



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Jessica REMAUD

le jeudi 23 octobre 2014

Titre :

Étude de la plasticité synaptique hippocampique
induite par un apprentissage contextuel

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Neurosciences

Unité de recherche :

Centre de Recherches sur la Cognition Animale (UMR 5169)

Directeur(s) de Thèse :

Bernard FRANCES - Lionel DAHAN

Jury :

Valérie DOYERE : Rapportrice et présidente du jury

Paul SALIN : Rapporteur

Bruno TRUCHET : Examineur

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accueillie au CRCA. Tout d'abord merci à **Martin Giurfa**, qui, après avoir reçu des mails insistants de ma part, a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et me présenter à l'équipe « souris ». Merci à **Jean-Michel Lassalle** et **John Ceccom**, qui m'ont tout de suite mis dans le bain et donné envie de venir faire mon stage au labo. Merci à **Claire Rampon** de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir répondu présente tout au long de ces 5 années quand j'ai eu besoin d'elle. Merci à **Hélène Halley** et **Stéphane Pech** pour leur gestion « à la carte » des souris et pour toutes ces discussions autour d'un café/clope qui « sortent du cadre purement scientifique de la thèse ».

Je souhaite adresser un très grand merci aux membres de mon jury. Merci à **Valérie Doyère** d'avoir corrigé mon manuscrit d'un œil critique et constructif. Cela m'a permis de retravailler sérieusement de nombreux points qui avaient été bâclés. Merci également d'avoir accepté d'être présente le jour de la soutenance et d'être nommée présidente du jury à la dernière minute ! Merci à **Paul Salin** d'avoir partagé avec autant d'ouverture d'esprit sa maîtrise du sujet et sa culture scientifique, que ce soit dans son rapport écrit ou à l'oral lors de la soutenance. Merci à **Bruno Truchet** d'avoir accepté d'être présent le jour de ma soutenance et de m'avoir aidé (un peu) à me détendre, en discutant de neurosciences mais aussi de la vie en dehors des sciences, avant l'heure fatidique. Merci aussi pour les bouquins, je suis loin d'avoir fini de les lire ! Merci encore à vous trois, la rédaction du manuscrit était difficile, mais vous m'avez permis de garder un magnifique souvenir de la thèse à travers cette journée de soutenance.

Un merci tout spécial à **Fanny Roumier** et **Emilie Dia**. Sans votre travail acharné, une grande partie de ce manuscrit aurait un goût d'inachevé. On a beaucoup fait la comparaison de la vie de labo et de la vie de famille. On a beaucoup réfléchi à la thèse comme une allégorie de l'adolescence où les encadrants seraient les parents. Tout est dit, vous avez été comme des petites sœurs pour moi. Toujours à trainer dans mes pattes, à demander des conseils, à se serrer les coudes, à grandir super vite. Qu'est-ce qu'on a pu se marrer, quand même ! Merci pour tout, pour vos sourires, pour votre boulot, pour les pauses café/thé, pour votre humanité.

Il est donc temps de remercier mes « papas de thèse » qui m'ont aidé, chacun dans leur domaine et à leur manière. Merci à **Bernard Francés** pour m'avoir soutenu dans tout ce qui n'avait rien à voir avec l'électrophysiologie, y compris mon inscription en M1 : les

questions de pharmacologie, les enseignements, la préparation des oraux et du concours, les questions administratives, etc... Merci d'avoir été présent quand il le fallait, avec le sourire et la chaleur de l'accent du Sud-Ouest. Un grand merci à **Lionel Dahan**, pour m'avoir supportée (dans tous les sens du terme) pendant ces 5 années. Merci pour m'avoir permis d'être ta première étudiante en thèse. Merci pour tout ce que tu m'as appris, le débogage d'un poste d'électrophysio, la gestion de projet, la pédagogie, les stats, les présentations orales, et j'en passe... Merci aussi à ta **grand-mère** de penser à tout le monde à chaque fois qu'elle cuisine. Merci pour les heures passées à me raconter des anecdotes (parfois tu radotes, fais gaffe...), et pour celles passées à bosser alors que tout le monde dort. Merci de m'avoir accueillie dans ce projet, d'y avoir apporté ta touche de pédagogie, d'humour et d'humanité, de n'avoir pas lâché l'affaire malgré l'ampleur du défi, d'avoir su nous transmettre cette manière de travailler à moi ainsi qu'aux autres étudiants.

Un grand merci également à tous les chercheurs et étudiants de l'équipe MPV présents ou passés qui ont créé une atmosphère de labo chaleureuse et vivante. Je pense tout particulièrement à **Cédric, Laure** et **Bruno** qui ont apporté un nouveau souffle à l'équipe. Je pense aussi à **Charlotte, Kevin, Petnoi** et **Alice** pour les discussions sans fin notamment sur « quoi faire après la thèse ? ». Je pense également à **Nico, Falek, Khaoula, Trinovita, Hélène, Aïcha, Cécile, Marie, Antoine**, ainsi qu'aux plus jeunes : **Benjamin, Cindy, Vanessa, Jean-Arnaud**. Je ne vais pas citer tout le monde, mais je remercie tous les étudiants et chercheurs des autres équipes pour le plaisir que j'ai pu avoir à collaborer ou simplement discuter avec eux. Merci notamment à **Jean-Marc Devaud** et **Cathy Armengaud** pour leur soutien et conseils en ce qui concerne l'enseignement. Merci également aux ITA que je n'ai pas encore cités, notamment **Patrick Arrufat, Stéphane Ferrer, Maud Combe** et **Alix Gabrielli** pour leur travail efficace et dans la bonne humeur. Je tiens à remercier également **Valentina Castagnola, Emeline Descamps**, ainsi que l'équipe d'**Emmanuel Valjent**, c'était un plaisir de partager un bout de chemin avec vous.

Pour finir, il me tient à cœur de remercier **maman, papa, Blandine, Sylvain, Lisa** (tricheuse, arrivée en cours de route), **Manu**. Merci **mamie**, merci tous les **Bretonne/Remaud**, vous avez été une vraie bouffée d'oxygène dans ce chapitre de ma vie. Merci à la **famille Jeziorski**, ma famille d'ici. Un grand merci aux amis de là-bas (**Coralie, Mélissa C., Nadoue, Elodie, Gwen, Mélissa B., Laurie**) et à ceux rencontrés ici (**Emilie, Béa, Nath, Mag, Pow, Yas, Camille, Vio, Kro, Antoine, Max, Gagou, Chris, les musiciens de la Grange Magnétique, Rodolphe, Elsa et Etienne**). Merci enfin à **Céline**, tu as su m'épauler et me faire sortir la tête du guidon, ta présence quotidienne compte plus que tout, merci.

Sommaire

Introduction générale-----	7
Mémoire et apprentissage -----	7
Les théories de l'apprentissage -----	7
Le behaviorisme -----	7
Le cognitivisme-----	10
La mémoire, des mémoires-----	11
Différentes catégories de mémoires -----	13
La mémoire épisodique -----	15
La consolidation de la mémoire, du court terme vers le long terme -----	20
L'hippocampe et ses structures connexes -----	26
Description anatomo-fonctionnelle -----	26
Implication dans les mécanismes de la mémorisation-----	28
La plasticité synaptique-----	29
La potentialisation à long terme (LTP)-----	29
Mécanismes de la LTP artificielle-----	30
La dépression à long terme (LTD)-----	36
Les plasticités hétérosynaptiques -----	38
La LTP, support de la mémoire ? -----	39
Des mécanismes communs-----	39
Les plasticités synaptiques induites par l'apprentissage-----	40
Problématiques de la thèse-----	44
Chapitre 1 : Etude de l'implication de la synthèse protéique dans CA3 dans la consolidation de la mémoire contextuelle-----	45
Introduction -----	45

Matériels et méthodes -----	50
Animaux -----	50
Chirurgie -----	50
Dispositif comportemental -----	51
Procédures comportementales -----	52
Procédure d'injection -----	54
Traitement des données -----	54
Contrôle histologique -----	55
Résultats -----	56
Expérience 1 : La synthèse protéique est nécessaire dans CA1 pour former la mémoire à long terme d'un contexte -----	56
Expérience 2 : La synthèse protéique est nécessaire dans CA3 pour former la mémoire à court et à long terme d'un contexte -----	58
Discussion -----	60
Chapitre 2 : Etude de la LTP induite dans la région CA1 par un apprentissage contextuel -----	66
Introduction -----	67
Matériels et méthodes -----	69
Animaux -----	69
Procédures générales -----	69
Fabrication des électrodes -----	71
Chirurgie -----	72
Dispositif d'électrophysiologie -----	73
Procédures comportementales -----	74
Protocole d'induction de LTP « artificielle » -----	75
Traitement des données -----	75
Pharmacologie -----	76
Histologie -----	77
Résultats et discussion -----	78

Expérience 1 : Le conditionnement de peur au contexte induit une potentialisation à long terme dans CA1-----	78
Expérience 2 : L'exposition à la nouveauté contextuelle suffit à induire une potentialisation à long terme dans CA1-----	91
Expérience 3 : Etude pharmacologique de la LTP induite par l'apprentissage -----	97
Conclusion-----	106
Discussion générale-----	107
Références bibliographiques-----	118
Annexes -----	142
Annexe 1 : Des enregistrements multiples pour observer la répartition de la plasticité induite dans CA1 par le CFC -----	143
Annexe 2 : Cartographie des LTP dans CA1-----	146
Annexe 3 : L'électrophysiologie "pour les nuls" -----	151
Annexe 4 : Programme Spike2 pour analyser les rythmes et fEPSPs -----	159
Publication 1 : Anisomycin injection in area CA3 of the hippocampus impairs both short-term and long-term memories of contextual fear -----	165
Publication 2 : Parylene-based flexible neural probes with PEDOT coated surface for brain stimulation and recording -----	170
Publication 3 : Early onset of hypersynchronous network activity and expression of a marker of chronic seizures in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease -----	191

Introduction générale

Mémoire et apprentissage

Les théories de l'apprentissage

Selon le dictionnaire Larousse, la mémoire est une « activité biologique et psychique qui permet d'emmagasiner, de conserver et de restituer des informations ». Cette définition reflète l'existence de trois étapes clés de la formation de la mémoire : l'encodage, la consolidation et le rappel. Le concept de mémoire est donc étroitement lié au processus d'apprentissage. Une question fondamentale continue de se poser malgré la robustesse des connaissances actuelles en neurosciences : comment un individu peut-il apprendre et comment se forme la mémoire de cet apprentissage ? Pour répondre à cette question, plusieurs théories sont apparues au cours du siècle dernier, à l'origine de deux grands courants de pensée opposés. Basés sur l'observation et/ou l'expérimentation, ces mouvements ont fortement contribué à l'essor des neurosciences et de la psychologie.

Le behaviorisme

L'un des pionniers en matière d'étude de l'apprentissage est Ivan Pavlov. Ce médecin et physiologiste étudiait le système digestif chez le chien et notamment la salivation. En remarquant que le chien salivait parfois en l'absence de nourriture, il a décidé de mener une expérience pour tenter de comprendre ce qui provoquait cette salivation chez l'animal. Il a observé qu'en présentant plusieurs fois un stimulus neutre (son de cloche) au chien en même temps que la nourriture (stimulus qui déclenche la salivation), l'animal présentait ensuite une réaction de salivation lorsqu'il entendait le son de cloche sans présentation de nourriture. Cette expérience, où un stimulus inconditionnel (nourriture) est associé à un stimulus conditionnel (son de cloche) pour conditionner une réponse comportementale (salivation), a été par la suite appelée « conditionnement classique ou Pavlovien ». Les travaux de Pavlov marquent le début de la théorie behavioriste selon laquelle le comportement d'un être vivant est déterminé par son environnement.

Cette théorie et ses principes sont réellement formulés par John Watson au début du XX^e siècle. Reprenant l'idée du conditionnement de Pavlov, Watson décide d'étudier en 1913 l'apprentissage chez un bébé (c'est l'expérience du « petit Albert »). Pour cela, il présente un rat à l'enfant, et produit un son violent et effrayant dès qu'Albert touche l'animal. Albert ne présente pas une peur innée du rongeur mais après plusieurs essais, la vue du rat seule suffit à effrayer le bambin. Par cette expérience, Watson prouve que le conditionnement classique est aussi observable chez l'être humain. Il montre également pour la première fois que la peur conditionnée peut être généralisée (dans ce cas, à d'autres animaux). Selon Watson, l'apprentissage résulte de l'association de stimuli très simples et non d'une introspection ou d'une conscience, en opposition aux idées des psychologues et philosophes de ce début de siècle.

Inspiré par les travaux de ces précurseurs, le psychologue américain Burrhus Skinner invente un nouveau type d'apprentissage : le conditionnement opérant. Par exemple, un rat affamé placé dans une cage peut apprendre à appuyer sur un levier pour recevoir de la nourriture (Figure 1). A la différence des conditionnements classiques où le sujet perçoit et associe passivement des stimuli, Skinner permet par ce procédé un apprentissage par l'action. Il démontre également l'important rôle du renforcement appétitif ou aversif dans l'apprentissage, comme le suggérait la « loi de l'effet » de Thorndike, selon laquelle le comportement est conditionné par ses conséquences.

