows:

3 In section **(A)** are included analyses of experiments involving the LHb. In **Part 1** are
4 included all analyses justifying the pooling of both control groups (Veh) for each
5 experiment. In **Part 2** are included analyses of data regarding the two water maze
6 experiments, which have not been presented in the manuscript: the latency to the platform,
7 the amount of thigmotaxis, the swim speed, the resting time, both during training and
8 during the retention tests, the latters also including analyses of the number of crossings
9 and of the total distance swum.

10 In section **(B)** are included supplementary materials and methods and analyses
11 concerning control experiments designed to assess if the memory deficits seen in LHb-
12 treated animals were not the consequence of alteration in surrounding structures due to
13 the spreading of the drugs during the infusions. In **Part 1** are included data concerning the
14 *dorsal hippocampus*, in **Part 2** data concerning the *thalamic region*, and in **Part 3** data
15 concerning the *ventricular region*.

16

1

2 **A. ANALYSES OF PERFORMANCE IN EXPERIMENTS INVOLVING THE Lhb**

3 **Part 1: Analyses of performance of control groups of the two drugs of the different** 4 **experiments which justify their pooling in a single Veh group**

5 **Water maze, experiment 1**

6 Control rats from drug-treated animals injected prior to each training session (encoding):
7 analyses of distance and latency to platform in controls of Musc-pre and CNQX-pre rats
8 showed comparable performance: there was no effect of Group ($F(1,12)=0.87$; $p>0.1$ and
9 $F(1,12)=0.02$; $p>0.1$ respectively), a significant effect of Training day ($F(4,48)=14.35$;
10 $p<0.0001$ and $F(4,48)=12.52$; $p<0.0001$ respectively) and no significant interaction
11 ($F(4,48)=0.53$; $p>0.1$ and $F(4,48)=0.51$; $p>0.1$ respectively). Therefore, both control groups
12 have been pooled in a single group named Veh-pre.

13 Control rats from drug-treated animals injected following each training session
14 (consolidation): analyses of distance and latency to platform in controls of Musc-post and
15 CNQX-post rats showed comparable performance: there was no effect of Group
16 ($F(1,9)=0.01$; $p>0.1$ and $F(1,9)=0.13$; $p>0.1$ respectively), a significant effect of Training
17 day ($F(4,36)=24.59$; $p<0.0001$ and $F(4,36)=23.25$; $p<0.0001$ respectively) and no
18 significant interaction ($F(4,36)=0.89$; $p>0.1$ and $F(4,36)=0.72$; $p>0.1$ respectively).
19 Therefore, both control groups have been pooled in a single group named Veh-post.

20 **Water maze, experiment 2**

21 Control rats from drug-treated animals injected prior to the retention test following a drug-
22 free training (retrieval): analyses of distance and latency to platform in controls of
23 muscimol- and CNQX-treated rats showed comparable performance: there was no effect
24 of Group ($F(1,11)=0.01$; $p>0.1$ and $F(1,11)=0.08$; $p>0.1$ respectively), a significant effect of
25 Training day ($F(4,44)=12.36$; $p<0.0001$ and $F(4,44)=9.86$; $p<0.0001$ respectively) and no
26 significant interaction ($F(4,44)=2.01$; $p>0.1$ and $F(4,44)=1.22$; $p>0.1$ respectively).
27 Therefore, both control groups have been pooled in a single group, i.e., Veh.

28 **Locomotor activity**

29 Analyses of pre-infusion activity (Bins1-4) in controls of muscimol - and CNQX-treated rats
30 showed comparable performance: there was no effect of Group ($F(1,10)=1.94$; $p>0.1$), no
31 significant effect of Time ($F(3,30)=2.63$; $p>0.1$) and no significant interaction
32 ($F(3,30)=0.03$; $p>0.1$). Analyses of post-infusion activity (Bins6-10) in the same rats also
33 showed comparable performance levels: there was no effect of Group ($F(1,10)=0.11$;
34 $p>0.1$), a significant effect of Time ($F(5,50)=77.07$; $p<0.0001$) and no significant interaction
35 ($F(5,50)=0.61$; $p>0.1$). Therefore, both control groups have been pooled in a single group,
36 i.e., Veh.

37 **Beam-walking test**

1 Analyses of the score in controls of muscimol- and CNQX-treated rats showed comparable
2 performance: there was no effect of Group ($F(1,7)=0.22$; $p>0.1$). As control rats from both
3 drug treatments had comparable performance, they have been pooled in a single group
4 (Veh).

5 **Elevated plus-maze test**

6 Analyses of the time spent in open and closed arms in control groups of muscimol and
7 CNQX showed comparable performance: there was no effect of Group ($F(1,8)=1.48$; $p>0.1$
8 and $F(1,8)=1.31$; $p>0.1$ respectively). Therefore, both control groups have been pooled in
9 a single group, i.e., Veh.

10 Remark: it is noteworthy that the pooling of both control groups of each drug treatment in
11 the different experiments did not result in statistically significant effects that were absent
12 when the analyses considered both groups separately.

13 **Part 2: Additional analyses of water maze experiments**

14 **Experiment 1**

15 Results are shown in **Figure S1**.

16 **Training**

17 *Latency to platform (Figure S1a)*: there was a significant effect of Group ($F(5,62)=31.86$;
18 $p<0.0001$), of Training day ($F(4,248)=24.86$; $p<0.0001$) and a significant interaction
19 ($F(20,248)=2.69$; $p<0.001$). *Post hoc* analysis showed that Musc-pre and CNQX-pre rats
20 took longer to find the platform than rats from the other groups ($p<0.001$ for each
21 comparison).

22 *Thigmotaxis (Figure S1b)*: there was a significant effect of Group ($F(5,62)=42.29$;
23 $p<0.0001$), of Training day ($F(4,248)=10.25$; $p<0.0001$), and the interaction tended
24 towards significance ($F(20,248)=1.58$; $p=0.062$). *Post hoc* analysis showed that Musc-pre
25 and CNQX-pre rats exhibited more thigmotaxis than those of the four other groups ($p<0.01$
26 for each comparison). The difference between Musc-pre and CNQX-pre rats was also
27 significant ($p<0.001$).

28 *Swim speed (Figure S1c)*: there was a significant Group effect ($F(5,62)=9.12$; $p<0.0001$),
29 no Training day effect ($F(4,248)=0.61$; $p>0.1$) and a significant interaction
30 ($F(20,2484)=2.95$; $p<0.0001$). *Post hoc* analysis showed that Musc-pre rats were slower
31 than rats from all other groups ($p<0.01$ for each comparison, except with CNQX-pre,
32 $p<0.05$).

33 *Resting time (Figure S1d)*: there was no significant Group effect ($F(5,62)=1.81$; $p>0.1$), a
34 significant Training day effect ($F(4,248)=3.15$; $p<0.05$), and a significant interaction
35 ($F(20,248)=3.13$; $p<0.0001$). *Post hoc* analysis showed that, on day 5, CNQX-pre rats
36 exhibited more resting than in the five other groups ($p<0.0001$ for all comparisons). This
37 difference remains unexplained.

1

2

3 **Retention test**

4 *Crossings (Figure S1e)*: there was a significant effect of Group ($F(5,62)=8.02$; $p<0.0001$).
5 *Post hoc* analysis showed that Musc-pre and CNQX-pre crossed the platform area less
6 frequently than in the four other groups ($p<0.05$ at least for each comparison).

7 *Thigmotaxis (Figure S1f)*: there was a significant effect of Group ($F(5,62)=14.98$;
8 $p<0.0001$). *Post hoc* analysis showed significant differences between Musc-pre or CNQX-
9 pre and the four other groups ($p<0.05$ at least for each comparisons). The difference
10 between Musc-pre and CNQX-pre rats was also significant ($p<0.01$). These analyses
11 indicate that both treatments, which impaired learning when administered before training,
12 resulted in a marked increase of thigmotaxis during the subsequent drug-free retention
13 test, confirming the lack of learning. Moreover, thigmotaxis was exacerbated in muscimol-
14 treated rats as compared to the two other groups, suggesting even more profound
15 alterations after Muscimol infusions.

16 *Swim speed (Figure S1g)*: there was a significant effect of Group ($F(5,62)=3.54$; $p<0.01$).
17 *Post hoc* analysis showed that CNQX-pre rats swam slower than in the five other groups
18 ($p<0.05$ at least for each comparison).

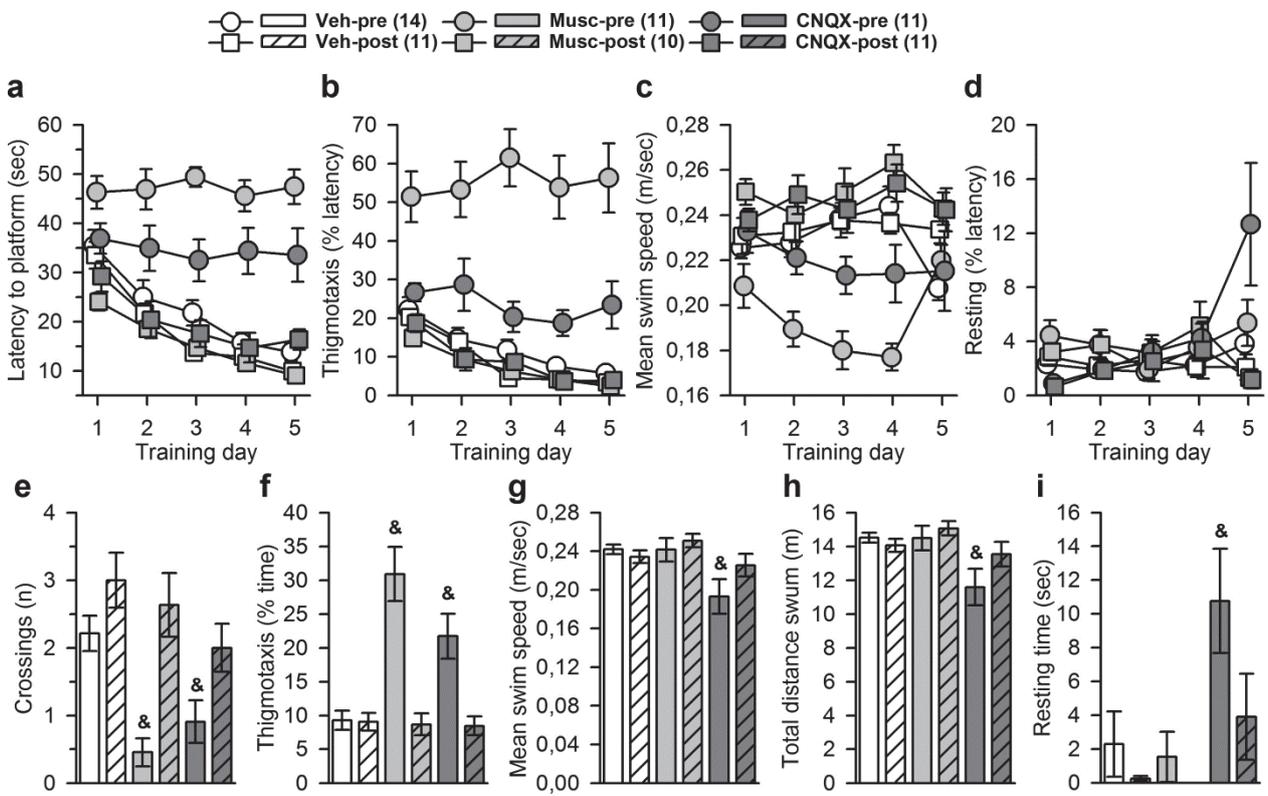
19 *Distance swum (Figure S1h)*: there was a significant effect of Group ($F(5,62)=3.55$;
20 $p<0.01$). *Post hoc* analysis showed that CNQX-pre swam a shorter distance than in the
21 five other groups ($p<0.05$ at least for each comparison).

22 *Resting time (Figure S1i)*: there was a significant effect of Group ($F(5,62)=4.02$; $p<0.01$).
23 *Post hoc* analysis showed that CNQX-pre rats did more resting than in the five other
24 groups ($p<0.05$ at least for each comparison).

25 Overall these results indicate that, when CNQX or muscimol was infused into the LHb
26 before training, it induced increased thigmotaxis. Muscimol also decreased swimming
27 speed. Moreover, during the subsequent drug-free retention test, while both drug-groups
28 still showed more thigmotaxis, speed was decreased in rats that were given CNQX during
29 training. Muscimol did not alter the amount of resting during both training and drug-free
30 retention test, but CNQX infusions during training resulted in more resting during the
31 retention test. These effects might suggest two types of disturbances induced by the
32 drugs. Thigmotaxis in the water maze is often considered a correlate of memory
33 impairments: animals spend most of their time swimming along the edge of the pool in a
34 stereotypic manner because they do not know about a possible escape. It can also
35 demonstrate an exacerbated stress induced by the anxiogenic aspect of the task, either
36 independently or as a possible consequence of impaired learning/memory. The results
37 obtained in the elevated plus-maze test suggest that muscimol administration induced
38 marked anxiety per se, which could have worsened the cognitive deficits. Therefore, the
39 larger deficit found in Musc-pre rats (i.e., an impaired learning accompanied by thigmotaxis

1 larger than in CNQX-pre rats) could reflect a lack of coping with the stressful situation, in
 2 addition to the absence of learning.

3



4

5 **Figure S1.** Additional analyses of performances in the water maze in Experiment 1. Numbers
 6 between brackets indicate group sizes. **Training:** both muscimol and CNQX infusion increased
 7 latency to reach the platform (a) as well as the amount of thigmotaxis, an increase that was
 8 exacerbated in muscimol-treated animals (b); (c) only Musc-pre rats had a slower swim speed as
 9 compared to all other groups. CNQX-treated rats swam slower than CNQX-post and Musc-post
 10 rats; (d) overall neither treatment increased resting, except for CNQX-pre on day 5. **Retention**
 11 **test:** (e) the number of crossings mirrored the amount of time spent in the target quadrant, as
 12 CNQX-pre and Musc-pre made fewer crossings than all other group; (f) both Musc-pre and CNQX-
 13 pre rats exhibited more thigmotaxis, but only CNQX-pre rats swam slower (g), over a shorter
 14 distance (h) and made more resting (i) than all other groups. Statistics: & $p < 0.05$, && $p < 0.01$,
 15 &&& $p < 0.001$ vs all other groups. Abbreviations: Musc, muscimol; Veh, vehicle.

16 Experiment 2

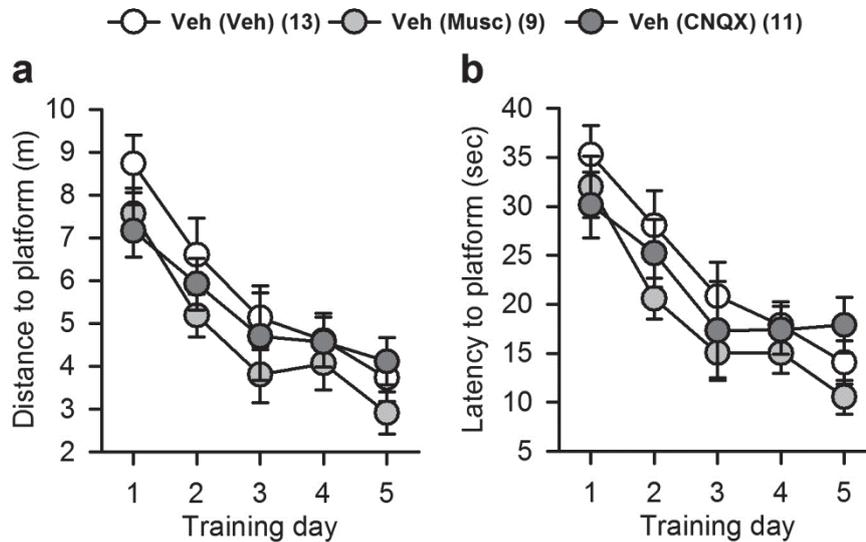
17 Results are shown in **Figure S2** and **Figure S3**.

18 Training

19 Treatment groups of the retention test were composed according to training performances.
 20 Therefore, there was no Group effect on distance (**Figure S2a**) and latency (**Figure S2b**)
 21 to platform ($F(2,32)=2.40$; $p > 0.1$ and $F(2,32)=2.05$; $p > 0.1$ respectively). We found an effect
 22 of Training day ($F(4,128)=26.23$; $p < 0.0001$ and $F(4,128)=19.99$; $p < 0.0001$ respectively)
 23 and, logically, there was no significant interaction ($F(8,128)=1.20$; $p > 0.1$ and

1 $F(8,128)=1.04$; $p>0.1$ respectively). These analyses confirm that all groups showed similar
2 training performance and indicate that the effects induced by the drug treatments infused
3 before the retention test cannot be attributed to biases resulting from learning biases.

4



5

6 **Figure S2.** Training performance of the 3 groups used in Experiment 2. Numbers between
7 brackets indicate group sizes. The three groups had similar training performances according to
8 distance (a) and latency (b) to reach the hidden platform. Abbreviations: Musc, muscimol; Veh,
9 vehicle.

10 Retention test

11 Results are presented in **Figure S3**.

12 **Crossings (Figure S3a):** there was a significant effect of Group ($F(2,30)=6.91$; $p<0.01$).
13 *Post hoc* analysis showed that muscimol and CNQX rats crossed the platform area less
14 frequently than controls ($p<0.001$ and $p<0.05$ vs. Veh, respectively), confirming their
15 absence of recall of the platform location.

16 **Thigmotaxis (Figure S3b):** there was a significant effect of Group ($F(2,30)=41.52$;
17 $p<0.0001$). *Post hoc* analysis showed significant differences between either muscimol- or
18 CNQX-treated rats and controls ($p<0.001$ vs Veh for each comparison). The difference
19 between muscimol and CNQX rats was also significant ($p<0.001$), showing that
20 thigmotaxis was exacerbated by muscimol treatment.

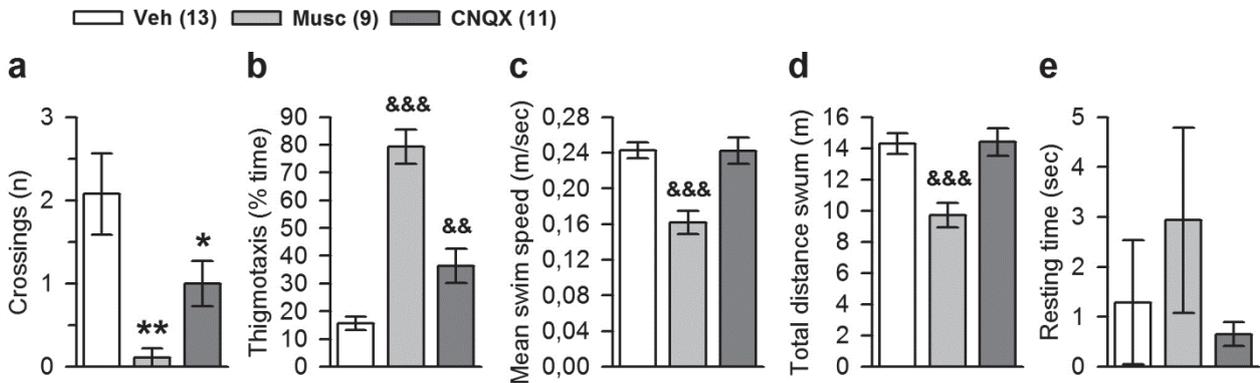
21 **Swim speed (Figure S3c):** there was a significant effect of Group ($F(2,30)=13.24$;
22 $p<0.0001$). *Post hoc* analysis showed that muscimol-treated rats were slower than in the
23 two other groups ($p<0.001$ for each comparison).

24 **Distance swum (Figure S3d):** there was a significant effect of Group ($F(2,30)=10.39$;
25 $p<0.0001$). *Post hoc* analysis showed that muscimol-treated rats swam a shorter distance
26 than in the two other groups ($p<0.001$ for each comparison).

1 *Resting time (Figure S3e)*: there was no significant Group effect ($F(2,30)=0.47$; $p>0.1$),
2 indicating that none of the treatments altered the motivation to swim.

3

4



5

6 **Figure S3.** Additional analyses of performance in the retention test of the water maze, Experiment
7 2. Numbers between brackets indicate group sizes. (a) The fewer numbers of crossings of CNQX
8 and muscimol rats showed the poor knowledge of the platform location and confirmed the results
9 of the amount of time spent in the target quadrant. (b) Drug infusions induced an increased
10 thigmotaxis, which was exacerbated in muscimol-treated rats as compared to their CNQX-infused
11 counterparts. (c) Only muscimol-treated rats swam slower and (d) over a shorter distance. (e)
12 Resting time was similar in all groups. Statistics: && $p<0.01$, &&& $p<0.001$ vs the two other groups;
13 * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs Veh. Abbreviations: Musc, muscimol; Veh, vehicle.

14 Overall, these results show that besides memory impairments, intra-LHb muscimol and
15 CNQX infusions induced a higher amount of thigmotaxis. Moreover, muscimol
16 administration induced a decreased swim speed.

17

18

19

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

B. SUPPLEMENTARY MATERIALS, METHODS AND RESULTS

In the present study we controlled for possible biases due to the spread of the drugs, while injected in the LHb, to surrounding structures. Those structures include the dorsal hippocampus (dHPC), which is a crucial structure in spatial reference memory processing in rodents, the underlying thalamic region and the third ventricle.

Animals were subjected to the same surgical procedures as already described, except when specified. According to dHPC, guide cannulae were implanted, in 30 rats, at the following coordinates (in mm): AP, -3.9 from Bregma; ML, ± 0.7 ; DV, -2.6 from dura. According to the thalamic region, guide cannulae were implanted, in 30 rats, at the following coordinates (in mm): AP, -3.7 from Bregma; ML, ± 0.7 ; DV, -4.9 from dura. In those animals the guides were implanted at the infusion site so that the infusion cannulae did not protrude from them when inserted. According to the ventricular region, only one guide cannula was implanted, in 30 rats, at the following coordinates (in mm): AP, -3.9 from Bregma; ML, ± 0.8 ; DV, -3.3 from dura with a 10° angle. Rats were implanted on the left side. For all experiments, infusion protocols were identical to those used when drugs were infused within the LHb:

For ethical reasons, in doing those control experiments we made our best to keep the number of rats used at a reasonably low level. According to dHPC, we decided not to assess the effects of drug infusions on encoding performance of the hidden platform version of the water maze. We reasoned that the dHPC is as important in the encoding as in the retrieval of spatial information. Thus, if dHPC infusion had no effects on encoding, ruling out the possibility that spread to the overlying HPC in LHb-injected rats might have explained the observed deficits, it became inappropriate to pursue in this direction with an extra experiment assessing retrieval. According to the underlying thalamic region, we decided to assess the effects of drug infusions on retrieval performance of the hidden platform version of the water maze; the reason is that, although this region has not been shown to play a fundamental role in spatial reference memory processing (see review Mitchell and Chakraborty, 2013), few studies have suggested a role in retrieval but not encoding of spatial memory for the mediodorsal nucleus (e.g., Kolb et al., 1982) which is included in this thalamic region. According to the ventricular region, we also assessed retrieval, based on the assumption that if no deficits could be evidenced during retrieval, this infusion would therefore not lead to encoding deficits.

Finally, for all experiments, such as for the experiments including drug infusions in the LHb, both control groups have been pooled in a single vehicle ("Veh") group, after it was checked and confirmed that their performance did not differ statistically (data and analyses not shown).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

PART 1: Consequences of intra-dHPC muscimol and CNQX infusion

Intra-dHPC infusion of muscimol or CNQX before each training session in the hidden-platform version of the water maze did not prevent learning

Results are presented in **Figure S4** and **Figure S5**.

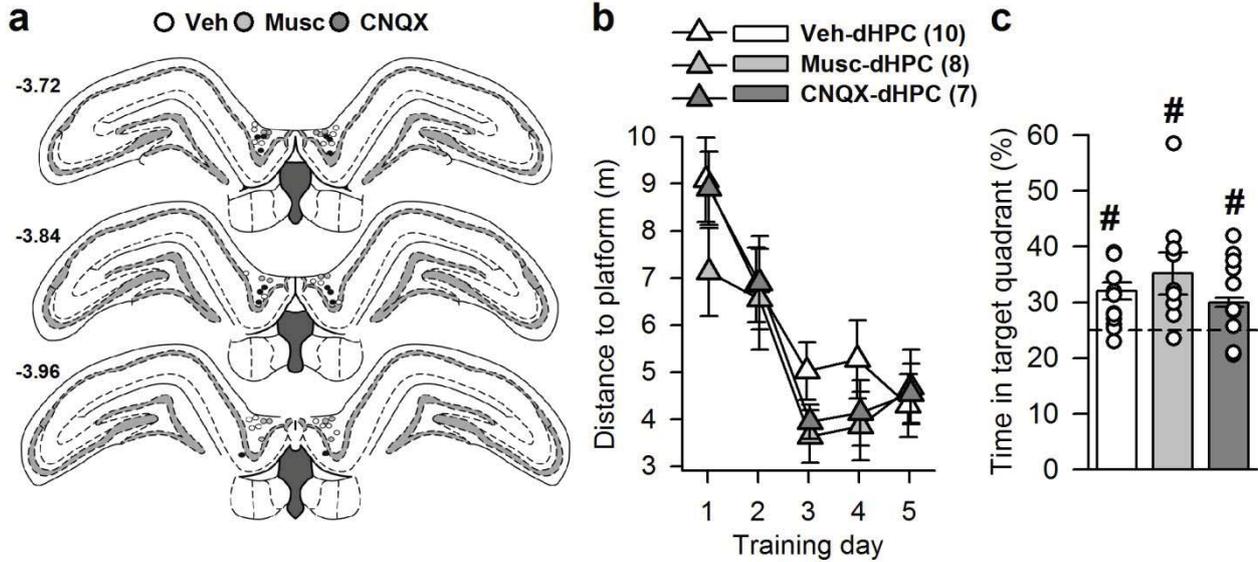
Training

Neither treatment impaired training performance as shown by the analyses of Distance (**Figure S4a**) and Latency (**Figure S5a**) to platform. There was no effect of Group ($F(2,22)=1.34$; $p>0.1$ and $F(2,22)=1.84$; $p>0.1$ respectively), a significant effect of Training Day ($F(4,88)=11.12$; $p<0.0001$ and $F(4,88)=10.87$; $p<0.0001$ respectively) and no interaction ($F(8,88)=1.19$; $p>0.1$ and $F(8,88)=1.04$; $p>0.1$ respectively). Analysis of Thigmotaxis (**Figure S5b**) yielded similar results, i.e., no effect of Group ($F(2,22)=3.08$; $p>0.05$), a significant effect of Training Day ($F(4,88)=11.91$; $p<0.0001$) and no interaction ($F(8,88)=1.11$; $p>0.1$). On Swim speed (**Figure S5c**), there was no effect Group ($F(2,22)=0.60$; $p>0.1$), no effect of Training Day ($F(4,88)=2.08$; $p>0.05$) and no interaction ($F(8,88)=0.59$; $p>0.1$). Finally, the analysis of Resting time (**Figure S5d**) showed no effect of Group ($F(2,22)=0.50$; $p>0.1$), no effect of Training Day ($F(4,88)=1.58$; $p>0.1$) and no interaction ($F(8,88)=1.76$; $p>0.1$). These analyses demonstrated that none of the treatments affected behavioral strategies or motivation to swim.

Retention test

Analysis of the Time spent in the target quadrant (**Figure S4b**) showed no effect of Group ($F(2,22)=0.93$; $p>0.1$). Neither drug prevented memory formation. Indeed, all groups performed above chance level: Veh ($t(9)=4.08$, $p<0.01$), muscimol ($t(7)=2.66$, $p<0.05$), CNQX ($t(6)=5.42$, $p<0.001$). Analysis of Crossings (**Figure S5e**) yielded similar results: there was no Group effect ($F(2,22)=1.74$; $p>0.1$). Analyses of Distance swum (**Figure S5f**), Thigmotaxis (**Figure S5j**), Swim speed (**Figure S5h**) and Resting time (**Figure S5i**) showed no effect of Group ($F(2,22)=0.35$; $p>0.1$, $F(2,22)=2.72$; $p>0.05$, $F(2,22)=0.27$; $p>0.1$, $F(2,22)=1.65$; $p>0.1$ respectively). Therefore, it can be concluded that neither treatment impaired the motivation to swim and search for the platform.

1



2

3 **Figure S4.** Performance in the water maze experiment. Numbers between brackets indicate group
4 sizes. (a) Position of infusion sites in each group according to treatments received (Veh, white
5 circles; muscimol, light-grey circles; CNQX, dark-grey circles). Numbers correspond to mm from
6 Bregma. (b) Drug infusions did not impair learning as shown by identical overall distance to the
7 platform throughout training. (c) This unaffected learning became evident during the retention test
8 when all groups performed above chance level ($^{\#}p < 0.05$ vs chance level; 25% in target quadrant).
9 White dots represent individual performance; note that, due to partial or complete overlap, the
10 number of dots is smaller than the total number of rats. (d) Density plot representation of WM
11 occupancy during the retention test including all rats in each group; the black or white circles
12 represent the position of the platform during training. Abbreviations: dHPC, dorsal hippocampus;
13 Musc, muscimol; Veh, vehicle.

14

15

16

17

18

19

20

21

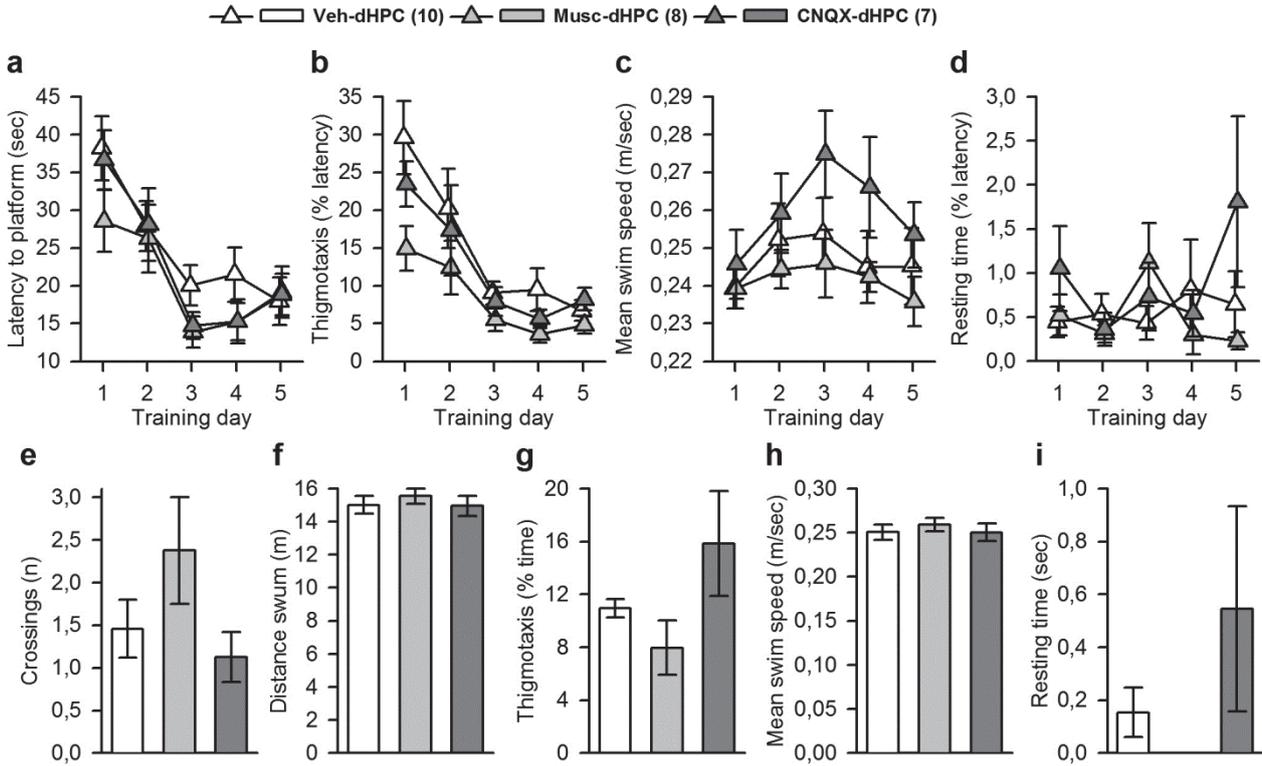
22

23

24

25

1



2

3 **Figure S5.** Additional analyses of performance in the water maze experiment. Numbers between
4 brackets indicate group sizes. *Training:* there were no differences according to all parameters
5 considered, i.e., latency to platform (a), thigmotaxis (b), swim speed (c) and resting time (d).
6 *Retention test:* there were no differences according to all parameters considered, i.e., the number
7 of crossings (e), the distance swum (f), the amount of thigmotaxis (g), the swim speed (h), and the
8 amount of resting (i). Abbreviations: dHPC, dorsal hippocampus; Musc, muscimol; Veh, vehicle.

9 Overall, these analyses suggest that, during the experiments including LHb inactivation, if
10 part of the injected drugs had spread to the overlying HPC, such spreading did not account
11 for the memory impairments observed. Indeed, none of the deficits observed following
12 intra-LHb drug infusions could be reproduced by infusion of the drugs directly in the
13 overlying dHPC.

14

15

1

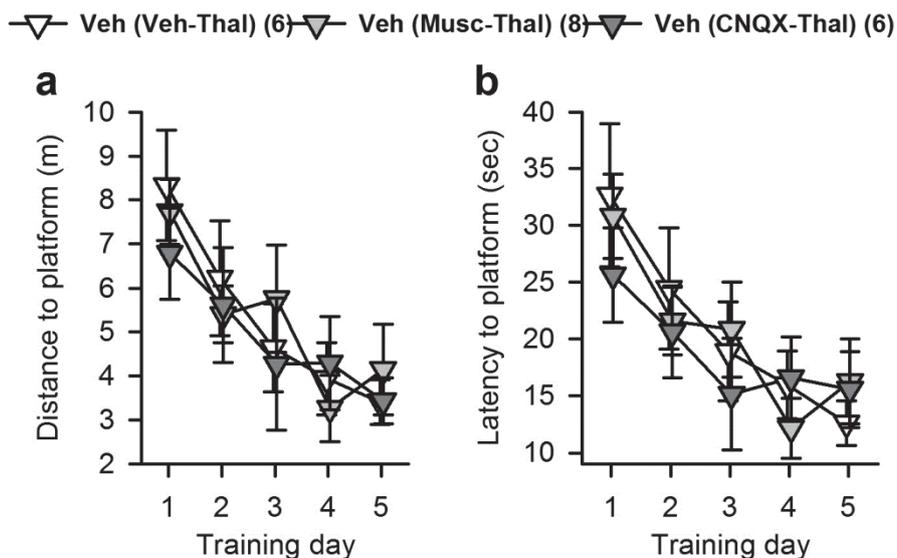
2 **PART 2: Consequences of intra-thalamic muscimol or CNQX infusion**

3 **Intra-thalamic infusion of muscimol or CNQX before the retention test in the hidden-**
4 **platform version of the water maze, following a drug-free training, did not prevent**
5 **memory retrieval**

6 **Training**

7 Results are presented in **Figure S6**.

8 Treatment groups for the retention test were composed so that there were no differences
9 according to training performance. Indeed, the analyses of Distance (**Figure S6a**) and
10 Latency (**Figure S6b**) to platform showed no effect of Group ($F(2,17)=0.12$; $p>0.1$ and
11 $F(2,17)=0.25$; $p>0.1$ respectively), a significant effect of Training Day ($F(4,68)=10.25$;
12 $p<0.0001$ and $F(4,68)=8.36$; $p<0.0001$ respectively) and no interaction ($F(8,68)=0.53$;
13 $p>0.1$ and $F(8,68)=0.52$; $p>0.1$ respectively). Therefore it can be concluded that
14 performances during the probe trial were not biased by differences in performances during
15 training.



16

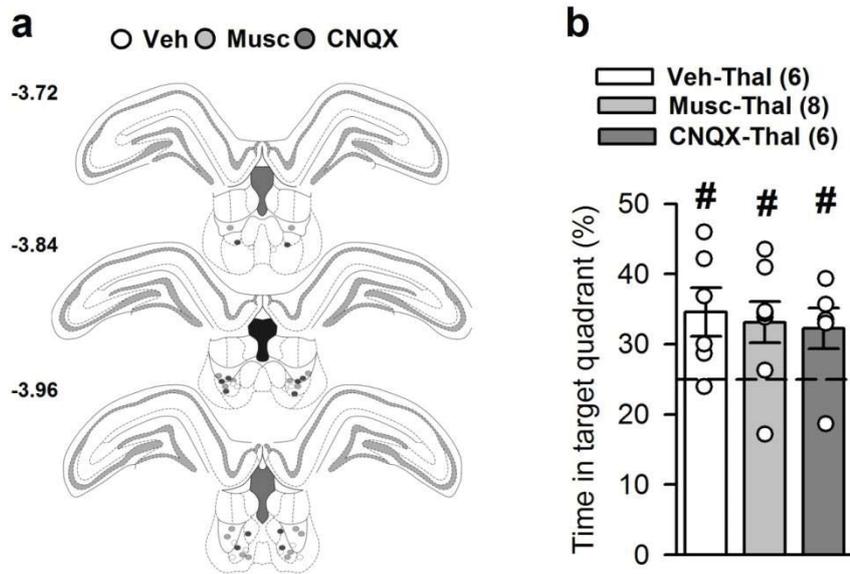
17 **Figure S6**. Training performance of the 3 groups. Numbers between brackets indicate group sizes.
18 The three groups had similar training performance, according to distance (a) and latency (b)
19 to reach the hidden platform. Abbreviations: Musc, muscimol; Thal, thalamic region; Veh, vehicle.