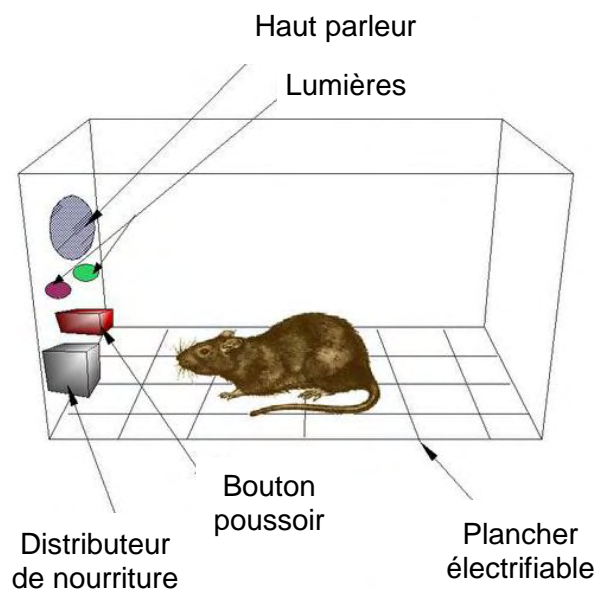


Figure1 : Représentation d'un rat dans une boîte de Skinner. Le dispositif présente un haut parleur et des lumières permettant de délivrer des stimuli conditionnels, un distributeur pour récompenser l'animal, un plancher électrifiable permettant le renforcement négatif, et un bouton poussoir sur lequel l'animal doit effectuer une pression dans le but d'être récompensé. Source : Wikipédia

Edward Tolman, partageant certaines idées behavioristes, semble plus modéré. Pour lui, le comportement n'est pas uniquement la conséquence de l'environnement, mais résulte également du but recherché par l'individu. Pour appuyer cette idée, il utilise une des expériences de Skinner en plaçant des rats dans un labyrinthe. Un groupe de rat bénéficie d'un apprentissage avec renforcement, c'est-à-dire comprenant une récompense à la sortie du labyrinthe, et un autre groupe doit sortir du labyrinthe sans renforcement à l'arrivée. Les animaux apprennent chaque jour par essai-erreur et ceux du groupe renforcé réussissent le parcours le 8^{ème} jour. Ceux du second groupe ne reçoivent de renforcement qu'à partir du 6^{ème} jour mais réussissent également le parcours au bout du 8^{ème} jour. Ce résultat montre que les animaux n'ont pas besoin du renforcement pour apprendre à se repérer dans le labyrinthe, le but de l'animal (sortir du labyrinthe) suffit à le motiver à trouver la sortie.

Le cognitivisme

Contrairement au behaviorisme, les théories cognitivistes qui émergent dans les années 1950 soulignent l'importance de la conscience, de l'introspection et des représentations mentales dans les processus cognitifs et mnésiques. En effet, le behaviorisme ne permet pas d'expliquer par exemple comment quelqu'un qui a entendu une histoire peut la raconter en utilisant d'autres mots que ceux entendus, même si les idées et la trame restent les mêmes.

Jean Piaget, psychologue Suisse connu notamment pour ses travaux sur les stades de développement chez l'enfant, a apporté un éclairage édifiant sur les théories de l'apprentissage, la pédagogie, et l'éducation. Son approche constructiviste s'inscrit dans le mouvement cognitiviste en mettant en valeur la reconstruction et l'interprétation qu'un individu fait de la réalité. Selon lui, les sens ne suffisent pas à apprendre, l'apprentissage se fait progressivement par l'assimilation, par l'intégration d'éléments nouveaux à des schémas préexistants.

Le cognitivisme est donc l'idée selon laquelle la connaissance doit être construite et reconstruite par l'apprenant pour pouvoir être intégrée et comprise. Cela souligne d'une part l'aspect extrêmement dynamique du processus d'apprentissage et donc la malléabilité de la mémoire à laquelle de nouvelles informations doivent être intégrées, et d'autre part le caractère actif de la démarche d'apprentissage.

Pour conclure, l'opposition de ces théories de l'apprentissage a permis un cheminement prolifique sur les questions de base de la construction d'une mémoire. Cependant, malgré le recours à des procédures comportementales robustes encore utilisées aujourd'hui, les mécanismes biologiques et les structures cérébrales qui supportent le maintien de la trace mnésique sur le long terme n'ont pas été explorés. Les apports de l'expérimentation animale (avec les outils développés par les behavioristes) et de l'étude de patients cérébro-lésés permettront par la suite de répondre à ces questions de manière plus concrète.

La mémoire, des mémoires

Les théoriciens de l'apprentissage, bien qu'admettant l'existence d'un lien entre la mémorisation et le cerveau, n'ont pas établi de relation entre l'anatomie du cerveau et sa fonctionnalité mnésique. Pourtant, dès le début des années 1800, des médecins ont eu l'intuition d'une relation entre les différentes régions cérébrales et certains traits de caractère. Ils pensent que les reliefs du crâne sont la conséquence de reliefs cérébraux sous-jacents, qui reflètent l'expression plus ou moins importante de certains traits de personnalité. Ces médecins pensent que « le crâne se moule sur le cerveau, et nullement le cerveau sur le crâne » et que « tant la surface externe que la surface interne du crâne offrent l'empreinte fidèle de la surface du cerveau, et deviennent par conséquent le moyen principal, non seulement pour découvrir les forces primitives de l'âme, mais encore pour déterminer le siège de leurs organes » (Gall, 1825). Cela marque les débuts de la phrénologie. Cette théorie fut abandonnée par la suite, mais l'idée d'une régionalisation des fonctions cérébrales est restée. Au milieu du XIXe siècle, des scientifiques tels que Paul Broca et Carl Wernicke, en étudiant des patients aphasiques, identifient certaines régions cérébrales (lésées chez ces patients) impliquées dans la parole.

Un siècle plus tard, le même principe méthodologique, c'est-à-dire l'étude d'un déficit induit par une lésion cérébrale permet l'identification d'une région cérébrale associée à la mémoire. Cette étude a été menée sur le patient épileptique Henry Gustav Molaison (patient H.M.) qui, souffrant d'épilepsie résistante aux traitements depuis son plus jeune âge, a subi à 27 ans une résection bilatérale des lobes temporaux où se trouvaient les foyers épileptogènes, par le chirurgien William Scoville (Figure 2). Bien que cette intervention ait permis une guérison de son épilepsie, le sujet H.M. développa une amnésie antérograde, ainsi qu'une amnésie rétrograde partielle affectant des souvenirs sur quelques années précédant la chirurgie (Scoville et Milner, 1957).

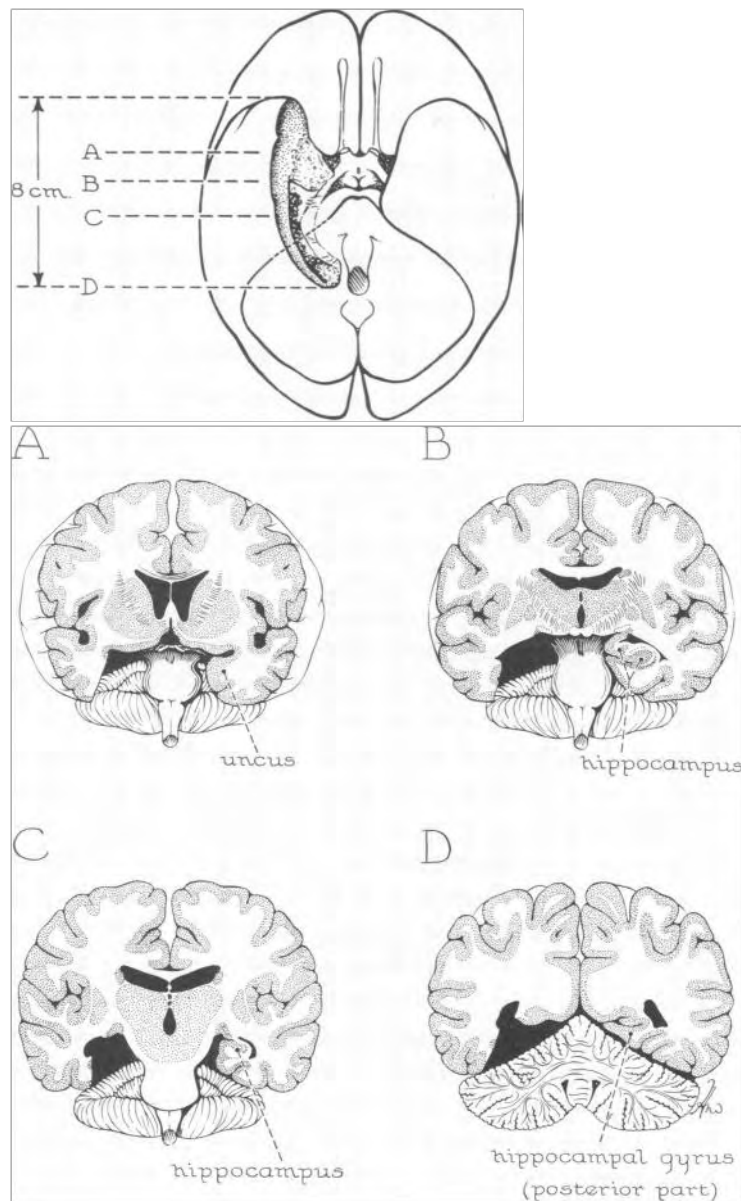


Figure 2 : Schéma d'une résection unilatérale gauche du lobe temporal médian. La zone retirée est représentée en noir sur les vues transversales. Chez le sujet HM, cette résection est effectuée de manière bilatérale. D'après Scoville et Milner, 1957.

En dehors de ses problèmes de mémoire, les facultés perceptives et intellectuelles de H.M. sont intactes. Henry Molaison, en acceptant d'être un sujet de recherches, a permis un grand nombre d'études ultérieures sur la mémoire. Il a notamment été montré que sa mémoire procédurale, c'est-à-dire sa mémoire des savoir-faire, était intacte et qu'il était également capable de former de nouveaux souvenirs de ce type, même sans en avoir conscience (Corkin, 1968). Cela a mené les scientifiques à considérer que la mémoire n'est pas une entité diffuse dans le cerveau mais qu'il existe un système de mémoire à part entière dissociable des « mémoires perceptuelles », que différents types de mémoire existent et qu'ils sont supportés par différentes régions cérébrales.

Différentes catégories de mémoire

Dans la seconde moitié du XXe siècle, les études menées auprès de patients amnésiques ont permis l'évolution du concept de mémoire. Par exemple, afin d'expliquer la dissociation entre la capacité d'apprentissages moteurs et l'impossibilité de se souvenir de cet apprentissage chez des patients cérébro-lésés, il a été suggéré que le lobe temporal médian serait impliqué dans la formation d'une mémoire explicite et qu'il existerait donc une mémoire implicite gérée par d'autres régions cérébrales (Cohen et Squire, 1980, Squire, 1986). La mémoire explicite repose sur le rappel conscient des informations, elle est donc également appelée mémoire déclarative. Au contraire, la mémoire implicite ne nécessite pas le rappel conscient des informations préalablement acquise, il s'agit d'une mémoire non déclarative.

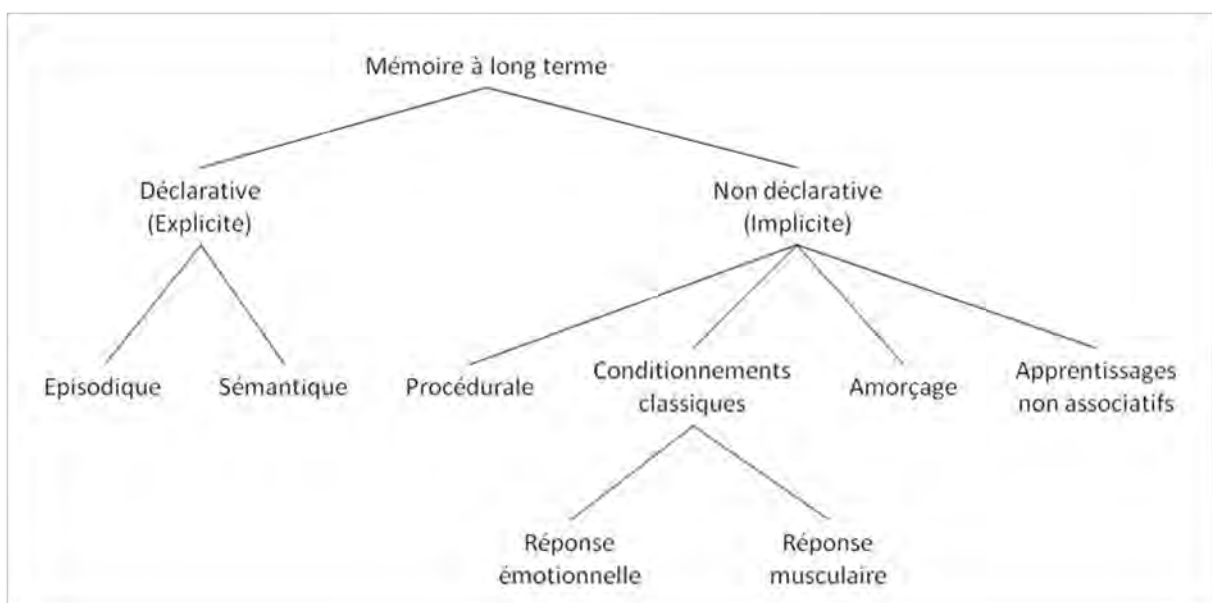


Figure 3 : Taxonomie de la mémoire à long terme, modifié d'après Squire, 2004.

Par la suite, il a été montré qu'au sein de chacun de ces deux systèmes de mémoire il existe plusieurs catégories, qui définissent de manière de plus en plus précise les différents systèmes de mémoire (Figure 3). Au sein de la mémoire déclarative, il existe par exemple une dichotomie entre la mémoire épisodique et la mémoire sémantique. La mémoire épisodique serait la mémoire des expériences personnelles et de leurs relations temporelles, alors que la mémoire sémantique serait celle de la signification des mots et des concepts ainsi que de la classification de concepts (Tulving, 1972). La mémoire épisodique serait donc autobiographique et appellerait le sujet à encoder, stocker, et récupérer des informations sur des faits personnellement vécus, avec le souvenir du contexte spatio-temporel, émotionnel et sensoriel d'apprentissage. Lors du rappel d'un souvenir épisodique, le sujet présente la capacité à « voyager mentalement dans l'espace et le temps ». Cette capacité est appelée « conscience auto-noétique » et reflète la possibilité pour l'Homme d'être conscient de son existence passée et de son existence future. Autrement dit, l'individu est conscient de sa propre identité dans un temps subjectif. Cet état propre à la mémoire épisodique est opposée à la conscience noétique, caractéristique de la mémoire sémantique (pour revue, Tulving, 2002).

Le schéma taxinomique présenté plus haut ne représente pas de manière absolue la classification des systèmes de mémoire, il en existe plusieurs car certaines de ces catégories se recouvrent, au moins en partie. Des souvenirs épisodiques peuvent perdre peu à peu leur caractère autobiographique et subir un processus de sémantisation au fil du temps. Par exemple, la mémoire épisodique que constitue la rencontre d'une nouvelle personne va devenir petit à petit un souvenir sémantique, il ne sera plus nécessaire de se remémorer cette rencontre pour se souvenir du prénom de cette personne. Cette évolution suggère une réinterprétation, une reconstruction dynamique des souvenirs au cours du temps, et contribue à l'élaboration et aux modifications de notre savoir et de nos connaissances. Par ailleurs, la mémoire sémantique permet une compréhension et une conceptualisation de nos événements autobiographiques. Ces deux types de mémoire interagissent donc, et cette interdépendance permet de structurer notre pensée, notre comportement, et finalement notre identité.

La mémoire épisodique

L'existence d'une conscience auto-néotique semble naturelle chez l'être humain. Elle est même fondamentale pour la construction de soi ainsi que pour la faculté d'anticipation. Il est en revanche difficile de pouvoir faire ce constat chez l'animal qui ne possède pas le langage articulé. En tout cas, si les animaux sont doués d'une mémoire déclarative, son rappel semble au premier abord compliqué d'accès. Si la mémoire épisodique est définie comme une expérience consciente, on ne peut la mettre en évidence chez l'animal car le rappel conscient d'informations mnésiques ne peut être démontré chez ce dernier. Cependant, si la mémoire épisodique est la mémoire qui permet de savoir « où, quand et qu'est-il arrivé ? », il est possible d'accéder à ce souvenir chez l'animal, par des approches indirectes (Griffiths *et al.*, 1999, Clayton *et al.*, 2001). La plupart des paradigmes comportementaux utilisés consiste en une association de stimuli multisensoriels que l'on pourra vérifier par le biais du comportement ultérieur des animaux (recherche de nourriture, comportement de peur, etc...).

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur le conditionnement de peur au contexte, chez la souris. Cet apprentissage consiste à placer l'animal dans un environnement neutre émotionnellement au départ, puis à délivrer des chocs électriques au niveau des pattes de la souris. Il y a alors une association entre ces chocs et l'environnement. Par la suite, l'animal craint ce contexte et éprouve de la peur lorsqu'il y est exposé, ce qui se manifeste par un comportement de freezing (absence de mouvement). Le conditionnement de peur au contexte peut être considéré comme un conditionnement classique (ne faisant pas intervenir la mémoire épisodique) car le freezing est une réponse automatique à la peur chez le rongeur, c'est-à-dire une réponse non volontaire. Cependant, cet apprentissage est plus complexe que les autres conditionnements classiques qui consistent en général à associer deux stimuli « simples » (par exemple un son de cloche et une récompense dans le conditionnement de Pavlov). Le contexte d'apprentissage est un environnement complexe constitué de nombreux stimuli multisensoriels (indices visuels, olfactifs, tactiles et auditifs). Il entraîne donc la formation d'un souvenir du « quoi ? » (le choc électrique) et du « où ? » (dans quel environnement). Même si le souvenir du « quand ? » est difficile à mettre en évidence, la mémoire de cet apprentissage est très proche de ce que l'on considère être une mémoire épisodique chez l'homme. Le comportement de peur déclenché par le contexte nécessite que l'animal se fasse une représentation du contexte. Ce processus cognitif est, comme la mémoire épisodique, dépendant de l'hippocampe. Ainsi, cet apprentissage contextuel est utilisé au sein de notre équipe de recherche pour étudier les substrats neurobiologiques de la mémoire épisodique.

Lorsqu'un animal a réalisé un apprentissage contextuel, il est en ensuite possible de mettre en évidence l'existence d'un souvenir lors d'un test de rappel qui consiste à placer l'animal dans le contexte d'apprentissage. Si le test de rappel est effectué dans une situation ambiguë par rapport à la situation d'apprentissage (par exemple, les indices sont les mêmes, excepté la couleur d'un mur qui est rouge au lieu d'être bleue), le rappel de l'information est rendue possible par la capacité de généralisation de l'animal. Plus la similitude est faible entre les deux contextes, moins il y a de généralisation. L'animal peut alors différencier le contexte d'apprentissage de celui du rappel, on parle de « séparation de motifs » ou de « pattern separation ». A l'inverse, si l'animal n'est réexposé qu'à une partie des indices de la situation d'apprentissage, l'ensemble du souvenir peut tout de même être rappelé, on parle cette fois-ci d'« achèvement de motifs » ou de « pattern completion » (Marr, 1971, McNaughton et Nadel, 1990). Des cellules particulières du cerveau permettraient de traiter la composante « où ? » de la mémoire épisodique chez l'animal. Ces neurones, situés dans la région hippocampique semblent s'activer en fonction d'une localisation spatiale précise de l'animal dans son environnement. Il s'agit des cellules de lieu et leur schéma d'activité, qui se met en place au fur et à mesure de l'exploration d'un nouvel environnement, semble pouvoir prédire l'exploration future de l'animal (Pfeiffer et Foster, 2013). Cette observation se rapproche de l'idée du voyage dans l'espace et le temps, elle reflète une certaine capacité d'anticipation des trajectoires futures prises par l'animal. Un autre point caractéristique de la mémoire épisodique est qu'elle nous paraît vraie. Autrement dit, le rappel d'un souvenir épisodique donne la sensation de revivre la scène telle qu'elle s'était passée à l'époque des faits. Or des données empiriques indiquent que les souvenirs autobiographiques, tout comme les autres souvenirs, sont en fait reconstruits par des processus actifs, sensibles aux erreurs systématiques induites par l'inattention, la suggestion, les attentes, ou des schémas cognitifs de familiarité (Schacter, 1999). Cette propriété fait de la mémoire quelque chose de fragile, de malléable. Récemment, il a été montré qu'il est possible de créer de faux souvenirs. Ces faux souvenirs sont tout de même basés sur l'existence d'une mémoire préalablement encodée. L'expérience, réalisée avec des souris, a consisté à exposer ces animaux à un choc électrique dans un contexte B, tout en activant les cellules du gyrus denté de l'hippocampe correspondant à un autre environnement exploré précédemment (contexte A) à l'aide d'outils optogénétiques. Les résultats montrent que les souris associent le contexte A au choc électrique, mais également le contexte B, tout en étant capables de différencier les deux. Cela signifie qu'il est possible de manipuler la mémoire lors de son acquisition (Ramirez *et al.*, 2013). Au vu de ces résultats, nous pouvons nous demander ce que provoque chez l'animal cette activation du réseau neuronal hippocampique du contexte A alors qu'il est en train d'explorer un contexte B. Plusieurs questions restent cependant en suspens, est-ce que cela provoque une vision du contexte A ?, une hallucination ?, une sorte

de rêve éveillé ?, ou bien une remémoration d'un souvenir chez l'animal ? Est-ce que les deux contextes fusionnent pour former une représentation contextuelle intermédiaire ? Les animaux ont-ils conscience de la supercherie ? Chez l'être humain, une étude a montré qu'il est possible d'induire de faux souvenirs d'enfance au travers de la présentation de photographies suffisamment en cohérence avec la réalité pour être intégrées à une mémoire d'épisodes anciens grâce à la capacité du cerveau de minimiser les dissonances cognitives (Wade *et al.*, 2002). Ces distorsions de la mémoire montrent que plutôt qu'un voyage mental dans le passé, la reviviscence des souvenirs serait une représentation reconstruite, sur la base de données fragmentaires qui s'assemblent entre elles de manière heuristique (Schacter, 1999, Conway *et al.*, 2000). A l'instar de son contenu, le contexte temporel de la mémoire épisodique est une inférence de notre cerveau (Friedman, 1993). En effet, les dates précises des événements rappelés ne sont généralement pas mémorisées (Friedman, 1993, 2001). Ainsi, le contenu, le lieu et le moment des événements rappelés ne sont pas reproduits ou rejoués mais reconstruits à partir des différents types d'informations, faisant notamment intervenir la mémoire sémantique.

Ces données suggèrent que l'expérience autoéotique du « voyage dans le temps » n'est en fait qu'une illusion, une caractéristique de la conscience analogue à l'illusion des contours générée par le système visuel et non pas une caractéristique centrale de la mémoire épisodique (Ferbinteanu *et al.*, 2006). Dans la mesure où la mémoire épisodique est « reconstructrice », ses caractéristiques cognitives peuvent être examinées indépendamment des processus qui génèrent l'expérience consciente et la description verbale qui peuvent accompagner le rappel chez l'Homme. Même si les animaux et les humains éprouvent différemment l'expérience de rappel, de nombreuses caractéristiques clefs de la mémoire des épisodes et leurs processus neuronaux et computationnels sont grandement préservés chez l'animal ; le cortex préfrontal et le lobe temporal médian requis pour la mémoire épisodique chez l'être humain, existent également chez les singes, chats, chiens, rongeurs avec une connectivité relativement préservée (Burwell *et al.*, 1995).

Par conséquent, si l'on veut utiliser des modèles animaux pour étudier les bases neuronales qui sous-tendent la mémoire épisodique, des caractéristiques cognitives et comportementales pertinentes doivent être traduites en définitions opérationnelles et implémentées dans des tâches comportementales appropriées (Ferbinteanu, 2006). Pour ce faire, Clayton et Dickinson ont proposé de redéfinir la mémoire épisodique non pas en termes phénoménologiques tel que l'envisageait Endel Tulving, mais grâce à des critères comportementaux reflétant le contenu, la structure et la flexibilité de cette mémoire, de manière indirecte. L'expérience la plus concluante qui illustre cette mémoire épisodique chez

l'animal, qualifiée de mémoire de type épisodique (« episodic-like » en anglais), est celle qui fut réalisée en utilisant les geais cacheurs. Ces oiseaux étaient entraînés à retrouver leur nourriture favorite (le « quoi »), dans une cachette particulière (le « où »), en fonction du moment où la nourriture avait été cachée (le « quand ») (Clayton et Dickinson, 1998). La réponse des animaux était donc flexible, non basée sur des effets de familiarité, et la mémoire pouvait être utilisée de manière rétrospective et prospective (Clayton et Dickinson, 1999, Emery et Clayton, 2001, Emery *et al.*, 2004, Clayton *et al.*, 2001, 2003, 2005). Grâce à cette expérience, les auteurs ont pu définir la règle des 3W (« what ?, where ?, when ? ») caractérisant la mémoire de type épisodique. De plus, ces données suggèrent que des mécanismes de base pour le rappel d'épisodes dans un contexte spatio-temporel existent chez les animaux de manière générale.

Depuis cette expérience pionnière, de nombreux chercheurs ont tenté d'adapter (avec plus ou moins de succès) ce type de tâche mnésique à d'autres modèles animaux en particulier aux rongeurs. Des expériences réalisées chez le rat ont montré que cet animal est capable lui aussi de mémoriser le lieu et le moment où a été dissimulée sa nourriture préférée. Il réalise cette tâche tout en tenant compte du contexte associé à l'élaboration du souvenir (Babb, 2006, Naqshbandi, 2007). Un tel encodage des différentes caractéristiques de l'événement préalablement vécu, en particulier de son contenu, de sa localisation spatiale, et des circonstances dans lesquelles il est intervenu, évoque bien sûr la mémoire épisodique chez l'Homme. Cependant, l'analyse de la composante temporelle montre que les rats n'utilisent pas la conscience auto-noétique mais plutôt d'autres mécanismes tels que des accumulateurs, des oscillateurs circadiens ou encore la force de la trace mnésique comme indices, non pas du « quand ? », mais du « depuis combien de temps ? » un lieu a été appâté ou non. La mémoire épisodique animale serait donc différente de celle des êtres humains, chez qui la reconstruction des expériences passées s'effectuerait avec une dimension temporelle absolue (Roberts *et al.*, 2008).

Cependant, entre les expériences de Clayton et Dickinson et celles de Roberts, d'autres chercheurs ont mis au point des paradigmes expérimentaux variés afin d'étudier la mémoire de type épisodique chez l'animal. Le développement de telles expériences suppose une grande inventivité de la part des auteurs, aussi bien au niveau des protocoles que des dispositifs utilisés. Certaines tâches se focalisent sur le contexte dans lequel l'apprentissage a lieu (Kim et Fanselow, 1992), d'autres sur la mémorisation de séquences d'événements (Fortin *et al.*, 2002), ou encore sur la mémoire spatiale dans un contexte temporel particulier (Chen *et al.*, 2000).

Toutefois, ces travaux ne présentent pas l'une des caractéristiques fondamentales de la mémoire épisodique telle qu'on la retrouve chez l'Homme, à savoir la possibilité de mémoriser durablement un événement survenu une seule fois dans la vie du sujet. Or, il existe de nombreux tests comportementaux permettant à l'animal d'acquiescer un apprentissage en un seul essai. C'est le cas par exemple d'une aversion alimentaire conditionnée, de certains apprentissages spatiaux (certains protocoles de labyrinthe aquatique par exemple), contextuels (par exemple le conditionnement de peur au contexte), des conditionnements associatifs. Ces protocoles d'apprentissage en un seul essai ont été largement utilisés dans l'étude de la mémoire en général (Steele et Morris, 1999), et de la mémoire épisodique en particulier (Clayton et Dickinson, 1998, Day *et al.*, 2003). Dans l'étude de Day et ses collaborateurs, l'information à mémoriser est unique à chaque essai. Des rats doivent associer l'arôme spécifique d'un aliment à une localisation précise dans un des puits d'une arène, en étant exposé une seule fois au dispositif. Lors du test, une des récompenses aromatisée apprise est placée dans l'arène et le comportement de recherche du rat est observé. Quel que soit le point de départ du rat dans cette arène, un essai est suffisant pour associer la localisation de la récompense à son arôme (la récompense est présentée au rat au point de départ, il doit ensuite rechercher le puits d'origine de la nourriture). Cependant, comme dans les autres travaux cités ci-dessus, ce paradigme ne remplit pas complètement la règle des 3W, il ne permet pas de tester la composante temporelle de la mémoire épisodique.