20 **Retention test**

21 Results are presented in **Figure S7** and **Figure S8**.

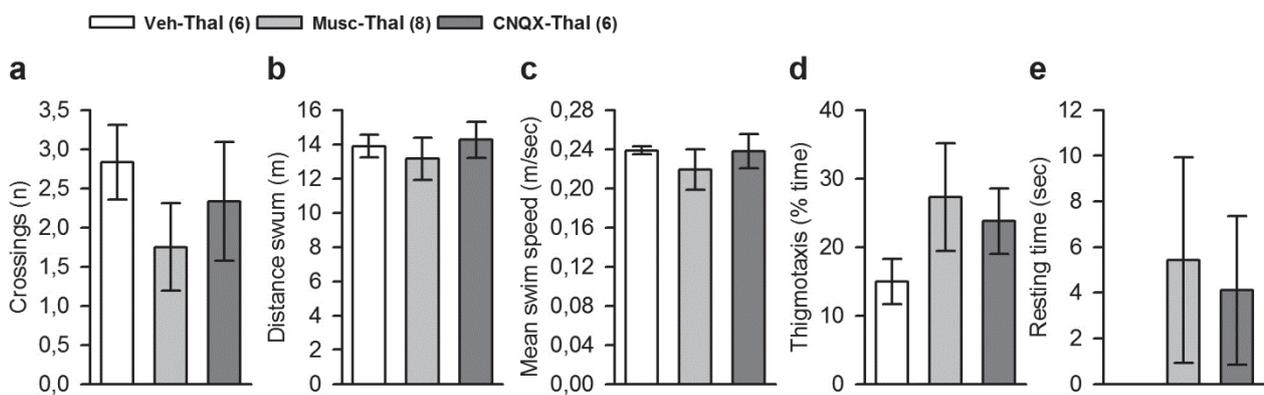
22 Analysis of the Time spent in the target quadrant (**Figure S7b**) showed no effect of Group
23 ($F(2,17)=0.13$; $p>0.1$). Neither drug prevented memory retrieval. Indeed, all groups
24 performed above chance level: Veh ($t(5)=2.77$, $p<0.01$), muscimol ($t(7)=2.79$, $p<0.05$),
25 CNQX ($t(5)=2.80$, $p<0.05$). Analysis of Crossings (**Figure S8a**) yielded similar results:
26 there was no Group effect ($F(2,17)=0.83$; $p>0.1$). Analyses of Distance swum (**Figure**
27 **S8b**), Swim speed (**Figure S8c**), Thigmotaxis (**Figure S8d**) and Resting time (**Figure S8e**)

1 showed no effect of Group ($F(2,17)=0.29$; $p>0.1$, $F(2,17)=0.45$; $p>0.1$, $F(2,17)=1.01$;
 2 $p>0.1$, $F(2,17)=0.61$; $p>0.1$ respectively).



3
 4 **Figure S7.** Performance in the water maze experiment. Numbers between brackets indicate group
 5 sizes. (a) Position of infusion sites in each group according to the treatments received (Veh, white
 6 circles; muscimol, light-grey circles; CNQX, dark-grey circles). Numbers correspond to mm from
 7 Bregma. (b) During the retention test, all groups performed above chance level ($^{\#}p<0.05$ vs chance
 8 level; 25% in target quadrant). White dots represent individual performance; note that, due to
 9 partial or complete overlap, the number of dots is smaller than the total number of rats.
 10 Abbreviations: Musc, muscimol; Thal, thalamic region; Veh, vehicle.

11



12
 13 **Figure S8.** Additional analyses of performance in the retention test of the water maze. The three
 14 groups showed similar performance according to the number of crossings (a), the total distance
 15 swum (b), the swim speed (c), the amount of thigmotaxis (d) and the resting time (e).
 16 Abbreviations: Thal, thalamic region; Musc, muscimol; Veh, vehicle.

17 Overall, these analyses show that, during the experiments including LHb inactivation, if
 18 part of the injected drugs had spread to the underlying thalamic region, such spreading did
 19 not account for the memory impairments observed. Indeed, none of the deficits observed

1 following intra-LHb drug infusions could be reproduced by infusion of the drugs directly in
2 the thalamic region.

3

4

5

6

1

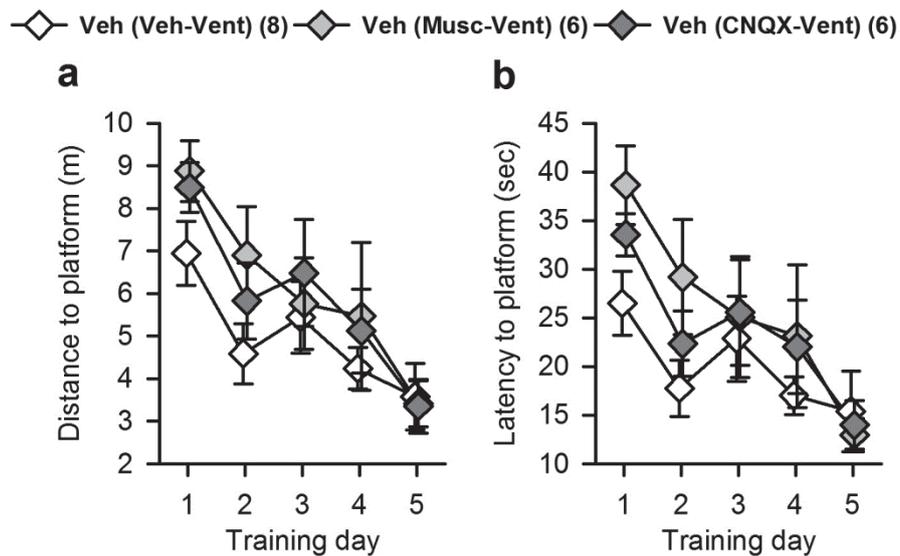
2 **PART 3: Consequences of intra-ventricular muscimol or CNQX infusion**

3 **Intra-ventricular infusion of muscimol or CNQX before the retention test in the**
4 **hidden-platform version of the water maze, following a drug-free training, did not**
5 **prevent memory retrieval**

6 **Training**

7 Results are presented in **Figure S9**.

8 Treatment groups for the retention test were composed so that there were no differences
9 according to training performance. Indeed, the analyses of Distance (**Figure S9a**) and
10 Latency (**Figure S9b**) to platform showed no effect of Group ($F(2,17)=1.24$; $p>0.1$ and
11 $F(2,17)=1.29$; $p>0.1$ respectively), a significant effect of Training Day ($F(4,68)=13.41$;
12 $p<0.0001$ and $F(4,68)=10.51$; $p<0.0001$ respectively) and no interaction ($F(8,68)=0.54$;
13 $p>0.1$ and $F(8,68)=0.80$; $p>0.1$ respectively). Therefore it can be concluded that
14 performances during the probe trial were not biased by differences in performances during
15 training.



16

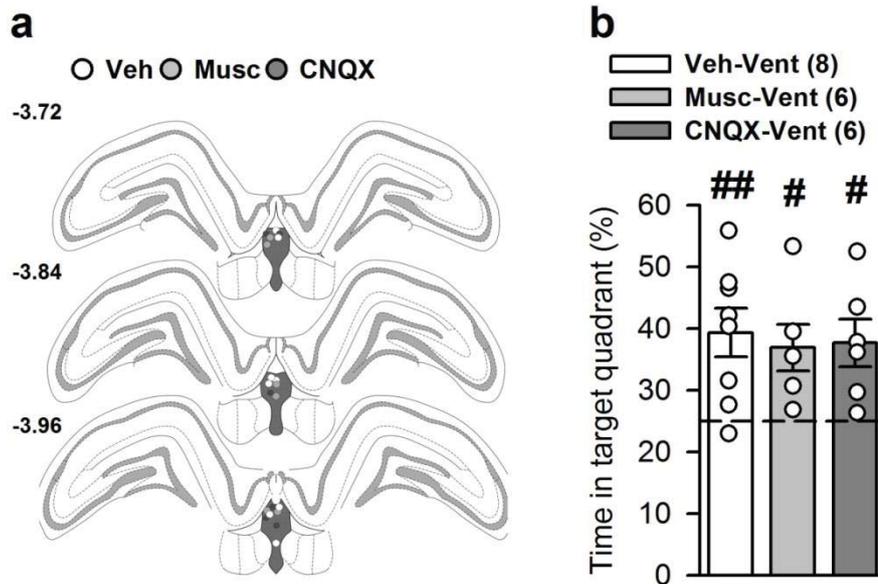
17 **Figure S9.** Training performance of the 3 groups. Numbers between brackets indicate group sizes.
18 The three groups had similar training performance, according to distance (a) and latency (b)
19 to reach the hidden platform. Abbreviations: Musc, muscimol; Veh, vehicle; Vent, ventricular region

20 **Retention test**

21 Results are presented in **Figure S10** and **Figure S11**.

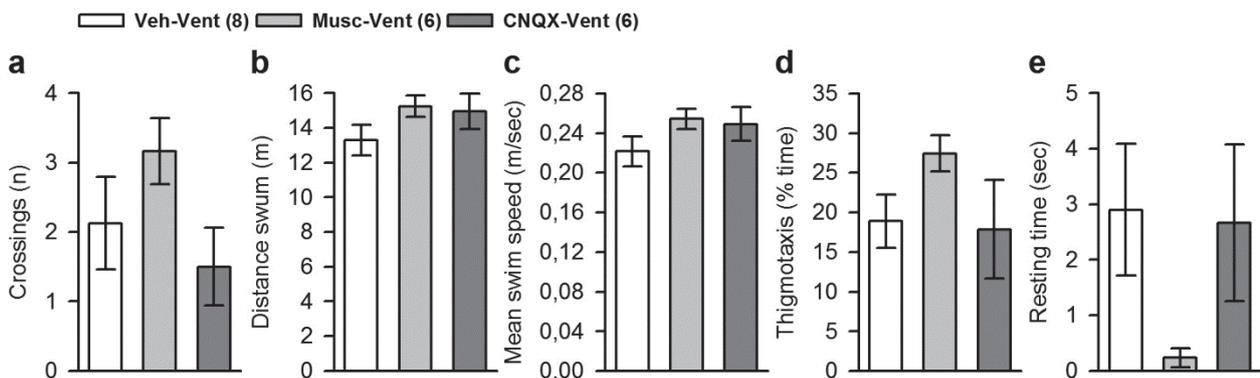
22 Analysis of the Time spent in the target quadrant (**Figure S10a**) showed no effect of Group
23 ($F(2,17)=0.11$; $p>0.1$). Neither drug prevented memory retrieval. Indeed, all groups
24 performed above chance level: Veh ($t(5)=3.64$, $p<0.01$), muscimol ($t(7)=3.17$, $p<0.05$),
25 CNQX ($t(5)=3.27$, $p<0.05$). Analysis of Crossings (**Figure S11a**) yielded similar results:
26 there was no Group effect ($F(2,17)=1.76$; $p>0.1$). Analyses of Distance swum (**Figure**
27 **S11b**), Swim speed (**Figure S11c**), Thigmotaxis (**Figure S11d**) and Resting time (**Figure**

1 **S11e)** showed no effect of Group ($F(2,17)=53$; $p>0.1$, $F(2,17)=1.54$; $p>0.1$, $F(2,17)=1.49$;
 2 $p>0.1$, $F(2,17)=1.69$; $p>0.1$ respectively).



3
 4 **Figure S10.** Performance in the water maze experiment. Numbers between brackets indicate
 5 group sizes. (a) Position of infusion sites in each group according to the treatments received (Veh,
 6 white circles; muscimol, light-grey circles; CNQX, dark-grey circles). Numbers correspond to mm
 7 from Bregma. (b) During the retention test, all groups performed above chance level ($^{\#}p<0.05$,
 8 $^{\#\#}p<0.01$ vs chance level; 25% in target quadrant). White dots represent individual performance;
 9 note that, due to partial or complete overlap, the number of dots is smaller than the total number of
 10 rats. Abbreviations: Musc, muscimol; Veh, vehicle; Vent, ventricular region.

11



12

13 **Figure S11.** Additional analyses of performance in the retention test of the water maze. The three
 14 groups showed similar performance according to the number of crossings (a), the total distance
 15 swum (b), the swim speed (c), the amount of thigmotaxis (d) and the resting time (e).
 16 Abbreviations: Musc, muscimol; Veh, vehicle; Vent, ventricle.

17 Overall, these analyses show that, during the experiments including Lhb inactivation, if
 18 part of the injected drugs had spread to the adjacent ventricular region, such spreading
 19 could not account for the memory impairments observed. Indeed, none of the deficits

1 observed following intra-LHb drug infusions could be reproduced by infusion of the drugs
2 directly in the ventricular region.

3 **References**

4 Kolb B, Pittman K, Sutherland RJ, Whishaw IQ (1982). Dissociation of the contributions of
5 the prefrontal cortex and dorsomedial thalamic nucleus to spatially guided behavior
6 in the rat. *Behav Brain Res* **6**: 365-378.

7 Mitchell AS, Chakraborty S (2013). What does the mediodorsal thalamus do? *Front Syst*
8 *Neurosci* **7**:37.

Résultats

3.1. Résultats complémentaires

3.1.1 Second test de rétention

Cette expérience n'a concerné que les animaux pour lesquels le rappel du souvenir a été testé, c'est-à-dire les animaux ayant reçu les instillations des différents composés pharmacologiques avant le test de rétention (TR) et non pas pendant l'apprentissage. Ainsi, ces animaux ont effectué un second test de rétention (TR 2), le jour suivant le premier test de rétention (TR 1). Ce TR 2 visait à mieux décrire l'état d'amnésie observé lors du rappel du souvenir des animaux lors TR 1.

3.1.2 Matériels et méthodes

Le principe de ce test était exactement le même que le TR1 ([cf. publication 2](#)) excepté que tous les rats recevaient une instillation de LCRa avant le test. Il est important de bien préciser ici que la dénomination des traitements indiqués entre parenthèse dans la [figure 49](#) fait référence à celui que ces rats ont reçu lors du TR1.

De plus, je parlerai de « groupe », de « traitement au muscimol » (ou CNQX ou LCRa) ou encore de « rats traités au muscimol » (ou CNQX ou LCRa) plutôt que « les rats instillés à l'aide de muscimol » (ou CNQX ou LCRa) afin d'alléger le texte.

3.1.3 Résultats

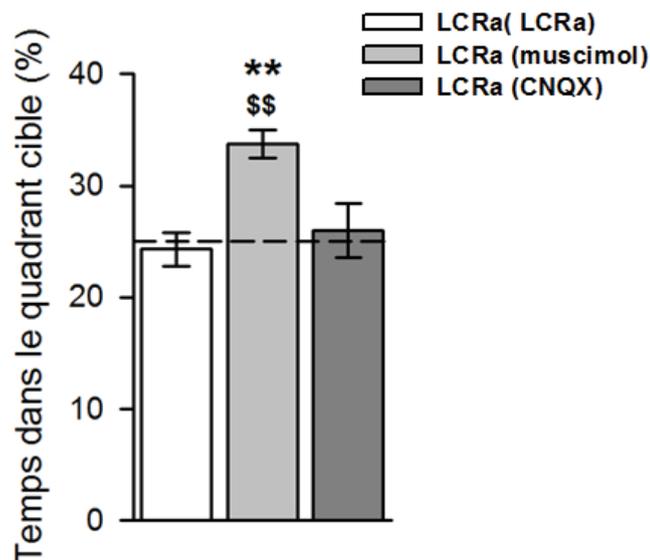


Figure 4942 Résultats du second test de rétention.

Graphique représentant le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible lors du TR2. Seuls les rats traités au muscimol présentent des performances significativement supérieures à 25% (** : $p < 0,005$). De plus, ces mêmes animaux sont les seuls à présenter des performances différentes des animaux témoins (\$\$: $p < 0,005$).

Résultats

Les résultats de ce test sont présentés sur la [figure 49](#). L'analyse statistique ANOVA à un facteur a indiqué un effet traitement ($F_{2, 30} = 8,248$; $p < 0,005$) et le test post-hoc (Newman-Keuls) a précisé que les rats traités au muscimol différaient des deux autres groupes ($p < 0,005$ pour les deux comparaisons) alors que les performances des rats traités au LCra ou au CNQX ne différaient pas l'une de l'autre ($p > 0,5$).

La comparaison du pourcentage de temps passé dans le quadrant cible par rapport au hasard (25%, t -test) a montré que seuls les rats traités au muscimol présentaient des performances significativement supérieures au niveau du hasard ($t_8 = 6,144$; $p < 0,005$) contrairement aux deux autres groupes (LCra, $t_{12} = 0,714$; CNQX $t_{10} = 0,859$; $p > 0,05$ pour les trois groupes).

Ainsi, lors de ce TR 2, seuls les rats traités au muscimol lors du TR 1 présentaient des performances suggérant qu'ils focalisaient leur recherche à l'endroit où se situait la plateforme lors de l'apprentissage.

3.2 Conclusion du second test de rétention

Ce second test de rétention a montré que les animaux témoins de cette expérience (ayant reçu du LCra aux deux tests de rétention) ont présenté un comportement de recherche aléatoire lors du TR 2. Ce comportement dit *d'extinction* indique qu'ils ont pris en compte l'absence de plateforme lors du TR 1 et ont donc « appris à oublier » cette position puisqu'elle ne représentait plus une échappatoire possible.

Ainsi, les rats semblent avoir intégré qu'un comportement de recherche focalisée dans un seul quadrant n'était plus adapté à la situation.

Les animaux traités au muscimol lors du TR 1 ont présenté un comportement de recherche focalisée dans le quadrant cible lors du TR 2. Ce comportement démontre que ces animaux possédaient l'information spatiale lors du TR 1 et confirment donc que le traitement au muscimol a bien créé une amnésie ponctuelle lors de ce premier test de rétention. C'est donc l'accessibilité au souvenir qui semble avoir été perturbée lors du TR1.

Les rats traités au CNQX ont, comme lors du TR 1, fait preuve d'un comportement de recherche aléatoire lors du TR 2. Ce résultat, apparaît plus compliqué à interpréter que ceux décrits ci-dessus, et comme nous n'avons pas trouvé d'explication logique et inattaquable, et également à cause des impératifs du journal

Résultats

Neurpsychopharmacology en ce qui concerne la taille de la discussion, nous avons décidé de ne pas inclure les résultats du TR2 dans la publication. Il semble que plusieurs explications soient possibles.

Si l'on interprète ces résultats comme le reflet, chez ces animaux, d'un apprentissage de la modification opérée lors du TR 1 (la disparition de la plateforme) et donc d'une forme d'extinction, comme celle qui semble avoir eu lieu chez les animaux témoins, cela n'apparaît pas cohérent avec les résultats obtenus démontrant que l'instillation de CNQX au sein de l'HbL induit des déficits d'encodage.

Il est également possible que lors du premier test de rétention, l'instillation de CNQX n'ait pas perturbé la mémoire directement mais plutôt la stratégie utilisée par les animaux. Ainsi, bien qu'utilisant un comportement inadapté à la situation lors du TR1, les animaux ont pu prendre en compte l'absence de plateforme et ainsi modifier leur comportement lors du TR 2. Cette hypothèse est cependant difficile à confirmer avec les résultats présentés.

3.3 Conclusions générales de la publication 2 et des résultats complémentaires

Cette étude a permis de montrer pour la première fois l'implication spécifique de l'HbL dans l'encodage et le rappel d'une mémoire spatiale, c'est à dire dans des processus « online », mais pas dans la consolidation du souvenir. Ces déficits ne semblent pas être dus à des perturbations des fonctions sensori-motrices puisque ces dernières n'ont pas été perturbées suite à l'instillation des deux drogues utilisées. Néanmoins, en piscine de Morris, lors d'une tâche de nage vers une plateforme visible, le traitement au muscimol a induit une augmentation de la distance parcourue pour rejoindre la plateforme. De plus, ce traitement a également provoqué une augmentation du pourcentage de thigmotaxie en piscine et du niveau d'anxiété en labyrinthe en croix surélevé.

Ainsi, ces résultats ont précisé le rôle de l'HbL dans les processus d'encodage et de rappel d'un souvenir spatial mais ont également décrit une dichotomie fonctionnelle au sein de l'HbL suggérant que cette dernière pouvait être une interface entre cognition et émotions.

Résultats

3.4 Expérience complémentaire : possible latéralisation fonctionnelle de l'HbL

3.4.1 Objectifs

A la suite de ces expériences, nous avons souhaité évaluer une possible latéralisation des fonctions mnésiques de l'HbL en piscine de Morris. En effet, comme mentionné dans l'introduction, sa latéralisation fonctionnelle est peu documentée et n'a jamais été étudiée chez le rongeur (*cf. Le complexe habénulaire, page 2*). Pourtant différents travaux ont déjà mis en évidence une latéralisation des fonctions de cette structure chez le zebrafish (Dreosti et al., 2014, Krishnan et al., 2014). En effet, l'Hb gauche semble répondre préférentiellement à des stimulations lumineuses alors que la droite répond à des stimulations olfactives (Dreosti et al 2014). De plus, des études sur les capacités mnésiques et de navigation humaines ont démontré l'existence d'une latéralisation de ces fonctions au sein de l'HPC (Maguire et al 1997, 1998, 2000 Nunn et coll., 1998, 1999; Kessels et coll., 2001; Burgess et coll., 2002). Il a également été démontré au laboratoire que l'acquisition d'une mémoire spatiale serait essentiellement dépendante du fonctionnement de l'HPC gauche, alors que le rappel d'une telle mémoire serait dépendant de l'HPC droit (Klur et al 2011). Ainsi, étant donné que l'HPC et l'HbL présentent des cohérences d'activité lors de tâche de mémoire chez le Rat (Goutagny et al 2013), nous avons cherché à évaluer si l'implication de l'HbL dans les fonctions mnésiques pouvait également être latéralisée.

3.4.2 Matériel et méthodes

Lors de cette étude nous avons utilisé le même protocole que celui ciblant l'encodage d'une information spatiale lors des expériences ayant conduit à la publication 2. Les seules différences ont été que les inactivations étaient effectuées pendant l'apprentissage et uniquement à l'aide de muscimol, de manière unilatérale sauf pour un groupe de rats instillés bilatéralement. Les protocoles de contention, d'instillation et de piscine de Morris étaient identiques à ceux présentés précédemment (*cf. Publication 2*).

Groupes utilisés lors de cette expérience :

Tous les animaux ont été implantés bilatéralement pour cibler l'HbL et l'attribution des groupes (gauche ou droite) a été faite de manière aléatoire. Après vérification

Résultats

histologique (les critères d'exclusions ont été les mêmes que ceux utilisés pour les publications 1 et 2) les effectifs d'animaux ont été les suivants : animaux témoins (LCRa) N = 9 (4 à gauche et 5 à droite); animaux recevant l'instillation de muscimol dans l'Hbl droite (muscimol droite) N = 11 ; animaux recevant l'instillation de muscimol dans l'Hbl gauche (muscimol gauche) N = 8. En plus de ces groupes, quelques animaux ont reçu une injection bilatérale de muscimol (groupe bilat N = 5) afin d'observer que dans ces conditions expérimentales nous retrouvions les déficits mnésiques décrits dans la publication 1.

3.4.3 Résultats comportementaux

Apprentissage

La distance moyenne parcourue lors des 4 essais chaque jour par chacun des groupes testés est présentée dans la [figure 50](#). Les animaux témoins ne présentaient pas de différence selon le côté instillé (ANOVA à mesures répétées sur la distance ($F_{7,1}=1,209$; $p>0,05$) ils ont donc été poolés. Ces animaux témoins présentaient une diminution de la distance parcourue au cours de l'apprentissage ($F_{4,28}=1,209$; $p<0,05$). L'analyse ANOVA à mesures répétées effectuée [avec le facteur traitement (4 niveaux) et le facteur jour (5 niveaux) en mesure répétée] décrit un effet traitement ($F_{3,29} = 4,239$; $p<0,05$), un effet jour ($F_{4,116} = 12,671$; $p<0,001$) mais pas d'interaction ($F_{12,116} = 0,974$; $p>0,5$). Au regard des résultats, nous avons tout de même effectué un test post-hoc (Newman-Keuls). Ce test décrit que tous les rats traités au muscimol, quel que soit le côté (gauche, droite et bilat), différaient des rats témoins ($p<0,05$ pour les trois groupes par rapport aux témoins) mais pas entre eux ($p>0,05$ pour chaque comparaison). De plus l'analyse ANOVA à mesures répétées concernant le pourcentage de thigmotaxie effectuée [avec le facteur traitement (4 niveaux) et le facteur jour (5 niveaux) en mesure répétée] décrit un effet traitement ($F_{3,29} = 8,102$, $p<0,001$), un effet jour ($F_{4,116} = 5,712$; $p<0,001$) mais pas d'interaction ($F_{12,116} = 1,073$; $p>0,5$) (*cf. figure 50*). A nouveau nous avons effectué le test post-hoc (Newman-Keuls) qui a décrit que seuls les animaux instillés bilatéralement différaient des témoins pour chaque jour d'apprentissage ($p<0,05$ pour chaque jour comparé aux témoins) contrairement aux animaux instillés unilatéralement ($p>0,05$ pour chaque jour comparé aux témoins).

Résultats

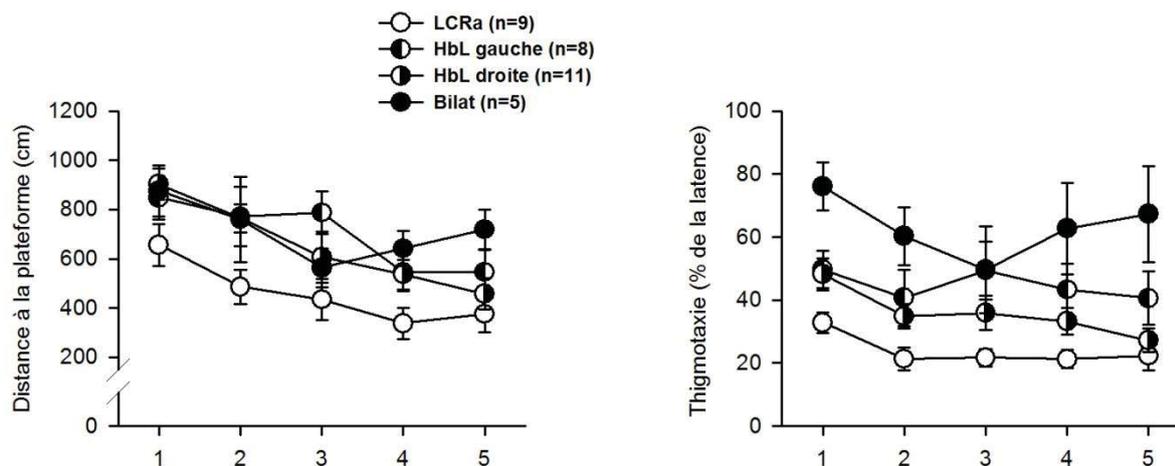


Figure 50 Distance moyenne au cours des cinq jours d'apprentissage pour les différents groupes de rats.

Les graphiques représentent (a) la distance moyenne des quatre essais de chaque session d'apprentissage et (b) le pourcentage moyen de thigmotaxie. Seul le groupe témoin présente une diminution significative de la distance parcourue au cours de cet apprentissage (cf. texte). Dans un objectif de clarté les statistiques ne sont pas directement affichées sur la figure. Un effet significatif du traitement est également observé sur le pourcentage de thigmotaxie (cf. texte).

Rappel

Le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible par chaque groupe lors du test de rétention est présenté sur la [figure 51](#).

L'analyse ANOVA à un facteur du pourcentage de temps passé dans le quadrant cible a indiqué un effet traitement ($F_{3, 29} = 3,190$; $p < 0,05$), cependant, seuls les rats traités bilatéralement présentaient des performances différentes des rats témoins ($p < 0,05$) et aucune différence n'a été observée entre les autres groupes ($p > 0,05$ pour toutes les comparaisons).

Cependant, la comparaison des performances par rapport à la chance (25%, t -test) a indiqué que seul le groupe témoin présente des performances supérieures au niveau du hasard ($t_8 = 2,516$; $p < 0,05$) contrairement aux 3 autres groupes (Musc droit $t_{10} = -0,219$; Musc gauche $t_7 = -0,082$; bilat $t_4 = -2,59$; $p > 0,05$ pour les trois groupes).

Ces résultats suggèrent que seul le groupe témoin était capable de rappeler la localisation de la plateforme.

La distance parcourue par tous les groupes d'animaux ne différait pas pendant le test de rétention ($F_{3, 29} = 0,088$; $p > 0,05$). Cependant, le pourcentage de thigmotaxie était plus important pour tous les rats traités au muscimol par rapport aux rats témoins [(ANOVA à un facteur : $F_{3,29} = 6,901$; $p < 0,005$, tous les groupes muscimol étant différents des témoins ($p < 0,005$)).

Résultats

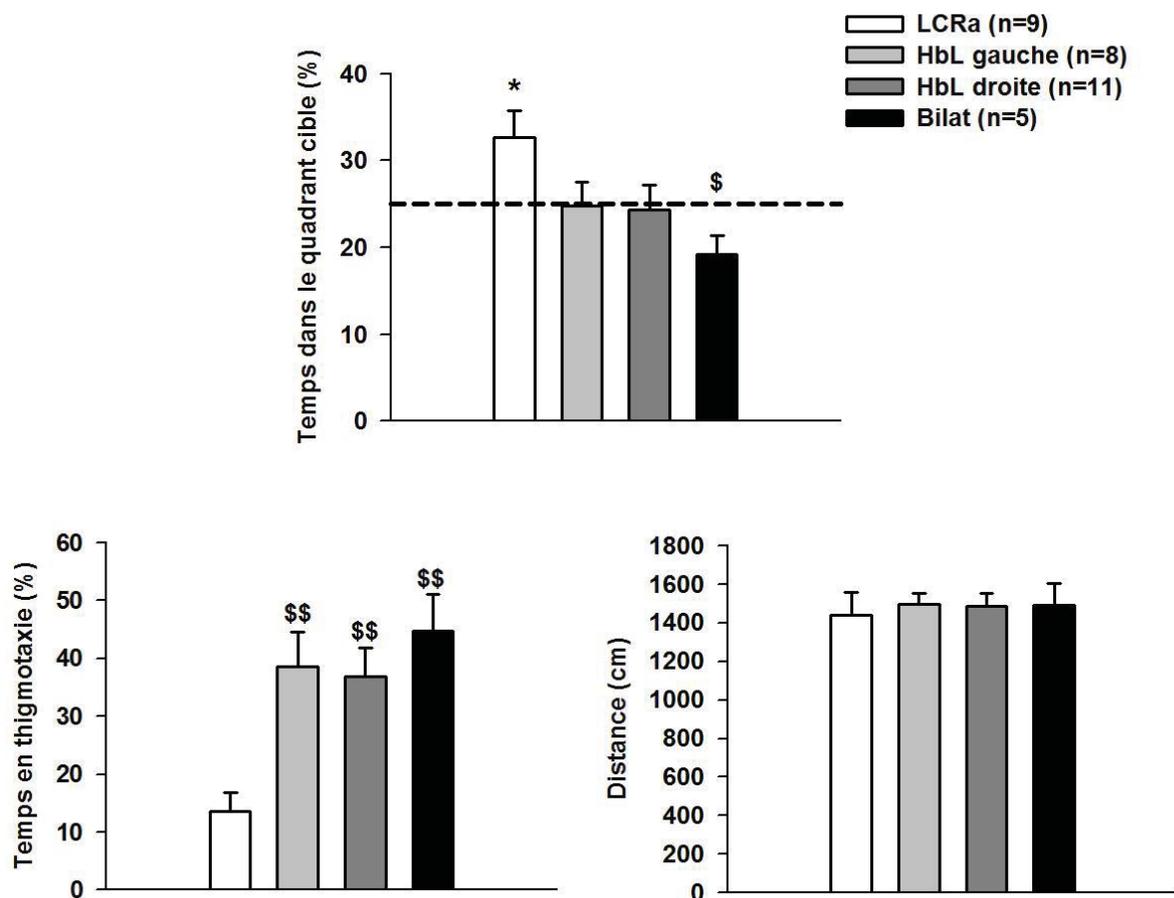


Figure 51 Représentation de plusieurs variables analysées lors du test de rétention.

(a) Graphique représentant le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible par les différents groupes d'animaux. Seuls les animaux témoins présentent des performances supérieures à 25% (* : $p < 0,05$). De plus seuls les animaux ayant reçu une instillation bilatérale de muscimol présentent des performances significativement différentes des animaux témoins (\$: $p < 0,05$). (b) Graphique représentant le pourcentage de temps passé en thigmotaxie. Tous les groupes diffèrent du groupe contrôle (\$\$: $p < 0,005$). (c) Graphique représentant la distance totale parcourue lors du test de rétention. Aucun groupe ne diffère significativement.

3.4.4 Conclusion

Cette expérience a permis de mettre en évidence que, quel que soit le côté d'instillation, le traitement unilatéral au muscimol produit des déficits d'encodage d'une information spatiale, semblables à ceux obtenus suite à l'instillation bilatérale. Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans la publication 2 et confortent l'importance de l'HbL dans l'encodage d'un souvenir spatial, en précisant que les deux HbL semblent avoir une importance équivalente dans cette fonction.

Puisque l'encodage et le rappel d'un souvenir spatial semblent impliquer différemment l'HPC gauche et l'HPC droit chez le Rat (Klur et al., 2009), il sera intéressant d'effectuer la même expérience en ciblant uniquement le rappel d'un souvenir spatial afin de savoir si une latéralisation des fonctions de l'HbL ne concerne pas plutôt ce processus.

4. Rôle de l'HbL dans la gestion du stress et les comportements anxieux

4.1 Introduction

Lors de nos expériences en piscine de Morris, nous avons observé une augmentation du comportement de thigmotaxie, et ce indépendamment du composé utilisé. Comme mentionné dans la partie matériels et méthodes ([cf. page 95](#)) et dans la [publication 2](#), ces altérations comportementales pourraient refléter une perturbation émotionnelle (stress ou anxiété) importante lors du test, ou une incapacité à modifier une stratégie comportementale « par défaut » des animaux (Devan et al., 1999b; Treit and Fundytus, 1988). Afin d'essayer de mieux comprendre ces résultats, nous avons dans un premier temps effectué le test en labyrinthe en croix surélevé, dont les résultats sont présentés dans la [publication 2](#). Ce test nous a permis de mettre en évidence une augmentation de l'anxiété suite au traitement au muscimol uniquement. Ce résultat a donc suggéré que: soit notre traitement au muscimol a placé, presque artificiellement, les animaux dans un état physiologique de stress ou d'anxiété les empêchant d'effectuer la tâche en piscine de Morris ; soit, si l'HbL est impliquée dans la gestion du stress inhérent à une situation comportementale, notre traitement a empêché l'HbL de jouer son rôle et a conduit à des déficits en piscine de Morris, suggérant que l'HbL se situe à l'interface de la cognition et des émotions. Cependant, cette hypothèse ne semblait pas concerner les rats traités au CNQX.

Afin de confirmer ces perturbations des comportements anxieux et ces différences entre nos composés, nous avons évalué l'implication de l'HbL dans un autre test d'anxiété, le champ ouvert (CO).

Cependant, l'implication de l'HbL dans des réactions à des stimulations stressantes chez le Rat a également été décrite [[cf. Nociception, stress et anxiété, page 21](#)], (Chasterette et al 1991, Wirtshafter 1994, Carr et al 1998, Benabid et al 1988)]. En effet, à l'aide du marquage du gène C-Fos chez le Rat, des auteurs ont mis en évidence que la partie médiane de l'HbL était particulièrement activée par des événements stressants comme la contention, le placement dans un nouvel environnement ou suite à des chocs électriques au niveau des pattes (McEwen 2016, Wirtshafter 1994 brown and Shepard 2013).

Résultats

Ainsi, puisque le test de la piscine de Morris se base sur le stress induit par la situation expérimentale, nous avons décidé d'évaluer si, plus que l'anxiété, ce n'était pas un défaut de gestion du stress qui pouvait provoquer les déficits mnésiques observés. En effet, l'influence du stress sur les processus mnésiques est largement décrite dans la littérature. Elle suivrait une courbe en U inversé, reflet des effets positifs ou délétères que peut avoir un stress sur les performances mnésiques (McEwen et al 2016, Oitzl et De Kloet 1992, Conrad 2010, Roozendaal 2003, Sandi et Pinelo-Nava 2007, Joels et al 2006). Il a notamment été démontré que l'ablation de la glande surrénale ou l'injection d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs aux glucocorticoides pouvaient perturber les performances mnésiques de rongeurs (Oitzl et Kloet 1992, sandi 1997). Il semble donc que l'état physiologique et notamment la réponse de l'axe HHS puisse influencer les performances mnésiques. Ainsi, nous avons étudié l'effet des instillations de muscimol et CNQX au sein de l'HbL dans la réponse de l'axe HHS en cage d'élevage et lors du test de la piscine de Morris.

4.2 Evaluation du niveau d'anxiété en CO :

Ce second test d'anxiété avait pour objectif de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus avec le labyrinthe en croix surélevé en utilisant un autre paradigme comportemental, un CO fortement éclairé. L'exposition à un tel environnement est fortement anxiogène pour les rats. Comme pour le labyrinthe en croix surélevé, les parois représentent l'endroit le plus sûr du dispositif et cela nous a permis, comme en piscine de Morris, d'évaluer le comportement de thigmotaxie des animaux dans le dispositif. Nous avons également choisi d'utiliser un protocole d'expositions répétées au CO – chose impossible avec le labyrinthe en croix surélevé - afin de pouvoir comparer le comportement des animaux lors de trois sessions consécutives (inter-session). Ce protocole nous a permis, en plus du comportement anxieux, d'évaluer les capacités d'habituation des animaux à une situation anxiogène.

4.3 Matériels et méthodes

Le dispositif ([cf.figure 52](#)), le déroulement du test ainsi que les variables analysées sont décrits dans la partie « matériels et méthodes » ([cf.Evaluation du niveau d'anxiété en champ ouvert, page 99](#)). Je ne rappellerai donc ici que succinctement le protocole utilisé.