La majorité des travaux réalisés jusqu'à présent se base sur des tâches présentant des aspects de la mémoire de type épisodique comme des paradigmes expérimentaux dans lesquels on attend de l'animal qu'il mémorise des sous-ensembles de caractéristiques de cette mémoire de manière intégrée, flexible, et qu'il utilise ces informations à des fins prospectives et rétrospectives pour guider des réponses comportementales orientées vers un but (Ferbinteanu *et al.*, 2006). De tels protocoles comportementaux devraient mettre en jeu des réseaux neuronaux similaires à ceux requis pour former la mémoire épisodique chez l'Homme et, même s'ils ne remplissent pas complètement les critères de ce type de mémoire, ils peuvent tout de même fournir des données pertinentes pour l'étude des corrélats neuronaux de la mémoire de type épisodique.

Au-delà de l'aspect comportemental, ces expériences ont pu mettre en évidence l'implication de certaines structures cérébrales dans la formation de la mémoire de type épisodique chez le rongeur. C'est le cas de la formation hippocampique qui a été largement étudiée et décrite comme étant une structure impliquée dans la formation de la mémoire spatiale (O'Keefe et Nadel, 1978), mais aussi épisodique (Anagnostaras *et al.*, 2001, pour revue Burgess *et al.*, 2002). Cette structure cérébrale présente une grande conservation au cours de l'évolution des mammifères, ce qui amène un argument supplémentaire quant à l'existence d'une mémoire épisodique chez l'animal.

La consolidation de la mémoire, du court terme vers le long terme

La mémoire peut également être dissociée selon des critères temporels. Dès 1900, Muller et Pilzecker avaient mis en évidence deux types de mémoire chez l'Homme se différenciant par la durée de leur persistance, mais sans étudier le support cérébral de ces mémoires. L'apprentissage consistait à associer des syllabes sans signification par paires en les prononçant à voix haute et en accentuant une syllabe sur deux au sein d'une série. Les sujets étaient ensuite testés sur leur capacité à retrouver une syllabe lorsqu'on leur présentait l'autre. Ils devaient également témoigner de la confiance qu'ils avaient en leur réponse, et les expérimentateurs ont également essayé d'identifier la stratégie adoptée par chaque sujet pour retrouver la syllabe cachée. Dans une autre expérience, ils ont testé l'influence d'un autre apprentissage entre la première acquisition et le test de rappel. Lors de cette seconde acquisition, une partie des syllabes déjà mémorisées étaient associées à de nouvelles syllabes. Les auteurs ont ainsi pu montrer d'une part que le rappel peut se faire de manière multi sensorielle. En effet, certains sujets ont une image de la syllabe cachée en tête au moment du rappel, d'autres l'entendent, d'autres la prononcent comme si la mémoire était motrice (mouvements de la bouche), pour certains plusieurs de ces sens étaient activés en même temps. La mémoire peut donc faire intervenir plusieurs sens. D'autre part, ils ont pu montrer une diminution de la 1^{ère} association par la 2^{nde}, uniquement lorsque l'intervalle entre les deux apprentissages est suffisamment court (moins de 6min). Ils ont appelé ce phénomène « inhibition rétroactive ». Cette expérience montre qu'il existe une mémoire à court terme, fragile, qui peut être perturbée par l'arrivée de nouvelles informations juste après la période d'acquisition. Ensuite se forme une mémoire à long terme, ayant eu davantage de temps pour être consolidée, qui semble être insensible à ces interférences.

Cette dichotomie a depuis été étayée par de nombreux travaux de recherche, permettant une caractérisation de ces deux formes de mémoire liées par le processus de consolidation, du niveau phénotypique au niveau moléculaire. Le temps en lui-même n'est pas un bon indicateur de mémoire à court ou à long terme. En effet, chez l'Homme, on considère qu'un test effectué 1h après un apprentissage constitue déjà une mémoire à long terme alors que chez le rongeur, cela correspond à un test de mémoire à court terme. La mémoire à long terme est une mémoire consolidée. Cela signifie que, contrairement à la mémoire à court terme, elle est peu sensible aux interférences, aux effets de récence et de primauté, et induit des modifications structurales et fonctionnelles du réseau mis en jeu.

A partir de la seconde moitié du 20^{ème} siècle, les études comportementales menées sur des modèles animaux, notamment des rongeurs, se sont multipliées. Ainsi les mécanismes de la consolidation de la mémoire ont été très étudiés. Il est désormais admis que toutes les informations stockées en mémoire à court terme ne seront pas nécessairement intégrées à une mémoire à long terme. Il semble qu'il existe un tri des informations en fonction de leur pertinence sémantique ou émotionnelle. Ce tri, effectué au moins en partie durant le sommeil, permet de préserver les systèmes mnésiques d'une quantité d'informations superflues ou parasites. Par ailleurs, même des traces mnésiques stockées en mémoire à long terme peuvent subir un mécanisme d'oubli, s'estomper, ou perdre leur caractère autobiographique.

La plupart de ces études tend à montrer que la consolidation est un processus qui permet de faire passer la mémoire du court terme vers le long terme de manière sérielle. Autrement dit, s'il n'y a pas de mémoire à court terme, la formation de la mémoire à long terme est impossible. Cela suggère qu'il existe un continuum de l'information entre l'acquisition et l'ancrage d'une mémoire dans le long terme.

Chez les vertébrés, à ma connaissance seule une étude s'est approchée d'un résultat suggérant qu'il puisse y avoir une mémoire à long terme sans mémoire à court terme (Izquierdo *et al.*, 1998). Dans cet article, les auteurs utilisent un protocole d'évitement passif avec des rats. Les animaux sont placés sur une plateforme et reçoivent un choc électrique lorsqu'ils en descendent (phase d'acquisition). Leur mémoire est testée en les replaçant sur la plateforme soit 1h30 (mémoire à court terme) soit 24h (mémoire à long terme) après cet apprentissage, en mesurant la latence avant qu'ils ne descendent de la plateforme. Les auteurs injectent diverses drogues dans la région CA1 de l'hippocampe ou dans le cortex entorhinal immédiatement après l'apprentissage et observent leurs effets sur le rappel. Les résultats montrent un effet sur la mémoire à court terme sans affecter la mémoire à long terme, cependant le contrôle permettant de s'affranchir d'un effet sur le rappel en lui-même

n'est pas présenté dans la publication. Outre l'absence de ce contrôle, l'absence de reproductibilité des résultats par une autre équipe et la contradiction avec des résultats précédemment obtenus par la même équipe (Quillfeldt *et al.*, 1994) sont autant de raisons qui permettent d'affirmer qu'une mémoire à long terme se forme sans mémoire à court terme chez les vertébrés reste à prouver.

Bien qu'elle n'ait pas encore été démontrée chez le vertébré, l'existence d'une mémoire à long terme sans mémoire à court terme est possible chez les insectes (Trannoy *et al.*, 2011). De plus, il existe pour ces animaux une mémoire à long terme sensible aux inhibiteurs de la synthèse protéique et une mémoire à long terme qui ne l'est pas (Wittstock *et al.*, 1993, Wüstenberg *et al.*, 1998). Cela suggère que chez certains organismes les mémoires à long et à court terme présentent des mécanismes différents et se mettent en place en parallèle. Dès lors, nous pouvons nous interroger sur l'intérêt biologique ou évolutif de cette possibilité. Peut-être que cette faculté permet de limiter la perte de mémoire liée aux interférences.

La consolidation est un phénomène faisant intervenir des modifications aux niveaux synaptique et systémique (Redondo et Morris, 2011). D'une part, la consolidation synaptique (ou cellulaire) consiste en des changements morphologiques (ou plasticité) intervenant de manière précoce afin d'initier la stabilisation de la trace mnésique hippocampique. Elle correspondrait à des événements moléculaires ayant lieu dans les cellules de cette région particulière du cerveau. Il s'agit par exemple de changements de taille des épines dendritiques déjà présentes au sein du réseau neuronal, de la création de nouvelles épines, ou de la disparition de certaines épines, qui permettent de remanier les connexions entre les neurones dans les premières heures suivant un apprentissage. La consolidation synaptique est initiée par l'activité synaptique, c'est-à-dire par l'activation des récepteurs au glutamate (NMDA, AMPA et mGluR). Cette activation permet de déclencher une cascade de réactions intracellulaires post-synaptiques faisant intervenir des messagers secondaires et comprenant entre autres l'activation de kinases (PKA, PKC) et de phosphatases (PP1, PP2A, PP2B). Cela conduirait finalement à la synthèse de nouvelles protéines via des facteurs de transcription tels que CREB (Schafe *et al.*, 2001, Izquierdo et Medina, 1997). Ainsi, perturber l'un de ces mécanismes durant cette période, en utilisant par exemple des inhibiteurs de la synthèse protéique, ou bien des interférences rétroactives (ou inhibitions rétroactives, comme dans l'expérience de Muller et Pilzecker décrite plus haut), peut conduire à un défaut de consolidation, qui se traduira par un déficit mnésique.

D'autre part, la consolidation se ferait à un niveau systémique. Il existe deux théories de la consolidation systémique : celle du désengagement hippocampique et celle des traces multiples proposée par Nadel et Moscovitch en 1997. La première hypothèse correspondrait au transfert progressif de la trace mnésique de la région hippocampique vers les zones corticales supérieures puis vers le cortex préfrontal qui jouerait alors un rôle dans le désengagement hippocampique (Scoville et Milner, 1957, pour revue Frankland et Bontempi, 2005). En effet, il a été montré que l'hippocampe ne serait plus nécessaire au rappel mnésique à très long terme (Kim et Fanselow, 1992, Bontempi *et al.*, 1999). La seconde théorie est apparue plus récemment. A l'époque, les auteurs présentent une revue des cas d'amnésie rétrograde liée à une lésion hippocampique chez l'homme et l'animal (Nadel et Moscovitch, 1997). Ils montrent que le modèle classique de la consolidation (désengagement hippocampique au cours du temps) ne permet pas d'expliquer toutes les observations. Ils décrivent alors neuf processus constituant leur hypothèse selon laquelle l'hippocampe et le cortex frontal sont impliqués dans la rétention mnésique à très long terme. L'information spatiale serait stockée dans l'hippocampe alors que les repères temporels seraient stockés dans le cortex frontal. Ces deux structures interagiraient au cours de la consolidation pour aboutir à la formation de multiples traces mnésiques d'un épisode. Ainsi, le souvenir serait plus robuste et résistant aux lésions au cours du temps (voir aussi Squire *et al.*, 2004, Frankland *et al.*, 2006). Récemment, une étude faisant intervenir des techniques d'inactivation optogénétique de l'hippocampe a permis l'obtention de résultats réconciliant les deux théories. L'optogénétique est un outil qui permet non seulement de cibler une population neuronale mais aussi de stimuler ou inhiber ces neurones pendant un temps très bref (ce qui n'est pas le cas des approches pharmacologiques). Cet outil a été utilisé dans une expérience de blocage réversible de la région CA1 de l'hippocampe spécifiquement durant le rappel d'un conditionnement de peur au contexte. Les résultats montrent un déficit du rappel mnésique à très long terme, ce qui n'est pas le cas lors d'une inhibition prolongée (30min). Cela montre que l'hippocampe peut intervenir dans le rappel d'une mémoire à très long terme, mais qu'en cas d'inactivation prolongée d'autres structures peuvent prendre le relais (Goshen *et al.*, 2011).

Il est d'un intérêt majeur de comprendre les mécanismes de la consolidation, à la fois dans un but thérapeutique (pour ralentir les effets de la maladie d'Alzheimer sur la mémoire par exemple), mais également pour améliorer le quotidien de tous ceux qui aimeraient avoir un meilleur contrôle de leur mémorisation. La mémorisation nécessite un effort d'encodage, il ne suffit pas de considérer qu'une information est importante pour la retenir (que la vie d'étudiant serait belle si tel était le cas !). Cependant, certains facteurs tels que le sommeil, l'attention, l'organisation des informations favorisent leur intégration dans un réseau de connaissances préalables.

La répétition ou redondance des informations ou des événements peut également influencer la qualité de la mémorisation. Lorsqu'une trace mnésique déjà consolidée est réactivée, c'est-à-dire lors d'un rappel du souvenir, elle redevient labile et peut donc être modifiée (Misanin *et al.*, 1968, Przybyslawski et Sara, 1997, Rouillet et Sara, 1998). Par exemple, il a été montré chez le rat qu'une injection intracérébroventriculaire d'un antagoniste des récepteurs β -adrénergiques 1h après une réactivation mnésique provoque des déficits de mémoire spatiale (testée en labyrinthe radial) le lendemain de cette réactivation (Rouillet et Sara, 1998). De même, inhiber la synthèse protéique dans la région CA3 de l'hippocampe de souris juste après la réactivation d'une mémoire spatiale (piscine de Morris) entraîne un déficit mnésique 24h après la réactivation (Artinian *et al.*, 2007). Pour être à nouveau mémorisé sur le long terme après sa réactivation, le souvenir doit subir un processus de reconsolidation. La reconsolidation n'est pas simplement une nouvelle consolidation, bien que ces processus soient proches, certains de leurs mécanismes semblent différents (pour revue, Alberini, 2005). Il a par exemple été montré chez le rat que la reconsolidation d'un conditionnement de peur fait intervenir le gène immédiat précoce *zif268* au niveau de l'hippocampe et de l'amygdale, ce qui n'est pas le cas de la consolidation (Lee *et al.*, 2004, Debiec *et al.*, 2006). De plus, bien que les deux phénomènes nécessitent une dégradation protéique juste après l'apprentissage ou la réactivation, la synthèse protéique ayant lieu après l'apprentissage semble avoir une dynamique différente de celle post-réactivation. En effet, il a été montré pour une même tâche comportementale que la consolidation nécessiterait deux vagues de synthèse protéique (immédiatement et 4h après l'apprentissage) alors que la reconsolidation ne nécessiterait qu'une seule phase de synthèse protéique, immédiatement après l'apprentissage (Artinian *et al.*, 2008). Ceci suggère que la reconsolidation serait plus rapide et solliciterait moins de plasticité que la consolidation.