Résultats

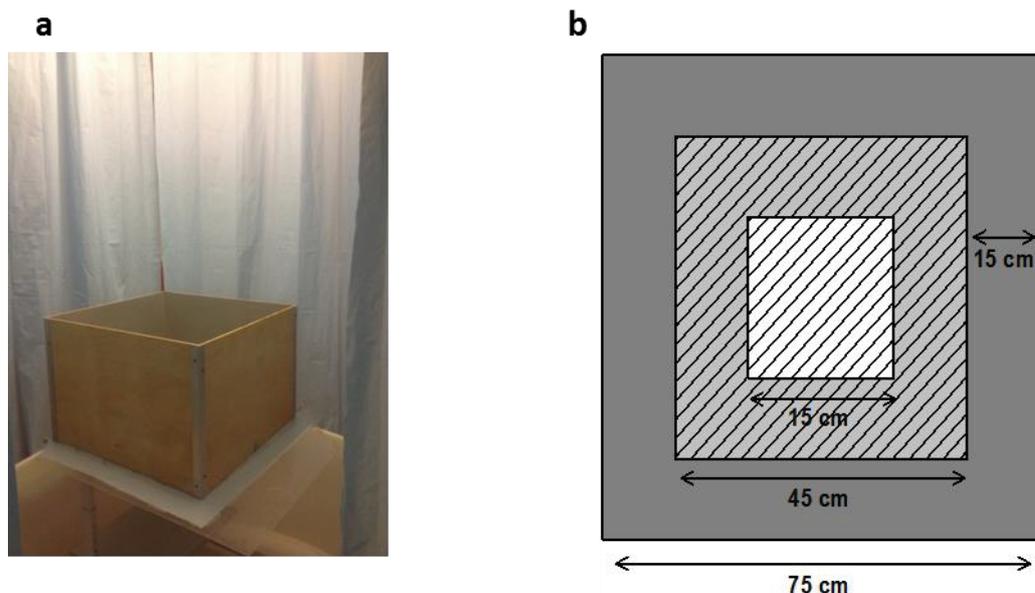


Figure 52 Le dispositif du champ ouvert

Photographie (a) et schéma (b) du dispositif du champ ouvert, virtuellement délimité en 3 zones, dont un hyper-centre (carré rayé blanc), un centre élargi (carré rayé gris clair) et une zone de thigmotaxie, contre les parois (zone gris foncée).

Lors de cette expérience, les rats ont été instillés dans l'HbL à l'aide de CNQX, de muscimol ou de leur excipient respectif 15 ou 30 minutes (respectivement) avant la première exposition de 6 minutes au CO (CO1). Ils ont été réexposés deux fois au CO (CO2 et CO3) avec 3 minutes d'intervalle entre chaque exposition. Les variables analysées ont essentiellement été la distance parcourue dans les différentes zones du dispositif.

4.4 Résultats

Après vérification histologique, les effectifs utilisés lors de ce test étaient composés comme suit : LCRA : N = 9 (les deux groupes témoins ont été poolés), CNQX : N= 10, muscimol : N=13.

Les résultats seront présentés de la manière suivante : dans un premier temps je ne décrirai que les résultats de la première séance de CO, qui correspondait au placement dans un nouvel environnement, fortement anxiogène pour les animaux. Cette première exposition permettait d'évaluer la réaction des rats face à ce nouvel environnement. Ensuite, je décrirai les résultats de manière globale, en incluant les deux séances d'exposition au CO qui ont suivi la première et qui permettaient d'évaluer l'habituation éventuelle des animaux à l'environnement, devenu familier.

Résultats

4.4.1 La 1ère session de CO

Les résultats de la distance parcourue dans les différentes zones du CO et du pourcentage de temps passé en thigmotaxie sont présentés sur la [figure 53](#).

L'ANOVA à un facteur (traitement) effectuée sur la distance totale parcourue par les animaux a montré un effet traitement ($F_{2,30}=6,570$; $p<0.005$). L'analyse post-hoc (Newman-Keuls) a précisé que les rats traités au muscimol parcouraient une distance plus faible que les rats témoins et ceux traités au CNQX ($p<0,01$ vs LCRa ; $p<0,05$ vs CNQX). Les mêmes différences ont été observées suite à l'analyse de la distance parcourue contre les parois (effet traitement $F_{2,30}=5,953$; $p<0,01$; post-hoc (Newman-Keuls) groupe muscimol différent du groupe LCRa $p<0,05$ et du groupe CNQX $p<0,01$). Les performances des groupes LCRa et CNQX n'étaient pas différentes ($p>0.05$).

Concernant la distance au centre, l'ANOVA à un facteur (traitement) a montré un effet traitement ($F_{2,30}=7,339$; $p<0.005$). L'analyse post-hoc (Newman-Keuls) montre que les rats témoins parcouraient une distance plus importante dans le centre du CO que les rats traités au CNQX et au muscimol ($p<0,005$ vs muscimol; $p<0,01$ vs CNQX). Les mêmes différences ont été observées suite à l'analyse de la distance parcourue dans le centre élargi et du pourcentage de thigmotaxie [(distance dans le centre élargi : effet groupe $F_{2,30}=12,429$; $p<0,001$; groupe LCRa différent du groupe muscimol $p<0,001$ et du groupe CNQX $p<0,001$; pourcentage de thigmotaxie : effet groupe $F_{2,30}=10,810$; $p<0,001$; groupe LCRa différent du groupe muscimol $p<0,001$ et du groupe CNQX $p<0,001$)].

Ces résultats décrivent donc une anxiété important induite par les deux composés pharmacologiques utilisés. Pour les instillations de muscimol, ce résultat est similaire au comportement observé en labyrinthe en croix surélevé ([cf. publication 2](#)). En effet dans les deux tests les animaux ont montré une diminution de leur activité locomotrice et une augmentation de leur comportement anxieux (forte thigmotaxie dans le CO ou présence dans les bras fermés dans le labyrinthe en croix surélevé). Par contre le test en CO décrit pour la première fois une augmentation du niveau d'anxiété des animaux suite à l'instillation de CNQX, mais sans diminution de leur niveau d'activité locomotrice par rapport aux témoins.

Résultats

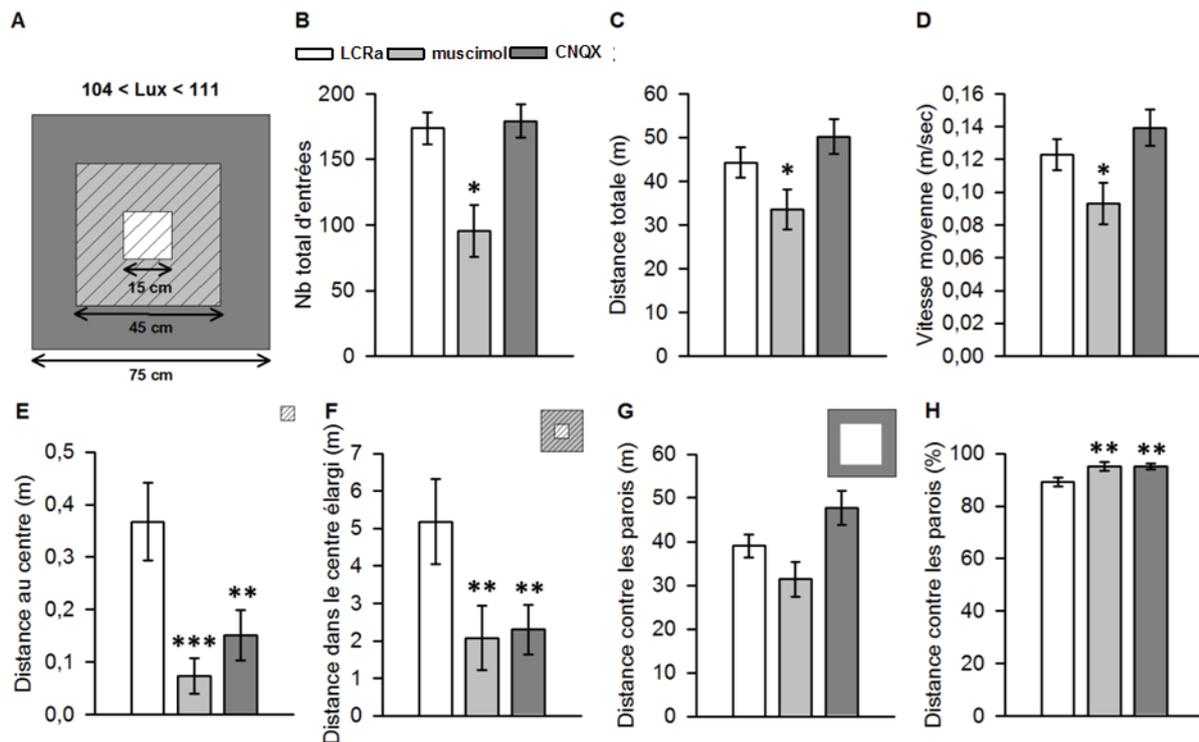


Figure 53 Résultats de la première session de champ ouvert

(A) Schéma des différentes zones du dispositif. (B) à (H) les différentes variables analysées (statistiques : * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.005$; *** : $p < 0.0005$; comparaison aux animaux témoins).

4.4.2 Comparaison des trois sessions de CO

Les résultats de la distance parcourue dans les différentes zones du CO et du pourcentage de temps passé en thigmotaxie sont présentés sur la [figure 54](#).

L'analyse ANOVA à mesures répétées [avec le facteur traitement (3 niveaux) et le facteur sessions (3 niveaux) comme mesure répétées] décrit un effet traitement ($F_{2,30}=4,803$; $p < 0,05$), un effet session ($F_{2,60}=77,930$; $p < 0,0001$) et une interaction ($F_{4,60}=4,083$; $p < 0,01$). L'analyse post-hoc (Newman-Keuls) montre que tous les groupes présentent une diminution de leur activité locomotrice au cours des sessions (différence statistique entre la session 1 et la session 3 : LCRa $p < 0,0001$; CNQX $p < 0,0001$; muscimol $p < 0,0001$). La même analyse effectuée sur la distance parcourue dans la zone centrale du CO montre un effet traitement ($F_{2,30}=13,474$; $p < 0,0001$), un effet session ($F_{2,60}=3,628$; $p < 0,05$) et une interaction ($F_{4,60}=2,54618$; $p < 0,05$). L'analyse post-hoc (Newman-Keuls) montre que seul le groupe LCRa présente une diminution de son activité locomotrice au cours des sessions (statistique entre la session 1 et la session 3 : LCRa $p < 0,005$; CNQX $p > 0,05$; muscimol $p > 0,05$). Les deux autres groupes ne montrent pas de modification de leur visite au centre du CO au cours des séances.

Résultats

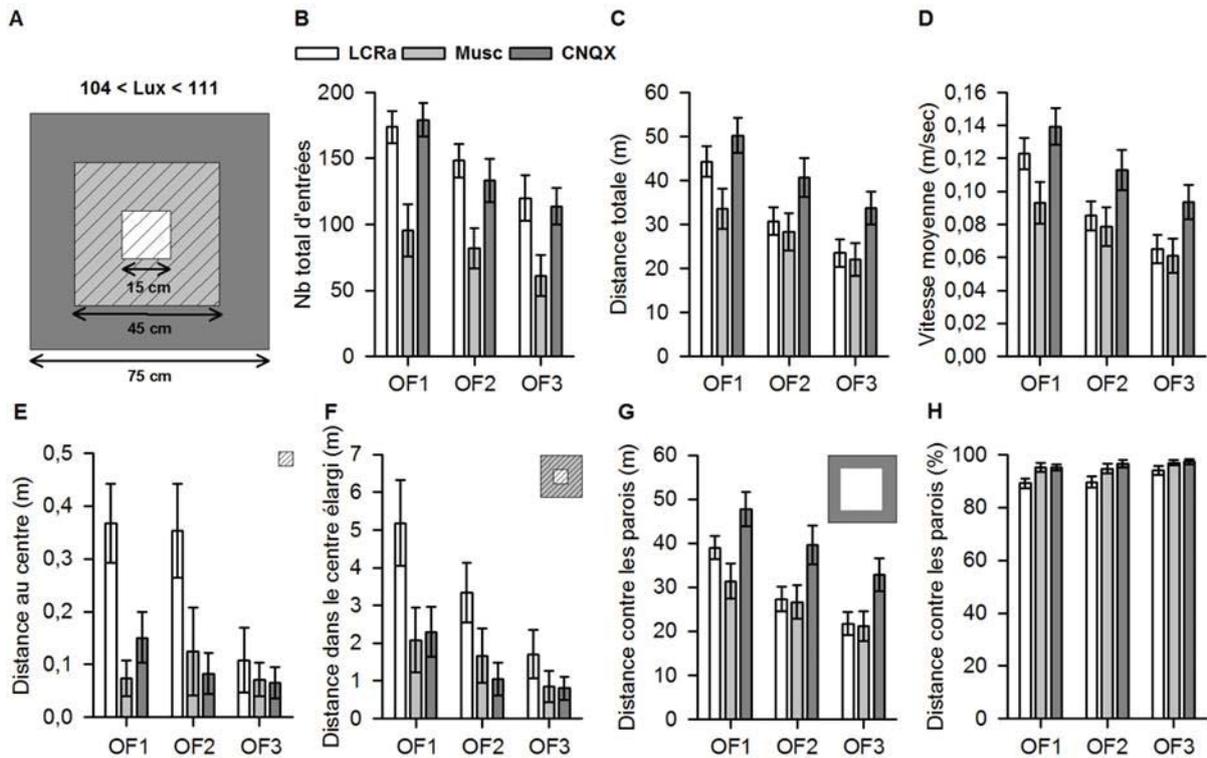


Figure 54 Résultats des trois champs ouverts

(A) Schéma des différentes zones du dispositif. (B) à (H) les différentes variables analysées (Les statistiques ne sont pas présentées sur la figure pour une meilleure clarté).

Concernant le pourcentage de thigmotaxie l'ANOVA à mesures répétées décrit uniquement un effet traitement ($F_{2,30}=11,68$; $p<0,0005$) mais pas d'effet session ($F_{2,60}=1,65$; $p>0,05$) ni d'interaction ($F_{4,60}=1,47$; $p>0,05$).

Ces résultats montrent que tous les groupes d'animaux diminuent leur activité dans le CO au cours des sessions, suggérant la familiarisation à cet environnement. Cependant les animaux instillés avec du CNQX et du muscimol ne modifient pas leur comportement d'exploration des différentes zones plus ou moins stressantes du CO, contrairement aux animaux témoins qui eux diminuent leur passage au centre.

4.5 Conclusions du comportement en CO :

Concernant les instillations de muscimol, les résultats obtenus apparaissent cohérents avec ceux obtenus en labyrinthe en croix surélevé, puisque les animaux ont présenté un temps passé en thigmotaxie plus élevé que les témoins, suggérant une anxiété plus importante. Cependant, leur exploration du CO est apparue « imparfaite » car ils n'ont que très peu visité le centre du dispositif.

Résultats

Par contre, la diminution du niveau d'activité générale, déjà observée en labyrinthe en croix surélevé, est contradictoire avec nos résultats obtenus en cage d'élevage (*cf. publication 2*). L'instillation de muscimol semble bien avoir provoquée une augmentation du niveau d'anxiété des animaux mais a également diminué leur activité motrice. Il semble donc que ce dernier paramètre soit dépendant des conditions que l'on pourrait qualifier d'émotionnelles du test employé. Les animaux ont néanmoins présenté une diminution de leur activité générale au cours des sessions, suggérant qu'ils se familiarisaient au dispositif, du moins en ce qui concerne les zones « sûres » du CO.

Ce dernier résultat suggère que les animaux ont intégré chacun des passages dans le CO, preuve qu'ils avaient mémorisé la situation précédente, effectuée 3 minutes auparavant. Ce résultat n'est pas cohérent avec nos résultats obtenus en piscine de Morris ni lors du test de NADP. Cependant, l'activité générale d'un animal dans un CO est difficilement comparable à la mise en place d'un souvenir précis comme la localisation d'une plateforme, d'une règle ou d'une information en mémoire de travail. De plus, entre chaque ré-exposition le dispositif n'était nettoyé qu'à l'eau, n'éliminant pas les odeurs déposées par l'animal. Il est donc possible que l'environnement ait été considéré comme familier par les rats et cela même s'ils ne se souvenaient pas d'y avoir été. Il apparaît donc difficile de conclure quant au niveau de familiarisation des rats au dispositif.

Concernant les instillations de CNQX, les résultats obtenus ont démontré que, dans ces conditions de test, les animaux présentaient une anxiété plus importante que les animaux témoins, ce qui n'était pas le cas en labyrinthe en croix surélevé.

Ainsi, la neurotransmission glutamatergique au sein de l'HbL semble impliquée dans les comportements anxieux mais de manière dépendante des conditions expérimentales. Par contre, l'activité locomotrice n'apparaît pas diminuée par rapport aux témoins. Ainsi, tout comme pour les animaux instillés avec du muscimol, le niveau d'anxiété élevé des animaux traités au CNQX a rendu leur exploration du dispositif imparfaite puisqu'ils n'en ont que peu visité le centre. Cependant, la diminution progressive de l'activité locomotrice semble bien être le reflet de leur habitude au cours d'expositions répétées au CO.

Résultats

Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse évoquée plus haut que la réponse locomotrice suite à un dysfonctionnement de l'HbL est dépendant de la situation. Cependant, le CNQX n'engendre jamais de diminution de la locomotion comme peut le faire le muscimol. De plus, d'un point de vue mnésique, comme pour le muscimol, la diminution de l'activité locomotrice des rats traités au CNQX au cours des ré-expositions, reflet de leur habituation, apparaît incohérente avec les déficits mnésiques observés dans les publications 1 et 2. Cependant, à nouveau, leur exploration imparfaite du dispositif rend cette conclusion difficile. Donc comme, comme pour les animaux ayant reçu du muscimol, il apparaît difficile de conclure sur le comportement de familiarisation des rats, du moins concernant les zones « anxigènes » du dispositif.

Ces résultats renforcent les conclusions concernant l'importance de l'HbL dans la réponse comportementale face à une situation anxigène. Cependant, ils démontrent tout de même des effets différents selon le composé utilisé, notamment concernant l'activité locomotrice. De plus, le fait que les animaux présentent un comportement suggérant la présence d'une habituation (et donc d'une mémoire de l'expérience vécue) est intrigant vis-à-vis des résultats obtenus dans les publications 1 et 2.

4.6 Evaluation de la réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien

Toutes ces expériences ont eu pour but d'évaluer la réponse de l'axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien (HHS), par mesure de la CORT sanguine, suite à l'inactivation de l'HbL. Nous avons ainsi mesuré la réponse physiologique au stress des animaux dans une situation contrôle, leur cage d'élevage et dans le test de la piscine de Morris, lors du protocole ciblant le rappel. Ces expériences visaient dans un premier temps à évaluer si l'HbL pouvait jouer un rôle dans la modulation d'un système impliqué dans la réponse au stress et dans un second temps si les déficits mnésiques observés suite à l'inactivation de l'HbL pouvaient être expliqués par une altération du fonctionnement de ce système.

4.6.1 Matériels et méthodes

Les expériences effectuées sont décrites dans la partie « Matériels et Méthodes » ([Prélèvements sanguins et dosages de corticostérone page, page 104](#)). Je vais néanmoins rappeler succinctement les grandes étapes des protocoles utilisés.

Résultats

Conséquences d'une inactivation de l'HbL sur le niveau de corticostérone circulante en cage d'élevage

Trois prises de sangs ont été effectuées afin de mesurer l'effet des différentes instillations au sein de l'HbL sur les niveaux de CORT plasmatique des rats. Lors de nos expériences, nous avons utilisé trois groupes d'animaux le premier traité au muscimol, le second au CNQX et un troisième, poolé, traité avec les excipients respectifs des deux autres groupes (nommé groupe LCRa).

Le premier prélèvement correspondait au niveau basal de corticostérone, permettant une comparaison avec le second qui, lui, représentait la réponse physiologique au stress induite par la contention et l'instillation des composés pharmacologiques dans l'HbL. Le troisième et dernier prélèvement avait pour but d'évaluer le profil de retour au niveau de base de la corticostérone (*cf. figure 55*).

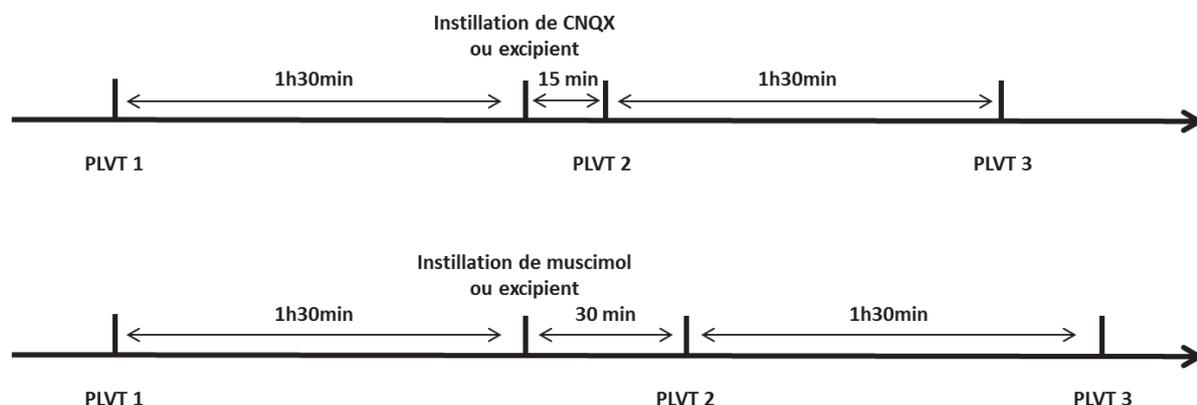


Figure 5543 Décours temporel des prélèvements en cage d'élevage

Néanmoins, les durées d'action des deux composés n'étant pas les mêmes, ce dernier prélèvement nous a juste informé sur la cinétique de diminution du niveau de corticostérone après le protocole de contention.

Conséquences d'une inactivation de l'HbL sur les niveaux de corticostérone en condition de test comportemental en piscine de Morris

Lors de cette expérience, seuls deux prélèvements ont été effectués, le jour du test de rétention. Le premier nous permettait d'obtenir les niveaux de base de CORT des animaux. Le second prélèvement était effectué 15 min après la fin du test de rétention, afin de se placer au moment correspondant au maximum de la libération de CORT consécutive à un stress (Ferland and Schrader, 2011; Koolhaas et al., 2011) (*cf. figure 56*).

Résultats

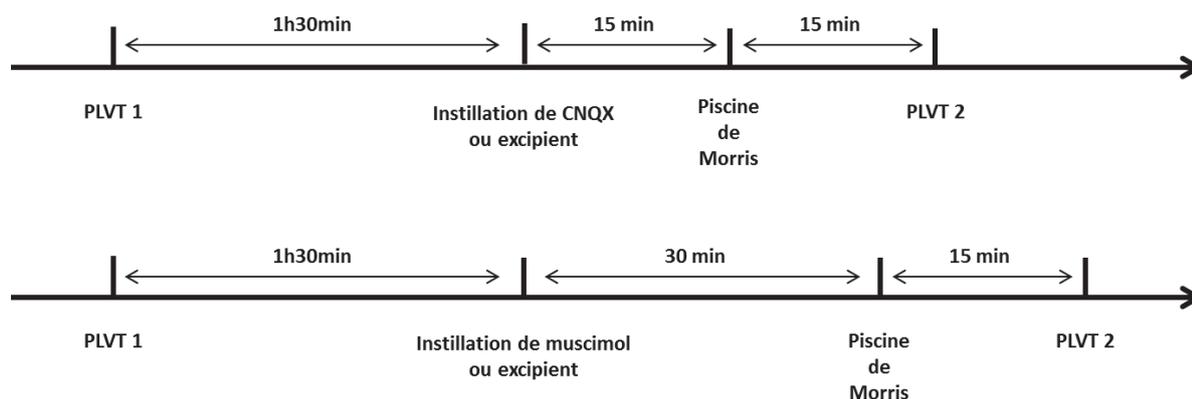


Figure 56 Déroulement temporel des prélèvements lors du test de piscine de Morris

4.6.2 Résultats

Conséquences d'une inactivation de l'HbL sur le niveau de corticostérone circulante en cage d'élevage

Après vérification histologique (basée sur les mêmes critères d'exclusion que pour la publication 2), les effectifs de rats utilisés étaient les suivants : LCRa : N = 14, CNQX : N = 9, muscimol : N = 5.

Nous avons analysé nos données de deux façons. La première sur les données brutes (concentrations en ng/mL) en pratiquant une ANOVA à mesures répétées avec le traitement comme facteur principal et le prélèvement (3 niveaux) comme mesure répétée. La seconde en comparant à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur (traitement) les valeurs obtenues lors des deuxième et troisième prélèvements calculées en pourcentage de la valeur de base obtenue lors du premier prélèvement. Nous avons effectué, le cas échéant, des analyses post-hoc (Newman-Keuls).

Les résultats sont présentés sur la [figure 57](#). Données brutes : l'ANOVA à mesure répétée a montré un effet significatif du traitement ($F_{2,25}=16,60$, $p<0,0001$), un effet significatif du prélèvement ($F_{2,50}=99,43$, $p<0,0001$) et une interaction significative de ces deux facteurs ($F_{4,50}=7,08$, $p<0,0001$). L'analyse post-hoc (Newman-Keuls) a indiqué que les concentrations lors du premier prélèvement ne différaient pas entre les groupes ($p=0,06$ au moins pour chaque comparaison). De plus, la concentration obtenue lors du second prélèvement était significativement supérieure à celle obtenue lors du premier prélèvement pour les groupes LCRa ($p<0,001$), muscimol ($p<0,001$) et CNQX ($p<0,001$) et la concentration du deuxième prélèvement du groupe muscimol était significativement supérieure à celle du deuxième prélèvement

Résultats

des groupes LCRa et CNQX ($p < 0,001$ pour chaque comparaison) alors qu'il n'y avait pas de différence entre les concentrations du deuxième prélèvement des groupes LCRa et CNQX ($p > 0,1$). La concentration du troisième (et dernier) prélèvement du groupe muscimol était significativement supérieure à celle des groupes LCRa et CNQX ($p < 0,001$ pour chaque comparaison) alors qu'il n'y avait pas de différence entre les concentrations du troisième prélèvement des groupes LCRa et CNQX ($p > 0,6$). Finalement, en ce qui concerne les rats ayant reçu du muscimol, la concentration lors du troisième prélèvement était restée significativement supérieure à celle du premier prélèvement ($p < 0,001$) alors qu'elle n'était plus différente de celle du premier prélèvement pour les groupes LCRa ($p > 0,7$) et CNQX ($p > 0,6$).

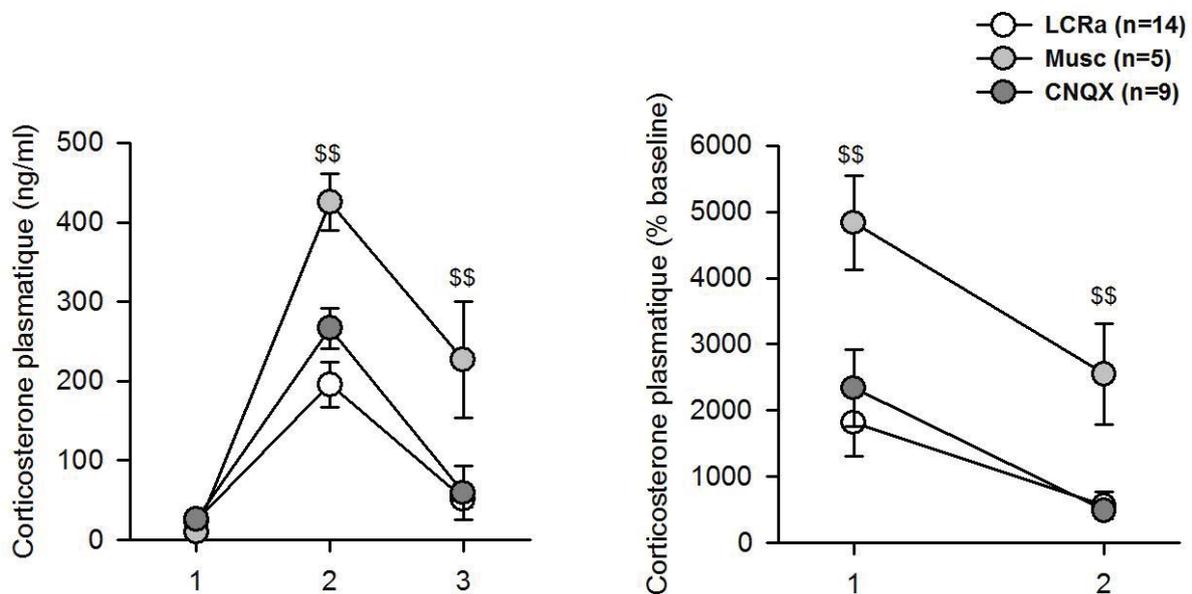


Figure 57 Résultats des dosages de CORT plasmatique suite à l'inactivation de l'HbL à l'aide de muscimol ou de CNQX.

(a) Graphique représentant la concentration de corticostérone plasmatique moyenne de chaque groupe lors des trois prélèvements. Tous les groupes présentent une augmentation de la libération de corticostérone suite au protocole d'inactivation (15 minutes avant le prélèvement 2) puis un retour progressif au niveau de base (équivalent au prélèvement 1). Seules les animaux ayant reçu du muscimol présentent une augmentation significativement supérieure aux deux autres groupes (**: $p < 0,001$ pour chaque comparaison). (b) Représentation des résultats lors des prélèvements 2 et 3 présentés sur le graphique (a) calculés en pourcentage de la concentration du premier prélèvement. À nouveau nous observons que seuls les animaux ayant reçu du muscimol présentent une augmentation de corticostérone plus importante que les deux autres groupes (\$\$ $p < 0,001$ pour chaque comparaison).

Données calculées en pourcentage : l'ANOVA a décrit un effet significatif du traitement ($F_{2,25}=11,58$, $p < 0,001$), un effet significatif du prélèvement ($F_{1,25}=28,10$, $p < 0,0001$) mais pas d'interaction significative de ces deux facteurs ($F_{2,25}=1,23$, $p > 0,3$). Malgré tout, en raison de la possibilité, visible sur la [figure 57](#), de différences

Résultats

intergroupe, nous avons effectué une analyse post hoc (Newman-Keuls), qui a indiqué une différence significative, lors du prélèvement 2, entre le groupe muscimol et les deux autres groupes ($p < 0,001$ pour chaque comparaison), les taux de ces derniers n'étaient pas différents entre eux ($p > 0,5$), indiquant que les rats du groupe muscimol ont présenté une élévation du taux de CORT, par rapport au premier prélèvement, significativement supérieure à celle des deux autres groupes (*cf. figure 57*). Nous avons également constaté une différence significative, lors du troisième prélèvement, entre le groupe muscimol et les deux autres groupes ($p < 0,025$ pour les deux comparaisons), dont les taux ne différaient pas l'un de l'autre ($p > 0,7$).

4.6.3 Conclusion

Lors de cette première expérience nous avons constaté que le protocole de micro-instillation a induit une élévation importante des niveaux sanguins de CORT, y compris pour les rats ayant reçu les excipients, indiquant que ce protocole représentait un stress non négligeable pour nos animaux. Ce résultat est en accord avec nos expériences d'activité locomotrice (*publication 2*) qui ont indiqué une réaction comportementale non négligeable chez les animaux témoins. De plus, seule l'instillation de muscimol a engendré une élévation de CORT plus importante que celle des animaux témoins. Ces résultats suggèrent que l'HbL peut jouer un rôle dans la régulation de l'axe HHS et que ce rôle semble dépendre de la transmission GABAergique en son sein.

4.7 Conséquences d'une inactivation de l'HbL sur les niveaux de corticostérone en condition de test comportemental en piscine de Morris

4.7.1 Résultats comportementaux

Apprentissage : lors de l'apprentissage tous les rats ont reçu une injection de LCRa avant chaque session; après le cinquième et dernier jour, nous avons constitué les groupes *a posteriori*, afin qu'il n'y ait pas de différences statistiques entre les performances des différents groupes (ANOVA à mesures répétées avec le groupe comme facteur et le jour d'apprentissage comme mesure répétée) entre les trois groupes [(distance parcourue avant d'atteindre la plateforme ($F_{2,32} = 0,56$, $p > 0,05$), pourcentage de temps passé en thigmotaxie ($F_{2,32} = 0,55$, $p > 0,05$), vitesse de nage ($F_{2,32} = 0,54$, $p > 0,05$)]. Ainsi nous étions sûr que chaque groupe était constitué de rats ayant eu un niveau similaire d'apprentissage (*cf. figure.58*).

Résultats

L'effectif de chaque groupe a ensuite été revu en fonction des vérifications histologiques. Ainsi les groupes utilisés pour cette expérience sont les suivants : LCRa : N = 19, muscimol : N = 6, CNQX : N = 10.

Test de rétention : Les résultats comportementaux sont présentés sur la [figure 59](#)

L'analyse du temps passé dans le quadrant cible a indiqué un effet significatif du traitement ($F_{2,32}=7,53$, $p<0,01$), et l'analyse post hoc a indiqué que les performances des groupes muscimol et CNQX ne différaient pas entre elles ($p>0,3$) mais différaient chacune de celles du groupe LCRa ($p<0,01$ et $p<0,05$ respectivement) ([cf.figure 59](#)). Une comparaison des performances de chaque groupe par rapport au hasard (25%) a indiqué que si les performances du groupe LCRa en différaient significativement ($t_{18}=5,116$, $p<0,0001$), celles des groupes muscimol et CNQX non ($t_5=-1,126$, $p>0,3$ et $t_9=-0,27$, $p>0,7$ respectivement) ([cf.figure 59](#)).

L'analyse de la distance totale parcourue a décrit un effet significatif du traitement ($F_{2,32}=23,91$, $p<0,0005$), l'analyse post hoc indiquant que les rats des groupes LCRa et CNQX, dont les distances de nage ne présentaient pas de différence significative ($p>0,5$), nageaient une distance significativement plus longue que les rats du groupe muscimol ($p<0,0001$ pour chaque comparaison) ([cf.figure 59](#)).

L'analyse de la vitesse de nage moyenne a indiqué un effet significatif du traitement ($F_{2,32}=38,83$, $p<0,01$), l'analyse post hoc indiquant que les rats muscimol nageaient significativement moins vite que les rats des groupes LCRa et CNQX ($p<0,0001$ pour chaque comparaison) qui eux nageaient à une vitesse comparable ($p>0,2$) ([cf.figure 59](#)).

L'analyse du pourcentage de temps passé en thigmotaxie a indiqué un effet significatif du traitement ($F_{2,32}=38,81$, $p<0,005$), l'analyse post hoc indiquant que les rats du groupe muscimol passaient significativement plus de temps en thigmotaxie que les rats des groupes LCRa et CNQX ($p<0,0005$ et $p<0,0005$ respectivement). De plus, les rats du groupe LCRa passaient moins de temps en thigmotaxie que les rats du groupe CNQX ($p<0,0005$) ([cf.figure 59](#)).

Enfin, l'analyse du temps de flottaison a indiqué un effet significatif du traitement ($F_{2,32}=6,62$, $p<0,01$), l'analyse post-hoc a précisé que les rats muscimol passaient significativement plus de temps à flotter que les rats des groupes LCRa et CNQX ($p<0,001$ et $p<0,001$ respectivement), ces derniers passant un temps comparable à

Résultats

flotter ($p>0,5$) (cf. figure 59). En conclusion, l'on peut dire que ces résultats ont été équivalents à ceux que nous avons trouvés lors de notre première étude, qui a donné lieu à la [publication 2](#).

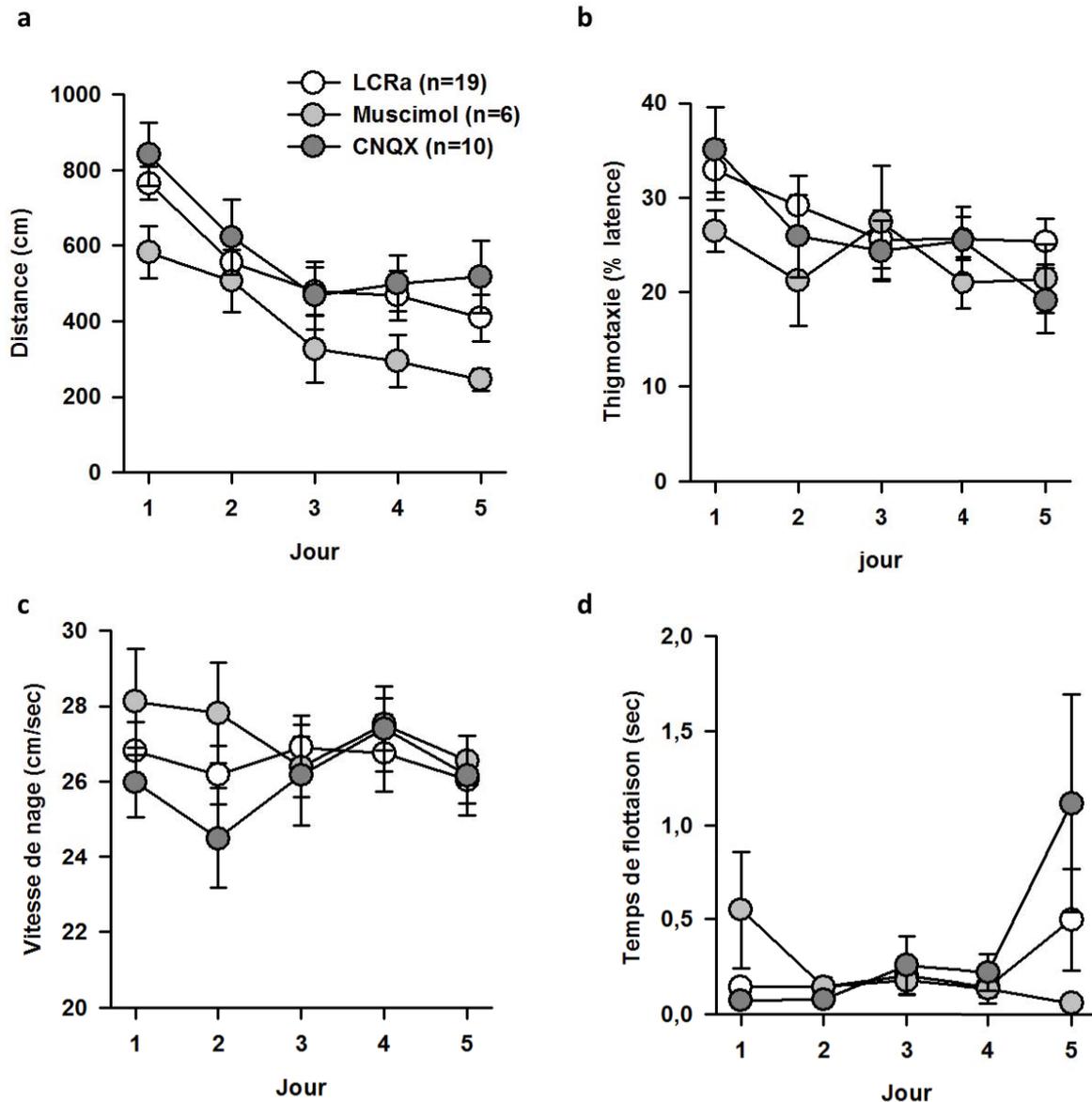


Figure 58 Résultats de l'apprentissage en piscine de Morris

Graphiques représentant les moyennes de (a) la distance parcourue jusqu'à la plateforme (b) le pourcentage de thigmotaxie, (c) la vitesse de nage et (d) le temps de flottaison des groupes d'animaux constitués a posteriori.