Outre la répétition des informations, des sentiments tels que la joie, le plaisir, l'intérêt ou la peur peuvent moduler les capacités de mémorisation en « cristallisant » des apprentissages de manière très rapide et robuste. Les sentiments ressentis par un sujet durant un apprentissage ou un événement peuvent être déterminants dans la mémorisation d'informations et dans leur devenir à long terme. Le puissant effet d'amélioration de la mémoire d'événements survenant dans une période de forte émotion a dans un premier temps été qualifié d'hypermnésie (Stratton, 1919), puis plus tard de « flashbulb memory » (Brown et Kulik, 1977). Ce type d'expériences, connu chez l'Homme, fait encore débat dans les recherches menées en neurosciences cognitives chez l'animal et sera abordé dans le premier chapitre de ma thèse. Au sein de notre laboratoire, il a été montré chez des souris que ce type de mémoire serait dépendant d'une libération rapide de zinc au niveau de la synapse des fibres moussues du gyrus denté sur la région CA3 hippocampique. L'apprentissage utilisé est un conditionnement de peur au contexte, qui consiste à associer un environnement particulier (le « où ? ») à un choc électrique (le « quoi ? »). Il s'agit d'un apprentissage très fort émotionnellement, pouvant se faire en moins de 5min et permettant une rétention de l'information à vie. La libération de zinc au niveau de CA3 n'intervient pas dans des apprentissages cognitifs moins forts émotionnellement, ce qui suggère que la synapse du DG sur CA3 présenterait deux modes de fonctionnement dont l'un permettrait la formation d'une mémoire de type « flashbulb » (Ceccom *et al.*, 2014).

L'hippocampe et ses structures connexes

Description anatomo-fonctionnelle

La formation hippocampique au sens large est une structure située chez l'homme dans les lobes temporaux et appartenant au système limbique (Figure 4). Elle comprend, en plus de l'hippocampe, des régions voisines cruciales pour le traitement de l'information. Il s'agit du subiculum et du cortex entorhinal. Le cortex entorhinal est un lieu de convergence des informations sensorielles. Ces informations proviennent des aires associatives chargées d'intégrer les signaux émanant des différents cortex sensoriels primaires. Il transmet ensuite, à travers la voie perforante (perforant la substance grise du subiculum), ces informations à l'hippocampe. Après traitement de ces informations, les neurones de l'hippocampe les transmettent en retour au cortex entorhinal en projetant leurs axones sur la couche V de ce dernier. Les neurones du cortex entorhinal émettent alors des efférences neuronales vers d'autres régions telles que l'amygdale, le noyau accumbens ou le cortex préfrontal. Le cortex entorhinal constitue ainsi une interface entre les différents cortex associatifs et l'hippocampe.

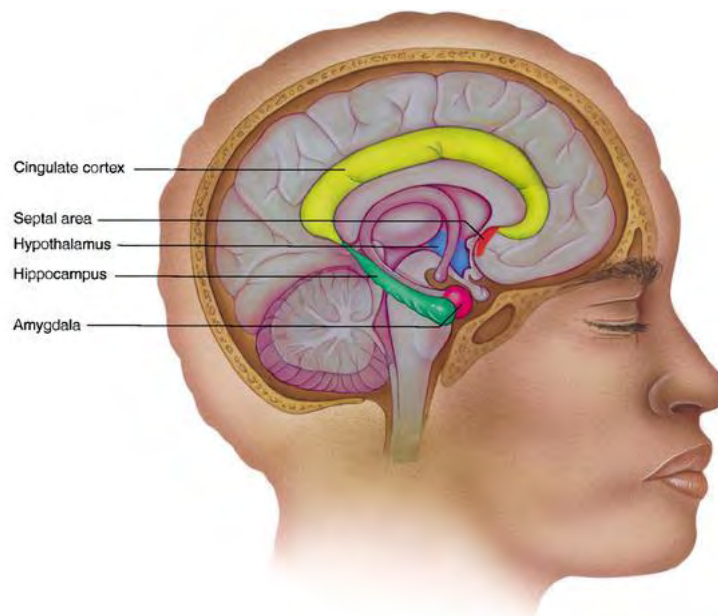


Figure 4 : Anatomie du système limbique chez l'Homme. Le système limbique est représenté en couleurs. L'hippocampe (en vert) est situé dans les lobes temporaux et est en contact étroit avec l'amygdale (en rose). Le système limbique comprend aussi le cortex cingulaire (ou gyrus cingulaire, en jaune) qui est constitué de fibres neuronales et permet d'établir un lien entre les différentes aires du système limbique, l'hypothalamus (en bleu) impliqué entre autres dans la rythmicité circadienne et la thermorégulation de l'organisme, et le septum (en rouge) qui a un rôle dans l'agressivité et l'addiction. Source : Google Images.

L'hippocampe au sens strict est un archicortex, les cellules qui le composent sont donc disposées en couches. Il existe plusieurs types de neurones dans cette région mais elle est composée en grande partie de neurones glutamatergiques. Ces neurones sont alignés, et leurs corps cellulaires forment une structure organisée en couches relativement fines clairement définies, délimitant ainsi des sous-régions au sein de l'hippocampe (Figure 5). Le gyrus denté (DG) contient des cellules glutamatergiques granulaires alors que la corne d'Ammon (subdivisée en CA1, CA2, CA3, CA4) comprend des cellules glutamatergiques pyramidales. Ces régions sont interconnectées et forment un circuit trisynaptique. Les cellules granulaires du DG émettent des axones appelés fibres moussues en direction de CA3. Ces fibres font synapse sur les dendrites des cellules pyramidales de CA3 qui envoient à leur tour des projections axonales, appelées collatérales de Schaffer, sur CA1. Les cellules pyramidales de CA3 présentent un autre type d'axones appelés collatérales récurrentes et commissurales. Comme leur nom le suggère, ces collatérales forment une boucle de récurrence en se projetant sur les dendrites des régions CA3 respectivement ipsi et controlatérale.

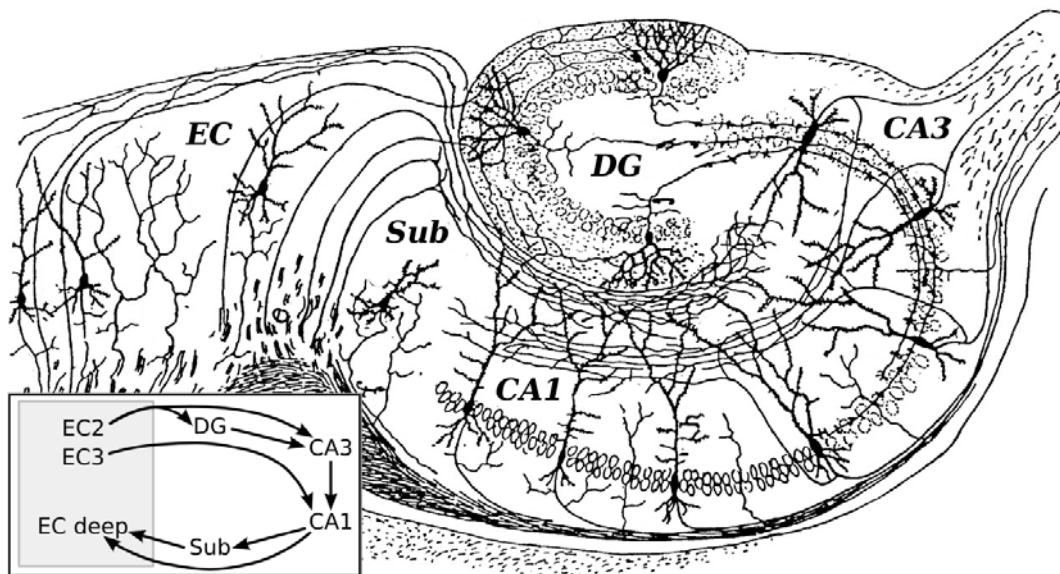


Figure 5 : Schéma d'un hippocampe de rongeur. EC : Cortex entorhinal, Sub : Subiculum, DG : Gyrus denté. Les axones du cortex entorhinal constituent la voie perforante (qui perfore le subiculum). Ils projettent sur les trois populations cellulaires des régions DG, CA1, CA3. Les cellules granulaires du DG envoient leurs efférences (fibres moussues) vers les cellules pyramidales de CA3. Les axones de CA3 se divisent en deux pour former d'une part les collatérales de Schaffer qui projettent sur les cellules pyramidales de CA1 et d'autre part les collatérales récurrentes qui font synapses sur les régions CA3 ipsi- et contro-latérales. Les cellules de CA1 constituent la voie de sortie de l'hippocampe et projettent vers le cortex entorhinal en passant par le subiculum. D'après Ramon y Cajal (1911).

Ce circuit trisynaptique laisse penser que l'hippocampe traite les informations de manière sérielle. Cependant, le cortex entorhinal envoie des informations sensorielles, via la voie perforante, aux trois régions précitées et de manière indépendante. Les axones des cellules pyramidales de la couche II du cortex entorhinal se projettent sur le gyrus denté alors que ceux des cellules étoilées de la couche III se projettent sur les régions CA3, CA2 et CA1 formant ainsi la voie temporoammonique. Cela signifie qu'il peut y avoir un traitement en parallèle des informations au sein de l'hippocampe.

Implication dans les mécanismes de la mémorisation

Les travaux sur des patients cérébro-lésés tels que Henry Molaison montrent que la région hippocampo-amygdalienne est impliquée dans la mémorisation des souvenirs épisodiques mais en préservant tout de même les souvenirs anciens. Cela suggère que l'hippocampe joue un rôle important dans la formation de la mémoire et la consolidation, mais que d'autres structures sont impliquées dans le stockage à long terme de cette mémoire.

Comme décrit précédemment dans le paragraphe sur la consolidation, les souvenirs épisodiques seraient stockés pour le très long terme dans les régions corticales (Frankland et Bontempi, 2005), mais aussi dans l'hippocampe (Nadel et Moscovitch, 1997, Winocur, Moscovitch et Bontempi, 2010, Goshen *et al.*, 2011), permettant une redondance des informations et l'accroissement au cours du temps de la robustesse de la trace mnésique vis-à-vis des interférences, lésions, ou blocages pharmacologiques.

Chez l'animal, il a été montré que des lésions électrolytiques de l'hippocampe (Phillips et Ledoux, 1992) ou par des injections d'acide iboténique (Selden *et al.*, 1991) réalisées avant un apprentissage perturbent la mémorisation contextuelle. Des lésions électrolytiques de l'hippocampe réalisées 1 jour mais pas 7, 14, ni 28 jours après l'apprentissage (Kim et Fanselow, 1992) entraînent des déficits de mémorisation du contexte sans bloquer la mémoire émotionnelle, suggérant ainsi que l'hippocampe est nécessaire à la représentation contextuelle et/ou à l'association de cette représentation au choc électrique. Le même type d'expérience a montré l'importance de cette région cérébrale dans la mémorisation spatiale (Morris *et al.*, 1982). L'hippocampe a donc un rôle central dans les processus d'apprentissage et de mémoire, en particulier dans la mémoire spatiale et la mémoire épisodique (pour revue, Dickerson et Eichenbaum, 2010).

La plasticité synaptique

La mémorisation nécessite des modifications des connexions neuronales dans le cerveau. La plasticité d'un objet en règle générale est sa faculté à être déformé, modifié, sculpté sans se casser. On nomme plasticité cérébrale la capacité des neurones du cerveau à modifier leurs connexions au cours du temps, en fonction de l'expérience sensorielle, du développement et de l'expérience d'un individu.

Elle se manifeste à différentes échelles (réticulaire, neuronale, synaptique) par des changements structuraux et/ou fonctionnels. La plasticité cérébrale trouve son origine dans l'activité neuronale. Il existe plusieurs formes de plasticités cérébrales. Au cours de ce travail de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement aux phénomènes de potentialisation et dépression à long terme (respectivement LTP et LTD) qui ont été très étudiées et qui semblent jouer un rôle clé dans les mécanismes d'apprentissage, de mémorisation et d'oubli.

La potentialisation à long terme

En 1949, dans son ouvrage intitulé « The organization of behavior », Donald Hebb émet l'hypothèse que l'activation synchrone et répétée de deux groupes de neurones connectés entre eux mène à un renforcement de leur connexion, et qu'à l'inverse l'absence d'activation entraîne une diminution puis une perte de cette connexion. Selon lui, ce phénomène pourrait être le substrat neuronal d'apprentissages associatifs simples. Lorsque deux stimuli qui activent chacun une population neuronale seraient présentés au sujet en même temps, cela entraînerait un renforcement des liens entre les deux populations neuronales ce qui permettrait d'établir également un lien entre les deux stimuli. Ce phénomène, décrit à l'époque à titre spéculatif, fut pour la première fois observé in vivo chez le lapin anesthésié par Bliss et Lomo. Leur expérience consiste à stimuler les fibres de la voie perforante et à enregistrer les potentiels de champs post-synaptiques excitateurs (fEPSPs) et les « pop-spike » ainsi évoqués au niveau des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe (respectivement au niveau des dendrites et des corps cellulaires). Les auteurs réalisent une ligne de base de 10min, pendant laquelle ils évoquent des réponses toutes les 2s. Puis ils effectuent un protocole de stimulations à plus haute fréquence (15Hz pendant 15s). Après ce protocole, des réponses sont à nouveau évoquées toutes les 2s. Ils remarquent alors que l'amplitude des fEPSPs et des pop-spike est augmentée et que la latence d'apparition des pop-spike est diminuée de manière stable et

pendant au moins 22min. Ils notent également que répéter le protocole de stimulations à haute fréquence (HFS) induit une augmentation de plus en plus importante de l'amplitude des fEPSPs et que ce phénomène peut être observé jusqu'à 3h après la fin des HFS (5h30 après le 1^{er} protocole de HFS). L'augmentation des réponses post-synaptiques (fEPSPs et pop-spike) évoquées par une stimulation de même intensité qu'au cours de la ligne de base montrent que le protocole de HFS a induit des changements (pré- et/ou post-synaptiques) qui ont permis un renforcement durable de la connexion entre la voie perforante et le gyrus denté. En d'autres termes, ces travaux constituent la première illustration expérimentale in vivo du postulat de Hebb. Les auteurs nomment ce phénomène potentialisation de longue durée (« long lasting potentiation » en Anglais) (Bliss et Lomo, 1973). Cela marque le début d'intenses investigations, dans différentes régions cérébrales, sur ce qui sera appelé par la suite la potentialisation à long terme (LTP).

Mécanismes de la LTP

La potentialisation à long terme induite par des stimulations à haute fréquence est considérée comme un « prototype de laboratoire », on pourrait donc parler de LTP « artificielle » car elle ne représente pas ce qui se passe réellement lors d'un apprentissage. En effet, les protocoles utilisés, même s'ils varient en intensité et durée, consistent à stimuler fortement de grands ensembles de neurones. Cependant, la découverte de la LTP faisant intervenir ce type de protocole, le terme « LTP » est resté très lié à ce mode d'induction d'une plasticité synaptique. Ainsi, on trouve parfois dans la littérature le terme « LTP-like » pour des formes de plasticité ressemblant à cette LTP (voire potentiellement identiques au niveau des mécanismes cellulaires) mais obtenues par des protocoles différents (par exemple pour des travaux réalisés chez l'homme à l'aide de stimulations magnétiques transcrâniennes). Or, il est possible d'observer des plasticités synaptiques induites directement par un apprentissage (voir paragraphe « Les plasticités synaptiques induites par un apprentissage » en page 40). Ces plasticités synaptiques dépendantes de l'expérience seront appelées « LTP naturelles » dans la suite de ce manuscrit. En revanche, j'ai choisi d'utiliser les termes « LTP artificielle » pour la LTP induite par des stimulations.

Les protocoles d'induction de LTP ne reflètent pas la réalité de l'activité électrique neuronale car, en l'absence de toute stimulation électrophysiologique, les neurones d'une même région sont rarement activés tous en même temps. Cette activation synchrone d'un groupe important de neurones est en fait caractéristique d'une activité épileptique, ou du moins épileptogène. Un biais important de la LTP « artificielle » induite par des stimulations à haute fréquence est ce risque de survenue de crises d'épilepsie induite par l'activation de grandes populations neuronales au même moment. Certains protocoles de stimulation téτανique hippocampique ont été basés sur la propriété des neurones de l'hippocampe à s'activer en même temps suivant des oscillations de rythme thêτα (environ 6 à 12Hz), dont l'implication dans la formation de la trace mnésique est admise (Buzsaki *et al.*, 1981). En effet, il a été montré chez le rat anesthésié que stimuler les collatérales de Schaffer de manière précise au moment de la phase positive du thêτα permet d'induire une LTP dans la région CA1 de l'hippocampe (Holscher *et al.*, 1997). Ces protocoles sont donc un peu plus en accord avec la physiologie cérébrale, cependant, ils consistent également à activer une importante quantité de neurones, ce qui n'affranchit pas les chercheurs du risque de crises d'épilepsie malgré une fréquence de stimulations plus faible. Aujourd'hui encore, il semble difficile d'induire une LTP dans la région CA1 d'un hippocampe de souris non anesthésiée par des protocoles de stimulation téτανique sans induire de crise d'épilepsie (Cooke *et al.*, 2006). En excluant les données de sujets présentant une épilepsie induite par le tetanus, l'utilisation de ces protocoles a tout de même permis une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes qui pourraient être à l'origine d'une LTP physiologique, supposée être le support (encore difficilement détectable) de la formation de la mémoire.

La LTP est un phénomène qui peut s'exprimer au niveau pré- et/ou post-synaptique. La LTP dite « classique », c'est-à-dire celle des collatérales de Schaffer ou du gyrus denté serait plutôt post-synaptique. Au niveau de ces synapses, en l'absence de plasticité, c'est-à-dire lors d'une activité basale des neurones, il a été montré que le glutamate active plutôt les récepteurs post-synaptiques AMPA car le site d'activation des récepteurs NMDA (perméables au calcium) est occupé (donc bloqué) par du Mg²⁺ qui ne s'en échappe pour permettre leur activation que lors d'une dépolarisation suffisamment importante (Nowak *et al.*, 1984, Mayer *et al.*, 1984). Ces études ont fait des récepteurs NMDA de bons candidats comme détecteurs de coïncidence entre activité pré- et post-synaptique pour le déclenchement d'une LTP. Il a été montré ensuite que la transmission glutamatergique (Bliss *et al.*, 1986) et plus précisément l'activation des récepteurs post-synaptiques NMDA est à l'origine de l'initiation de la LTP (Collingridge *et al.*, 1983, Harris *et al.*, 1984, Abraham et Mason, 1988, Nicoll *et al.*, 1988, Barria et Malinow, 2005).

Depuis les années 1970, des travaux ont permis de mettre en évidence que le phénomène de LTP hippocampique repose sur une cascade de réactions impliquant le calcium post-synaptique. En effet, il a été montré chez le cochon d'Inde que déclencher une LTP des collatérales de Schaffer entraîne une augmentation de la concentration de calcium dans les dendrites de CA1 (Kuhnt *et al.*, 1988). De plus, le BAPTA-AM (Acide bis(OAmino-phénoxy)-éthane-N,N,N,N-tétraacétique), un chélateur du calcium capable de traverser les membranes biologiques (Tsien, 1980), réduit l'amplitude de la LTP induite par des stimulations à haute fréquence sur des tranches de cerveaux de rats (Tonkikh *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il a été montré que l'induction de la LTP classique dépend de l'activation de la calmoduline (une protéine qui se lie au calcium) et que son maintien dépend d'une protéine kinase C (PKC) (Reymann *et al.*, 1986, Lynch et Bliss, 1986, Hu *et al.*, 1987). Le calcium active également l'adénylate cyclase qui produit l'AMP cyclique (AMPC) qui, à son tour, active la protéine kinase A (PKA). Des études ont également montré que cette LTP dépend de l'activation d'une protéine kinase dépendante du complexe calcium-calmoduline, la calcium-calmoduline kinase II (CaMKII) (Kennedy *et al.*, 1983, Lisman et Goldring, 1988). Or, toutes ces kinases (PKC, PKA et CaMKII) sont activées dans le domaine post-synaptique, ce qui signifie que l'entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone post-synaptique, permise par l'activation des récepteurs NMDA glutamatergiques, déclenche une cascade de réactions intracellulaires post-synaptiques grâce à l'activation des kinases (Malenka *et al.*, 1989). Le complexe CaMKII possède de multiples rôles dans la LTP. Il génère par exemple un signal rétrograde (l'oxyde nitrique) vers l'élément présynaptique qui favorise la libération de glutamate. Ce signal auto-activateur peut durer plusieurs heures, indépendamment du calcium (Barria *et al.*, 1997) et pourrait ainsi former une boucle d'amplification de l'activité synaptique pour contribuer à la mise en place de la LTP. En outre, la formation du complexe CaMKII phosphoryle la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA qui permet une augmentation de leur adressage à la synapse au niveau de la densité post-synaptique (PSD pour « Post-Synaptic Density) (Cammarota *et al.*, 1998). Cette PSD est la zone où la membrane post-synaptique s'épaissit en raison de la présence de nombreuses protéines d'échafaudage, de récepteurs, de molécules de signalisation et d'adhérence, de canaux ioniques, dont la présence constitue un support pour organiser la réponse post-synaptique. Le complexe CaMKII serait aussi à l'origine de l'insertion membranaire et de l'augmentation de la conductance des récepteurs AMPA (Shi *et al.*, 1999). En d'autres termes, l'activation des kinases (dont la CaMKII) suite à l'entrée de calcium par les canaux NMDA permet d'augmenter la transmission synaptique AMPA.

La LTP classique peut être décomposée en deux phases. Une phase précoce (e-LTP) reposerait sur des modifications post-traductionnelles telles que présentées ci-dessus (Malinow *et al.*, 1989) et une phase tardive (I-LTP) serait dépendante de la synthèse protéique (Frey *et al.*, 1988, Nguyen *et al.*, 1994). Cette synthèse protéique apparaît environ 1h après l'induction de la LTP et servirait à la consolider, c'est-à-dire à passer d'une e-LTP à une I-LTP (Abel *et al.*, 1997). Il a été montré, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la traduction que le début de la I-LTP dépend de la synthèse protéique à partir d'ARNm préexistants au niveau des dendrites (Vickers *et al.*, 2005, Bradshaw *et al.*, 2003). Cependant, la traduction de ces ARNm n'est pas suffisante pour maintenir la I-LTP au-delà de quelques heures. La synthèse protéique qui permet le maintien de la LTP semble nécessaire rapidement après l'induction de celle-ci. En effet, des inhibiteurs de la synthèse protéique (transcription ou traduction) sont inefficaces dans le blocage de la LTP s'ils sont administrés quelques heures après l'induction, c'est-à-dire une fois que la I-LTP est en place (Otani *et al.*, 1989, Nguyen *et al.*, 1994).

Les protéines qui seraient synthétisées pour la I-LTP sont issues de l'activation de gènes induite par les phases de la e-LTP. Des enzymes telles que la PKA, la CaMKII, la PKC, ou la PI-3K (Phosphoinositide-3 Kinase) activent la voie des MAPK-ERK (pour « Mitogen-Activated Protein Kinase » et « Extracellular signal-Regulated Kinase ») (Figure 6), ce qui permet, via la phosphorylation de CREB (qui peut également être phosphorylée directement par les kinases citées précédemment), d'exprimer des gènes immédiats précoces (IEG) tels que c-Fos, zif268, Arc. Certains de ces IEG peuvent avoir un effet direct sur le réarrangement structural de la synapse, en interagissant avec des protéines du cytosquelette telles que l'actine. Ils peuvent également agir en tant que facteurs de transcription pour induire l'expression de gènes tardifs impliqués dans la synthèse de protéines de structure, de canaux ioniques, d'enzymes, de neurotransmetteurs, etc...(Citri et Malenka, 2008).

En résumé, une stimulation tétanique appliquée au niveau des neurones présynaptiques permet l'activation des récepteurs NMDA qui provoque une entrée massive de calcium dans l'élément post-synaptique. Il se forme alors un complexe calcium-calmoduline permettant l'activité de la CaMKII. Cette kinase (ainsi que d'autres telles que la PKC), agit d'une part en phosphorylant les récepteurs AMPA déjà synthétisés, ce qui permet d'augmenter leur insertion synaptique et leur fonctionnalité (cela constitue la e-LTP), et d'autre part en activant CREB et la voie des MAPK-ERK, permettant ainsi l'expression d'IEG et la synthèse de protéines nécessaires au maintien de la LTP. Dans CA3, il existe deux types de synapses. La LTP des collatérales récurrentes semble être analogue à celle des

collatérales de Schaffer, mais les mécanismes de la LTP des fibres moussues sont différents. Cette dernière ne nécessite pas l'activation des récepteurs NMDA (Harris et Cotman, 1986, Zalutsky et Nicoll, 1990). Pourtant il existe des récepteurs NMDA au niveau des dendrites des cellules pyramidales de CA3, mais ils sont deux fois moins nombreux que dans CA1 (Sindreu *et al.*, 2003). La LTP des fibres moussues s'exprimerait essentiellement au niveau de l'élément présynaptique (Nicoll et Schmitz, 2005), bien que des études un peu plus récentes aient montré qu'il existe également plusieurs formes de LTP post-synaptiques qui interviennent en complément de la première (Sivakumaran *et al.*, 2009, Galván *et al.*, 2010, Pan *et al.*, 2011).

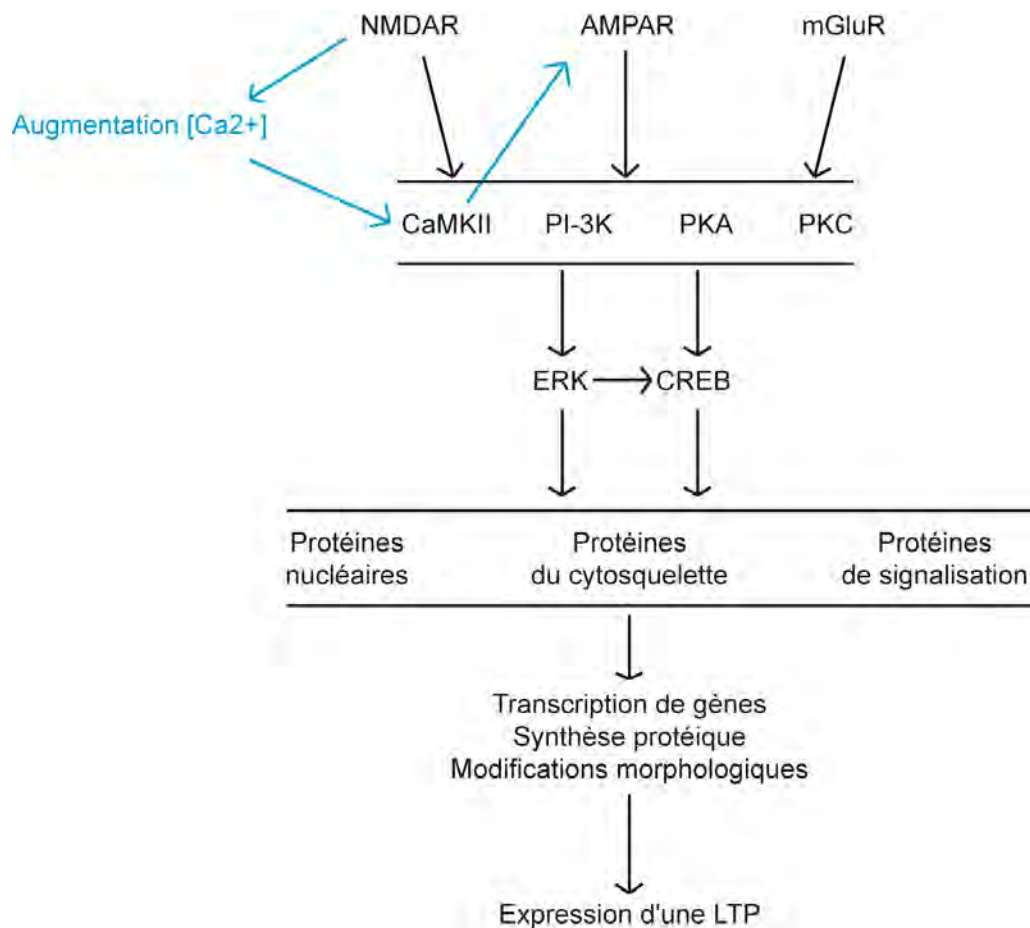


Figure 6 : Cascades de réactions aboutissant à l'expression d'une LTP telle qu'elle est classiquement décrite au niveau de la synapse des collatérales de Schaffer sur les cellules pyramidales de CA3. En bleu, les mécanismes impliqués dans la e-LTP. D'après Lynch, 2004.