Résultats

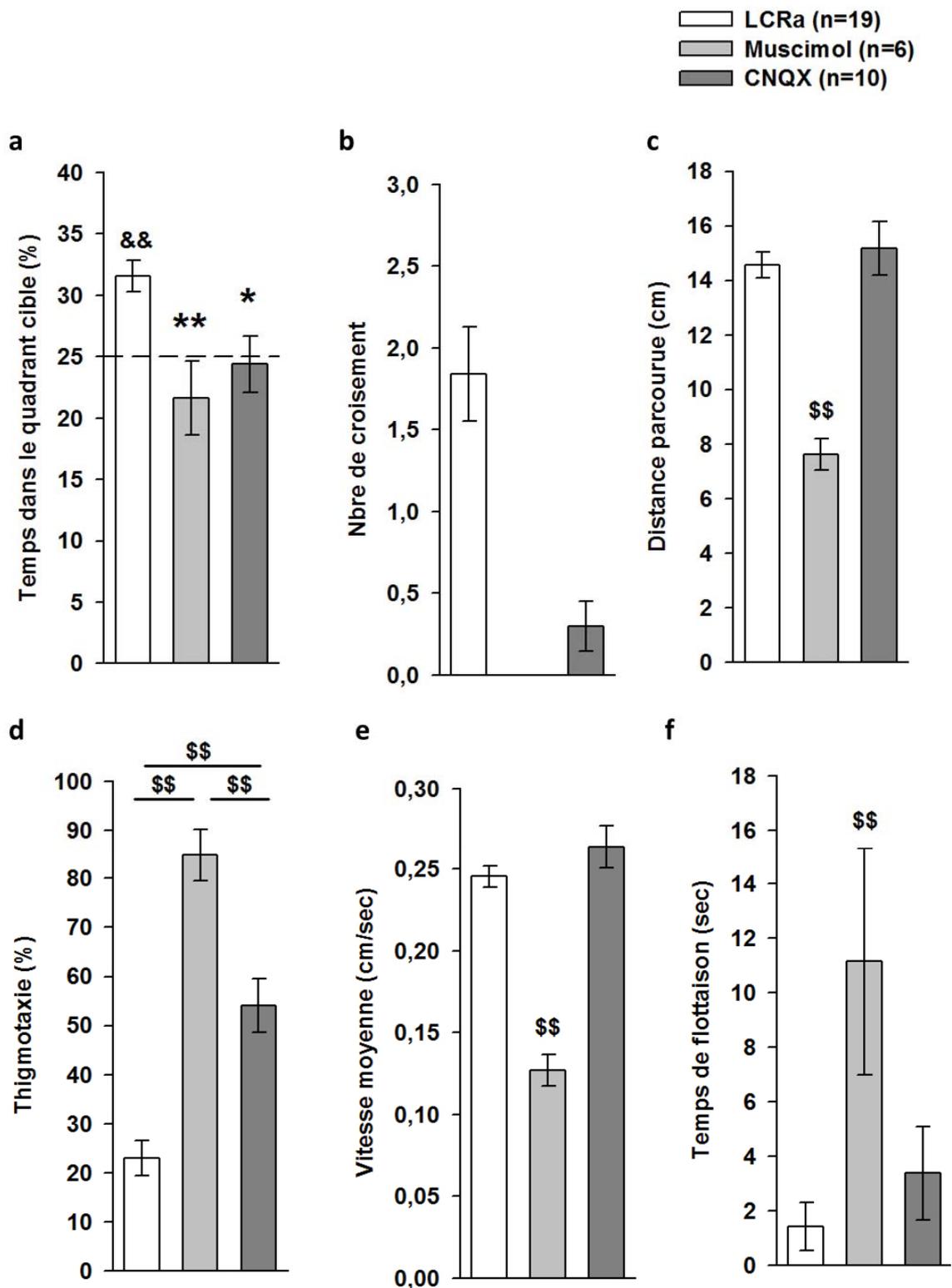


Figure 59 Résultats du test de rétention

Graphiques représentant les différentes variables analysées lors du test de rétention. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs LCRa ; && $p < 0,001$ vs hasard (25%) ; \$\$ $p < 0,001$ vs deux autres groupes.

Résultats

4.8 DONNÉES CORTICOSTÉRONÉ

A nouveau, nous avons analysé nos données concernant la concentration sanguine de corticostérone de deux façons. La première, en considérant les données brutes (concentration en ng/mL) en pratiquant une ANOVA à mesures répétées avec groupe comme facteur principal et prélèvement (2 niveaux) comme mesure répétée. La seconde, en comparant à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur (groupe) les valeurs obtenues lors du deuxième prélèvement (suite au test), calculées en pourcentage de la valeur de base obtenue lors du premier prélèvement (1h30 avant le test). Les données sont présentées sur la *figure 60*.

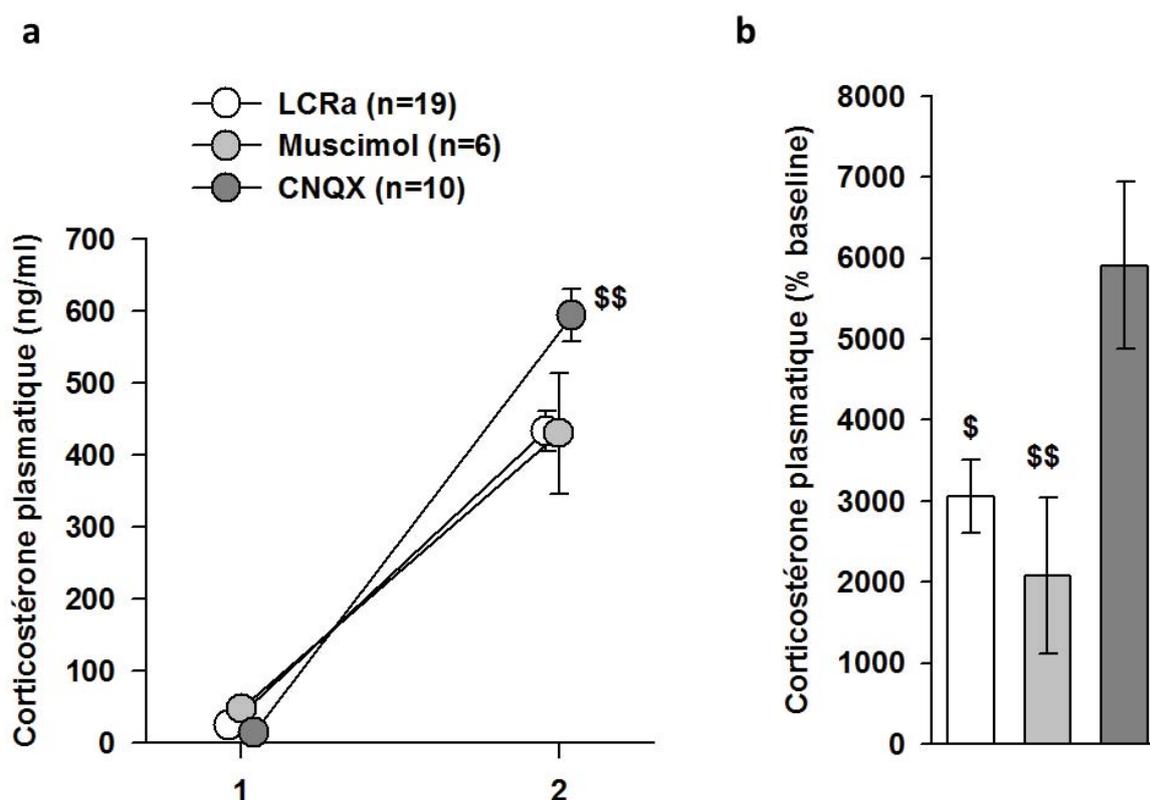


Figure 60 Résultat des dosages de corticostérone en piscine de Morris

(a) Graphique représentant la concentration de corticostérone plasmatique moyenne de chaque groupe lors des deux prélèvements. Tous les groupes présentent une augmentation de corticostérone suite au test de rétention en piscine de Morris (le prélèvement 2 est effectué 15 minutes après le TR). (b) Représentation des résultats du prélèvement 2 du graphique (a) calculés en pourcentage de la concentration du premier prélèvement. (\$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,001$ vs CNQX).

Données brutes : l'ANOVA à mesure répétée a indiqué un effet significatif du traitement ($F_{2,32}=4,13$, $p < 0,05$), un effet significatif du prélèvement ($F_{1,32}=294,9$, $p < 0,0001$) et une interaction significative de ces deux facteurs ($F_{2,32}=5,62$, $p < 0,01$). L'analyse post hoc indique que les concentrations lors du premier prélèvement ne différaient pas entre les groupes ($p < 0,05$ au moins pour chaque comparaison). De

Résultats

plus, pour chacun des traitements la concentration obtenue lors du second prélèvement étaient significativement supérieure à celle obtenue lors du premier ($p < 0,0001$ pour chaque traitement). Enfin, lors du second prélèvement la concentration obtenue pour le groupe CNQX était significativement supérieure à celle de chacun des autres groupes ($p < 0,001$ vs LCRa et $p < 0,01$ vs muscimol), alors que les concentrations chez les animaux ayant reçu du LCRa ou du muscimol étaient équivalentes ($p > 0,9$) (cf. figure 60).

Données calculées en pourcentage : l'ANOVA a indiqué un effet significatif du traitement ($F_{2,32} = 5,95$, $p < 0,01$), l'analyse post hoc indiquant que les rats du groupe CNQX présentaient une augmentation du taux de corticostérone, par rapport au premier prélèvement, significativement supérieure à celui des deux autres groupes ($p < 0,05$ vs LCRa et $p < 0,01$ vs Musc), ces derniers n'étant pas différents ($p = 0,39$) (cf. figure 60).

4.9 CONCLUSIONS

Ces résultats ont tout d'abord démontré que le paradigme de piscine de Morris provoquait une augmentation du niveau de corticostérone, quel que soit le traitement administré dans l'HbL, reflet probable du stress induit par une telle situation.

A la vue des résultats des différents tests d'anxiété que nous avons effectués (labyrinthe en croix surélevé et CO ; cf. page 126 et publication 2) ainsi que ceux des prélèvements en condition « cage d'élevage » (cf. page 134) nous nous attendions à observer une augmentation significative des niveaux de corticostérone pour le groupe muscimol, car c'est le traitement qui semblait avoir le plus fortement modifié le comportement des animaux, vers un profil stressé/anxieux. Cependant, nos résultats montrent que c'est uniquement l'administration de CNQX qui a eu pour conséquence de modifier la réponse physiologique au stress lors de notre test en piscine de Morris. Ceci est d'autant plus surprenant que c'est suite à l'administration de muscimol, et non de CNQX, qu'en cage d'élevage une élévation de la libération de corticostérone a été constatée. Cependant, ces résultats suggèrent que les déficits mnésiques induits par le muscimol ne semblent pas être dus à un défaut de gestion du stress. Par contre, la transmission glutamatergique au sein de l'HbL semble potentiellement être impliquée dans la gestion du stress lors d'une tâche nécessitant un traitement cognitif.

Discussion

Annexes

Dans cette partie discussion, après une brève introduction récapitulative, je discuterai la technique principalement utilisée, la micro-instillation. Puis je passerai en revue les résultats et les principaux points de discussion relatifs aux travaux présentés dans ce manuscrit et les confronterai les uns aux autres. Je m'attarderai surtout sur les résultats non encore publiés et sur le regard qu'ils apportent sur ceux que nous déjà publiés. Enfin, une partie « discussion générale et perspectives » visera à replacer l'ensemble de nos résultats dans une théorie des fonctions de l'HbL et à la confronter aux données de la littérature. Comme pour la présentation des résultats, l'ordre de la discussion ne suivra pas la chronologie des expériences mais concernera d'abord le rôle de l'HbL dans la mémoire travail (MdT) puis dans la mémoire de référence spatiale (MRS) pour finir avec la partie concernant son rôle supposé dans la gestion du stress.

1. Récapitulatif

Jusqu'alors, les travaux concernant l'HbL s'étaient essentiellement focalisés sur son rôle dans des comportements d'anxiété et d'aversion, des comportements liés à la récompense, ou avaient abordé son implication dans des pathologies comme la dépression (Amo et al., 2010; Lammel et al., 2012; Matsumoto and Hikosaka, 2009; Sartorius et al., 2010; Stamatakis and Stuber, 2012; Stamatakis et al., 2013). Son implication dans la mémoire n'avait été que peu étudiée. Les travaux effectués dans le cadre de ce projet de thèse ont permis de mettre en évidence que l'HbL participe aux fonctions nécessaires à la MdT (*publication 1*). Plus précisément, nos résultats suggèrent que l'HbL pourrait servir de relai des informations en provenance du CPFm lors d'une tâche de non-appariement différé à la position. Ces travaux ont également montré qu'elle participe aux processus d'encodage et de rappel - mais pas de consolidation - d'une information spatiale (*publication 2*).

Nos expériences suggèrent qu'elle pourrait aussi intervenir dans des comportements anxieux et dans la gestion, notamment physiologique, du stress. Cependant, ce rôle semble être influencé par les conditions expérimentales et les systèmes de neurotransmission étudiés. En effet, si nous avons observé une augmentation des niveaux de corticostérone plasmatique, en cage d'élevage, suite à nos protocoles d'inactivation, seul l'instillation de CNQX a engendré une augmentation de ce marqueur de la réponse physiologique au stress en piscine de Morris.

2. Considérations techniques

Durant ce travail, nous avons utilisé la technique de micro-instillation intra-parenchymateuse, largement employée dans les études de neurosciences comportementales (Chudasama and Robbins, 2004; Piantadosi et al., 2016; St. Onge et al., 2012; Stopper and Floresco, 2013).

L'utilisation d'une telle technique, au regard de nos questionnements, est apparue comme la méthode disponible au laboratoire la plus appropriée. Ainsi, elle nous a permis de dissocier les différentes étapes de mise en place et de rappel d'un souvenir spatial. Elle nous a également permis de mettre en évidence une dichotomie neurochimique fonctionnelle lors du test en piscine de Morris ([publication 2](#)). Ces conclusions n'auraient pas été possibles avec une technique lésionnelle.

En effet, les lésions, qu'elles soient excitotoxiques ou électriques, peuvent provoquer des réorganisations cérébrales importantes qui modifient les réseaux neuronaux (Deller and Frotscher, 1997; Lomber, 1999). Ces réorganisations, qui sont souvent le résultat d'une tentative de compensation des dégâts créés par la lésion, peuvent engendrer une atténuation des déficits lors d'études comportementales (Lomber, 1999; Wang et al., 2015); il devient alors difficile de conclure si les résultats comportementaux sont le reflet de la lésion et/ou des réorganisations qui se sont opérées. Ces considérations sont probablement à prendre en compte lors d'études antérieures ayant mis en évidence des déficits mnésiques moins importants suite à des lésions de l'habénula (Lecourtier et al., 2004; Wang et al., 2013).

Un autre avantage se situe au niveau éthique. Lors de notre étude concernant le rôle de l'HbL et de la voie CPFm-HbL dans la MdT, cette technique nous a permis d'utiliser des protocoles pour lesquels les animaux étaient leurs propres témoins, permettant ainsi de diminuer leur effectif.

Néanmoins, certains aspects et certaines limites de cette technique de micro-instillation sont à prendre en considération dans l'interprétation de nos résultats.

En général, la technique consistant en l'administration intra-parenchymateuse d'agonistes des récepteurs GABAergiques ou d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques conduit à ce que les auteurs nomment une « inactivation » de la structure cible. Cependant, il est important de noter que l'utilisation de muscimol et de CNQX ne correspond pas exactement à la même « inactivation » de l'HbL.

Annexes

En effet, dans le cas du muscimol, un message inhibiteur est envoyé à la structure et elle semble ainsi inactive. Néanmoins, physiologiquement l'HbL reçoit des afférences inhibitrices, notamment depuis l'hypothalamus latérale, le noyau entopédonculaire, le septum, la bande diagonale de Broca et le Nac (Golden et al., 2016; Meye et al., 2016a; Nagy et al., 1978) ou encore de structures capables de co-libérer GABA et glutamate, comme le NE ou l'ATV (Root et al., 2014; Shabel et al., 2014). De cette manière il est possible de considérer que le muscimol mime et amplifie le message de ces voies inhibitrices en direction de l'HbL, tout en diminuant son activité générale. De sorte que l'inhibition constatée est surtout le reflet d'une amplification de ces messages inhibiteurs et donc la modification d'un système dans son ensemble.

Le CNQX, quant à lui empêche l'activation des récepteurs glutamatergiques AMPA. De ce fait, aucun message excitateur ne peut être induit via leur activation. Ainsi, l'HbL ne peut plus intégrer des informations impliquant le glutamate (au moins au niveau des récepteurs AMPA) en provenance de l'ensemble de ses afférences glutamatergiques, alors que les informations inhibitrices citées précédemment sont, elles, toujours présentes (*cf. figure 61*). Enfin, l'activité de l'HbL est aussi modulée par d'autres types de neurotransmissions (dopaminergique, cholinergique ou noradrénergique) que nous n'avons pas testées lors de ma thèse et qui n'ont en principe pas été affectée par ces procédures d'inactivation.

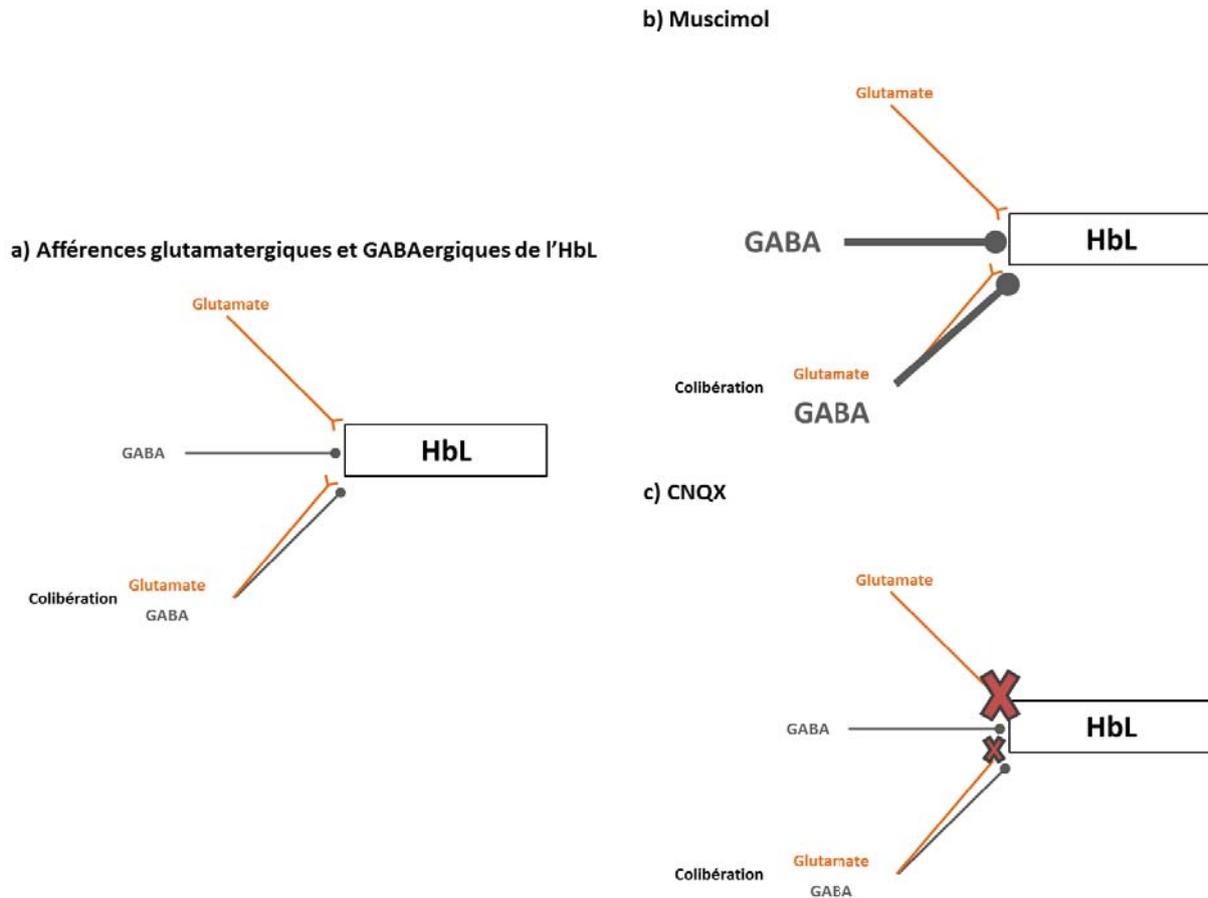


Figure 441 Effets de nos composés pharmacologiques instillés dans l’HbL

Représentation des effets des composés pharmacologiques sur la neurotransmission glutamatergique et GABAergique de l’HbL. (a) Représentation des afférences glutamatergiques et GABAergiques projetant à l’HbL. (b) L’application de muscimol conduit à l’inactivation de la structure mais mime également une augmentation des messages GABAergiques envoyés à l’HbL. (c) Le CNQX conduit au blocage de la transmission glutamatergique impliquant les récepteurs AMPA sans perturber les autres neurotransmissions.

De cette manière, nous pouvons considérer l’effet des composés instillés, plutôt que sous l’angle d’une inactivation, sous l’angle de la modification de certains réseaux afférents à l’HbL – voire à l’intérieur de l’HbL, ces derniers étant méconnus -, ce qui pourrait expliquer les différences parfois observées selon le composé pharmacologique utilisé. Néanmoins, l’utilisation de ces différents composés pharmacologiques nous a permis de mettre à jour une dichotomie neurochimique fonctionnelle au sein de l’HbL. En effet, dans notre étude de MRS en piscine de Morris, le CNQX semble n’avoir provoqué que des déficits mnésiques alors que le muscimol semble avoir également engendré une augmentation de l’anxiété des animaux. Ces résultats suggèrent que l’implication de l’HbL dans la MRS implique majoritairement un système de neurotransmission glutamatergique, alors que son rôle dans ce qui semble être la gestion de l’aspect émotionnel des situations comportementales implique également la neurotransmission GABAergique.

Annexes

Outre ces considérations concernant les composés utilisés, notre technique présente également certaines limites. La première est qu'elle nécessite l'implantation à demeure de guides canules chez nos animaux et l'utilisation d'un protocole de contention par le manipulateur. Le caractère stressant de cette contention est probablement un facteur limitant pour la poursuite des études concernant l'importance de l'HbL dans les comportements anxieux et de réaction face au stress. Ceci est particulièrement frappant au regard des dosages sanguins effectués qui ont indiqué que la contention nécessaire aux micro-instillations générerait une réponse physiologique de réponse au stress chez les rats, y compris ceux ayant reçu les excipients. L'induction d'une telle réponse pourrait être un biais important lors d'expérience visant à étudier le rôle de l'HbL dans les émotions.

Enfin, cette technique ne permet pas un contrôle exact de la diffusion de nos composés au sein de la région ciblée. Cette limite nous a obligés à faire des expériences supplémentaires lors desquels les animaux recevaient l'instillation des composés pharmacologiques dans les régions adjacentes à l'HbL (*cf. publication 2, données supplémentaires*). Cette limite apparaît donc à la fois technique (nécessité de vérifier que nos effets sont uniquement dus à l'action des composés dans la structure ciblée) mais également éthique (augmentation du nombre d'animaux pour effectuer les différents contrôles neuroanatomiques).

Ainsi, dans le cadre d'études futures, qui viseront notamment à mieux décrire le rôle de l'HbL en tant qu'interface entre cognition et émotion, il apparaîtra pertinent de changer de technique afin de palier autant que possible à ces limites (*cf. annexes, développement de la technique pharmacogénétique*).

3. Rôle de l'HbL dans les processus mnésiques

Les deux publications présentées dans ce manuscrit ont décrit le rôle de l'HbL dans la MdT (*publication 1*) et la MRS (*publication 2*). Bien que ces études aient ciblé des types différents de mémoire, la comparaison des résultats peut potentiellement permettre de mieux comprendre le rôle de l'HbL dans les processus mnésiques en général.

Les déficits observés en piscine de Morris, plus particulièrement suite à l'administration de muscimol, pourraient être attribués à une diminution de la

Annexes

motivation de nos animaux. En effet, lors du test comprenant une plateforme visible, le muscimol avaient engendré une augmentation de la distance parcourue pour rejoindre la plateforme plus importante que les rats témoins et ceux ayant reçu du CNQX (*publication 2*). Cependant, lors du test de MdT, l'administration de muscimol n'a pas semblée avoir d'effets délétères sur des paramètres tels que le nombre d'omissions, lors des phases d'échantillonnage et de test, ou la latence pour répondre aux stimuli lumineux et pour aller consommer la récompense. Ainsi, bien que la motivation des rats à effectuer les deux tests ne soit pas comparable ; ce résultat suggère que les processus motivationnels n'étaient pas perturbés par nos protocoles d'inactivation de l'HbL.

Une autre comparaison possible entre les deux tests est la suivante : les déficits d'encodage de MRS, notamment suite à l'administration de muscimol, pourraient être en partie expliqués par le fait que ce traitement induit des déficits de MdT.

Ainsi, en piscine de Morris, une altération de cette mémoire, pourrait conduire les animaux à ne pas améliorer leurs performances d'un essai à l'autre au cours d'une même session d'apprentissage. Notre protocole ne nous a malheureusement pas permis d'évaluer la MdT en piscine de Morris lors de nos expériences. En effet, chaque essai d'une même session n'étant situé à la même distance de la plateforme, il n'était pas possible de comparer les quatre essais d'une même session. Cependant, lors du test ciblant uniquement le rappel, des déficits ont été induits alors même que la MdT n'était pas mise en jeu (les rats n'effectuant qu'un essai unique). Ainsi, l'HbL joue un rôle dans la MdT mais ce rôle ne semble pas pouvoir expliquer l'ensemble des déficits de MRS constatés. Ces résultats suggèrent finalement que l'HbL intervient probablement dans plusieurs systèmes de mémoire.

En ce qui concerne les omissions lors du test de MdT, il est également intéressant de les considérer non pas seulement comme un reflet des processus motivationnels, mais également comme un reflet d'un maintien de la règle apprise. Nos résultats démontrent que les animaux restaient capables de rappeler une règle qui était dans ce cas de répondre aux stimuli lumineux afin de chercher une récompense. Or, en piscine de Morris, les déficits constatés semblent indiquer qu'ils avaient oublié la « règle » consistant à chercher la plateforme et non pas à utiliser un comportement

Annexes

de thigmotaxie, inefficace dans ce cas précis. A nouveau les tâches mnésiques sont différentes. Lors de l'étude de MRS, l'apprentissage a duré 5 jours et les performances dépendaient toujours de la prise en compte de l'environnement. L'apprentissage de la règle de la tâche de MdT a été effectué pendant une période bien plus longue, ce qui pourrait avoir engendré l'automatisation des comportements liés à la règle. Un tel phénomène, laisserait la possibilité aux rats de focaliser leur attention sur l'aspect lié à la MdT uniquement, et pourrait être considéré comme de la sémantisation ou de la procéduralisation. Tous nos résultats ont également précisé le rôle de l'HbL dans les processus « online » de mémorisation (MdT, encodage et rappel d'une MRS). Ainsi, il semble que cette structure ne soit impliquée que lorsque le contexte d'apprentissage est pris en compte, et même plus précisément lorsque le comportement est dirigé vers un but précis.

Ces résultats peuvent donc suggérer que l'implication de l'HbL dans la mémoire est plus spécifique de souvenirs contextualisés que de souvenirs sémantisés ou procéduralisés.

4. L'HbL comme interface entre émotions et cognition

Si nos travaux ont montré l'implication de l'HbL dans les processus mnésiques, certains des comportements engendrés par l'inactivation de l'HbL (par ex. la présence d'un niveau excessif de thigmotaxie en piscine de Morris) sont apparus cohérents avec une littérature décrivant son rôle dans les émotions. Nous avons alors voulu déterminer si l'HbL pouvait se situer à l'interface des émotions et de la cognition.

Dans un premier temps nous avons cherché à évaluer le lien entre les déficits mnésiques et le niveau d'anxiété de nos animaux. En effet, un comportement de thigmotaxie en piscine de Morris a été décrit comme étant le reflet d'une anxiété exacerbé venant perturber les processus d'apprentissage (Topic et al., 2005; Treit and Fundytus, 1988). Si, les différents tests d'anxiété effectués (labyrinthe en croix surélevé et champ ouvert) ont permis de mettre en évidence l'importance de la transmission GABAergique au sein de l'HbL dans les comportements anxieux ; en ce qui concerne le CNQX, la réaction d'anxiété était spécifique du champ ouvert,

Annexes

suggérant que les systèmes neurochimiques impliqués sont dépendants des conditions expérimentales.

Ces résultats sont cohérents avec les travaux qui ont décrit l'importance de la balance entre excitation et inhibition au sein de l'HbL. En effet, l'altération de cette balance, induite par une prise de drogue notamment, semble conduire à des comportements pathologiques comme la dépression (Lecca et al., 2014; Meye et al., 2016a; Valentinova and Mameli, 2016). Ainsi, il n'est pas étonnant d'observer des différences entre les composés utilisés dans les comportements émotionnels testés. Cependant, les études récentes qui ont mis en évidence l'importance de l'HbL dans les comportements anxieux et d'évitement démontrent que c'est son activation – et non pas son inhibition – qui conduit à un profil anxieux (Shabel et al., 2012; Stamatakis and Stuber, 2012; Stamatakis et al., 2013). De plus, certaines des altérations comportementales observées dans des modèles de dépression chez les rongeurs (anhédonie, perte de motivation) sont associées à une hyperactivité de l'HbL (Li et al., 2011, 2013, Meye et al., 2015, 2016b). Or, nos protocoles ayant systématiquement eu pour but de diminuer l'activité de cette structure, il semble peu probable que les déficits observés aient été la conséquence d'un désordre émotionnel proche de la dépression.

Ainsi, il semblerait que, les déficits constatés suite à nos protocoles d'inactivation aient été le reflet d'une perturbation dans la mise en place d'un comportement adapté face à une situation anxiogène.

Nous avons également évalué si l'inactivation de l'HbL pouvait perturber la réaction physiologique des animaux confrontés à un stress en procédant à des dosages du taux sanguin circulant de CORT. Nous avons effectué deux expériences différentes lors de cette étude. La première visait à démontrer le rôle de l'HbL sur la libération de CORT, sans tâche comportementale. La seconde posait la même question mais dans des conditions stressantes et mettant en jeu une contrainte cognitive (la piscine de Morris). Lors de la première expérience (en cage d'élevage) seul le muscimol a engendré une augmentation des niveaux de CORT circulante par rapport à l'administration d'excipient. Par contre, en piscine de Morris, seul le CNQX a provoqué une augmentation du niveau sanguin de CORT par rapport aux animaux témoins.

Annexes

Globalement, ces résultats apparaissent cohérents avec les expériences de Ootsuka et Mohammed (2015) démontrant, sur des animaux anesthésiés, le rôle de l'HbL dans des réponses physiologiques à un stress (*cf. Nociception, stress et anxiété, page 21*). Cependant, durant leurs expériences ces auteurs ont activé l'HbL par micro-instillation de bicuculine (un antagoniste GABA_A). Lors de nos expériences nous avons inhibé cette structure et pourtant nous avons également observé une modulation d'un des marqueurs physiologiques au stress. Ainsi, que l'on active ou inactive l'HbL les réponses physiologiques au stress peuvent être similaires. A nouveau ce résultat semble démontrer que l'activité globale de l'HbL et donc la balance entre excitation et inhibition au sein de cette structure a une importance fonctionnelle particulière et encore mal comprise.

Les conséquences de l'administration de muscimol sur la libération de CORT en piscine de Morris semblent incohérentes avec les résultats comportementaux. En effet, suite à l'administration de muscimol, la présence très faible dans les bras ouverts dans le labyrinthe en croix et la forte thigmotaxie dans la piscine de Morris, ainsi que l'augmentation excessive de la libération de corticostérone en cage d'élevage, étaient pour nous le reflet d'une anxiété excessive, d'un défaut de gestion d'une situation stressante. Ainsi, nous nous attendions à observer une hausse significative de la libération de corticostérone chez les animaux ayant reçu du muscimol lors du test en piscine de Morris. Or ce n'est pas ce que nous avons constaté. Ainsi, ce résultat semble donc indiquer que lors d'une situation comportementale nécessitant le rappel d'un souvenir, la neurotransmission GABAergique est impliquée dans la dimension mnésique sans affecter l'intégration de la dimension stressante de la situation.

En ce qui concerne le CNQX, l'absence d'effets constatés, suite à son administration, lors du test du labyrinthe en croix surélevé, ainsi que lors des dosages de CORT en cage d'élevage, nous avait fait anticiper une absence de différence lors des dosages de CORT en piscine de Morris. La présence d'une forte hausse de CORT circulante suite à l'administration de CNQX par rapport aux animaux témoins et ceux qui ont reçu du muscimol a donc été totalement contraire à nos attentes. Elle indique que la dichotomie neurochimique fonctionnelle décrite dans la publication 2 est plus complexe que ce que nous imaginions. Finalement, elle suggère que la transmission glutamatergique au sein de l'HbL semble, au-delà des processus mnésiques, jouer

Annexes

un rôle dans la gestion du stress. Tous ces résultats décrivent la difficulté d'étudier le stress et l'anxiété de manière indépendante. En effet, l'animal a toujours la possibilité d'anticiper le test comportemental auquel il va être soumis, puis il va subir le stress inhérent à ce test. Le comportement qu'il présentera dans la tâche sera finalement la conjonction de tous ces paramètres.

Nos résultats semblent finalement dégager l'hypothèse selon laquelle l'HbL pourrait intervenir dans la réponse au stress mais également dans l'anticipation d'une situation potentiellement stressante. Ces hypothèses apparaissent cohérentes avec nos résultats concernant le rôle online de prise en compte d'information par l'HbL qui expliquerait sa capacité à moduler l'axe HHS. Elles sont également cohérentes avec son rôle dans le rappel d'une mémoire épisodique qui pourrait expliquer comment elle peut participer à des comportements anxieux. Cependant, nos résultats n'ont pas encore permis d'étudier précisément ces différents aspects fonctionnels de l'HbL.

Pour la suite, à la vue de nos résultats, il apparaît particulièrement pertinent d'étudier la balance entre excitation et inhibition au sein de cette structure (Meye et al., 2016; Root et al., 2014; Shabel et al., 2014). En effet, cette dernière semble jouer un rôle fonctionnel primordial dans ces processus liés au stress et à l'anxiété et pourrait expliquer nos résultats contradictoires.

5. Interprétations alternatives

Enfin, l'ensemble des résultats issus de notre étude des comportements anxieux et de la réponse physiologique au stress a apporté une vision différente et des explications alternatives face aux comportements observés en piscine de Morris. En effet, nos résultats pourraient suggérer que l'inactivation de l'HbL a conduit nos animaux à utiliser un comportement inadapté. Le comportement de thigmotaxie observé serait alors le résultat de leur incapacité à modifier ce comportement qui, par défaut, resterait la nage contre la paroi plutôt que la recherche focalisée de la plateforme (Devan et al., 1999b).

Ainsi, l'HbL semblerait intervenir dans la sélection du comportement moteur adapté à une situation. Cette interprétation correspond en partie à l'hypothèse d'Hikosaka qui propose que l'HbL participe aux fonctions nécessaires à la prise de décision et participe à la suppression motrice (Hikosaka, 2010). Lors de notre étude, la

Annexes

diminution de l'activité en champ ouvert et la plus faible exploration du labyrinthe en croix surélevé des animaux traités au muscimol pourrait être cohérente avec cette hypothèse. En piscine de Morris plutôt qu'une suppression motrice, l'inactivation de l'HbL semble avoir empêché l'utilisation d'une stratégie motrice alternative à la thigmotaxie. Nos résultats apparaissent ainsi cohérents avec les travaux plus récents démontrant le rôle de l'HbL dans la flexibilité comportementale (Baker et al., 2016). Ce propos rejoint donc l'idée générale décrite en introduction proposant l'HbL comme une interface entre cognition et émotion afin d'adapter le comportement d'un individu. Cependant, les travaux effectués durant cette thèse permettent de préciser que son rôle dans la cognition se déroule durant la gestion de processus « online », c'est-à-dire lorsque l'expérience est vécue et l'attention maximale dans une période d'intégration des informations sensoriels.

Baker et collaborateurs proposent même que l'HbL puisse intervenir dans la prise en compte d'informations pro- et rétro-actives (Baker et al., 2016) suggérant qu'elle peut être un lien entre ce que nous avons expérimenté et ce que nous sommes en train de faire. Cette hypothèse est cohérente avec les expériences d'enregistrement menées chez le primate démontrant que l'HbL participe à la critique du comportement utilisé (Bromberg-Martin and Hikosaka, 2011; Bromberg-Martin et al., 2010).

6. Vers une théorie unifiée du rôle de l'HbL

L'ensemble de nos résultats place finalement l'HbL comme une structure pivot permettant l'apprentissage et le rappel de souvenirs épisodiques qui nécessitent la sélection d'un comportement. De plus, ce rôle semble intégrer la valence émotionnelle de la situation. Le fait que l'HbL participe à des processus de mémorisation « online » et son implication dans la MdT lui permet d'intervenir durant l'intégration des multiples stimulations de l'environnement lorsque l'individu est en train de réagir à une situation.