Il est possible d'induire une LTP présynaptique des fibres moussues par différents protocoles. Par exemple, un protocole long (48 stimulations à 25Hz ou 100 stimulations à 100Hz) entraîne l'ouverture de canaux calciques pré-synaptiques dépendants du voltage. Cette ouverture est facilitée par l'activation des récepteurs kaïnate GluR6 au glutamate (Schmitz *et al.*, 2003, Yeckel *et al.*, 1999). L'augmentation de la concentration calcique présynaptique active l'adénylyl cyclase dépendante du complexe calcium-calmoduline ce qui entraîne la production d'AMPc. Cet AMPc engendre à son tour une activation de la PKA qui peut phosphoryler des substrats présynaptiques impliqués dans le maintien à long terme de l'amplification de l'efficacité de la transmission synaptique (Nicoll et Malenka, 1995, Nicoll et Schmitz, 2005). Lorsque le protocole d'induction de la LTP est bref (7 stimulations à 100Hz), les récepteurs métabotropiques glutamatergiques (mGluR) de type I de CA3 sont activés et provoquent une entrée de calcium post-synaptique. Ce calcium permet alors l'émission d'un messenger rétrograde qui va entraîner l'activation de cascades moléculaires présynaptiques (notamment la voie de la PKA) aboutissant à l'augmentation soutenue de la libération de neurotransmetteurs par les fibres moussues et au maintien de la LTP (Yeckel *et al.*, 1999).

Il existerait également une LTP des fibres moussues, induite par des stimulations brèves et modérées, dépendante des récepteurs NMDA et nécessitant l'activation des mGluR5 (Kwon et Castillo, 2008, Rebola *et al.*, 2008). La coactivation de ces deux types de récepteurs permet d'une part l'entrée massive de calcium dans l'élément post-synaptique (implication des récepteurs NMDA) et d'autre part la formation de diacylglycérol (DAG), qui active la PKC, et la libération intracellulaire de calcium via la génération d'IP3 (implication des mGluR5). Le couplage de ces deux activités permet une entrée de calcium suffisamment importante pour déclencher une LTP des fibres moussues dans CA3. La PKC permettrait l'incorporation de récepteurs NMDA dans la PSD grâce à une exocytose dépendante du système SNARE (Barria et Malinow, 2002). Cette LTP étant post-synaptique, il est possible qu'elle soit facilitée par l'activation de récepteurs kaïnate post-synaptiques (Kwon et Castillo, 2008) qui contribueraient à la sommation temporelle des informations (Frerking et Ohliger-Frerking, 2002). L'activation de tyrosine kinases participerait également à cette LTP en augmentant la conductance et la phosphorylation des récepteurs NMDA (Salter et Kalia, 2004). Comme décrit plus haut, la LTP des collatérales de Schaffer présente deux phases. La e-LTP est indépendante de la synthèse protéique, contrairement à la I-LTP. Concernant la LTP des fibres moussues sur CA3, le doute subsiste quant à l'implication de la synthèse protéique. Il a été montré sur des tranches de cerveau de rat qu'il existe une e-LTP et une I-LTP des fibres moussues, c'est-à-dire que la synthèse protéique serait nécessaire pour le maintien de la LTP mais pas pour son induction (Huang *et al.*, 1994). En revanche, une seconde étude menée *in vivo* sur des rats anesthésiés montre que la LTP des fibres

moussues nécessite une synthèse protéique dès son induction (Barea-Rodriguez *et al.*, 2000). Ces deux équipes ont utilisé le même protocole de stimulation, seul le modèle change (in vivo vs in vitro). Le décours de la formation de la LTP semble donc différent selon l'expérience, il est tout à fait possible d'imaginer que sur tranche de cerveau, le fonctionnement cellulaire soit altéré. L'étude réalisée in vivo présente une probabilité plus importante d'être proche de la réalité d'un apprentissage.

La dépression à long terme

La dépression à long terme (LTD) est le phénomène opposé à la LTP, il s'agit donc d'une diminution à long terme de la force de connexion synaptique. Elle a été mise en évidence quelques années après la LTP et a été très étudiée dans le cervelet au début des années 1980 (pour revue, Ito, 1986) et au niveau de l'hippocampe. Par exemple, il a été montré sur des tranches de cerveaux de rats que des stimulations répétées à basse fréquence (1Hz) induisent une LTD alors que des stimulations répétées à haute fréquence (15 à 100Hz) induisent une LTP (Dunwiddie et Lynch, 1978). De même, l'étude de la synapse de la voie perforante sur le DG de rats anesthésiés a montré que des stimulations à haute fréquence (400Hz) induisent plutôt des LTP alors que des stimulations à basse fréquence (15Hz) induisent plutôt des LTD, bien qu'il soit possible d'obtenir l'inverse (Bramham et Srebro, 1987). Il est intéressant de noter que la notion de basse ou haute fréquence est relative (un protocole appliqué sur une synapse n'aura pas le même effet sur une autre synapse) et qu'un même protocole appliqué sur une même synapse mais sur deux sujets différents pourra avoir des conséquences opposées (LTP vs. LTD). Ces résultats témoignent d'un lien fort ou d'une ressemblance dans les mécanismes d'induction de la LTP et de la LTD.

Des LTD ont pu être observées dans de nombreuses aires cérébrales et chez diverses espèces animales. Il semblerait que, comme dans le cas des LTP, il n'existe pas une mais plusieurs formes de LTD pouvant impliquer des voies moléculaires variées. Au niveau des collatérales de Schaffer, il existe une LTD dépendante des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR, Manahan-Vaughan, 1997) et une LTD dépendante des récepteurs NMDA (Dudek et Bear, 1992). Je ne détaillerai pas ici la LTD dépendante des mGluR mais celle qui me semble être le miroir de la LTP, la LTD NMDA-dépendante (pour revue, Pöschel et Stanton, 2007). Dans le cadre de cette plasticité, l'activation post-synaptique des récepteurs NMDA entraîne une entrée de calcium relativement faible dans le neurone post-synaptique. Ce calcium active alors des phosphatases, la calcineurine

(dépendante du complexe calcium/calmoduline) et la phosphatase PP1 (Mulkey et Malenka, 1992). Ces phosphatases déphosphorylent certains acteurs de la LTP, en particulier les sous-unités GluR1 des récepteurs AMPA, les rendant ainsi moins efficaces (Banke *et al.*, 2000) et provoquant leur internalisation (Malenka et Nicoll, 1997). Les récepteurs AMPA resteraient d'abord dans la membrane mais s'éloigneraient de la PSD par un déplacement latéral puis subiraient une endocytose sous contrôle de la clathrine et de la dynamine (Ashby *et al.*, 2004). Le maintien de la LTD sur le long terme nécessiterait la synthèse de nouvelles protéines (Pfeiffer et Huber, 2006). Cela peut sembler contre intuitif au premier abord, mais souligne le caractère actif de cette LTD et peut s'expliquer par la nécessité de réarrangements de la membrane post-synaptique et de la diminution de la taille des synapses (Zhou *et al.*, 2004).

Etant donné que l'initiation de la LTD se fait via les mêmes mécanismes que celle de la LTP (activation des récepteurs NMDA et entrée de calcium post-synaptique), la question est de savoir ce qui détermine la survenue de l'une ou de l'autre. Dans une revue en 1995 Mark Bear se base sur une théorie émise par Bienenstock *et al.* (1982) pour expliquer le lien entre LTP et LTD. Il propose qu'il existe un continuum de fréquences de stimulation pour induire des plasticités synaptiques et qu'au sein de ce continuum est présent un seuil à partir duquel une LTP sera déclenchée et en deçà duquel une LTD sera déclenchée. Sur la base de résultats obtenus sur tranches de cerveaux, au niveau de la région CA1, il a été proposé qu'une faible entrée de calcium dans le compartiment post-synaptique entraînerait l'activation de phosphatases et la mise en place d'une LTD alors qu'une entrée importante de calcium entraînerait l'activation de kinases et la mise en place d'une LTP (Bear et Malenka, 1994). La concentration calcique ne permet pas à elle-seule d'expliquer ce seuil LTP/LTD. Il a été montré par la suite que non seulement la concentration mais aussi la dynamique d'entrée du calcium post-synaptique joue un rôle. Une entrée rapide d'une grande quantité de calcium entraînerait la formation d'une LTP alors qu'une entrée modérée et lente contribuerait à former une LTD (Yang *et al.*, 1999, Nishiyama *et al.*, 2000, Mizuno *et al.*, 2001). Ainsi, un protocole de stimulations à haute fréquence provoque une entrée rapide et massive de calcium post-synaptique qui conduirait à la formation d'une LTP alors qu'un protocole de stimulations à basse fréquence provoque une entrée faible de calcium, conduisant à la formation d'une LTD.

Les plasticités hétérosynaptiques

Les plasticités décrites dans les autres paragraphes de ce manuscrit sont dites « homosynaptiques », c'est-à-dire que les modifications ont lieu au niveau de la synapse activée. Nous allons introduire brièvement ici la notion de plasticité hétérosynaptique. Ces plasticités correspondent aux modifications d'une synapse lorsqu'une autre synapse est activée, autrement dit c'est une synapse inactive au moment de la stimulation qui va subir des modifications. Par exemple, au niveau des cellules pyramidales de CA1, il a été montré qu'une stimulation tétanique des collatérales de Schaffer entraîne la formation d'une LTP sur cette synapse et d'une LTD sur la synapse de la voie commissurale sur CA1. De même, une stimulation tétanique de la voie commissurale entraîne la formation d'une LTP sur cette voie et d'une LTD sur la voie des collatérales de Schaffer (Lynch *et al.*, 1977). Ce phénomène a également été mis en évidence au niveau des cellules granulaires du gyrus denté. Des stimulations téaniques de la voie perforante (au niveau du faisceau angulaire, où passe l'ensemble des axones de la voie perforante) induisent une LTP de cette voie et une LTD sur la voie perforante controlatérale (Levy et Steward, 1983). De plus, la voie perforante peut être subdivisée en deux groupes de projections nerveuses. Les fibres provenant du cortex entorhinal latéral et médian constituent respectivement les voies perforantes latérale (LPP) et médiane (MPP). Des enregistrements simultanés des fEPSPs évoqués dans le gyrus denté par la stimulation de la LPP et de la MPP ont permis d'étudier les plasticités hétérosynaptiques sur ces voies (Doyère *et al.*, 1997). Il a été montré que l'induction d'une LTP au niveau de la LPP induit une LTD hétérosynaptique robuste sur la voie médiane. L'induction de la LTP au niveau de la MPP n'induit cependant pas une LTD comparable sur la voie latérale. De plus, la stimulation tétanique ultérieure de la LPP permet de dépotentialiser la MPP, mais la stimulation de la MPP, bien qu'elle annule la LTD hétérosynaptique de la MPP, ne dépotentialise pas la LPP. Cela révèle une certaine asymétrie de ces plasticités hétérosynaptiques. Il est intéressant de noter que la LTD hétérosynaptique enregistrée au niveau de la MPP s'estompe après quelques jours alors que la LTP induite conjointement au niveau de la LPP persiste, montrant ainsi qu'il s'agit de deux phénomènes distincts. Les plasticités hétérosynaptiques jouent probablement un rôle dans la régulation de la force de connexion de grands ensembles synaptiques afin d'éviter les surcharges d'activité neuronale. Leurs mécanismes sont encore mal connus mais font probablement intervenir des neuromodulateurs, une activité gliale au niveau des synapses tripartites ou l'activation d'interneurones (pour revues, Bear et Abraham, 1996, Bailey *et al.*, 2000, Hulme *et al.*, 2013).

La LTP, support de la mémoire ?

Le paradoxe de la mémoire est de nécessiter à la fois une certaine plasticité pour être malléable et s'adapter, et en même temps une robustesse pour perdurer sur du long terme. La mémorisation nécessite ainsi un compromis entre stabilité et plasticité (Abraham et Robins, 2005).