Cette vue d'ensemble de nos résultats suggère donc que l'HbL participe à la sélection d'un comportement adapté à une situation en fonction des expériences que l'on a personnellement vécues et des attentes vis-à-vis de la situation en cours (*cf. figure 62*).

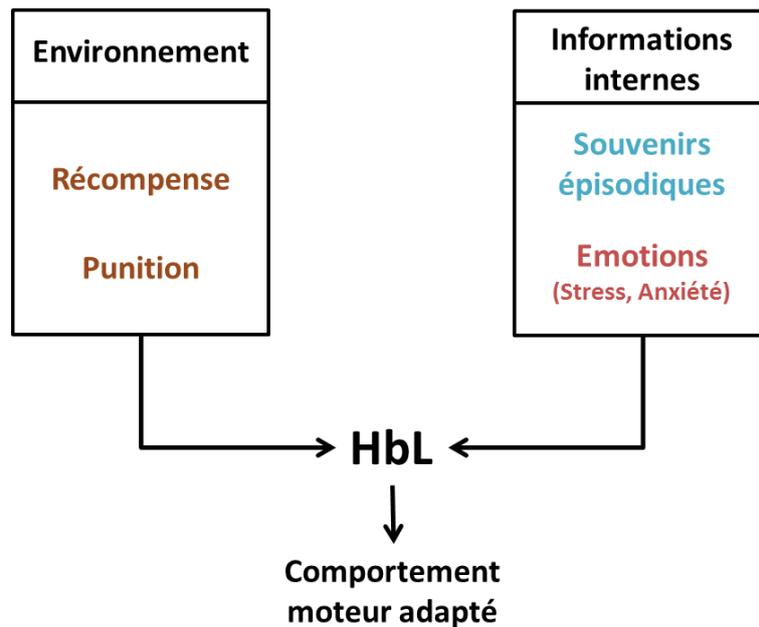


Figure 62 L'HbL, une structure intégratrice des informations externes et internes ?

L'HbL semble intégrer et mettre en lien différentes informations concernant l'environnement et l'état interne d'un individu afin de participer à la sélection du comportement le plus adapté à la situation.

Cette hypothèse suppose que l'HbL peut confronter le ressenti que nous avons d'une expérience en cours avec toutes les expériences similaires que nous avons déjà vécues (nos souvenirs épisodiques) et qui peuvent moduler notre comportement.

De cette manière elle va mettre en lien, en direct, des informations internes comme les souvenirs personnels et les émotions ressenties, avec les informations de l'environnement, comme la récompense ou la punition envisageable, pour conduire à un comportement adapté.

La position anatomique de l'HbL lui permet de remplir ce rôle. Elle peut recevoir directement des informations concernant l'état interne de l'individu via des afférences en provenance de l'HL, du NSC, de la PAG ou encore de la lamina 1 de la corne dorsale de la moelle épinière (Craig, 2003; Herkenham and Nauta, 1977; Zhang et al., 2016b). Toutes les informations concernant les actions motrices en cours peuvent lui parvenir via ses afférences depuis le NE (Herkenham and Nauta, 1977; Parent et al., 1981, 2001). De plus, ses cohérences d'activité avec l'HPC (Aizawa et al., 2013b; Goutagny et al., 2013) lui permettraient de participer aux processus de mémoire épisodique, tout comme elle semble pouvoir intervenir dans la MdT via ses connexions avec le CPF (Kim and Lee, 2012). A cela s'ajoute le rôle de l'HbL le

Annexes

mieux décrit à ce jour, celui de codage de la « non-récompense » ou « du pire » (Matsumoto and Hikosaka, 2007, 2009) lui permettant de participer à la sélection d'un comportement en fonction de sa conséquence possible.

Toutes ces informations vont pouvoir moduler l'activité de l'HbL, qui va alors contrôler directement ou indirectement différents centres neurochimiques mésencéphaliques comprenant la dopamine, la sérotonine, la noradrénaline et l'acétylcholine, et *in fine* influencer la sélection du comportement à utiliser, ainsi que les réponses physiologiques de l'individu face à une situation, et participer à la mémorisation de l'expérience (*cf. figure 63*).

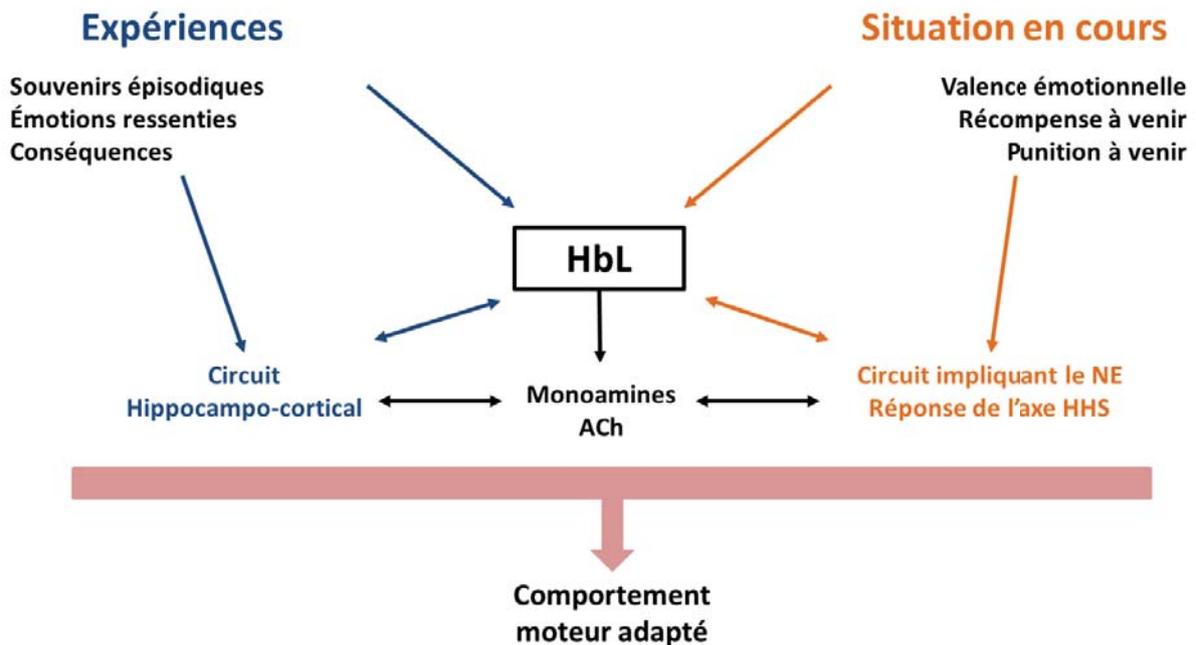


Figure 453 L'HbL : un centre intégrateur responsable de l'adaptation comportementale ?

L'HbL se situe au centre d'un réseau cérébral qui lui permettrait de prendre en compte les expériences vécues par un individu et les informations en lien avec la situation en cours. Cette intégration par l'HbL serait ensuite communiquée à différents centres modulateurs qui pourraient en retour moduler l'activité de différents circuits pour finalement adapter le comportement moteur.

7. Perspectives

7.1 Inclure l'HbL dans le réseau cérébral responsable de la MdT

Nous avons suggéré dans la [publication 1](#) que l'HbL pouvait servir de relai d'informations en provenance du CPFm lorsque la charge en MdT augmentait. Par contre le mécanisme par lequel l'HbL peut intervenir dans cette mémoire est encore inconnu. Une poursuite nécessaire de ces travaux sera de comprendre comment l'HbL peut moduler l'activité du CPFm, comment ces deux structures interagissent, et dans quel but. Un circuit probable impliquerait l'ATV et la qATV.

Afin de mieux comprendre ce réseau, une expérience consisterait à enregistrer l'activité électrophysiologique de l'HbL, du CPFm et de l'ATV/qATV durant une tâche de MdT. En effet, il est probable que l'HbL puisse moduler la libération de dopamine au sein du CPFm (Lecourtier et al., 2008; Lisoprawski et al., 1980) lors de la tâche et plus précisément lorsque les délais augmentent. Ainsi, l'analyse des cohérences d'activité entre les structures de ce réseau permettrait peut-être de mieux définir le niveau de communication entre elles (Fries, 2005, 2015). Ensuite, il faudrait observer les conséquences d'une inactivation de l'HbL sur l'activité du CPFm et de l'ATV/qATV.

Une autre approche consisterait à explorer, en utilisant la voltamétrie par exemple, les conséquences de l'inactivation de l'HbL sur la libération de DA dans le CPF et notamment en condition de test comportemental durant la tâche de NADP.

Ensemble, ces différentes expériences permettraient de mieux comprendre comment le CPFm, l'HbL et l'ATV/qATV peuvent interagir lors de tâches de mémoire de travail nécessitant une modulation fine de la DA.

7.2 Etudier l'organisation interne de l'HbL

Une des limites de nos conclusions concernant notre étude de la MdT vient du fait que la connexion CPFm – HbL n'est que très peu détaillée. Il serait donc pertinent de mettre en évidence quel(s) sont le(s) type(s) de neurones du CPFm qui projettent à quel(s) type(s) de neurones de l'HbL. Différentes expériences de traçage, démarrées lors de ce travail, associées à des techniques immunohistologiques, pourraient permettre de renseigner la nature de cette connexion préfronto-habénulaire.

Annexes

Ensuite, il serait intéressant de poursuivre ces investigations en explorant en aval la suite du réseau proposé ci-dessus, en incluant l'ATV/qATV. Ainsi, à l'aide de différents traceurs viraux antérogrades et rétrogrades ou encore la méthode TRIO (Schwarz et al., 2015) il serait possible de démontrer qu'un neurone de l'HbL reçoit des afférences du CPFm et projette à l'ATV et/ou à la qATV. Ainsi un réseau comprenant l'HbL qui connecterait entre eux le CPFm et l'ATV/qATV serait précisément décrit (*cf. figure 64*). Nous pourrions également imaginer décrire la nature neurochimique des différents neurones de ce circuit. Une telle investigation nécessiterait, en plus de la technique de traçage, des marquages immunohistochimiques ou des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches comprenant au moins deux des structures citées et la possibilité de visualiser les neurones appartenant au réseau CPFm-HbL-ATV/qATV.

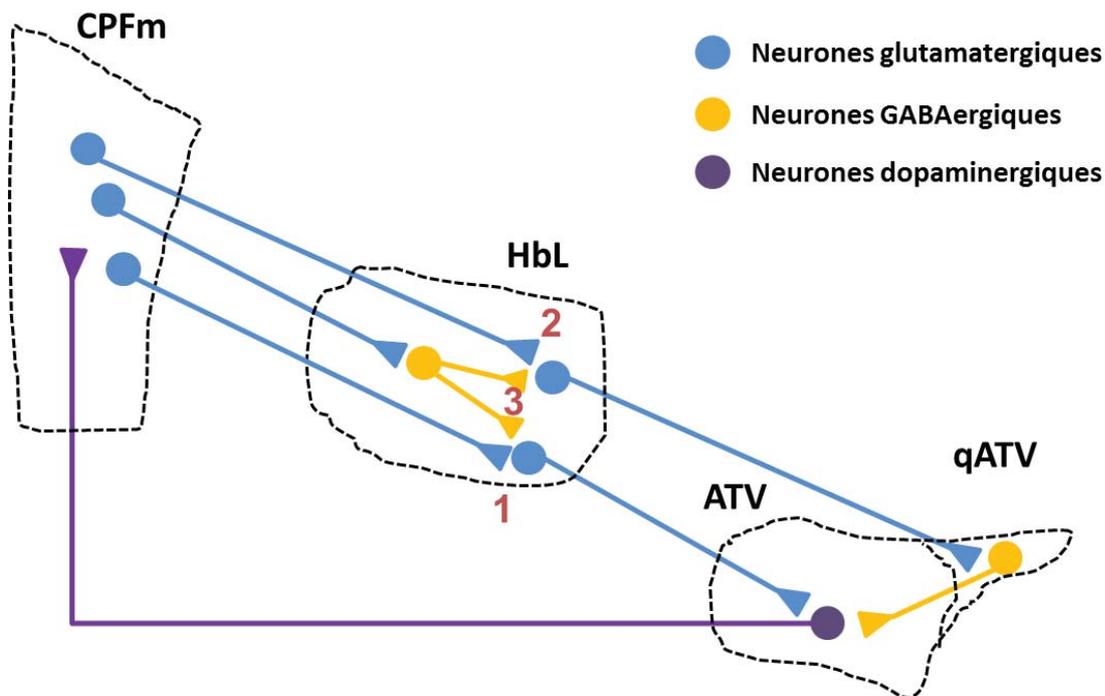


Figure 64 Proposition d'un circuit préfronto-habénulo-mésencéphalique

Représentation schématique d'un circuit possible au sein duquel l'HbL serait un relai entre le CPFm et l'ATV/qATV. Un tel réseau pourrait impliquer différents types de neurones (glutamatergiques, GABAergique et dopaminergiques). (1) Il est possible que des neurones glutamatergiques du CPFm projettent à des neurones glutamatergiques de l'HbL qui eux-mêmes projettent à des neurones dopaminergiques de l'ATV. (2) Un autre circuit pourrait ajouter au circuit (1) un relai via des neurones GABAergiques de la qATV. (3) Enfin un dernier circuit pourrait inclure des neurones GABA au sein de l'HbL qui pourraient potentiellement agir sur les circuits (1) et (2).

7.3 Etudier le rôle de l'HbL dans une mémoire émotionnelle

Dans le cadre de la MLT, nous avons proposé que l'HbL était impliquée dans un type de mémoire très contextualisée et qu'elle jouait un rôle dans les émotions. Ainsi, il

Annexes

apparaît intéressant de confirmer cette hypothèse lors d'un test comportemental de conditionnement de peur (*cf. Modèles de mémoire épisodic-like chez le Rat, page 62*) qui repose sur une mémoire émotionnelle [Izquierdo et al., 2016) (*cf. Modèles de mémoire épisodic-like chez le Rat, page 62*)]. Un tel paradigme nous permettrait de mieux décrire dans quelle mesure l'HbL est une interface entre cognition et émotion. De plus, cette étude nous permettrait de confirmer l'implication de l'HbL dans les processus « online » du traitement de l'information, en explorant l'encodage et le rappel d'un souvenir épisodique, mais dans un autre type de tâche.

Différents travaux ont déjà utilisé des paradigmes expérimentaux ciblant une mémoire dite *aversive* en lors des paradigmes d'évitement actif et passif (Ilango et al., 2013; Tomaiuolo et al., 2014). Cependant, ces expériences ont montré des résultats parfois contradictoires, dépendant de l'intensité des chocs électriques administrés aux animaux. Ainsi, une partie de cette étude consistera également à vérifier que l'HbL n'intervient pas dans l'aspect somato-sensoriel de la douleur et donc que son inactivation n'induit pas de diminution ou d'augmentation des seuils de douleurs des animaux.

Au laboratoire il serait intéressant d'inactiver l'HbL lors de différents types de conditionnement de peur tels que le conditionnement au contexte, ou le conditionnement de trace (Izquierdo et al., 2016; Woodruff-Pak and Disterhoft, 2008). De tels paradigmes n'impliquent pas forcément les mêmes réseaux cérébraux – préférentiellement l'HPC dans le premier et le CPF dans le second - et pourraient ainsi nous permettre de mieux définir les structures qui interagissent avec l'HbL lors de tâche mnésiques. Pour cela nous pourrions faire suivre ces expériences comportementales de marquages immunohistologiques de gènes précoces tels que C-Fos ou Zif268 par exemple, afin de mettre en évidence le réseau, incluant l'HbL, impliqué lors de la tâche, par une étude statistique factorielle.

Annexes

Mise en place de la technique pharmacogénétique

1. Introduction

Une partie de ma dernière année de thèse a été consacrée à la mise en place d'une nouvelle technique, visant à inactiver les neurones de l'HbL tout en évitant certains inconvénients inhérents à la technique de micro-instillation. En effet, comme mentionné plus haut, cette dernière, en plus d'être invasive, nous a, par exemple, conduit à effectuer différents contrôles neuroanatomiques ([publication 2](#)) afin d'évaluer les effets d'une possible diffusion de nos composés dans les régions adjacentes à l'HbL ; elle a également limité le nombre d'expériences effectuées avec un même animal, puisque la répétition des micro-instillations peut engendrer des dégâts mécaniques, dus au flux de la solution entrant dans la structure cible.

Pour éviter ces désagréments, et également améliorer le bien-être animal, nous avons choisi de développer la technique pharmacogénétique, ou DREADD (pour Designer Receptor Especially Activated by Designer Drug).

1.1 L'outil pharmacogénétique

Une première étude, effectuée par Coward et collaborateurs a ouvert le champ de recherche de la pharmacogénétique (Coward et al., 1998). Ces auteurs ont développé un récepteur k-opioïde modifié qui, une fois exprimés par des cultures de cellules ovariennes de hamster chinois, ne présentait plus son affinité naturelle pour 20 peptides endogènes testés mais présentait une affinité forte pour un composé de synthèse, la spiradoline. À l'aide de cet outil (le RASSLs, pour Receptor Activated Solely by a Synthetic Ligand), les auteurs pouvaient donc spécifiquement activer ce récepteur modifié et ainsi induire une réponse cellulaire. Le DREADD, plus utilisé aujourd'hui en neurosciences, est une variante des RASSLs utilisant d'autres récepteurs que ceux mis au point par Coward et collaborateurs (Conklin et al., 2008). Ces nouveaux outils, développés par Roth et collaborateurs et présentés dans une publication en 2007 (Armbruster et al., 2007), se basent donc sur le même principe que les RASSLs et conduisent au contrôle de l'activité de populations de neurones à l'aide de l'expression d'un récepteur spécifique activé par un ligand exogène. Une contrainte est que le récepteur se doit d'être inactif dans son état constitutif et inerte vis-à-vis de tous les ligands endogènes (Conklin et al., 2008). De plus, le ligand se

Annexes

doit également d'être inerte pour tout autre récepteur endogène. Les récepteurs modifiés utilisés sont principalement des récepteurs couplés aux protéines G (RcpG). De cette manière, comme l'optogénétique, cette technique appliquée aux neurosciences, permet d'étudier le rôle d'une structure dans une fonction particulière, ou encore le rôle de circuits neuronaux spécifiques. (Aston-Jones and Deisseroth, 2013; Lerner et al., 2016).

1.2 Les RcpG, des récepteurs de choix pour le DREADD

Les RcpG appartiennent à la plus importante famille de récepteurs cellulaires membranaires. Ils possèdent sept segments transmembranaires et peuvent être activés par différents ligands tels que les hormones et les neurotransmetteurs (Rosenbaum et al., 2009). La liaison d'un ligand au récepteur provoque un changement de conformation de ce dernier, ce qui va conduire à des interactions avec différentes protéines hétérodimériques (Gi, Gs ou encore Gq) (Allen and Roth, 2011; Zhu and Roth, 2015) (*cf. figure 1*). La liaison d'un ligand sur un RcpG et l'activation de la protéine G correspondante représentent les deux premières étapes indispensables au déclenchement de cascades moléculaires intracellulaires. Ensuite, la protéine G activée va pouvoir interagir avec différents effecteurs (notamment la phospholipase C et l'adénylate cyclase) qui vont conduire à la production d'AMP cyclique (AMP_c) ou son inhibition (*cf. figure 1*). Les différentes cascades intracellulaires mises en jeu suite à l'activation de ces récepteurs vont alors conduire, à la modulation de la concentration de calcium intracellulaire et ainsi participer à la modulation de l'activité neuronale.

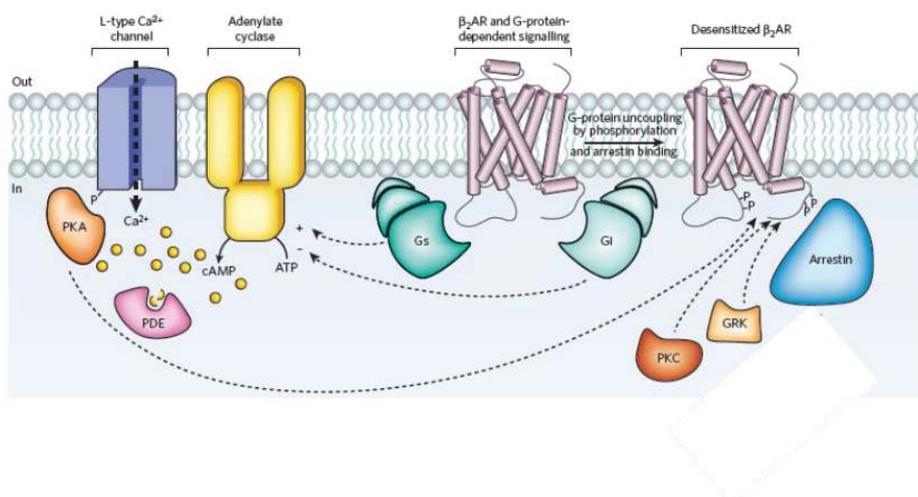


Figure 1 Les récepteurs couplés aux protéines G

Schéma de la transduction du signal par les récepteurs couplés aux protéines G (Rosenbaum et al., 2009).

2. Le DREADD

Les récepteurs les plus utilisés aujourd'hui pour le DREADD sont des récepteurs muscariniques humains modifiés (hMR), insensibles à l'ACh endogène, qui vont être exprimé par les cellules grâce à des vecteurs viraux (*voir plus bas 2.2 les vecteurs viraux*) (Armbruster et al., 2007; Rogan and Roth, 2011; Urban and Roth, 2015). Une fois la transfection virale effectuée et les hMR exprimés par les neurones, ces récepteurs pourront être activés par un ligand exogène (la clozapine-N-oxyde, ou CNO) administrée à l'animal par injection intra-péritonéale (IP) (English and Roth, 2015; Urban and Roth, 2015). La cascade intracellulaire induite par l'activation du hMR est couplée à des protéines G soit activatrices (G_q) soit inhibitrices (G_i) et va ainsi conduire à la modulation de l'activité du neurone, dans le sens d'une activation (déclenchement de potentiels d'actions) ou d'une inhibition (augmentation du seuil de déclenchement de potentiels d'action) respectivement (*cf.figure 2*). Aujourd'hui, différents « types » de DREADD ont été développés, mettant en jeu différents récepteurs et leur ligand spécifique (Roth, 2016) (*cf.figure 2*).

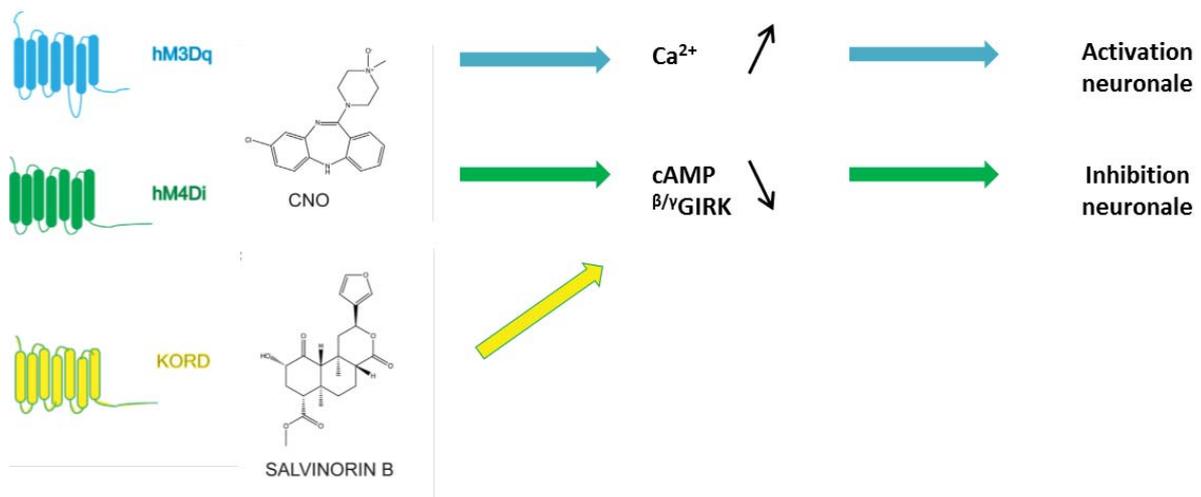


Figure 2 Les principaux DREADD utilisés en Neurosciences

Représentation des différents types de DREADD utilisés en Neurosciences, de leur ligand et de leur mécanisme d'action (inspiré de Roth, 2016)

L'insertion de tels récepteurs à la membrane neuronale se fait grâce à des vecteurs viraux. Ces vecteurs peuvent être vus comme des transporteurs de séquences génétiques. De cette manière, il est possible d'insérer différentes séquences d'ADN qui vont conduire à l'expression de protéines par les neurones. Ainsi, en plus du récepteur, il est possible de faire exprimer une cassette fluorescente ou encore un promoteur particulier.

Annexes

2.1 Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux, sont nombreux ; néanmoins leurs mécanismes d'action ne sont pas systématiquement les mêmes et leurs caractéristiques ne permettent pas forcément une application en neurosciences (*cf. figure 3*) (Choudhury et al. 2016). En effet, la capacité d'intégration de séquences génétiques (également nommé *transgène*) des vecteurs, c'est-à-dire leur capacité de transport, tout comme leur pathogénicité, limite leurs applications possibles.

Aujourd'hui, les retrovirus, les lentivirus, les virus de l'herpès (HSV), les adénovirus et les virus adéno-associés (VAA) sont les vecteurs les plus utilisés pour infecter différents types cellulaires (Choudhury et al. 2016). Cependant, les rétrovirus, possèdent des capacités de transport faibles et ne sont capables d'infecter que des cellules qui se divisent, les rendant moins utiles pour une application au système nerveux central (Choudhury et al.; Fields-Berry et al., 1992; Turner et al., 1990).

Les lentivirus et les HSV sont des virus présentant des capacités de transport intéressantes. Cependant, ils sont qualifiés « de type 2 » car ils nécessitent des moyens de confinement spécifiques, limitant leur utilisation aux laboratoires agréés. Le LNCA ne possède pas un tel agrément, nous n'avons donc pas pu les utiliser. Enfin, les adénovirus et les VAA sont des vecteurs présentant des capacités de transport importantes et ont l'avantage de ne pas s'intégrer au génome des cellules hôtes, ce qui permet un niveau d'infection stable et durable de plusieurs mois à la suite d'une administration intra-parenchymateuse (Akli et al., 1993; Barcia et al., 2007; Davidson et al., 1993). Cependant, les protéines exprimées par la capsid de l'adénovirus (la structure protéique qui entoure le génome virale) provoquent une réponse immunitaire très importante (Choudhury et al. 2016). Ainsi, afin de limiter cet inconvénient, l'intérêt de différents groupes de recherche s'est plutôt tourné vers ce qui était longtemps considéré comme une contamination des préparations d'adénovirus, les VAA.

Les lentivirus et les HSV sont des virus présentant des capacités de transport intéressantes. Cependant, ils sont qualifiés « de type 2 » car ils nécessitent des moyens de confinement spécifiques, limitant leur utilisation aux laboratoires agréés. Le LNCA ne possède pas un tel agrément, nous n'avons donc pas pu les utiliser.

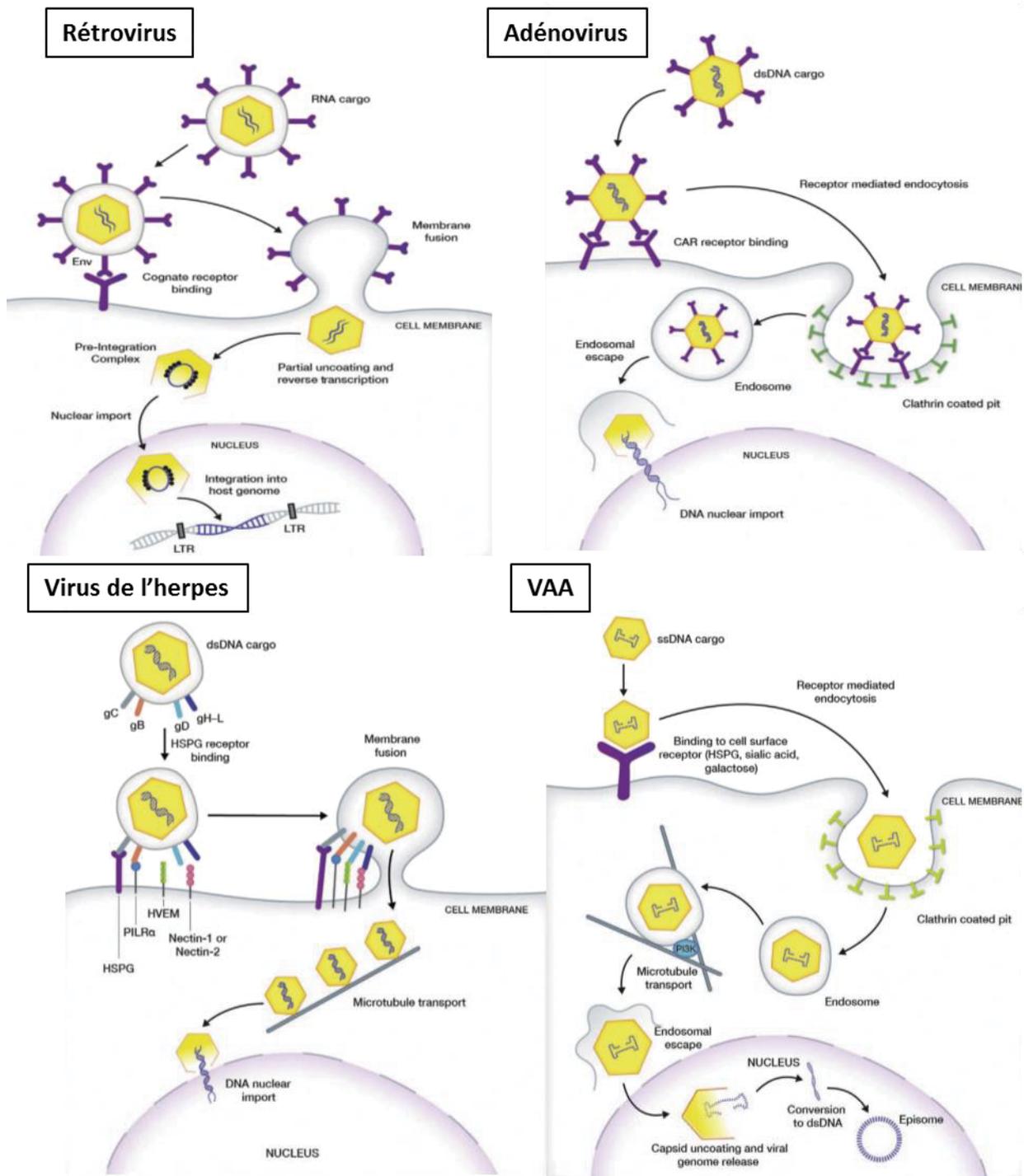


Figure 3 Les vecteurs viraux

Schéma des mécanismes de transfections des différents vecteurs viraux (inspiré de Choudhury et al.2016).

Enfin, les adénovirus et les VAA sont des vecteurs présentant des capacités de transport importantes et ont l'avantage de ne pas s'intégrer au génome des cellules hôtes, ce qui permet un niveau d'infection stable et durable de plusieurs mois à la suite d'une administration intra-parenchymateuse (Akli et al., 1993; Barcia et al., 2007; Davidson et al., 1993). Cependant, les protéines exprimées par la capsid de

Annexes

l'adénovirus (la structure protéique qui entoure le génome virale) provoquent une réponse immunitaire très importante (Choudhury et al. 2016). Ainsi, afin de limiter cet inconvénient, l'intérêt de différents groupes de recherche s'est plutôt tourné vers ce qui était longtemps considéré comme une contamination des préparations d'adénovirus, les VAA.

2.2 Les VAA, les vecteurs viraux par excellence ?

Les vecteurs viraux les plus utilisés à ce jour en Neurosciences aujourd'hui sont les VAA (Murlidharan et al., 2014). Ces virus adéno-associés, de la famille des parvovirus, sont d'excellents vecteurs de transfert de gènes. Il est possible d'insérer jusqu'à 5Kb d'ADN au sein de ces virus simple brin de 4,7 Kb, permettant ainsi d'inclure plusieurs gènes d'intérêt (Kotterman and Schaffer, 2014). Ils ont la propriété de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), ne sont pas pathogènes et ne déclenchent qu'une faible réponse immunitaire (Kotterman and Schaffer, 2014; Tenenbaum et al., 2004). De plus, comme les adénovirus, ils n'intègrent pas l'ADN de la cellule hôte mais forment un épisode qui sera exprimé de façon stable durant plusieurs mois (Choudhury et al., 2016; Reimsnider et al., 2007). Il existe différents variant de VAA que l'on nomme par leur sérotype (de 1 à 11), qui correspond aux différentes protéines de capsid qu'ils expriment. Les VAA semblent donc être des vecteurs viraux idéaux, néanmoins, certaines particularités sont à prendre en compte lors de leur utilisation. En effet, selon le sérotype, la construction virale peut plus ou moins infecter les astrocytes ou encore les oligodendrocytes ; de plus, les VAA sont également capables de migrer depuis leur zone d'instillation vers d'autres régions afférentes et efférentes (La Salle et al., 1993; Murlidharan et al., 2014; Tenenbaum et al., 2004). Ainsi, tous les VAA semblent pouvoir être transportés le long des axones, cette capacité de migration semblant être particulièrement importante pour les VAA 6, 8 et 9 (Castle et al., 2014; Masamizu et al., 2011; Towne et al., 2010) mais n'est malheureusement que peu documentée pour les VAA 5 et 8. Ainsi, bien qu'ils possèdent une capacité de migration rétrograde (Aschauer et al., 2013), les VAA 5 et 8 sont actuellement très utilisés lors d'infections dites « locales » en Neurosciences (Kerstetter et al 2016, Fernandez et al 2016, Grayson et al 2016, Gourley et al 2016, Aldrin-Kirk et al 2016). De plus les niveaux d'infection ne sont pas les mêmes selon les sérotypes, l'AAV 2 engendrant,

Annexes

par exemple, des infections faibles comparé au 5, 8 et 9 (Aschauer et al., 2013) (*cf. figure 4*).

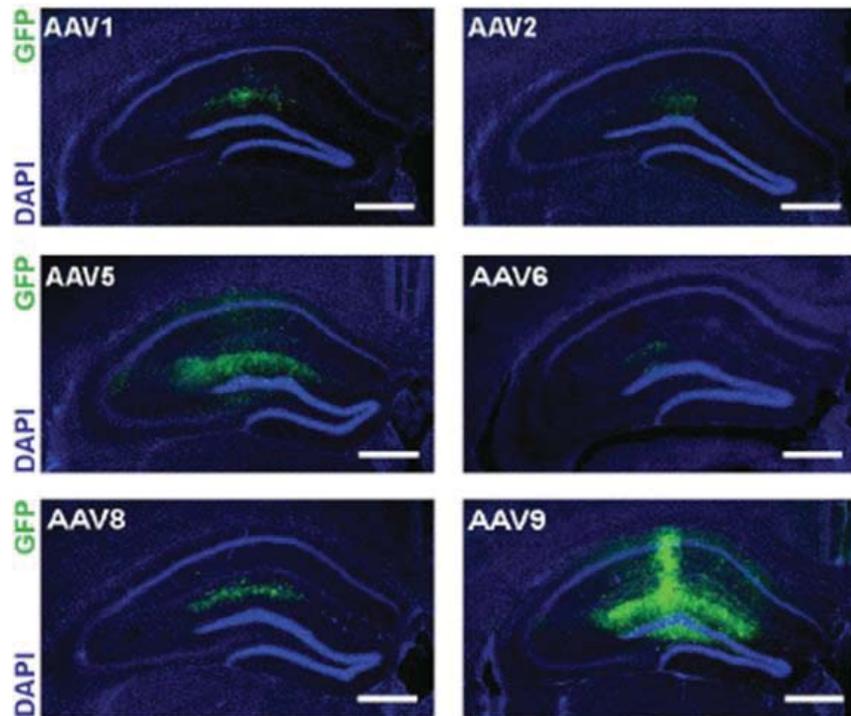


Figure 4 Différence d'expression de la GFP exprimée par des neurones infectés par différents sérotypes de VAA.

Photographies de l'expression de GFP induite par la transfection de différents sérotypes de VAA (inspiré de Aschauer et al., 2013)

En conséquence, chaque étude nécessitant l'utilisation de VAA doit passer par des contrôles préalables afin de cibler au mieux le sérotype à utiliser.

2.3 La spécificité du DREADD

Outre la question du vecteur, voire du sérotype, la spécificité de l'infection peut être modulée par l'utilisation de promoteurs. Ces promoteurs correspondent à des séquences d'ADN, placées en amont des différentes séquences du transgène, qui vont permettre la fixation de protéines régulatrices de la transcription. *In fine* vont ces séquences promotrice vont contrôler l'expression du transgène de manière spécifique d'un type cellulaire (Quinn, 1996). Un promoteur idéal doit être capable d'induire une expression importante et durable du transgène de manière spécifique d'un type cellulaire. La plupart des thérapies géniques utilisent des promoteurs viraux tels que le promoteur du cytomegalovirus (CMV IE) ou du virus du sarcome du Rous (RSV) qui permettent une expression forte des transgènes (Akli et al., 1993; Davidson et al., 1993; La Salle et al., 1993). D'autres types de promoteurs ont

Annexes

également été mis au point comme par exemple celui de la synapsine humaine (hSyn), permettant une expression spécifiquement neuronale (Betley and Sternson, 2011; Quinn, 1996), ou encore la CamK II (calmoduline Kinase II), ciblant les neurones excitateurs (Basu et al., 2008; Benson et al., 1992). L'utilisation de promoteur apporte ainsi une sélectivité d'infection importante ; néanmoins, la taille de la séquence des promoteurs est une limite majeure à leur utilisation. En effet, la taille de ces séquences promotrices va ensuite conditionner la taille des autres séquences désirées dans le vecteur. L'utilisation d'un vecteur de taille importante limitera donc ensuite les possibilités d'ajout d'autres séquences désirée (cassette fluorescente, récepteur DREADD ou autre).

2.4 Les avantages du DREADD

Le DREADD, en plus de nous permettre une spécificité neuronale importante, semble être un outil adéquat lorsque l'on aborde le comportement animal. En effet, cette technique est très peu invasive et ne nécessite presque aucune contention. De cette manière, le stress ressenti par l'animal est presque inexistant et le nombre d'expériences que l'on peut effectuer avec un même animal est bien plus important que lors de l'utilisation de micro-instillations ; du moins la technique ne semble pas le limiter.

Enfin, le DREADD nous permet de visualiser les neurones sur lesquels nous agissons, grâce à l'insertion de rapporteurs fluorescents au sein de la construction virale (cf. figure 4), ce qui permet une analyse anatomique *a posteriori* très précise permettant de rendre compte des régions infectées et donc modulées par la CNO.

Nous avons effectué, après le travail bibliographique nécessaire au choix des virus à utiliser, la mise au point des injections de ces virus et les premiers essais comportementaux. Les étapes de validation ont également consisté à observer l'effet de la CNO sur l'activité des neurones exprimant les hMR4, couplés à la Gi. Ce travail a été effectué à la fin de mes travaux de thèse, à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques soit *in vivo* sur animal anesthésié (au LNCA en collaboration avec le Docteur Aline Stephan et Etienne Quet) soit *in vitro* sur tranche de cerveaux coronales contenant l'HbL [en collaboration avec le Dr. Sylvain Hugel de l'Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégrées (INCI) de Strasbourg]. En ce qui concerne la validation comportementale, nous avons dans un premier temps tenté de retrouver

Annexes

des résultats similaires à ceux obtenus avec la technique de micro-instillation de muscimol et de CNQX en pratiquant une mesure de la réponse locomotrice en cage d'élevage (*cf. Publication 2*). Nous avons ensuite utilisé le DREADD lors d'une expérience visant à étudier le rôle de l'HbL lors d'un conditionnement de peur. Les paragraphes suivants décriront les matériels et méthodes utilisés pour cette mise en place, ainsi que les premiers résultats obtenus, qui concerneront uniquement l'activité locomotrice, les autres expériences étant toujours en cours lors de la rédaction de ce manuscrit. Une dernière partie exposera les résultats au regard de la littérature mais également en comparant le DREADD aux micro-instillations.

3. Matériels et méthodes

3.1 Souche utilisée et condition d'élevage

La souche utilisée ainsi que les conditions d'élevage ont été les mêmes que celles utilisées durant le reste de ma thèse (*cf. paragraphe matériels et méthodes Souche utilisée page 74*).

3.2 Vecteur viral utilisé

Si plusieurs études ont déjà utilisé des vecteurs viraux pour cibler l'HbL, dans le cadre de la technique optogénétique (e.g., Li et al., 2013; Meye et al., 2016b), seulement deux études l'ont fait pour moduler l'activité de cette structure de manière pharmacogénétique (Nair et al., 2013; Sachs et al., 2015). Ces auteurs ont soit utilisé un vecteur HSV (Nair et al., 2013) que nous ne pouvions pas utiliser au laboratoire soit effectué leurs expérience chez des modèles de souris en utilisant un VAA 8 muni du promoteur hSyn (Sachs et al., 2015). Pour nos expériences, nous avons fait l'acquisition des VAA 5 muni d'un promoteur CamK II et 8 muni d'un promoteur hSyn (UNC vector core, University of North Carolina), qui semblaient présenter les caractéristiques infectieuses les plus adaptées à nos questionnements. Cependant leurs capacités de transport restent à évaluer dans nos conditions et devront être prises en compte dans la conclusion de nos résultats. Nous avons dans un premier temps utilisé le VAA 5.

Annexes

Après le choix du sérotype, le reste de la construction virale dépendait de la question posée. Ici nous souhaitons inactiver l'HbL, une structure essentiellement glutamatergique (*cf. Neurochimie et marqueurs moléculaires, page 12*) ; nous avons donc choisi une construction virale permettant l'expression d'un DREADD couplé à une protéine G_i, le hM4, sous le contrôle d'un promoteur CamKII. Enfin, la construction comprenait également une séquence codante pour une cassette fluorescente rouge, la mCherry (longueur d'onde d'absorption : 587 nm; d'onde d'émission : 610 nm). Cette cassette nous permettait d'observer directement la fluorescence émise par les neurones exprimant la construction virale (*cf. figure 5*). La fluorescence provient de la forme monomérique d'une protéine du corail *Discosoma* plus communément appelé anémone disque.

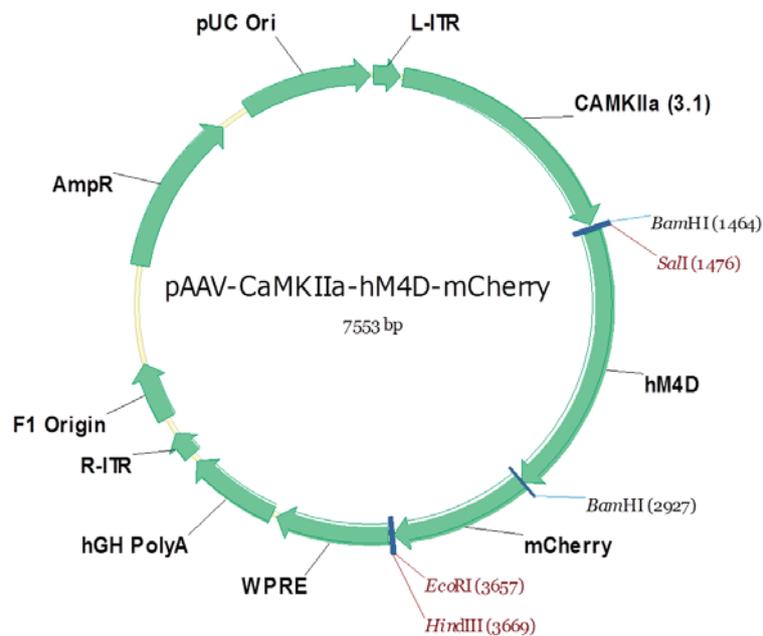


Figure 5

Représentation du vecteur viral utilisé lors de nos expériences (récupérée sur le site web d'UNC Vector Core, University of North Carolina).

3.3 Procédure chirurgicale d'instillation des virus

Les interventions chirurgicales ont été effectuées de la même manière que celles décrites dans le paragraphe « matériels et méthodes » (*cf. Traceurs rétrogrades et antérogrades, page 78*). Nous avons instillé bilatéralement une solution virale de concentration $3,4 \cdot 10^{12}$ particules/mL au sein de l'HbL. Suite à des premiers tests d'instillation destinés à observer la dynamique de diffusion de la construction virale (non présentés dans ce manuscrit) nous avons choisi d'effectuer deux instillations de

Annexes

0,15 μ L selon l'axe antéro-postérieur au sein de chaque HbL (*cf. tableau coordonnées utilisées*).

Structure	coordonnées		virus	volume
	1 ^{ère} injection	2 ^{ème} injection		
HbL	AP : -3,4	AP : -3,6	CamKII-hM4-mCherry	0,15 μ L / injection
	ML : +/- 0,7	ML : +/- 0,7		
	DV : -4,5	DV : -4,5		

Tableau 3 : coordonnées utilisées pour les instillations de virus DREADD au sein de l'HbL

Après la chirurgie les rats ont été replacés dans une cage propre et nous avons attendu cinq semaines avant le début des tests comportementaux. Cette durée a permis une infection optimale de la région cible et a été choisie en fonction de données de la littérature (Reimnsider et al., 2007) mais également suite à des discussions avec différents laboratoires utilisant de tels constructions virales.

3.4 Injection de CNO

La solution de CNO était préparée extemporanément à partir d'une poudre (Clozapine-N-Oxyde $\geq 99,9\%$, Enzo Life Science) diluée dans du chlorure de sodium (NaCl 0,9%, Lavoisier) et du diméthylsulfoxyde (DMSO, $\geq 99,9\%$, Sigma, 0,5% final) afin d'obtenir une concentration de 3mg/mL. Cette solution était ensuite injectée aux animaux à raison de 0,1mL/100g, la dose utilisée par Rat étant donc de 3mg/kg. Cette dose est généralement utilisé chez le Rat dans le cadre d'études comportementales. La solution contrôle pour ces expériences était une solution de NaCl 0,9% et DMSO (0,5% final) dépourvue de CNO.

Tout comme pour les micro-instillations utilisées dans le reste de ma thèse, nous avons laissé un délai entre les injections IP et les tests comportementaux afin que la CNO puisse parvenir aux neurones cibles. Nous avons ainsi choisi, en accord avec les données de la littérature, d'attendre 20 min après les injections pour placer les animaux en situation comportementale. En effet, selon plusieurs études (Vardy et al., 2015), le début des effets comportementaux induits par la CNO serait visible après une dizaine de minutes et l'effet comportemental de la CNO serait maintenu environ 60 minutes après l'injection IP (e.g., Vardy et al., 2015).

3.5 Test comportementaux

3.5.1 Evaluation de l'activité locomotrice en cage d'élevage

Annexes

Ce test a été effectué de la même manière que précédemment décrit [*cf. paragraphe « Matériels et méthodes : Mesure de l'activité locomotrice en cage d'élevage » (page 101)*]. La seule différence a été que tous les animaux ont effectué une première évaluation de leur activité suite à une injection de l'excipient puis, le lendemain, une seconde évaluation suite à l'injection de CNO. De cette manière chaque Rat était son propre témoin.

3.5.2 Congélation et coupe des cerveaux

Toutes les étapes permettant la coupe de cerveaux (de l'étape de mise à mort des rats aux coupes de cerveau) ont été effectuées de la même manière que celle présentée dans le paragraphe matériels et méthodes (*cf paragraphe « Matériels et méthodes : Techniques histologiques », page 109*). L'unique différence est qu'elles ont été effectuées dans la pénombre, afin d'éviter d'altérer la fluorescence. De plus, une fois récupérées sur lame, les coupes subissaient un unique rinçage avant d'être montées entre lame et lamelle à l'aide du milieu de montage Diamount DAPI (Dapi-Fluoromount-G®, Clinisciences).

3.5.3 Acquisition des photos

Toutes les photos des coupes ont été acquises à l'aide d'un microscope apotome (apotome.2, Zeiss®) équipé d'une platine motorisée selon des axes tridimensionnels (en X, Y et Z). Le microscope était relié à une caméra (Orca Flash 4.0 LT, Hamamatsu) et à un système d'acquisition (ZEN 2, Zeiss®). Ces images étaient ensuite comparées à un atlas de Rat (Paxinos and Watson, 2006) afin de vérifier la bonne localisation de nos différentes instillations.

3.6 Résultats

3.6.1 Infection de l'HbL par le virus DREADD

Au moment de l'écriture de ce manuscrit, les contrôles électrophysiologiques étaient en cours. Cependant des tests préliminaires d'instillation de virus nous ont tout de même permis d'évaluer la capacité d'infection de notre construction virale dans l'HbL (*cf figure 6*).

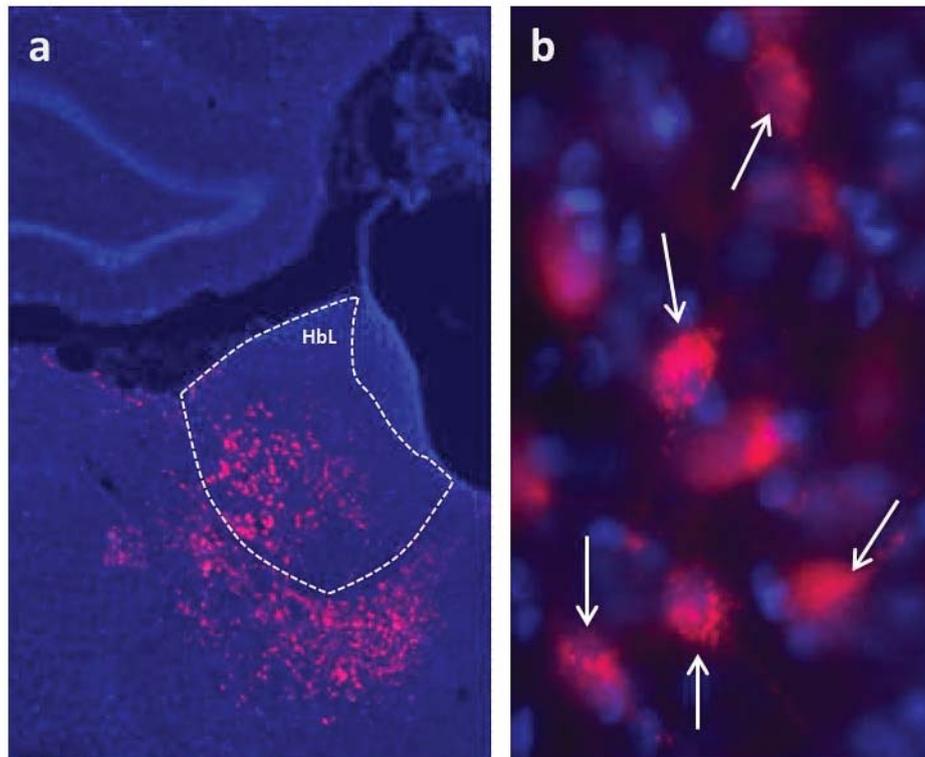


Figure 6 Photographie de neurones de l'HbL exprimant le DREADD

(a) Photographie au grossissement X2 de la région de l'HbL (délimitée en pointillée). On peut voir en rouge les neurones exprimant la m-cherry de la construction virale DREADD dans l'HbL. (b) Photographie de neurones de l'HbL au grossissement X40 exprimant la mCherry de la construction virale (flèches)

Ces analyses ont montré que nos coordonnées d'instillations de virus et les volumes utilisés devaient être modifiés. En effet, ces premiers essais ont montré une expression virale ayant « débordée » aux régions thalamiques voisines de l'HbL (*cf. figure 6a*). Comme mentionné plus haut, nous avons alors choisi de modifier nos coordonnées et d'effectuer deux instillations, 0,1 mm plus dorsalement, de 0,15 μ L par côté. L'analyse histologique de ces nouvelles infections n'ayant pas encore été réalisée au moment de l'écriture de ce manuscrit, les résultats d'activité locomotrice sont donnés sous toute réserve de cette vérification.

3.6.2 Evaluation de l'activité locomotrice en cage d'élevage

Nous avons analysé les données d'activité locomotrice de 16 rats (*cf. figure 7*) en pratiquant une ANOVA avec deux mesures répétées, le traitement et les intervalles de temps. Cette analyse montre un effet significatif de la variable traitement $F_{1,15}=9,503$, $p=0,01$, un effet significatif de la variable intervalles de temps $F_{5,75}=33,274$, $p=0,01$ et une interaction significative entre les deux variables $F_{5,75}=3,937$, $p=0,005$, démontrant un effet hyper locomoteur induit par l'injection de CNO. De plus l'analyse post-hoc (Neuwman-Keuls) démontre que les deux traitements ne diffèrent qu'après

Annexes

les premières 15 minutes (*intervalle 2 sur la figure 7* $p=0,88$ au temps 0 minute, $p<0,001$ au temps 15 minutes) et cette différence persiste pendant 60 minutes (*jusqu'à l'intervalle 5 sur la figure 7*, $p<0,005$) puis disparaît (*intervalle 6 sur la figure 7*, $p=0,25$). De plus, l'ANOVA à un facteur (traitement) effectuée sur l'activité totale des animaux durant 90 minutes décrit un effet traitement $F_{1,32}=8,27$, $p<0,01$.

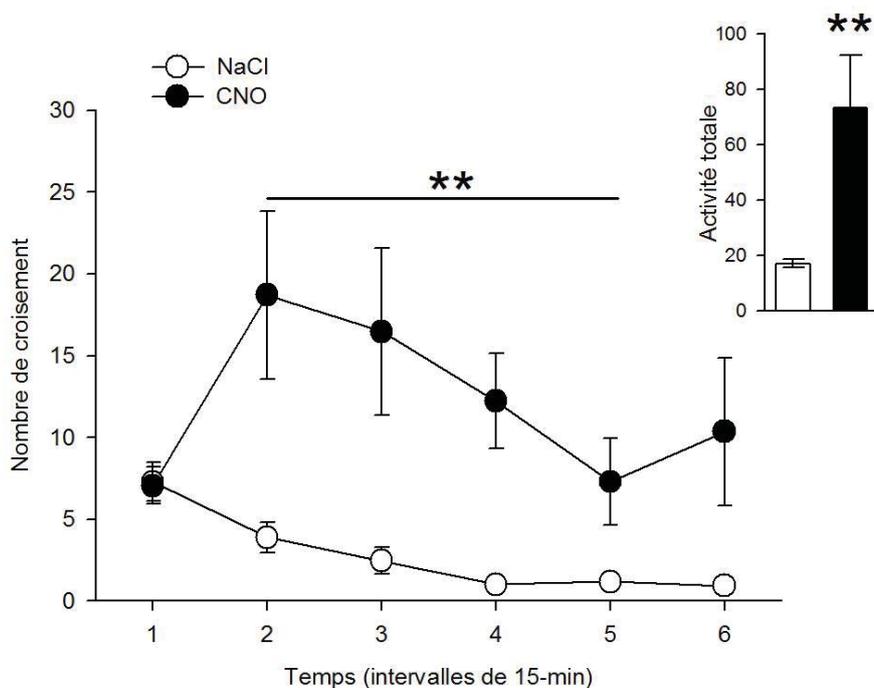


Figure 7 Activité locomotrice des rats suite aux différentes injections IP de NaCl et CNO

Le graphique présente l'activité des rats durant 1h30 suite aux injections (IP) de NaCl 0,9% - DMSO 0,5% et de CNO. L'injection de CNO a induit une hyperactivité transitoire après 15 minutes et qui a duré environ une heure (graphique). Cette différence est représentée par rapport à l'activité totale sur toute la séance (encart en haut à droite). Statistiques : ** $p<0,01$ vs NaCl 0,9% - DMSO 0,5%.

Comparaison avec la méthode de micro-instillation

Afin de pouvoir avoir une idée – visuelle – du niveau d'activité induit par la technique de micro-injection (comprenant une contention de plus de deux minutes) et par la technique du DREADD comprenant une injection IP prenant environ cinq secondes) nous avons rajouté à la *figure 7* les résultats issus de l'administration de muscimol dans l'HbL (*publication 2*). Nous n'avons pas effectué de statistiques comparatives car non seulement les expériences n'ont pas été effectuées au même moment, mais les groupes d'animaux n'ont pas été constitués de la même manière. En effet, pour l'expérience DREADD ce sont les mêmes animaux qui ont reçus les deux traitements (NaCl 0,9% DMSO 5% puis CNO) alors que pour l'expérience de micro-instillation ce sont deux groupes de rats différents qui ont reçus soit le muscimol soit le LCRa.

Annexes

Néanmoins, sur le graphique (*cf. figure 8*) il est intéressant de comparer les deux injections d'excipient, car le CNO et le muscimol n'agissent pas de la même manière et n'ont probablement pas la même cinétique d'action. Visuellement, les résultats semblent indiquer que l'administration de NaCl avec la technique de micro-instillation induit une augmentation plus importante de l'activité des rats dès les premières minutes du test, par rapport à l'injection IP de NaCl 0,9%-DMSO 0,5%. On peut suggérer que cette différence est due au stress généré par la contention lors de la micro-instillation, qui a eu pour conséquence d'exacerber la réponse comportementale des animaux. Il est également intéressant de constater que la différence entre les animaux traités avec du muscimol et leurs témoins est visible dès les premières minutes, contrairement à l'expérience DREADD où la différence entre CNO et excipient n'est visible qu'après 15 minutes. Ceci s'explique probablement par la voie d'administration des composés; le muscimol est injecté directement dans la structure, et donc se fixe plus rapidement aux récepteurs GABA_A, alors que la CNO, administrée par voie IP, doit d'abord être absorbée par la circulation et passer la BHE avant de pouvoir atteindre les récepteurs hM4.

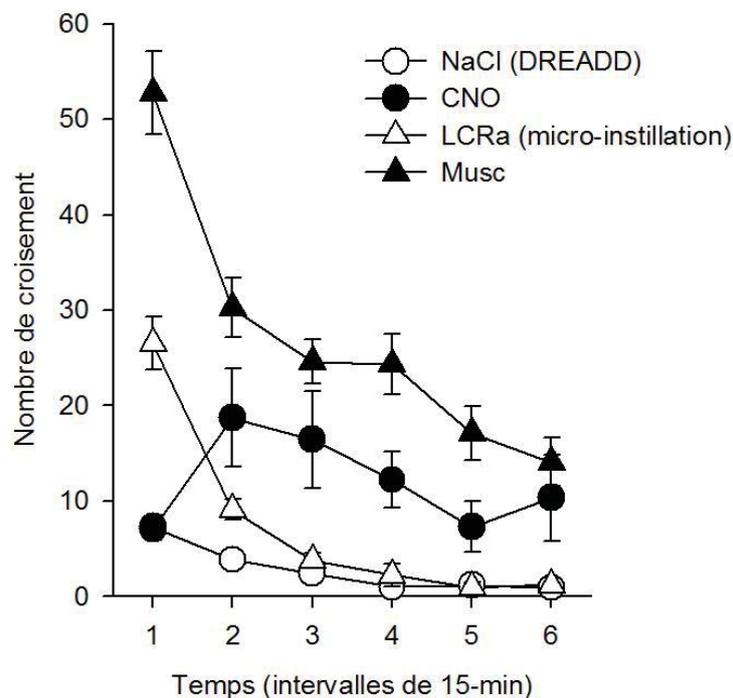


Figure 8 Comparaison des techniques de micro-instillations et du DREADD sur l'activité locomotrice des rats.

Le graphique présente – poolées – l'activité locomotrice des rats suite aux deux protocoles d'inactivation de l'HbL (micro-instillation de muscimol et DREADD). L'inactivation de l'HbL à l'aide de muscimol ou de la technique de DREADD induit une hyperactivité transitoire, semblant confirmer que dans les deux cas l'on obtient bien une inactivation de l'HbL.

4. Conclusion

Cette expérience nous a conduit aux mêmes résultats que ceux obtenus avec la technique de micro-instillation (i.e. une hyperactivité transitoire); une telle hyperactivité ayant déjà été constatée lors de protocoles variés d'inactivation ou de lésion de l'HbL (Lecourtier et al., 2008; Thornton et al., 1994), ils indiquent donc que l'infection de la construction virale et donc d'une protéine Gi a bien entraîné une inactivation de l'HbL suite à l'administration de CNO. Nous avons également pu observer que les injections IP semblent beaucoup moins stressantes pour les rats que la contention nécessaire aux micro-instillations. Cet aspect apparaît primordial dans le cadre de recherches sur le rôle de l'HbL dans des comportements de réponse au stress.

Concernant les autres résultats, à l'heure actuelle nous pouvons juste mentionner que les validations électrophysiologiques semblent apporter les résultats escomptés (i.e. une diminution de l'activité des neurones de l'HbL exprimant la construction virale suite à l'injection IP, ou sur tranche, de CNO).

5. Perspectives

Ces expériences préliminaires ont permis dans un premier temps de valider l'infection et l'expression du virus choisi au sein de l'HbL. Cependant, des contrôles immunologiques sont à effectuer afin de vérifier si, dans nos conditions, le virus a pu être transporté ou non de manière rétrograde ou antérograde. En effet, la fluorescence, dite native, induite par la construction virale peut parfois être trop faible pour permettre l'observation de ces transports. Ainsi, un marquage immunologique ciblant la mCherry permettrait d'augmenter ce signal et peut être mettre en évidence l'infection de neurones dans des régions afférentes ou efférentes de l'HbL.

Dans un second temps, ces travaux ont suggéré que l'utilisation du DREADD était moins stressante pour les animaux. Cet aspect ouvre de nombreuses perspectives pour le laboratoire concernant l'étude de l'HbL dans un système de mémoire «émotionnelle » pour laquelle le stress des animaux peut être un facteur limitant.

Le développement du DREADD permet d'ajouter un outil technique particulièrement intéressant dans l'étude de l'HbL et des voies cérébrales au sein desquelles elle peut s'intégrer. En effet, l'évolution des outils viraux et du génie génétique permet déjà

Annexes

d'utiliser des combinaisons de virus capables de cibler des voies de projection (le « retro-DREADD ») et ainsi questionner directement leurs implications comportementales (e.g., Marchant et al., 2016). Une telle technique se base sur l'utilisation de deux virus. Le premier, rétrograde (Canine-Adenovirus2, CAV2) va permettre l'expression de la Cre-recombinase (Cre), dans les régions afférentes d'une région X. Ensuite, l'instillation d'un second virus, dépendant de la cre, va être effectuée dans une des régions afférentes de la région X, ce qui va permettre l'expression des différents transgènes (récepteurs, cassette fluorescente ou autre), (cf figure 9).

Ainsi, seuls les neurones exprimant la Cre pourront spécifiquement exprimer le transgène, permettant de cibler une voie de projection.

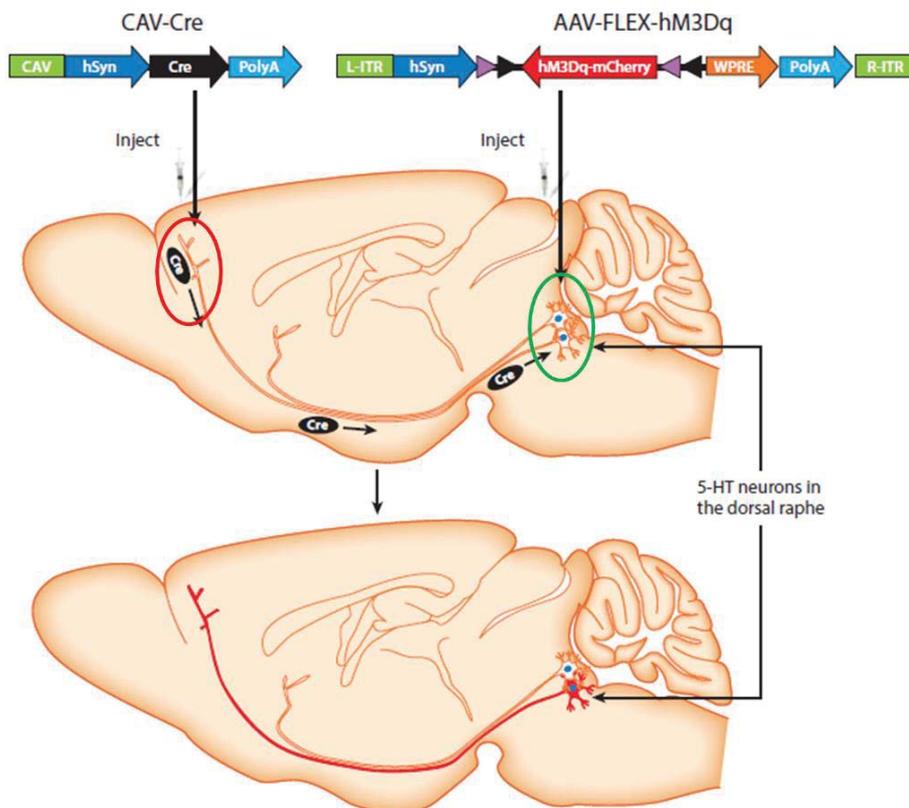


Figure 9 le « rétro-DREADD »

Schéma représentant la technique du « rétro-DREADD ». Un virus rétrograde permettant l'expression de la Cre-recombinase (Cre) est injecté dans une structure cérébrale (rond rouge), ici le CPFm, et va être transporté de façon rétrograde vers toutes les structures qui projettent au CPFm. Dans une seconde région (rond vert), ici le raphé, qui projette au CPFm, un deuxième virus dépendant de la Cre est injecté. Ainsi, uniquement les neurones de la région du raphé qui projettent au CPFm vont exprimer la construction virale (inspiré de Urban and Roth, 2015).

Dans notre cas, cette technique nous permettrait par exemple de cibler spécifiquement les neurones du CPFm qui projettent à l'HbL (CPFm \rightarrow HbL). De plus, l'aspect peu invasif de cette technique permettra l'association de plusieurs

Annexes

techniques afin de mieux décrire le réseau étudié. Comme mentionné dans les perspectives de mes travaux de thèse (*cf. page 156*) il serait particulièrement intéressant d'enregistrer l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV lors d'une tâche de mémoire de travail et d'observer l'effet induit par l'inactivation de la voie CPFm_→HbL sur ces neurones. Une telle étude va nécessiter l'implantation d'électrodes d'enregistrement dans différentes régions cérébrales, procédé qui pourrait être difficile avec l'encombrement spatial dû à la présence de guides canules.

Cependant, une des limites de cette technique est qu'actuellement elle ne permet pas de questionner la neurochimie des circuits étudiés. En effet, l'utilisation de RcpG induit une diminution ou une augmentation de la probabilité de décharge des neurones de manière indépendante des systèmes de neurotransmission potentiellement impliqués. Autrement dit, le DREADD permet d'inactiver ou d'activer un neurone mais ne renseigne en rien sur le type d'afférence qui pourrait être à l'origine de cet effet.

Finalement, le DREADD semble être un outil prometteur mais nécessite de nombreuses mises au point et ne permettra bien entendu pas de répondre à tous nos questionnements.

Bibliographie

Bibliographie

A

Aghajanian, G.K., and Wang, R.Y. (1977). Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res.* 122, 229–242.

Ahumada-Galleguillos, P., Lemus, C.G., Díaz, E., Osorio-Reich, M., Härtel, S., and Concha, M.L. (2016). Directional asymmetry in the volume of the human habenula. *Brain Struct. Funct.*

Aizawa, H., Amo, R., and Okamoto, H. (2011). Phylogeny and Ontogeny of the Habenular Structure. *Front. Neurosci.* 5.

Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., and Okamoto, H. (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J. Comp. Neurol.* 520, 4051–4066.

Aizawa, H., Cui, W., Tanaka, K., and Okamoto, H. (2013a). Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front. Hum. Neurosci.* 7.

Aizawa, H., Yanagihara, S., Kobayashi, M., Niisato, K., Takekawa, T., Harukuni, R., McHugh, T.J., Fukai, T., Isomura, Y., and Okamoto, H. (2013b). The Synchronous Activity of Lateral Habenular Neurons Is Essential for Regulating Hippocampal Theta Oscillation. *J. Neurosci.* 33, 8909–8921.

Akirav, I. (2004). A Facilitative Role for Corticosterone in the Acquisition of a Spatial Task Under Moderate Stress. *Learn. Mem.* 11, 188–195.

Akli, S., Caillaud, C., Vigne, E., Stratford-Perricaudet, L.D., Poenaru, L., Perricaudet, M., Kahn, A., and Peschanski, M.R. (1993). Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat. Genet.* 3, 224–228.

Allen, J.A., and Roth, B.L. (2011). Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 117–144.

Amilhon, B., Huh, C.Y.L., Manseau, F., Ducharme, G., Nichol, H., Adamantidis, A., and Williams, S. (2015). Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron* 86, 1277–1289.

Amo, R., Aizawa, H., Takahoko, M., Kobayashi, M., Takahashi, R., Aoki, T., and Okamoto, H. (2010). Identification of the Zebrafish Ventral Habenula As a Homolog of the Mammalian Lateral Habenula. *J. Neurosci.* 30, 1566–1574.

Amo, R., Fredes, F., Kinoshita, M., Aoki, R., Aizawa, H., Agetsuma, M., Aoki, T., Shiraki, T., Kakinuma, H., Matsuda, M., et al. (2014). The Habenulo-Raphe Serotonergic Circuit Encodes an Aversive Expectation Value Essential for Adaptive Active Avoidance of Danger. *Neuron* 84, 1034–1048.

Andrade, M.M.M., Tomé, M.F., Santiago, E.S., Lúcia-Santos, A., and de Andrade, T.G.C.S. (2003). Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav.* 78, 125–133.

Bibliographie

Araki, M., McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (1984). Retrograde HRP tracing combined with a pharmacohistochemical method for GABA transaminase for the identification of presumptive GABAergic projections to the habenula. *Brain Res.* *304*, 271–277.

Armbruster, B.N., Li, X., Pausch, M.H., Herlitze, S., and Roth, B.L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 5163–5168.

Arnsten, A.F.T., Wang, M., and Paspalas, C.D. (2015). Dopamine's Actions in Primate Prefrontal Cortex: Challenges for Treating Cognitive Disorders. *Pharmacol. Rev.* *67*, 681–696.

Arolfo, M.P., Zanudio, M.A., and Ramirez, O.A. (1998). Baclofen infused in rat hippocampal formation impairs spatial learning. *Hippocampus* *8*, 109–113.

Aschauer, D.F., Kreuz, S., and Rumpel, S. (2013). Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain. *PLoS ONE* *8*, e76310.

Aston-Jones, G., and Deisseroth, K. (2013). Recent advances in optogenetics and pharmacogenetics. *Brain Res.* *1511*, 1–5.

Atkinson, H.C., and Waddell, B.J. (1997). Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle 1. *Endocrinology* *138*, 3842–3848.

Atkinson, H.C., Wood, S.A., Kershaw, Y.M., Bate, E., and Lightman, S.L. (2006). Diurnal Variation in the Responsiveness of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis of the Male Rat to Noise Stress. *J. Neuroendocrinol.* *18*, 526–533.

B

Baddeley, A. (2003). Working memory: looking back and looking forward. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 829–839.

Baker, P.M., Oh, S.E., Kidder, K.S., and Mizumori, S.J.Y. (2015). Ongoing behavioral state information signaled in the lateral habenula guides choice flexibility in freely moving rats. *Front. Behav. Neurosci.* *9*.

Baker, P.M., Raynor, S.A., Francis, N.T., and Mizumori, S.J.Y. (2016). Lateral habenula integration of proactive and retroactive information mediates behavioral flexibility. *Neuroscience*.

Barcia, C., Jimenez-Dalmaroni, M., Kroeger, K.M., Puntel, M., Rapaport, A.J., Larocque, D., King, G.D., Johnson, S.A., Liu, C., Xiong, W., et al. (2007). One-year expression from high-capacity adenoviral vectors in the brains of animals with pre-existing anti-adenoviral immunity: clinical implications. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *15*, 2154–2163.

Bibliographie

- Barnes, T.D., Kubota, Y., Hu, D., Jin, D.Z., and Graybiel, A.M. (2005). Activity of striatal neurons reflects dynamic encoding and recoding of procedural memories. *Nature* 437, 1158–1161.
- Barnett, S.A. (2007). *The Rat: A Study in Behavior* (New Brunswick, N.J: Aldine Transaction).
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Pontecorvo, M.J., and Flicker, C. (1985). The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 444, 332–358.
- Bastide, M.F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C.E., Fernagut, P.-O., and Bézard, E. (2014). Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiol. Dis.* 62, 179–192.
- Bastide, M.F., de la Crompe, B., Doudnikoff, E., Fernagut, P.-O., Gross, C.E., Mallet, N., Boraud, T., and Bézard, E. (2016). Inhibiting Lateral Habenula Improves L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Biol. Psychiatry* 79, 345–353.
- Basu, K., Gravel, C., Tomioka, R., Kaneko, T., Tamamaki, N., and Sík, A. (2008). Novel strategy to selectively label excitatory and inhibitory neurons in the cerebral cortex of mice. *J. Neurosci. Methods* 170, 212–219.
- Benabid, A.L., and Jeaugey, L. (1989). Cells of the rat lateral habenula respond to high-threshold somatosensory inputs. *Neurosci. Lett.* 96, 289–294.
- Benson, D.L., Isackson, P.J., Gall, C.M., and Jones, E.G. (1992). Contrasting patterns in the localization of glutamic acid decarboxylase and Ca²⁺/calmodulin protein kinase gene expression in the rat central nervous system. *Neuroscience* 46, 825–849.
- Ben-Yakov, A., Dudai, Y., and Mayford, M.R. (2015). Memory Retrieval in Mice and Men. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* a021790.
- Bergmann, H.C., Daselaar, S.M., Fernández, G., and Kessels, R.P.C. (2016). Neural substrates of successful working memory and long-term memory formation in a relational spatial memory task. *Cogn. Process.*
- Bertoglio, L.J., and Carobrez, A.P. (2000). Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. *Behav. Brain Res.* 108, 197–203.
- Betley, J.N., and Sternson, S.M. (2011). Adeno-Associated Viral Vectors for Mapping, Monitoring, and Manipulating Neural Circuits. *Hum. Gene Ther.* 22, 669–677.
- Bezard, E., and Carta, M. (2015). Could the serotonin theory give rise to a treatment for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease? *Brain J. Neurol.* 138, 829–830.
- Bezard, E., Brotchie, J.M., and Gross, C.E. (2001). Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 577–588.

Bibliographie

Bianco, I.H., and Wilson, S.W. (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 1005–1020.

Binder, S., Dere, E., and Zlomuzica, A. (2015). A critical appraisal of the what-where-when episodic-like memory test in rodents: Achievements, caveats and future directions. *Prog. Neurobiol.* 130, 71–85.

Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331–356.

Bouthenet, M.L., Souil, E., Martres, M.P., Sokoloff, P., Giros, B., and Schwartz, J.C. (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.* 564, 203–219.

Boyce, R., Glasgow, S.D., Williams, S., and Adamantidis, A. (2016). Causal evidence for the role of REM sleep theta rhythm in contextual memory consolidation. *Science* 352, 812–816.

Brigman, J.L., Wright, T., Talani, G., Prasad-Mulcare, S., Jinde, S., Seabold, G.K., Mathur, P., Davis, M.I., Bock, R., Gustin, R.M., et al. (2010). Loss of GluN2B-Containing NMDA Receptors in CA1 Hippocampus and Cortex Impairs Long-Term Depression, Reduces Dendritic Spine Density, and Disrupts Learning. *J. Neurosci.* 30, 4590–4600.

Brinschwitz, K., Dittgen, A., Madai, V.I., Lommel, R., Geisler, S., and Veh, R.W. (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476.

Bromberg-Martin, E.S., and Hikosaka, O. (2011). Lateral habenula neurons signal errors in the prediction of reward information. *Nat. Neurosci.* 14, 1209–1216.

Bromberg-Martin, E.S., Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2010). Distinct Tonic and Phasic Anticipatory Activity in Lateral Habenula and Dopamine Neurons. *Neuron* 67, 144–155.

Brown, C. (2006). Blood collection from the tail of a rat. *Lab Anim.* 35, 24.

Brown, P.L., and Shepard, P.D. (2013). Lesions of the Fasciculus Retroflexus Alter Footshock-Induced cFos Expression in the Mesopontine Rostromedial Tegmental Area of Rats. *PLoS ONE* 8, e60678.

Brown, R.G., and Marsden, C.D. (1990). Cognitive function in Parkinson's disease: from description to theory. *Trends Neurosci.* 13, 21–29.

Buhot, M.-C., Martin, S., and Segu, L. (2000). Role of serotonin in memory impairment. *Ann. Med.* 32, 210–221.

Burgess, N., Maguire, E.A., and O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35, 625–641.

Bibliographie

Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33, 325–340.

Buzsáki, G., and Moser, E.I. (2013). Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat. Neurosci.* 16, 130–138.

C

Carobrez, A.P., and Bertoglio, L.J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1193–1205.

Carr, K.D., Park, T.H., Zhang, Y., and Stone, E.A. (1998). Neuroanatomical patterns of Fos-like immunoreactivity induced by naltrexone in food-restricted and ad libitum fed rats. *Brain Res.* 779, 26–32.

Carr, M.F., Jadhav, S.P., and Frank, L.M. (2011). Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nat. Neurosci.* 14, 147–153.

Casarrubea, M., Davies, C., Faulisi, F., Pierucci, M., Colangeli, R., Partridge, L., Chambers, S., Cassar, D., Valentino, M., Muscat, R., et al. (2015). Acute nicotine induces anxiety and disrupts temporal pattern organization of rat exploratory behavior in hole-board: a potential role for the lateral habenula. *Front. Cell. Neurosci.* 9.

Cassel, J.-C., and Pereira de Vasconcelos, A. (2015). Importance of the ventral midline thalamus in driving hippocampal functions. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 145–161.

Cassel, J.-C., Pereira de Vasconcelos, A., Loureiro, M., Cholvin, T., Dalrymple-Alford, J.C., and Vertes, R.P. (2013). The reuniens and rhomboid nuclei: Neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. *Prog. Neurobiol.* 111, 34–52.

Castle, M.J., Gershenson, Z.T., Giles, A.R., Holzbaur, E.L.F., and Wolfe, J.H. (2014). Adeno-Associated Virus Serotypes 1, 8, and 9 Share Conserved Mechanisms for Anterograde and Retrograde Axonal Transport. *Hum. Gene Ther.* 25, 705–720.

Castner, S., Goldman-Rakic, P., and Williams, G. (2004). Animal models of working memory: insights for targeting cognitive dysfunction in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)* 174.

Castro, C.A., and Larsen, T. (1992). Primacy and recency effects in nonhuman primates. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 18, 335–340.

Cenci, M.A., Kalén, P., Mandel, R.J., and Björklund, A. (1992). Regional differences in the regulation of dopamine and noradrenaline release in medial frontal cortex, nucleus accumbens and caudate-putamen: a microdialysis study in the rat. *Brain Res.* 581, 217–228.

Bibliographie

Chang, Q., and Gold, P.E. (2003). Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J. Neurosci.* 23, 3001–3005.

Chastrette, N., Pfaff, D.W., and Gibbs, R.B. (1991). Effects of daytime and nighttime stress on Fos-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, the habenula, and the posterior paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Res.* 563, 339–344.

Cholvin, T., Loureiro, M., Cassel, R., Cosquer, B., Herbeaux, K., de Vasconcelos, A.P., and Cassel, J.-C. (2016). Dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex each contribute to the retrieval of a recent spatial memory in rats. *Brain Struct. Funct.* 221, 91–102.

Choudhury, S.R., Hudry, E., Maguire, C.A., Sena-Esteves, M., Breakefield, X.O., and Grandi, P. Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology*.

Chowdhury, R., Guitart-Masip, M., Bunzeck, N., Dolan, R.J., and Duzel, E. (2012). Dopamine Modulates Episodic Memory Persistence in Old Age. *J. Neurosci.* 32, 14193–14204.

Christensen, T., Jensen, L., Bouzinova, E.V., and Wiborg, O. (2013). Molecular Profiling of the Lateral Habenula in a Rat Model of Depression. *PLoS ONE* 8, e80666.

Christoph, G.R., Leonzio, R.J., and Wilcox, K.S. (1986). Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J. Neurosci.* 6, 613–619.

Chudasama, Y., and Muir, J.L. (1997). A behavioural analysis of the delayed non-matching to position task: the effects of scopolamine, lesions of the fornix and of the prelimbic region on mediating behaviours by rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 134, 73–82.

Chudasama, Y., and Robbins, T.W. (2004). Dopaminergic Modulation of Visual Attention and Working Memory in the Rodent Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology* 29, 1628–1636.

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

Chudasama, Y., Doobay, V.M., and Liu, Y. (2012). Hippocampal-Prefrontal Cortical Circuit Mediates Inhibitory Response Control in the Rat. *J. Neurosci.* 32, 10915–10924.

Clark, K.L., and Noudoost, B. (2014). The role of prefrontal catecholamines in attention and working memory. *Front. Neural Circuits* 8.

Bibliographie

Clatworthy, P.L., Lewis, S.J.G., Brichard, L., Hong, Y.T., Izquierdo, D., Clark, L., Cools, R., Aigbirhio, F.I., Baron, J.-C., Fryer, T.D., et al. (2009). Dopamine Release in Dissociable Striatal Subregions Predicts the Different Effects of Oral Methylphenidate on Reversal Learning and Spatial Working Memory. *J. Neurosci.* 29, 4690–4696.

Cleary, D.R., Ozpinar, A., Raslan, A.M., and Ko, A.L. (2015). Deep brain stimulation for psychiatric disorders: where we are now. *Neurosurg. Focus* 38, E2.

Cohen, N., Pell, L., Edelson, M.G., Ben-Yakov, A., Pine, A., and Dudai, Y. (2015). Peri-encoding predictors of memory encoding and consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 50, 128–142.

Colgin, L.L. (2011). Oscillations and hippocampal–prefrontal synchrony. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 467–474.

Concha, M.L., and Wilson, S.W. (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat.* 199, 63–84.

Conklin, B.R., Hsiao, E.C., Claeysen, S., Dumuis, A., Srinivasan, S., Forsayeth, J.R., Guettier, J.-M., Chang, W.C., Pei, Y., McCarthy, K.D., et al. (2008). Engineering GPCR signaling pathways with RASSLs. *Nat. Methods* 5, 673–678.

Conte, W.L., Kamishina, H., and Reep, R.L. (2009). The efficacy of the fluorescent conjugates of cholera toxin subunit B for multiple retrograde tract tracing in the central nervous system. *Brain Struct. Funct.* 213, 367–373.

Conway, M.A. (2009). Episodic memories. *Neuropsychologia* 47, 2305–2313.

Cosquer, B., Galani, R., Kuster, N., and Cassel, J.-C. (2005). Whole-body exposure to 2.45GHz electromagnetic fields does not alter anxiety responses in rats: a plus-maze study including test validation. *Behav. Brain Res.* 156, 65–74.

Coward, P., Wada, H.G., Falk, M.S., Chan, S.D., Meng, F., Akil, H., and Conklin, B.R. (1998). Controlling signaling with a specifically designed Gi-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 352–357.

Craig, A.D. (2003). Distribution of trigeminothalamic and spinothalamic lamina I terminations in the cat. *Somatosens. Mot. Res.* 20, 209–222.

D

Dalrymple-Alford, J.C., Harland, B., Loukavenko, E.A., Perry, B., Mercer, S., Collings, D.A., Ulrich, K., Abraham, W.C., McNaughton, N., and Wolff, M. (2015). Anterior thalamic nuclei lesions and recovery of function: Relevance to cognitive thalamus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54, 145–160.

Davidson, B.L., Allen, E.D., Kozarsky, K.F., Wilson, J.M., and Roessler, B.J. (1993). A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat. Genet.* 3, 219–223.

Bibliographie

Davis, M., Walker, D.L., Miles, L., and Grillon, C. (2009). Phasic vs Sustained Fear in Rats and Humans: Role of the Extended Amygdala in Fear vs Anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35, 105–135.

Davoodi, F.G., Motamedi, F., Naghdi, N., and Akbari, E. (2009). Effect of reversible inactivation of the reuniens nucleus on spatial learning and memory in rats using Morris water maze task. *Behav. Brain Res.* 198, 130–135.

De Boer, S.F., and Van der Gugten, J. (1987). Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats. *Physiol. Behav.* 40, 323–328.

De Boer, S.F., Koopmans, S.J., Slangen, J.L., and Van der Gugten, J. (1990). Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol. Behav.* 47, 1117–1124.

Delatour, B., and Gisquet-Verrier, P. (2000). Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behav. Brain Res.* 109, 113–128.

Deller, T., and Frotscher, M. (1997). Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Prog. Neurobiol.* 53, 687–727.

D'Esposito, M., and Postle, B.R. (2015). The Cognitive Neuroscience of Working Memory. *Annu. Rev. Psychol.* 66, 115–142.

Devan, B.D., McDonald, R.J., and White, N.M. (1999a). Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place-and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav. Brain Res.* 100, 5–14.

Devan, B.D., McDonald, R.J., and White, N.M. (1999b). Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place-and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav. Brain Res.* 100, 5–14.

D'Hooge, R., and De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36, 60–90.

Díaz, E., Bravo, D., Rojas, X., and Concha, M.L. (2011). Morphologic and immunohistochemical organization of the human habenular complex. *J. Comp. Neurol.* 519, 3727–3747.

Dolleman-van der Weel, M.J., Morris, R.G.M., and Witter, M.P. (2009). Neurotoxic lesions of the thalamic reuniens or mediodorsal nucleus in rats affect non-mnemonic aspects of watermaze learning. *Brain Struct. Funct.* 213, 329–342.

Doyon, J., Penhune, V., and Ungerleider, L.G. (2003). Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia* 41, 252–262.

Dragoi, G., and Tonegawa, S. (2013). Development of schemas revealed by prior experience and NMDA receptor knock-out. *eLife* 2, e01326.

Bibliographie

Dreosti, E., Vendrell Llopis, N., Carl, M., Yaksi, E., and Wilson, S.W. (2014). Left-Right Asymmetry Is Required for the Habenulae to Respond to Both Visual and Olfactory Stimuli. *Curr. Biol.* 24, 440–445.

Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51–86.

Dudai, Y., Karni, A., and Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron* 88, 20–32.

Dudchenko, P.A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 699–709.

Dudchenko, P.A., and Wood, E.R. (2015). Place fields and the cognitive map: Cognitive Maps. *Hippocampus* 25, 709–712.

Dudchenko, P.A., Talpos, J., Young, J., and Baxter, M.G. (2013). Animal models of working memory: A review of tasks that might be used in screening drug treatments for the memory impairments found in schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 2111–2124.

Dunnett, S.B., Nathwani, F., and Brasted, P.J. (1999). Medial prefrontal and neostriatal lesions disrupt performance in an operant delayed alternation task in rats. *Behav. Brain Res.* 106, 13–28.

Durkin, M.M., Gunwaldsen, C.A., Borowsky, B., Jones, K.A., and Branchek, T.A. (1999). An in situ hybridization study of the distribution of the GABA B2 protein mRNA in the rat CNS. *Mol. Brain Res.* 71, 185–200.

van Duuren, E., van der Plasse, G., van der Blom, R., Joosten, R.N.J.M.A., Mulder, A.B., Pennartz, C.M.A., and Feenstra, M.G.P. (2007). Pharmacological Manipulation of Neuronal Ensemble Activity by Reverse Microdialysis in Freely Moving Rats: A Comparative Study of the Effects of Tetrodotoxin, Lidocaine, and Muscimol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 61–69.

E

Edeline, J.-M., Hars, B., Hennevin, E., and Cotillon, N. (2002). Muscimol Diffusion after Intracerebral Microinjections: A Reevaluation Based on Electrophysiological and Autoradiographic Quantifications. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78, 100–124.

Eichenbaum, H., and Cohen, N.J. (2014). Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function? *Neuron* 83, 764–770.

Eidi, A., Haeri-Rohani, A., Khakpai, F., Nasehi, M., and Zarrindast, M.R. (2013). The role of glutamatergic pathway between septum and hippocampus in the memory formation.

Elman, I., and Borsook, D. (2016). Common Brain Mechanisms of Chronic Pain and Addiction. *Neuron* 89, 11–36.

Bibliographie

Engelmann, M., Ebner, K., Landgraf, R., and Wotjak, C.T. (2006). Effects of Morris water maze testing on the neuroendocrine stress response and intrahypothalamic release of vasopressin and oxytocin in the rat. *Horm. Behav.* *50*, 496–501.

English, J.G., and Roth, B.L. (2015). Chemogenetics—A Transformational and Translational Platform. *JAMA Neurol.* *72*, 1361.

Eriksson, J., Vogel, E.K., Lansner, A., Bergström, F., and Nyberg, L. (2015). Neurocognitive Architecture of Working Memory. *Neuron* *88*, 33–46.

Eustache, F., and Desgranges, B. (2008). MNESIS: Towards the Integration of Current Multisystem Models of Memory. *Neuropsychol. Rev.* *18*, 53–69.

Evely, K.M., Hudson, R.L., Dubocovich, M.L., and Haj-dahmane, S. (2016). Melatonin receptor activation increases glutamatergic synaptic transmission in the rat medial lateral habenula: Melatonin Regulation of Glutamate Synapses in Habenula. *Synapse* *70*, 181–186.

F

Fadda, F., Cocco, S., and Stancampiano, R. (2000). Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuroreport* *11*, 2265–2269.

Ferland, C.L., and Schrader, L.A. (2011). Cage mate separation in pair-housed male rats evokes an acute stress corticosterone response. *Neurosci. Lett.* *489*, 154–158.

Fernandez, S.P., Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Barik, J., Gruart, A., Delgado-García, J.M., and Gaspar, P. (2016). Constitutive and Acquired Serotonin Deficiency Alters Memory and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuropsychopharmacology*.

Fields-Berry, S.C., Halliday, A.L., and Cepko, C.L. (1992). A recombinant retrovirus encoding alkaline phosphatase confirms clonal boundary assignment in lineage analysis of murine retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 693–697.

Fizet, J., Cassel, J.-C., Kelche, C., and Meunier, H. (2016). A review of the 5-Choice Serial Reaction Time (5-CSRT) task in different vertebrate models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *71*, 135–153.

Floresco, S.B. (2013). Prefrontal dopamine and behavioral flexibility: shifting from an “inverted-U” toward a family of functions. *Front. Neurosci.* *7*.

Floresco, S.B., and Ghods-Sharifi, S. (2006). Amygdala-Prefrontal Cortical Circuitry Regulates Effort-Based Decision Making. *Cereb. Cortex* *17*, 251–260.

Floresco, S.B., and Magyar, O. (2006). Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology (Berl.)* *188*, 567–585.

Bibliographie

Floresco, S.B., and Phillips, A.G. (2001). Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D-sub-1 agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behav. Neurosci.* *115*, 934–939.

Fluttert, M., Dalm, S., and Oitzl, M.S. (2000). A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Lab. Anim.* *34*, 372–378.

Fouquet, C., Babayan, B.M., Watilliaux, A., Bontempi, B., Tobin, C., and Rondi-Reig, L. (2013). Complementary Roles of the Hippocampus and the Dorsomedial Striatum during Spatial and Sequence-Based Navigation Behavior. *PLoS ONE* *8*, e67232.

Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 119–130.

Franklin, T.B., Saab, B.J., and Mansuy, I.M. (2012). Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. *Neuron* *75*, 747–761.

Fries, P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn. Sci.* *9*, 474–480.

Fries, P. (2015). Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. *Neuron* *88*, 220–235.

Fujisawa, S., and Buzsáki, G. (2011). A 4 Hz Oscillation Adaptively Synchronizes Prefrontal, VTA, and Hippocampal Activities. *Neuron* *72*, 153–165.

Fuster, J.M., Alexander, G.E., and others (1971). Neuron activity related to short-term memory. *Science* *173*, 652–654.

G

Gass, N., Cleppien, D., Zheng, L., Schwarz, A.J., Meyer-Lindenberg, A., Vollmayr, B., Weber-Fahr, W., and Sartorius, A. (2014). Functionally altered neurocircuits in a rat model of treatment-resistant depression show prominent role of the habenula. *Eur. Neuropsychopharmacol.* *24*, 381–390.

Geisler, S., and Trimble, M. (2008). The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr.* *13*, 484–489.

Geisler, S., Andres, K.H., and Veh, R.W. (2003). Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. *J. Comp. Neurol.* *458*, 78–97.

Genzel, L., and Robertson, E.M. (2015). To Replay, Perchance to Consolidate. *PLOS Biol.* *13*, e1002285.

Gipson, C.D., and Olive, M.F. (2016). Structural and functional plasticity of dendritic spines - root or result of behavior?: Dendritic spine plasticity and behavior. *Genes Brain Behav.*

Bibliographie

Gisquet-Verrier, P., and Delatour, B. (2006). The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: Not involved in the short-term maintenance but in monitoring and processing functions. *Neuroscience* 141, 585–596.

Gisquet-Verrier, P., and Riccio, D.C. (2012). Memory reactivation effects independent of reconsolidation. *Learn. Mem.* 19, 401–409.

Golden, S.A., Heshmati, M., Flanigan, M., Christoffel, D.J., Guise, K., Pfau, M.L., Aleyasin, H., Menard, C., Zhang, H., Hodes, G.E., et al. (2016). Basal forebrain projections to the lateral habenula modulate aggression reward. *Nature* 534, 688–692.

Goldman-Rakic, P.S. (1996). Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13473–13480.

Goldman-Rakic, P.S., Muly III, E.C., and Williams, G.V. (2000). D 1 receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res. Rev.* 31, 295–301.

Goldstein, R. (1983). A GABAergic habenulo-raphé pathway mediation of the hypnogenic effects of vasotocin in cat. *Neuroscience* 10, 941–945.

Good, C.H., Wang, H., Chen, Y.-H., Mejias-Aponte, C.A., Hoffman, A.F., and Lupica, C.R. (2013). Dopamine D4 Receptor Excitation of Lateral Habenula Neurons via Multiple Cellular Mechanisms. *J. Neurosci.* 33, 16853–16864.

Goutagny, R., Loureiro, M., Jackson, J., Chaumont, J., Williams, S., Isope, P., Kelche, C., Cassel, J.-C., and Lecourtier, L. (2013). Interactions between the lateral habenula and the hippocampus: implication for spatial memory processes. *Neuropsychopharmacology* 38, 2418–2426.

Graybiel, A.M. (2005). The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 638–644.

Greatrex, R.M., and Phillipson, O.T. (1982). Demonstration of synaptic input from prefrontal cortex to the habenula in the rat. *Brain Res.* 238, 192–197.

Griffin, A.L. (2015). Role of the thalamic nucleus reuniens in mediating interactions between the hippocampus and medial prefrontal cortex during spatial working memory. *Front. Syst. Neurosci.* 9.

Guglielmotti, V., and Cristino, L. (2006). The interplay between the pineal complex and the habenular nuclei in lower vertebrates in the context of the evolution of cerebral asymmetry. *Brain Res. Bull.* 69, 475–488.

Guilding, C., Hughes, A.T.L., and Piggins, H.D. (2010). Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience* 169, 1630–1639.

Gutiérrez-Guzmán, B.E., Hernández-Pérez, J.J., López-Vázquez, M.Á., Fregozo, C.S., Guevara, M.Á., and Olvera-Cortés, M.E. (2012). Serotonin depletion of supramammillary/posterior hypothalamus nuclei produces place learning deficiencies and alters the concomitant hippocampal theta activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 682, 99–109.

Bibliographie

Gutnikov, S.A., Barnes, J.C., and Rawlins, J.N. (1994). Working memory tasks in five-choice operant chambers: use of relative and absolute spatial memories. *Behav. Neurosci.* 108, 899–910.

H

Habermas, T., Diel, V., and Welzer, H. (2013). Lifespan trends of autobiographical remembering: Episodicity and search for meaning. *Conscious. Cogn.* 22, 1061–1073.

Haider, S., Khaliq, S., and Haleem, D.J. (2007). Enhanced serotonergic neurotransmission in the hippocampus following tryptophan administration improves learning acquisition and memory consolidation in rats. *Pharmacol. Rep.* 59, 53.

Hangya, B., Borhegyi, Z., Szilágyi, N., Freund, T.F., and Varga, V. (2009). GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 8094–8102.

Harker, K.T., and Whishaw, I.Q. (2002). Impaired spatial performance in rats with retrosplenial lesions: importance of the spatial problem and the rat strain in identifying lesion effects in a swimming pool. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1155–1164.

Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., and O'Keefe, J. (2013). Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20120510–20120510.

Hartung, H., Tan, S.K.H., Temel, Y., and Sharp, T. (2016). High frequency stimulation of the subthalamic nucleus modulates neuronal activity in the lateral habenula nucleus. *Eur. J. Neurosci.*

Hasselmo, M.E. (2005). What is the function of hippocampal theta rhythm?—Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus* 15, 936–949.

Havekes, R., Abel, T., and Van der Zee, E.A. (2011). The cholinergic system and neostriatal memory functions. *Behav. Brain Res.* 221, 412–423.

Hed, J., Dahlgren, C., and Rundquist, I. (1983). A simple fluorescence technique to stain the plasma membrane of human neutrophils. *Histochemistry* 79, 105–110.

Hembrook, J.R., Onos, K.D., and Mair, R.G. (2012). Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus* 22, 853–860.

Henke, K. (2010). A model for memory systems based on processing modes rather than consciousness. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 523–532.

Herkenham, M., and Nauta, W.J. (1977). Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J. Comp. Neurol.* 173, 123–146.

Bibliographie

Herkenham, M., and Nauta, W.J. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 19–47.

Herry, C., and Johansen, J.P. (2014). Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. *Nat. Neurosci.* 17, 1644–1654.

Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P., and El Mestikawy, S. (2004). Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123, 983–1002.

Hikosaka, O. (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 503–513.

Hikosaka, O., Sesack, S.R., Lecourtier, L., and Shepard, P.D. (2008). Habenula: Crossroad between the Basal Ganglia and the Limbic System. *J. Neurosci.* 28, 11825–11829.

Hollon, N.G., Burgeno, L.M., and Phillips, P.E.M. (2015). Stress effects on the neural substrates of motivated behavior. *Nat. Neurosci.* 18, 1405–1412.

Hong, S., and Hikosaka, O. (2008). The Globus Pallidus Sends Reward-Related Signals to the Lateral Habenula. *Neuron* 60, 720–729.

Honma, K.-I., Honma, S., and Hiroshige, T. (1987). Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. *Physiol. Behav.* 40, 767–774.

Honoré, T., Davies, S.N., Drejer, J., Fletcher, E.J., Jacobsen, P., Lodge, D., and Nielsen, F.E. (1988). Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* 241, 701–703.

Hörtnagl, H., Tasan, R.O., Wieselthaler, A., Kirchmair, E., Sieghart, W., and Sperk, G. (2013). Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. *Neuroscience* 236, 345–372.

Hu, H. (2016). Reward and Aversion. *Annu. Rev. Neurosci.* 39, 297–324.

I

Ilango, A., Shumake, J., Wetzell, W., Scheich, H., and Ohl, F.W. (2013). Electrical Stimulation of Lateral Habenula during Learning: Frequency-Dependent Effects on Acquisition but Not Retrieval of a Two-Way Active Avoidance Response. *PLoS ONE* 8, e65684.

Ito, H.T., Zhang, S.-J., Witter, M.P., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2015). A prefrontal–thalamo–hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation. *Nature* 522, 50–55.

Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., and Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav. Brain Res.* 103, 1–11.

Bibliographie

Izquierdo, I., Furini, C.R.G., and Myskiw, J.C. (2016). Fear Memory. *Physiol. Rev.* 96, 695–750.

J

Janak, P.H., and Tye, K.M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517, 284–292.

Jesuthasan, S. (2012). Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 395–403.

Jhou, T.C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B.A., and Zahm, D.S. (2009). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J. Comp. Neurol.* 513, 566–596.

Ji, H., and Shepard, P.D. (2007). Lateral Habenula Stimulation Inhibits Rat Midbrain Dopamine Neurons through a GABAA Receptor-Mediated Mechanism. *J. Neurosci.* 27, 6923–6930.

Joëls, M., Fernandez, G., and Roozendaal, B. (2011). Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends Cogn. Sci.* 15, 280–288.

Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., and LeDoux, J.E. (2011). Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell* 147, 509–524.

Josselyn, S.A., Köhler, S., and Frankland, P.W. (2015). Finding the engram. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 521–534.

Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.

K

Kalén, P., Lindvall, O., and Björklund, A. (1989a). Electrical stimulation of the lateral habenula increases hippocampal noradrenaline release as monitored by in vivo microdialysis. *Exp. Brain Res.* 76, 239–245.

Kalén, P., Lindvall, O., and Björklund, A. (1989b). Electrical stimulation of the lateral habenula increases hippocampal noradrenaline release as monitored by in vivo microdialysis. *Exp. Brain Res.* 76, 239–245.

Kalén, P., Strecker, R.E., Rosengren, E., and Björklund, A. (1989c). Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by in vivo microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA. *Brain Res.* 492, 187–202.

Kalén, P., Nilsson, O.G., Cenci, M.A., Rosengren, E., Lindvall, O., and Björklund, A. (1990). Intracerebral microdialysis as a tool to monitor transmitter release from grafted cholinergic and monoaminergic neurons. *J. Neurosci. Methods* 34, 107–115.

Bibliographie

- Kandel, E.R., Dudai, Y., and Mayford, M.R. (2014). The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell* 157, 163–186.
- Kaufling, J., Waltisperger, E., Bourdy, R., Valera, A., Veinante, P., Freund-Mercier, M.-J., and Barrot, M. (2010). Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure: FosB induction in the tVTA. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1677–1691.
- Kelsey, J.E., and Landry, B.A. (1988). Medial septal lesions disrupt spatial mapping ability in rats. *Behav. Neurosci.* 102, 289–293.
- van Kerkhof, L.W.M., Damsteegt, R., Trezza, V., Voorn, P., and Vanderschuren, L.J.M.J. (2013). Functional integrity of the habenula is necessary for social play behaviour in rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3465–3475.
- Kesner, R.P. (2000). Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat. *Psychobiology* 28, 219–228.
- Kesner, R.P., and Churchwell, J.C. (2011). An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 417–431.
- Khakpai, F., Nasehi, M., Haeri-Rohani, A., Eidi, A., and Zarrindast, M.R. (2013). Septo-hippocampo-septal loop and memory formation. *Basic Clin. Neurosci.* 4, 5.
- Khan, A.M., Stanley, B.G., Bozzetti, L., Chin, C., Stivers, C., and Currás-Collazo, M.C. (2000). N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B is widely expressed throughout the rat diencephalon: An immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 428, 428–449.
- Kiening, K., and Sartorius, A. (2013). A new translational target for deep brain stimulation to treat depression. *EMBO Mol. Med.* 5, 1151–1153.
- Kim, J.J., and Jung, M.W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 188–202.
- Kim, U., and Chang, S.-Y. (2005). Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus. *J. Comp. Neurol.* 483, 236–250.
- Kim, U., and Lee, T. (2012). Topography of descending projections from anterior insular and medial prefrontal regions to the lateral habenula of the epithalamus in the rat: Prefrontohabenular projections. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1253–1269.
- Kimura, M., Satoh, T., and Matsumoto, N. (2007). What does the habenula tell dopamine neurons? *Nat. Neurosci.* 10, 677–678.
- Kiss, J., Csáki, A., Bokor, H., Kocsis, K., and Kocsis, B. (2002). Possible glutamatergic/aspartatergic projections to the supramammillary nucleus and their origins in the rat studied by selective [(3)H]D-aspartate labelling and immunocytochemistry. *Neuroscience* 111, 671–691.

Bibliographie

- de Kloet, E.R., Oitzl, M.S., and Joëls, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 22, 422–426.
- Klur, S., Muller, C., Pereira de Vasconcelos, A., Ballard, T., Lopez, J., Galani, R., Certa, U., and Cassel, J.-C. (2009). Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* 19, 800–816.
- Koenig, J., Cosquer, B., and Cassel, J.-C. (2008). Activation of septal 5-HT_{1A} receptors alters spatial memory encoding, interferes with consolidation, but does not affect retrieval in rats subjected to a water-maze task. *Hippocampus* 18, 99–118.
- Koob, G.F., and Le Moal, M. (2008). Addiction and the brain antireward system. *Annu. Rev. Psychol.* 59, 29–53.
- Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flügge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., et al. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1291–1301.
- Kopelman, M.D. (1995). The Korsakoff syndrome. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 166, 154–173.
- Kopelman, M.D. (2015). What does a comparison of the alcoholic Korsakoff syndrome and thalamic infarction tell us about thalamic amnesia? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 54, 46–56.
- Korte, M., and Schmitz, D. (2016). Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. *Physiol. Rev.* 96, 647–693.
- Kotterman, M.A., and Schaffer, D.V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 445–451.
- Kowski, A.B., Veh, R.W., and Weiss, T. (2009). Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. *Neuroscience* 161, 1154–1165.
- Kozlowski, M.R., and Marshall, J.F. (1980). Plasticity of [¹⁴C]2-deoxy-D-glucose incorporation into neostriatum and related structures in response to dopamine neuron damage and apomorphine replacement. *Brain Res.* 197, 167–183.
- Krishnan, S., Mathuru, A.S., Kibat, C., Rahman, M., Lupton, C.E., Stewart, J., Claridge-Chang, A., Yen, S.-C., and Jesuthasan, S. (2014). The Right Dorsal Habenula Limits Attraction to an Odor in Zebrafish. *Curr. Biol.* 24, 1167–1175.
- Kullmann, D.M., and Lamsa, K.P. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 687–699.
- Kumaran, D., and Maguire, E.A. (2005). The human hippocampus: cognitive maps or relational memory? *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7254–7259.

Bibliographie

L

La Salle, G.L.G., Robert, J.J., Berrard, S., Ridoux, V., Stratford-Perricaudet, L.D., Perricaudet, M., and Mallet, J. (1993). An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259, 988–990.

LaLumiere, R.T., Buen, T.-V., and McGaugh, J.L. (2003). Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. *J. Neurosci.* 23, 6754–6758.

Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., and Malenka, R.C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217.

Lanciego, J.L., and Wouterlood, F.G. (2011). A half century of experimental neuroanatomical tracing. *J. Chem. Neuroanat.* 42, 157–183.

Lara, A.H., and Wallis, J.D. (2015). The Role of Prefrontal Cortex in Working Memory: A Mini Review. *Front. Syst. Neurosci.* 9.

Larocque, J.J., Lewis-Peacock, J.A., and Postle, B.R. (2014). Multiple neural states of representation in short-term memory? It's a matter of attention. *Front. Hum. Neurosci.* 8, 5.

Lecca, S., Meye, F.J., and Mameli, M. (2014). The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1170–1178.

Lechevalier, B., Eustache, F., and Viader, F. (2008). *Traité de neuropsychologie clinique (De Boeck Supérieur)*.

Lecourtier, L., Neijt, H.C., and Kelly, P.H. (2004). Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2551–2560.

Lecourtier, L., DeFrancesco, A., and Moghaddam, B. (2008). Differential tonic influence of lateral habenula on prefrontal cortex and nucleus accumbens dopamine release. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1755–1762.

Lecourtier, L., de Vasconcelos, A.P., Leroux, E., Cosquer, B., Geiger, K., Lithfous, S., and Cassel, J.-C. (2011). Septohippocampal pathways contribute to system consolidation of a spatial memory: sequential implication of GABAergic and cholinergic neurons. *Hippocampus* 21, 1277–1289.

Leon, W.C., Bruno, M.A., Allard, S., Nader, K., and Cuello, A.C. (2010). Engagement of the PFC in consolidation and recall of recent spatial memory. *Learn. Mem.* 17, 297–305.

Lerner, T.N., Ye, L., and Deisseroth, K. (2016). Communication in Neural Circuits: Tools, Opportunities, and Challenges. *Cell* 164, 1136–1150.

Bibliographie

- Lesburgueres, E., Gobbo, O.L., Alaux-Cantin, S., Hambucken, A., Trifilieff, P., and Bontempi, B. (2011). Early Tagging of Cortical Networks Is Required for the Formation of Enduring Associative Memory. *Science* 331, 924–928.
- Li, B., Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C.D., Schulz, D., Henn, F., and Malinow, R. (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 470, 535–539.
- Li, K., Zhou, T., Liao, L., Yang, Z., Wong, C., Henn, F., Malinow, R., Yates, J.R., and Hu, H. (2013). β CaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression. *Science* 341, 1016–1020.
- Li, S., Cullen, W.K., Anwyl, R., and Rowan, M.J. (2003). Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat. Neurosci.*
- Liang, F., Hatanaka, Y., Saito, H., Yamamori, T., and Hashikawa, T. (2000). Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 416, 475–495.
- Liggins, J.T. (2009). The roles of dopamine D1 and D2 receptors in working memory function. *Msurj* 4, 39–45.
- Lisman, J.E., and Grace, A.A. (2005). The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. *Neuron* 46, 703–713.
- Lisman, J., Grace, A.A., and Duzel, E. (2011). A neoHebbian framework for episodic memory; role of dopamine-dependent late LTP. *Trends Neurosci.* 34, 536–547.
- Lisoprawski, A., Herve, D., Blanc, G., Glowinski, J., and Tassin, J.P. (1980). Selective activation of the mesocortico-frontal dopaminergic neurons induced by lesion of the habenula in the rat. *Brain Res.* 183, 229–234.
- Liu, X., Ramirez, S., Redondo, R.L., and Tonegawa, S. (2014). Identification and Manipulation of Memory Engram Cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 79, 59–65.
- Lomber, S.G. (1999). The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *J. Neurosci. Methods* 86, 109–117.
- Lopez, J., Wolff, M., Lecourtier, L., Cosquer, B., Bontempi, B., Dalrymple-Alford, J., and Cassel, J.-C. (2009). The Intralaminar Thalamic Nuclei Contribute to Remote Spatial Memory. *J. Neurosci.* 29, 3302–3306.
- Loureiro, M., Lecourtier, L., Engeln, M., Lopez, J., Cosquer, B., Geiger, K., Kelche, C., Cassel, J.-C., and Pereira de Vasconcelos, A. (2012a). The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. *Brain Struct. Funct.* 217, 93–106.

Bibliographie

Loureiro, M., Cholvin, T., Lopez, J., Merienne, N., Latreche, A., Cosquer, B., Geiger, K., Kelche, C., Cassel, J.-C., and Pereira de Vasconcelos, A. (2012b). The Ventral Midline Thalamus (Reuniens and Rhomboid Nuclei) Contributes to the Persistence of Spatial Memory in Rats. *J. Neurosci.* 32, 9947–9959.

Luo, X.F., Zhang, B.L., Li, J.C., Yang, Y.Y., Sun, Y.F., and Zhao, H. (2015). Lateral habenula as a link between dopaminergic and serotonergic systems contributes to depressive symptoms in Parkinson's disease. *Brain Res. Bull.* 110, 40–46.

M

Maguire, E.A. (1997). Hippocampal involvement in human topographical memory: evidence from functional imaging. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 352, 1475–1480.

Maguire, E.A., Frackowiak, R.S., and Frith, C.D. (1997). Recalling routes around London: activation of the right hippocampus in taxi drivers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 7103–7110.

Majchrzak, M., and Di Scala, G. (2000). GABA and muscimol as reversible inactivation tools in learning and memory. *Neural Plast.* 7, 19–29.

Maquet, P., Laureys, S., Peigneux, P., Fuchs, S., Petiau, C., Phillips, C., Aerts, J., Del Fiore, G., Degueldre, C., Meulemans, T., et al. (2000). Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nat. Neurosci.* 3, 831–836.

Marchant, N.J., Campbell, E.J., Whitaker, L.R., Harvey, B.K., Kaganovsky, K., Adhikary, S., Hope, B.T., Heins, R.C., Prisinzano, T.E., Vardy, E., et al. (2016). Role of Ventral Subiculum in Context-Induced Relapse to Alcohol Seeking after Punishment-Imposed Abstinence. *J. Neurosci.* 36, 3281–3294.

Margeta-Mitrovic, M., Mitrovic, I., Riley, R.C., Jan, L.Y., and Basbaum, A.I. (1999). Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 405, 299–321.

Maroteaux, M., and Mamei, M. (2012). Cocaine Evokes Projection-Specific Synaptic Plasticity of Lateral Habenula Neurons. *J. Neurosci.* 32, 12641–12646.

Marr, D. (1971). Simple Memory: A Theory for Archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 262, 23–81.

Martin, J.H., and Ghez, C. (1999). Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. *J. Neurosci. Methods* 86, 145–159.

Masamizu, Y., Okada, T., Kawasaki, K., Ishibashi, H., Yuasa, S., Takeda, S., Hasegawa, I., and Nakahara, K. (2011). Local and retrograde gene transfer into primate neuronal pathways via adeno-associated virus serotype 8 and 9. *Neuroscience* 193, 249–258.

Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111–1115.

Bibliographie

Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* 459, 837–841.

Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2011). Electrical stimulation of the primate lateral habenula suppresses saccadic eye movement through a learning mechanism. *PLoS One* 6, e26701.

Maviel, T. (2004). Sites of Neocortical Reorganization Critical for Remote Spatial Memory. *Science* 305, 96–99.

McAlonan, G.M., Dawson, G.R., Wilkinson, L.O., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. (1995). The effects of AMPA-induced lesions of the medial septum and vertical limb nucleus of the diagonal band of Broca on spatial delayed non-matching to sample and spatial learning in the water maze. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1034–1049.

McDonald, A.J., and Mott, D.D. (2016). Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory: Amygdalohippocampal Interconnections. *J. Neurosci. Res.* n/a-n/a.

McDonald, R.J., and Hong, N.S. (2013). How does a specific learning and memory system in the mammalian brain gain control of behavior?: Memory Systems and Behavioral Control. *Hippocampus* 23, 1084–1102.

McGaugh, J.L. (2004). THE AMYGDALA MODULATES THE CONSOLIDATION OF MEMORIES OF EMOTIONALLY AROUSING EXPERIENCES. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 1–28.

McIntyre, C.K., Marriott, L.K., and Gold, P.E. (2003). Patterns of brain acetylcholine release predict individual differences in preferred learning strategies in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 79, 177–183.

McKenna, J.T., and Vertes, R.P. (2004). Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus. *J. Comp. Neurol.* 480, 115–142.

McNaughton, N., Ruan, M., and Woodnorth, M.-A. (2006). Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze. *Hippocampus* 16, 1102–1110.

Meneses, A., and Hong, E. (1999). 5-HT_{1A} receptors modulate the consolidation of learning in normal and cognitively impaired rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 71, 207–218.

Meneses, A., Terrón, J.A., and Hong, E. (1998). Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the consolidation of learning in cognitively impaired rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 861, 286–287.

Merlo, E., Bekinschtein, P., Jonkman, S., and Medina, J.H. (2015). Molecular Mechanisms of Memory Consolidation, Reconsolidation, and Persistence. *Neural Plast.* 2015, 687175.

Bibliographie

- Meshul, C.K., Noguchi, K., Emre, N., and Ellison, G. (1998). Cocaine-induced changes in glutamate and GABA immunolabeling within rat habenula and nucleus accumbens. *Synapse* 30, 211–220.
- Meye, F.J., Lecca, S., Valentinova, K., and Mameli, M. (2013). Synaptic and cellular profile of neurons in the lateral habenula. *Front. Hum. Neurosci.* 7.
- Meye, F.J., Valentinova, K., Lecca, S., Marion-Poll, L., Maroteaux, M.J., Musardo, S., Moutkine, I., Gardoni, F., Haganir, R.L., Georges, F., et al. (2015). Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula. *Nat. Neurosci.*
- Meye, F.J., Soiza-Reilly, M., Smit, T., Diana, M.A., Schwarz, M.K., and Mameli, M. (2016a). Shifted pallidal co-release of GABA and glutamate in habenula drives cocaine withdrawal and relapse. *Nat. Neurosci.* 19, 1019–1024.
- Meye, F.J., Soiza-Reilly, M., Smit, T., Diana, M.A., Schwarz, M.K., and Mameli, M. (2016b). Shifted pallidal co-release of GABA and glutamate in habenula drives cocaine withdrawal and relapse. *Nat. Neurosci.* 19, 1019–1024.
- Micheau, J., and Marighetto, A. (2011). Acetylcholine and memory: A long, complex and chaotic but still living relationship. *Behav. Brain Res.* 221, 424–429.
- Miller, G.A. (1956). The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. *Psychol. Rev.* 63, 81–97.
- Miller, G.A. (1960). *Plans and the structure of behavior* (New York,: Holt).
- Milot, M., and Plamondon, H. (2008). Ischemia-induced hyperactivity: Effects of dim versus bright illumination on open-field exploration and habituation following global ischemia in rats. *Behav. Brain Res.* 192, 166–172.
- Mok, A.C.S., and Mogenson, G.J. (1974). Effects of electrical stimulation of the lateral habenular nucleus and lateral hypothalamus on unit activity in the upper brain stem. *Brain Res.* 78, 425–435.
- Morey, R.A., Gold, A.L., LaBar, K.S., Beall, S.K., Brown, V.M., Haswell, C.C., Nasser, J.D., Wagner, H.R., McCarthy, G., and Mid-Atlantic MIRECC Workgroup, for the (2012). Amygdala Volume Changes in Posttraumatic Stress Disorder in a Large Case-Controlled Veterans Group. *Arch. Gen. Psychiatry* 69, 1169.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47–60.
- Morris, R.G.M. (1999). D.O. Hebb: *The Organization of Behavior*, Wiley: New York; 1949. *Brain Res. Bull.* 50, 437.
- Morris, J.S., Smith, K.A., Cowen, P.J., Friston, K.J., and Dolan, R.J. (1999). Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nuclei following tryptophan depletion. *NeuroImage* 10, 163–172.

Bibliographie

Morrison, D.J., Rashid, A.J., Yiu, A.P., Yan, C., Frankland, P.W., and Josselyn, S.A. (2016). Parvalbumin interneurons constrain the size of the lateral amygdala engram. *Neurobiol. Learn. Mem.* 135, 91–99.

Moser, M.-B., and Moser, E.I. (1998). Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 7535–7542.

Murdock, B.B., Jr. (1962). The serial position effect of free recall. *J. Exp. Psychol.* 64, 482–488.

Muridharan, G., Samulski, R.J., and Asokan, A. (2014). Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Front. Mol. Neurosci.* 7.

Murphy, B.L., Arnsten, A.F., Goldman-Rakic, P.S., and Roth, R.H. (1996). Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1325–1329.

N

Nadel, L., and Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 217–227.

Nadel, L., Ryan, L., Hayes, S., Gilboa, A., and Moscovitch, M. (2003). The role of the hippocampal complex in long-term episodic memory. *Int. Congr. Ser.* 1250, 215–234.

Nadel, L., Hupbach, A., Gomez, R., and Newman-Smith, K. (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1640–1645.

Nagy, J.I., Carter, D.A., Lehmann, J., and Fibiger, H.C. (1978). Evidence for a GABA-containing projection from the entopeduncular nucleus to the lateral habenula in the rat. *Brain Res.* 145, 360–364.

Nair, S.G., Strand, N.S., and Neumaier, J.F. (2013). DREADDing the lateral habenula: A review of methodological approaches for studying lateral habenula function. *Brain Res.* 1511, 93–101.

Namboodiri, V.M.K., Rodriguez-Romaguera, J., and Stuber, G.D. (2016). The habenula. *Curr. Biol.* CB 26, R873–R877.

Nauta, H.J. (1974). Evidence of a pallidohabenular pathway in the cat. *J. Comp. Neurol.* 156, 19–27.

Ness, D., and Calabrese, P. (2016). Stress Effects on Multiple Memory System Interactions. *Neural Plast.* 2016, 1–20.

Neves, G., Cooke, S.F., and Bliss, T.V.P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 65–75.

Bibliographie

Niewiadomska, G., Baksalerska-Pazera, M., and Riedel, G. (2009). The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 791–805.

Nilsson, O.G., Kalen, P., Rosengren, E., and Björklund, A. (1990). Acetylcholine release in the rat hippocampus as studied by microdialysis is dependent on axonal impulse flow and increases during behavioural activation. *Neuroscience* 36, 325–338.

O

O'Carroll, C.M., and Morris, R.G.. (2004). Heterosynaptic co-activation of glutamatergic and dopaminergic afferents is required to induce persistent long-term potentiation. *Neuropharmacology* 47, 324–332.

Oe, Y., Tominaga-Yoshino, K., Hasegawa, S., and Ogura, A. (2013). Dendritic spine dynamics in synaptogenesis after repeated LTP inductions: Dependence on pre-existing spine density. *Sci. Rep.* 3.

O'Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.

Olton, D.S., and Samuelson, R.J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 2, 97–116.

Olton, D.S., Collison, C., and Werz, M.A. (1977). Spatial memory and radial arm maze performance of rats. *Learn. Motiv.* 8, 289–314.

Olvera-Cortés, M.E., Gutiérrez-Guzmán, B.E., López-Loeza, E., Hernández-Pérez, J.J., and López-Vázquez, M.Á. (2013). Serotonergic modulation of hippocampal theta activity in relation to hippocampal information processing. *Exp. Brain Res.* 230, 407–426.

Omelchenko, N., Bell, R., and Sesack, S.R. (2009). Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area: Habenula input to VTA cell populations. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1239–1250.

Oorschot, D.E. (1996). Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the cavalieri and optical disector methods. *J. Comp. Neurol.* 366, 580–599.

Ootsuka, Y., and Mohammed, M. (2015). Activation of the habenula complex evokes autonomic physiological responses similar to those associated with emotional stress. *Physiol. Rep.* 3, e12297–e12297.

Bibliographie

P

- Packard, M.G., and Goodman, J. (2013). Factors that influence the relative use of multiple memory systems: Factors that Influence the use of Multiple Memory Systems. *Hippocampus* 23, 1044–1052.
- Packard, M.G., and Knowlton, B.J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 563–593.
- Packard, M.G., Hirsh, R., and White, N.M. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 9, 1465–1472.
- Padival, M., Quinette, D., and Rosenkranz, J.A. (2013a). Effects of repeated stress on excitatory drive of basal amygdala neurons in vivo. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 38, 1748–1762.
- Padival, M.A., Blume, S.R., and Rosenkranz, J.A. (2013b). Repeated restraint stress exerts different impact on structure of neurons in the lateral and basal nuclei of the amygdala. *Neuroscience* 246, 230–242.
- Palmer, A.M. (1996). Neurochemical studies of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* 5, 381–391.
- Parent, A., Gravel, S., and Boucher, R. (1981). The origin of forebrain afferents to the habenula in rat, cat and monkey. *Brain Res. Bull.* 6, 23–38.
- Parent, M., Lévesque, M., and Parent, A. (2001). Two types of projection neurons in the internal pallidum of primates: Single-axon tracing and three-dimensional reconstruction. *J. Comp. Neurol.* 439, 162–175.
- Paulsen, O., and Moser, E. (1998). A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 21, 273–278.
- Paxinos, G., and Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition* (Academic Press).
- Pelled, G., Bergman, H., Ben-Hur, T., and Goelman, G. (2007). Manganese-enhanced MRI in a rat model of Parkinson's disease. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 26, 863–870.
- Pellow, S., and File, S.E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525–529.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., and Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Perez-Garcia, G., and Meneses, A. (2008). Memory formation, amnesia, improved memory and reversed amnesia: 5-HT role. *Behav. Brain Res.* 195, 17–29.

Bibliographie

Peterson, L.R., and Peterson, M.J. (1959). Short-term retention of individual verbal items. *J. Exp. Psychol.* *58*, 193–198.

Petralia, R.S., Wang, Y.X., Niedzielski, A.S., and Wenthold, R.J. (1996). The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* *71*, 949–976.

Phelps, E.A., and LeDoux, J.E. (2005). Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior. *Neuron* *48*, 175–187.

Piantadosi, P.T., Khayambashi, S., Schluter, M.G., Kutarna, A., and Floresco, S.B. (2016). Perturbations in reward-related decision-making induced by reduced prefrontal cortical GABA transmission: Relevance for psychiatric disorders. *Neuropharmacology* *101*, 279–290.

Pierson, J.L., Pullins, S.E., and Quinn, J.J. (2015). Dorsal hippocampus infusions of CNQX into the dentate gyrus disrupt expression of trace fear conditioning: HIPPOCAMPUS AND TRACE FEAR CONDITIONING. *Hippocampus* *25*, 779–785.

Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., and Sperk, G. (2000). GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* *101*, 815–850.

Poldrack, R.A., and Packard, M.G. (2003). Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia* *41*, 245–251.

Pontecorvo, M.J., Sahgal, A., and Steckler, T. (1996). Further developments in the measurement of working memory in rodents. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* *3*, 205–213.

Poo, M., Pignatelli, M., Ryan, T.J., Tonegawa, S., Bonhoeffer, T., Martin, K.C., Rudenko, A., Tsai, L.-H., Tsien, R.W., Fishell, G., et al. (2016). What is memory? The present state of the engram. *BMC Biol.* *14*.

Powell, E.W. (1968). Septohabenular connections in the rat, cat and monkey. *J. Comp. Neurol.* *134*, 145–150.

Proulx, C.D., Hikosaka, O., and Malinow, R. (2014). Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat. Neurosci.* *17*, 1146–1152.

Q

Quina, L.A., Wang, S., Ng, L., and Turner, E.E. (2009). Brn3a and Nurr1 Mediate a Gene Regulatory Pathway for Habenula Development. *J. Neurosci.* *29*, 14309–14322.

Quinn, J.P. (1996). Neuronal-specific gene expression--the interaction of both positive and negative transcriptional regulators. *Prog. Neurobiol.* *50*, 363–379.

Bibliographie

R

Rainnie, D.G., Bergeron, R., Sajdyk, T.J., Patil, M., Gehlert, D.R., and Shekhar, A. (2004). Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 3471–3479.

Rajakumar, N., Elisevich, K., and Flumerfelt, B.A. (1993). Compartmental origin of the striato-entopeduncular projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* *331*, 286–296.

Ramirez, S., Liu, X., Lin, P.-A., Suh, J., Pignatelli, M., Redondo, R.L., Ryan, T.J., and Tonegawa, S. (2013). Creating a False Memory in the Hippocampus. *Science* *341*, 387–391.

Ramirez, S., Tonegawa, S., and Liu, X. (2014). Identification and optogenetic manipulation of memory engrams in the hippocampus. *Front. Behav. Neurosci.* *7*.

Ranft, K., Dobrowolny, H., Krell, D., Biela, H., Bogerts, B., and Bernstein, H.-G. (2010). Evidence for structural abnormalities of the human habenular complex in affective disorders but not in schizophrenia. *Psychol. Med.* *40*, 557–567.

Rashidy-Pour, A., Motamedi, F., Semnani, S., Zarrindast, M.R., Fatollahi, Y., and Behzadi, G. (1996a). Effects of reversible inactivation of the medial septal area on long-term potentiation and recurrent inhibition of hippocampal population spikes in rats. *Brain Res.* *734*, 43–48.

Rashidy-Pour, A., Motamedi, F., and Motahed-Larijani, Z. (1996b). Effects of reversible inactivations of the medial septal area on reference and working memory versions of the Morris water maze. *Brain Res.* *709*, 131–140.

Raybuck, J.D., and Lattal, K.M. (2014). Bridging the interval: Theory and neurobiology of trace conditioning. *Behav. Processes* *101*, 103–111.

Reimnsnider, S., Manfredsson, F.P., Muzyczka, N., and Mandel, R.J. (2007). Time Course of Transgene Expression After Intrastratial Pseudotyped rAAV2/1, rAAV2/2, rAAV2/5, and rAAV2/8 Transduction in the Rat. *Mol. Ther.* *15*, 1504–1511.

Reiner, A., Veenman, C.L., Medina, L., Jiao, Y., Del Mar, N., and Honig, M.G. (2000). Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J. Neurosci. Methods* *103*, 23–37.

RéMillard, S., Pourcher, E., and Cohen, H. (2010). Long-term skill proceduralization in schizophrenia. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* *16*, 148.

Ren, J., Qin, C., Hu, F., Tan, J., Qiu, L., Zhao, S., Feng, G., and Luo, M. (2011). Habenula “Cholinergic” Neurons Corelease Glutamate and Acetylcholine and Activate Postsynaptic Neurons via Distinct Transmission Modes. *Neuron* *69*, 445–452.

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* *397*, 251–255.

Bibliographie

Rogan, S.C., and Roth, B.L. (2011). Remote Control of Neuronal Signaling. *Pharmacol. Rev.* 63, 291–315.

Roland, J.J., Stewart, A.L., Janke, K.L., Gielow, M.R., Kostek, J.A., Savage, L.M., Servatius, R.J., and Pang, K.C.H. (2014). Medial Septum-Diagonal Band of Broca (MSDB) GABAergic Regulation of Hippocampal Acetylcholine Efflux Is Dependent on Cognitive Demands. *J. Neurosci.* 34, 506–514.

Root, D.H., Mejias-Aponte, C.A., Zhang, S., Wang, H.-L., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., and Morales, M. (2014). Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat. Neurosci.* 17, 1543–1551.

Root, D.H., Hoffman, A.F., Good, C.H., Zhang, S., Gigante, E., Lupica, C.R., and Morales, M. (2015). Norepinephrine Activates Dopamine D4 Receptors in the Rat Lateral Habenula. *J. Neurosci.* 35, 3460–3469.

Rose, M. (2004). The Relevance of the Nature of Learned Associations for the Differentiation of Human Memory Systems. *Learn. Mem.* 11, 145–152.

Rosenbaum, D.M., Rasmussen, S.G.F., and Kobilka, B.K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356–363.

Rosenkranz, J.A., and Grace, A.A. (2001). Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 4090–4103.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., and Cammarota, M. (2009). Dopamine Controls Persistence of Long-Term Memory Storage. *Science* 325, 1017–1020.

Roth, B.L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694.

Rothwell, J.C. (2011). THE MOTOR FUNCTIONS OF THE BASAL GANGLIA. *J. Integr. Neurosci.* 10, 303–315.

Rowe, J.B., Toni, I., Josephs, O., Frackowiak, R.S., and Passingham, R.E. (2000). The prefrontal cortex: response selection or maintenance within working memory? *Science* 288, 1656–1660.

Rowland, D.C., Roudi, Y., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2016). Ten Years of Grid Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 39, 19–40.

Rudy, J.W., Stadler-Morris, S., and Albert, P. (1987). Ontogeny of spatial navigation behaviors in the rat: dissociation of “proximal”- and “distal”-cue-based behaviors. *Behav. Neurosci.* 101, 62–73.

Bibliographie

S

Sachs, B.D., Ni, J.R., and Caron, M.G. (2015). Brain 5-HT deficiency increases stress vulnerability and impairs antidepressant responses following psychosocial stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 2557–2562.

Sakaguchi, M., and Hayashi, Y. (2012). Catching the engram: strategies to examine the memory trace. *Mol. Brain* 5, 32.

Sakhi, K., Belle, M.D.C., Gossan, N., Delagrangé, P., and Piggins, H.D. (2014a). Daily variation in the electrophysiological activity of mouse medial habenula neurones. *J. Physiol.* 592, 587–603.

Sakhi, K., Wegner, S., Belle, M.D.C., Howarth, M., Delagrangé, P., Brown, T.M., and Piggins, H.D. (2014b). Intrinsic and extrinsic cues regulate the daily profile of mouse lateral habenula neuronal activity. *J. Physiol.* 592, 5025–5045.

Salaberry, N.L., and Mendoza, J. (2016). Insights into the Role of the Habenular Circadian Clock in Addiction. *Front. Psychiatry* 6.

Salas, R., Baldwin, P., de Biasi, M., and Montague, P.R. (2010). BOLD Responses to Negative Reward Prediction Errors in Human Habenula. *Front. Hum. Neurosci.* 4, 36.

Sanders, D., Simkiss, D., Braddy, D., Baccus, S., Morton, T., Cannady, R., Weaver, N., Rose, J.E., and Levin, E.D. (2010). Nicotinic receptors in the habenula: importance for memory. *Neuroscience* 166, 386–390.

Sandyk, R. (1992). Pineal and habenula calcification in schizophrenia. *Int. J. Neurosci.* 67, 19–30.

Saria, A., and Lundberg, J.M. (1983). Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J. Neurosci. Methods* 8, 41–49.

Sartorius, A., Kiening, K.L., Kirsch, P., von Gall, C.C., Haberkorn, U., Unterberg, A.W., Henn, F.A., and Meyer-Lindenberg, A. (2010). Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biol. Psychiatry* 67, e9–e11.

Satoh, K., Staines, W.A., Atmadja, S., and Fibiger, H.C. (1983). Ultrastructural observations of the cholinergic neuron in the rat striatum as identified by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry. *Neuroscience* 10, 1121–1136.

Sawaguchi, T., and Goldman-Rakic, P.S. (1991). D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251, 947–950.

Schmid, L.C., Mittag, M., Poll, S., Steffen, J., Wagner, J., Geis, H.-R., Schwarz, I., Schmidt, B., Schwarz, M.K., Remy, S., et al. (2016). Dysfunction of Somatostatin-Positive Interneurons Associated with Memory Deficits in an Alzheimer's Disease Model. *Neuron* 92, 114–125.

Bibliographie

Schwabe, L. (2013). Stress and the engagement of multiple memory systems: Integration of animal and human studies: Engagement of Multiple Memory Systems after Stress. *Hippocampus* 23, 1035–1043.

Schwabe, L., Oitzl, M.S., Philippson, C., Richter, S., Bohringer, A., Wippich, W., and Schachinger, H. (2007). Stress modulates the use of spatial versus stimulus-response learning strategies in humans. *Learn. Mem.* 14, 109–116.

Schwarz, L.A., Miyamichi, K., Gao, X.J., Beier, K.T., Weissbourd, B., DeLoach, K.E., Ren, J., Ibanes, S., Malenka, R.C., Kremer, E.J., et al. (2015). Viral-genetic tracing of the input–output organization of a central noradrenaline circuit. *Nature* 524, 88–92.

Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.

Segal, M. (1975). Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. *Brain Res.* 94, 115–131.

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

Semm, P., and Demaine, C. (1984). Electrophysiology of the pigeon's habenular nuclei: evidence for pineal connections and input from the visual system. *Brain Res. Bull.* 12, 115–121.

Shabel, S.J., Proulx, C.D., Trias, A., Murphy, R.T., and Malinow, R. (2012). Input to the Lateral Habenula from the Basal Ganglia Is Excitatory, Aversive, and Suppressed by Serotonin. *Neuron* 74, 475–481.

Shabel, S.J., Proulx, C.D., Piriz, J., and Malinow, R. (2014). GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment. *Science* 345, 1494–1498.

Shadmehr, R., and Holcomb, H.H. (1997). Neural correlates of motor memory consolidation. *Science* 277, 821–825.

Shepard, P.D., Holcomb, H.H., and Gold, J.M. (2005). Schizophrenia in Translation: The Presence of Absence: Habenular Regulation of Dopamine Neurons and the Encoding of Negative Outcomes. *Schizophr. Bull.* 32, 417–421.

Shinoda, K., Inagaki, S., Shiosaka, S., Kohno, J., and Tohyama, M. (1984). Experimental immunohistochemical studies on the substance P neuron system in the lateral habenular nucleus of the rat: distribution and origins. *J. Comp. Neurol.* 222, 578–588.

Shumake, J., Ilango, A., Scheich, H., Wetzel, W., and Ohl, F.W. (2010). Differential Neuromodulation of Acquisition and Retrieval of Avoidance Learning by the Lateral Habenula and Ventral Tegmental Area. *J. Neurosci.* 30, 5876–5883.

Siegel, J.M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437, 1264–1271.

Bibliographie

Simon, P., Dupuis, R., and Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav. Brain Res.* 61, 59–64.

Somogyi, P., and Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* 562, 9–26.

Sourani, D., Eitan, R., Gordon, N., and Goelman, G. (2012). The habenula couples the dopaminergic and the serotonergic systems: application to depression in Parkinson's disease: Habenula couples dopamine and serotonin systems. *Eur. J. Neurosci.* 36, 2822–2829.

de Sousa Almeida, S., Garcia, R.A., and de Oliveira, L.M. (2016). EFFECTS OF EARLY PROTEIN MALNUTRITION AND REPEATED TESTING UPON LOCOMOTOR AND EXPLORATORY BEHAVIORS IN THE ELEVATED PLUS-MAZE. *Rev. Bras. Análise Comportamento* 10.

Spellman, T., Rigotti, M., Ahmari, S.E., Fusi, S., Gogos, J.A., and Gordon, J.A. (2015). Hippocampal–prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature* 522, 309–314.

Squire, L.R. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron* 61, 6–9.

Squire, L.R., and Zola-Morgan, S. (1991). The Medial Temporal. *Science* 253, 5026.

Squire, L.R., and Zola-Morgan, S. (1991). The Medial Temporal. *Science* 253, 5026.

Squire, L.R., Clark, R.E., and Knowlton, B.J. (2001). Retrograde amnesia. *Hippocampus* 11, 50–55.

St. Onge, J.R., Stopper, C.M., Zahm, D.S., and Floresco, S.B. (2012). Separate Prefrontal-Subcortical Circuits Mediate Different Components of Risk-Based Decision Making. *J. Neurosci.* 32, 2886–2899.

Stamatakis, A.M., and Stuber, G.D. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat. Neurosci.* 15, 1105–1107.

Stamatakis, A.M., Jennings, J.H., Ung, R.L., Blair, G.A., Weinberg, R.J., Neve, R.L., Boyce, F., Mattis, J., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., et al. (2013). A Unique Population of Ventral Tegmental Area Neurons Inhibits the Lateral Habenula to Promote Reward. *Neuron* 80, 1039–1053.

Stanhope, K.J., McLenachan, A.P., and Dourish, C.T. (1995). Dissociation between cognitive and motor/motivational deficits in the delayed matching to position test: effects of scopolamine, 8-OH-DPAT and EAA antagonists. *Psychopharmacology (Berl.)* 122, 268–280.

Stefanelli, T., Bertollini, C., Lüscher, C., Müller, D., and Mendez, P. (2016). Hippocampal Somatostatin Interneurons Control the Size of Neuronal Memory Ensembles. *Neuron* 89, 1074–1085.

Bibliographie

Stephenson-Jones, M., Yu, K., Ahrens, S., Tucciarone, J.M., van Huijstee, A.N., Mejia, L.A., Penzo, M.A., Tai, L.-H., Wilbrecht, L., and Li, B. (2016). A basal ganglia circuit for evaluating action outcomes. *Nature*.

Stopper, C.M., and Floresco, S.B. (2013). What's better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat. Neurosci.* 17, 33–35.

Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., and Moser, E.I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 655–669.

Sutherland, R.J. (1982). The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 6, 1–13.

Sutherland, G.R., and McNaughton, B. (2000). Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 180–186.

T

Takehara, K., Kawahara, S., and Kirino, Y. (2003). Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J. Neurosci.* 23, 9897–9905.

Takeuchi, T., Duzskiewicz, A.J., and Morris, R.G.M. (2013). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130288–20130288.

Tavakoli-Nezhad, M., and Schwartz, W.J. (2005). c-Fos expression in the brains of behaviorally “split” hamsters in constant light: calling attention to a dorsolateral region of the suprachiasmatic nucleus and the medial division of the lateral habenula. *J. Biol. Rhythms* 20, 419–429.

Tenenbaum, L., Chtarto, A., Lehtonen, E., Velu, T., Brotchi, J., and Levivier, M. (2004). Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *J. Gene Med.* 6, S212–S222.

Teng, E., and Squire, L.R. (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400, 675–677.

Thornton, E.W., Evans, J.A., and Harris, C. (1985). Attenuated response to nomifensine in rats during a swim test following lesion of the habenula complex. *Psychopharmacology (Berl.)* 87, 81–85.

Thornton, E.W., Murray, M., Connors-Eckenrode, T., and Haun, F. (1994). Dissociation of behavioral changes in rats resulting from lesions of the habenula versus fasciculus retroflexus and their possible anatomical substrates. *Behav. Neurosci.* 108, 1150–1162.

Bibliographie

- Tolman, E.C. (1948). Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.* *55*, 189.
- Tomaiuolo, M., Gonzalez, C., Medina, J.H., and Piriz, J. (2014). Lateral Habenula determines long-term storage of aversive memories. *Front. Behav. Neurosci.* *8*.
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., and Redondo, R. (2015). Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron* *87*, 918–931.
- Topic, B., Dere, E., Schulz, D., de Souza Silva, M.A., Jocham, G., Kart, E., and Huston, J.P. (2005). Aged and Adult Rats Compared in Acquisition and Extinction of Escape From the Water Maze: Focus on Individual Differences. *Behav. Neurosci.* *119*, 127–144.
- Towne, C., Schneider, B.L., Kieran, D., Redmond, D.E., and Aebischer, P. (2010). Efficient transduction of non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV serotype 6. *Gene Ther.* *17*, 141–146.
- Treit, D., and Fundytus, M. (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *31*, 959–962.
- Treit, D., Menard, J., and Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *44*, 463–469.
- Trugman, J.M., and Wooten, G.F. (1986). The effects of L-DOPA on regional cerebral glucose utilization in rats with unilateral lesions of the substantia nigra. *Brain Res.* *379*, 264–274.
- Tse, D., Langston, R.F., Kakeyama, M., Bethus, I., Spooner, P.A., Wood, E.R., Witter, M.P., and Morris, R.G.M. (2007). Schemas and memory consolidation. *Science* *316*, 76–82.
- Tse, D., Takeuchi, T., Kakeyama, M., Kajii, Y., Okuno, H., Tohyama, C., Bito, H., and Morris, R.G.M. (2011). Schema-Dependent Gene Activation and Memory Encoding in Neocortex. *Science* *333*, 891–895.
- Tulving, E. (2001). Episodic memory and common sense: how far apart? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *356*, 1505–1515.
- Tulving, E., and Markowitsch, H.J. (1998). Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* *8*, 198–204.
- Turner, D.L., Snyder, E.Y., and Cepko, C.L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* *4*, 833–845.

Bibliographie

U

Urban, D.J., and Roth, B.L. (2015). DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *55*, 399–417.

Uylings, H.B.M., Groenewegen, H.J., and Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* *146*, 3–17.

V

Valentinova, K., and Mameli, M. (2016). mGluR-LTD at Excitatory and Inhibitory Synapses in the Lateral Habenula Tunes Neuronal Output. *Cell Rep.* *16*, 2298–2307.

Van der Werf, Y.D., Jolles, J., Witter, M.P., and Uylings, H.B.M. (2003). Contributions of thalamic nuclei to declarative memory functioning. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* *39*, 1047–1062.

Vanderschuren, L.J.M.J., Achterberg, E.J.M., and Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.*

van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., and Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 272–282.

Vardy, E., Robinson, J.E., Li, C., Olsen, R.H.J., DiBerto, J.F., Giguere, P.M., Sassano, F.M., Huang, X.-P., Zhu, H., Urban, D.J., et al. (2015). A New DREADD Facilitates the Multiplexed Chemogenetic Interrogation of Behavior. *Neuron* *86*, 936–946.

Velasquez, K.M., Molfese, D.L., and Salas, R. (2014). The role of the habenula in drug addiction. *Front. Hum. Neurosci.* *8*.

Vertes, R.P., Fortin, W.J., and Crane, A.M. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* *407*, 555–582.

Villalón, A., Sepúlveda, M., Guerrero, N., Meynard, M.M., Palma, K., and Concha, M.L. (2012). Evolutionary Plasticity of Habenular Asymmetry with a Conserved Efferent Connectivity Pattern. *PLoS ONE* *7*, e35329.

Vorhees, C.V., and Williams, M.T. (2014). Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents. *ILAR J.* *55*, 310–332.

W

Wagner, F., Stroh, T., and Veh, R.W. (2014). Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria: Subnuclear organization of the mouse habenula. *J. Comp. Neurol.* 522, 2650–2662.

Wagner, F., Bernard, R., Derst, C., French, L., and Veh, R.W. (2016). Microarray analysis of transcripts with elevated expressions in the rat medial or lateral habenula suggest fast GABAergic excitation in the medial habenula and habenular involvement in the regulation of feeding and energy balance. *Brain Struct. Funct.*

Walf, A.A., and Frye, C.A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2, 322–328.

Walsh, R.N., and Cummins, R.A. (1976). The open-field test: A critical review. *Psychol. Bull.* 83, 482.

Wamsley, E.J. (2014). Dreaming and Offline Memory Consolidation. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 14.

Wang, H., and Peng, R.-Y. (2016). Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Mil. Med. Res.* 3.

Wang, R.Y., and Aghajanian, G.K. (1977). Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe. *Science* 197, 89–91.

Wang, D.-G., Gong, N., Luo, B., and Xu, T.-L. (2006). Absence of GABA type A signaling in adult medial habenular neurons. *Neuroscience* 141, 133–141.

Wang, J., Bast, T., Wang, Y.-C., and Zhang, W.-N. (2015). Hippocampus and two-way active avoidance conditioning: Contrasting effects of cytotoxic lesion and temporary inactivation: HIPPOCAMPUS AND TWO-WAY ACTIVE AVOIDANCE CONDITIONING. *Hippocampus* 25, 1517–1531.

Wang, S.-H., Tse, D., and Morris, R.G.M. (2012). Anterior cingulate cortex in schema assimilation and expression. *Learn. Mem.* 19, 315–318.

Wang, Z., Wang, L., Yamamoto, R., Sugai, T., and Kato, N. (2013). Role of the lateral habenula in shaping context-dependent locomotor activity during cognitive tasks: *NeuroReport* 24, 276–280.

Warburton, E.C., Harrison, A.A., Robbins, T.W., and Everitt, B.J. (1997). Contrasting effects of systemic and intracerebral infusions of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on spatial short-term working memory in rats. *Behav. Brain Res.* 84, 247–258.

Bibliographie

Weaver, D.R., Rivkees, S.A., and Reppert, S.M. (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 9, 2581–2590.

Weiss, T., and Veh, R.W. (2011). Morphological and electrophysiological characteristics of neurons within identified subnuclei of the lateral habenula in rat brain slices. *Neuroscience* 172, 74–93.

White, N.M., and McDonald, R.J. (2002). Multiple Parallel Memory Systems in the Brain of the Rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 77, 125–184.

White, N.M., Packard, M.G., and McDonald, R.J. (2013). Dissociation of memory systems: The story unfolds. *Behav. Neurosci.* 127, 813–834.

Winocur, G., Moscovitch, M., and Bontempi, B. (2010). Memory formation and long-term retention in humans and animals: Convergence towards a transformation account of hippocampal–neocortical interactions. *Neuropsychologia* 48, 2339–2356.

Winter, C., Vollmayr, B., Djodari-Irani, A., Klein, J., and Sartorius, A. (2011). Pharmacological inhibition of the lateral habenula improves depressive-like behavior in an animal model of treatment resistant depression. *Behav. Brain Res.* 216, 463–465.

Wirtshafter, D., Asin, K.E., and Pitzer, M.R. (1994). Dopamine agonists and stress produce different patterns of Fos-like immunoreactivity in the lateral habenula. *Brain Res.* 633, 21–26.

Wolff, M., Gibb, S.J., Cassel, J.-C., and Dalrymple-Alford, J.C. (2008). Anterior but not intralaminar thalamic nuclei support allocentric spatial memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 71–80.

Woodruff-Pak, D.S., and Disterhoft, J.F. (2008). Where is the trace in trace conditioning? *Trends Neurosci.* 31, 105–112.

Wooten, G.F., and Collins, R.C. (1981). Metabolic effects of unilateral lesion of the substantia nigra. *J. Neurosci.* 1, 285–291.

X

Xu, W., and Sudhof, T.C. (2013). A Neural Circuit for Memory Specificity and Generalization. *Science* 339, 1290–1295.

Xu, Y., Wang, L., Liu, Y., Yang, Y., Xue, X., and Wang, Z. (2016). GABAergic Interneurons are Required for Generation of Slow CA1 Oscillation in Rat Hippocampus. *Neurosci. Bull.* 32, 363–373.

Bibliographie

Y

Yañez, J., and Anadon, R. (1994). Afferent and efferent connections of the habenula in the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.): an experimental study. *J. Comp. Neurol.* *345*, 148–160.

Yañez, J., and Anadón, R. (1996). Afferent and efferent connections of the habenula in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): An indocarbocyanine dye (Dil) study. *J. Comp. Neurol.* *372*, 529–543.

Yasenkov, R., and Deboer, T. (2012). Circadian modulation of sleep in rodents. *Prog. Brain Res.* *199*, 203–218.

Yin, H.H., and Knowlton, B.J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 464–476.

Z

Zahm, D.S. (2006). The evolving theory of basal forebrain functional—anatomical “macrosystems.” *Neurosci. Biobehav. Rev.* *30*, 148–172.

Zanto, T.P., Rubens, M.T., Thangavel, A., and Gazzaley, A. (2011). Causal role of the prefrontal cortex in top-down modulation of visual processing and working memory. *Nat. Neurosci.* *14*, 656–661.

Zarrindast, M.R., Bakhsha, A., Rostami, P., and Shafaghi, B. (2002). Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* *16*, 313–319.

Zeidman, P., and Maguire, E.A. (2016). Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory. *Nat. Rev. Neurosci.* *17*, 173–182.

Zhang, R., and Oorschot, D.E. (2006). Total number of neurons in the habenular nuclei of the rat epithalamus: a stereological study. *J. Anat.* *208*, 577–585.

Zhang, J., Tan, L., Ren, Y., Liang, J., Lin, R., Feng, Q., Zhou, J., Hu, F., Ren, J., Wei, C., et al. (2016a). Presynaptic Excitation via GABAB Receptors in Habenula Cholinergic Neurons Regulates Fear Memory Expression. *Cell* *166*, 716–728.

Zhang, L., Hernández, V.S., Vázquez-Juárez, E., Chay, F.K., and Barrio, R.A. (2016b). Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? *Front. Neural Circuits* *10*.

Zhao, H., and Rusak, B. (2005). Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience* *132*, 519–528.

Zhao, Z., Xu, H., Liu, Y., Mu, L., Xiao, J., and Zhao, H. (2015). Diurnal Expression of the *Per2* Gene and Protein in the Lateral Habenular Nucleus. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 16740–16749.

Bibliographie

Zhu, H., and Roth, B.L. (2015). DREADD: A Chemogenetic GPCR Signaling Platform. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, pyu007-pyu007.

Zovkic, I.B., Guzman-Karlsson, M.C., and Sweatt, J.D. (2013). Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn. Mem.* 20, 61–74.

Implication de l'Habénula latérale dans les processus mnésiques chez le Rat

Résumé

Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier le rôle de l'habénula latérale (HbL) dans les processus mnésiques chez le Rat en utilisant une approche par inactivation réversible grâce à l'administration de muscimol ou de CNQX. Nous avons ainsi montré l'implication de l'HbL dans : i) les processus d'encodage et de rappel d'une mémoire spatiale en piscine de Morris ; ii) la mémoire de travail, comme relai potentiel d'informations en provenance du cortex préfrontal médian, dans un paradigme de non-appariement différé à la position en boîtes de conditionnement opérant; iii) la réponse émotionnelle, aux niveaux comportemental et physiologique, à une situation stressante. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'HbL est impliquée dans les processus « online » de gestion des informations sensorielles, et qu'elle participe à la prise en compte de l'aspect émotionnel d'une situation. Ces particularités en font un lien important potentiel entre gestion des émotions et cognition.

Mots-clés : Habénula latérale, cortex préfrontal médian, mémoire de référence spatiale, mémoire de travail, anxiété, stress, muscimol, CNQX.

Résumé en anglais

The main objective of this thesis was to investigate the role of the lateral habenula (LHb) in mnemonic processes in rats using reversible inactivations with muscimol or CNQX. We have shown the involvement of the LHb in : i) encoding and retrieval of spatial reference memory in the Morris water maze ; ii) working memory, as a potential relay of top-down information coming from the medial prefrontal cortex, in a delayed non-matching to position paradigm using operant chambers ; iii) the behavioral and physiological responses to stressful situations. Altogether, those results suggest that the LHb is involved in the « online » process of sensory information. They also suggest that it is involved in coping with particularly stressful situations, and further position the LHb as an interface between emotions and cognition.

Keywords : lateral habenula, medial prefrontal cortex, spatial memory, working memory, anxiety, stress, muscimol, CNQX.