Des mécanismes communs

Notre équipe a montré que lors d'un conditionnement de peur au contexte (CFC), le blocage de l'activité du circuit trisynaptique (DG-CA3-CA1) entraîne un déficit mnésique. Le DCG-IV est un agoniste des récepteurs métabotropiques glutamatergiques de types II présynaptiques qui peut agir dans l'hippocampe en inhibant l'activité des synapses de la voie perforante et des fibres moussues sur CA3 (mais pas celles des collatérales récurrentes ni des collatérales de Schaffer). Injecté localement dans CA3 ou dans le DG, il perturbe la formation de la mémoire contextuelle et semble n'avoir pas d'effet lorsqu'il est injecté dans CA1. Cela signifie que la voie perforante reliant le cortex entorhinal à CA1 ne serait pas nécessaire à la mémorisation du CFC (Daumas *et al.*, 2009). En revanche, la lidocaïne, un bloqueur des canaux sodiques, administrée dans CA3 ou CA1 aussitôt après la période d'acquisition, altère le rappel à 24h (Daumas *et al.*, 2005). L'effet obtenu lors des injections dans CA1 montrent que ce serait la synapse des collatérales de Schaffer qui serait importante dans la mémorisation du conditionnement de peur au contexte. Dans cette tâche, les projections de la voie perforante sur le DG et CA3 ainsi que la connexion de CA3 et CA1 semblent donc particulièrement impliquées dans la mémorisation du contexte.

Cependant, la lidocaïne et le DCG-IV bloquent respectivement la conduction et la transmission synaptique, ce qui inhibe de manière globale la propagation de l'influx nerveux. La mémorisation nécessiterait non seulement l'activité de l'hippocampe mais également une plasticité des connexions neuronales au sein de cette structure. Dès sa découverte, la LTP a été pressentie comme un bon support de la formation de la mémoire car les protocoles d'induction et le renforcement des connexions synaptiques observées rappelaient le postulat de Hebb. De plus, il a été montré que la formation de la mémoire peut être perturbée par un KO ou une inhibition pharmacologique des récepteurs NMDA dans CA3 et CA1 (McHugh et Tonegawa, 2009, Rampon *et al.*, 2000), par des inhibiteurs de la CaMKII (Bevilaqua *et al.*, 2005), ou encore par des mutations de CREB (pour revue, Silva *et al.*, 1998). Or, ces

molécules semblent également impliquées dans les cascades moléculaires conduisant à la formation de la LTP. Par ailleurs, plusieurs équipes ont montré que la synthèse protéique est impliquée dans les phénomènes de mémorisation. Par exemple, l'injection sous-cutanée d'anisomycine, un inhibiteur de la synthèse protéique induit une amnésie à long terme mais pas à court terme dans le cadre d'un CFC en un seul essai (Bourtchouladze *et al.*, 1998). La même chose a été observée en injectant cette substance spécifiquement dans CA1 (Motanis et Maroun, 2012), laissant supposer que l'inhibition de la synthèse protéique, en bloquant la phase tardive de la LTP des collatérales de Schaffer, bloque la formation de la mémoire à long terme. Des chercheurs de l'équipe ont obtenu des résultats allant dans le même sens pour un apprentissage spatial en piscine de Morris (Artinian *et al.*, 2008). Ils ont montré que la synthèse protéique est nécessaire dans CA3 aussitôt après l'apprentissage pour qu'il y ait une mémoire à 24h. Cependant, il n'existe à ce jour aucune donnée concernant un éventuel effet du blocage de la synthèse protéique spécifiquement dans CA3 sur la mémorisation d'un CFC.

Les plasticités synaptiques induites par l'apprentissage

Le lien entre LTP et mémoire a été étudié pendant longtemps de manière indirecte. D'un côté des expériences de pharmacologie couplées à un apprentissage permettent de disséquer les mécanismes de la formation de la mémoire. De l'autre, des expériences d'électrophysiologie couplées à de la pharmacologie permettent l'approfondissement des connaissances sur les mécanismes de la LTP. Le lien entre ces deux phénomènes est difficile à faire directement car cela suppose de réaliser des expériences d'électrophysiologie sur des animaux libres de leurs mouvements. Certains chercheurs ont trouvé une forme de parade à cette difficulté, en utilisant une approche *ex vivo* : ils réalisent d'abord des expériences comportementales puis préparent très rapidement des tranches de cerveaux des animaux testés pour mener une étude électrophysiologique (Deupree *et al.*, 1991, Kleschevnikov et Marchbanks, 1993, Barnes, 1995, Izaki et Arita, 1996, Jeffery, 1997, Xu *et al.*, 1997, Rioult-Pedotti *et al.*, 2000, Sacchetti *et al.*, 2002). Dans ces études, la LTP induite sur tranche est plus faible chez les animaux ayant appris que chez des contrôles naïfs. Une double interprétation de ces résultats est possible. Certains auteurs concluent que l'expérience comportementale bloque la LTP des collatérales de Schaffer (Xu *et al.*, 1997). Une seconde interprétation prend en compte le fait que la LTP est saturable et conclut que s'il est impossible d'observer une LTP sur tranche, c'est parce qu'il y a un effet d'occlusion provoqué par une LTP (non observable) induite par le comportement (Sacchetti *et al.*, 2002).

Ce type d'approche a permis de renforcer l'hypothèse de la LTP comme support de la mémoire pour différentes formes de mémoires et dans différentes régions cérébrales. Par exemple, après avoir effectué un apprentissage moteur unilatéral chez le rat, des chercheurs ont enregistré des potentiels de champs dans le cortex moteur primaire de ces animaux et de manière bilatérale sur des tranches de cerveaux (Riout-Pedotti *et al.*, 2000, Harms *et al.*, 2008) ou dans le cerveau des animaux libres de leurs mouvements (Monfils et Teskey, 2004). En saturant la LTP, ils ont observé qu'au sein d'un même animal la LTP maximale obtenue est supérieure dans l'hémisphère ipsilatéral (c'est-à-dire non impliqué dans le mouvement effectué lors de l'apprentissage) en comparaison à celle de l'hémisphère controlatéral. Bien qu'initialement interprété comme un effet inhibiteur de l'apprentissage sur la LTP, il est désormais considéré que cette moins grande amplitude de la LTP sur tranche reflète un phénomène d'occlusion. Dans ces études, il y aurait donc la mise en place d'une LTP au cours de l'apprentissage moteur dans le cortex moteur primaire correspondant. Cette LTP entraînerait l'occlusion de la LTP induite ensuite par les tetani. Ces mêmes auteurs ont également saturé la LTD chez des animaux ayant subi cet apprentissage. Ils ont remarqué que la LTD est plus importante (c'est-à-dire que les potentiels de champs sont plus petits que ceux de la ligne de base) dans l'hémisphère correspondant à celui de l'apprentissage. Il y aurait dans cet hémisphère une dépotentiation de la LTP induite par l'apprentissage puis la mise en place et saturation d'une LTD. L'amplitude des modifications des potentiels de champs est donc plus importante que dans l'hémisphère contrôle, où le protocole *ex vivo* induit directement de la LTD. Cela corrobore les données obtenues avec la saturation de la LTP. De la même manière, il a été montré qu'un apprentissage olfactif chez le rat provoque une occlusion de la LTP induite ensuite dans le cortex piriforme par des TBS, suggérant la mise en place d'une LTP dans cette région au cours de l'apprentissage (Quinlan *et al.*, 2004). Une autre méthode indirecte pour montrer que l'apprentissage nécessite la formation d'une LTP sur certaines voies est de saturer ces LTP avant l'apprentissage et de tester la capacité des animaux à apprendre. Par exemple, la saturation de la LTP de la voie perforante sur le gyrus denté de l'hippocampe provoque des déficits d'apprentissage spatial en piscine de Morris, montrant ainsi que cet apprentissage nécessite la formation d'une LTP sur cette voie (Castro *et al.*, 1989, Moser *et al.*, 1998). Le même type de protocole mais appliqué sur un apprentissage spatial avec mémoire de référence a également montré la nécessité d'une LTP sur la synapse de la voie perforante sur le gyrus denté (McNaughton *et al.*, 1986). Cependant, le résultat inverse a été obtenu par l'équipe de Richard Morris, avec une corrélation entre le niveau de LTP saturée et le niveau de performance en piscine de Morris (Jeffery et Morris, 1993). Plusieurs incertitudes quant à la fiabilité des protocoles utilisés ont été soulevées par la suite (pour revues, Bliss et Richter-Levin, 1993, Doyère *et al.*, 1993).

Par exemple, il est difficile d'être sûr que la LTP est effectivement saturée par le protocole de téτανisation. De plus, même si c'est le cas, il est impossible de s'assurer que l'ensemble des synapses de la voie stimulée sont saturées, cela dépend de la taille/impédance des électrodes de stimulation. Enfin, même si la voie étudiée est complètement saturée, il est possible que d'autres voies activées au cours de l'apprentissage suffisent à en consolider des informations. Il est également possible qu'une stimulation téτανique, en plus de saturer la LTP sur une voie en particulier, provoque, via une plasticité hétérosynaptique, une dépotentiation d'une ou plusieurs autres voies anatomiques.

De par son opposition à la LTP, la LTD est parfois considérée comme un mécanisme actif d'oubli (Dudek *et al.*, 1992, Malleret *et al.*, 2010, Dalton *et al.*, 2012). A l'inverse il est possible que la LTD participe à l'apprentissage. L'équilibre instable que constituerait la balance LTP-LTD permettrait une modulation bidirectionnelle de l'efficacité synaptique ainsi que l'encodage mnésique par une répartition hétérogène et pondérée de la force de connexion synaptique (Citri et Malenka, 2008). En effet, chez des souris transgéniques KO pour un gène d'un facteur de transcription (SRF pour Serum Response Factor) il a été montré une impossibilité de former une LTD hippocampique (au niveau des collatérales de Schaffer) associée à des déficits d'apprentissage d'un nouveau contexte (testé en arène ouverte et dans un labyrinthe en Y) et donc également à des déficits en mémoire spatiale (Etkin *et al.*, 2006). Récemment, des souris KO pour une autre molécule impliquée spécifiquement dans la LTD (Bax pour Bcl-2-associated X protein) ont également été testées en conditionnement de peur au contexte et au son. Les auteurs ont montré que l'association du son au choc électrique est intacte chez ces animaux alors qu'ils présentent un déficit de mémoire contextuelle à long terme, sans déficit d'apprentissage ni de mémoire à court terme (Liu *et al.*, 2014). La LTD serait donc nécessaire à la consolidation contextuelle dans cet apprentissage.

Les études indirectes des plasticités synaptiques ont permis des avancées considérables sur la compréhension des mécanismes d'apprentissage. Cependant, pour être sûr qu'il y a des LTP et/ou LTD au cours d'un apprentissage il faudrait mesurer ces plasticités directement induites par l'apprentissage. Cela nécessite de pouvoir mesurer des fEPSPs avant et après une tâche comportementale. Il a par exemple été montré chez le rat qu'un apprentissage de peur conditionnée (association d'un son avec un choc électrique) produit une LTP des synapses de la voie perforante sur le gyrus denté lorsque les stimuli sont appariés et une LTD lorsqu'ils ne le sont pas (Doyère *et al.*, 1995). Selon cette étude la LTD permettrait de ne pas associer les deux stimuli puisqu'ils ne sont pas présents en même temps.

Ces résultats sont cohérents avec ceux d'une autre étude réalisée chez la souris (Herry *et al.*, 1999). Les auteurs ont mesuré la force de connexion des synapses du thalamus médiodorsal sur le cortex préfrontal. Ils ont remarqué que l'extinction d'un conditionnement de peur au contexte s'accompagne d'une LTD sur cette voie. Dans cette publication, la LTD semble être transitoire (elle n'apparaît qu'au début du protocole d'extinction, par la suite l'extinction entraîne même la formation d'une LTP). Selon les auteurs, la LTD serait liée à l'occurrence d'un stimulus aversif. Au début de l'extinction, le son est encore très aversif, la suite du protocole d'extinction consisterait en un nouvel apprentissage (le son n'est plus aversif, il y a une dissociation du choc et du son), ce qui expliquerait la formation d'une LTP. En 2006, plusieurs équipes ont réalisé le même type d'expériences en mesurant les fEPSPs au niveau des collatérales de Schaffer. Au sein des trois équipes, il a été observé une « LTP » induite par l'apprentissage mais jamais de LTD (Gruart *et al.*, 2006, Trifilieff *et al.*, 2006, Whitlock *et al.*, 2006). Ces expériences ont été menées chez le rongeur, en utilisant respectivement un conditionnement de clignement de l'œil (chez la souris), un conditionnement de peur au contexte avec stimuli appariés ou non (chez la souris) et un apprentissage d'évitement passif (chez le rat). Malgré des modifications de l'amplitude des réponses post-synaptiques observées après un apprentissage, de nombreux biais subsistent. Dans certains cas les enregistrements ont été réalisés dans la zone d'apprentissage et l'état émotionnel ou l'état d'éveil de l'animal n'a pas été contrôlé lors des enregistrements électrophysiologiques. Ainsi les modifications des potentiels de champs observés ne sont peut-être pas réellement des plasticités à long terme mais des modulations de la transmission synaptique induites par l'exposition à un contexte associé à une réponse émotionnelle (Doyère *et al.*, 1995, Gruart *et al.*, 2006, Trifilieff *et al.*, 2006). De plus, aucune de ces études ne porte sur la plasticité des fibres moussues alors que cette voie semble être déterminante pour la mémorisation d'un conditionnement de peur au contexte. Malgré des résultats encourageants pour les futures investigations, notamment des LTP obtenues chez le rat dans des conditions expérimentales très contrôlées (Whitlock *et al.*, 2006), aucune de ces équipes n'a encore questionné les mécanismes des plasticités induites par l'apprentissage.

Problématiques de la thèse

Les mécanismes de la LTP induite par des protocoles de stimulation ont pu être étudiés en profondeur depuis 40 ans. La communauté scientifique est désormais d'accord sur un grand nombre de cascades moléculaires impliquées dans la LTP hippocampique, particulièrement celles ayant lieu au niveau des collatérales de Schaffer. Comme ces mécanismes sont également impliqués dans l'apprentissage et/ou la mémorisation il semble que la LTP serait le support de la mémoire.

Les différentes LTP de CA3 sont plus difficiles à étudier et l'implication de la synthèse protéique dans l'induction de la LTP des fibres moussues pose toujours question. Si la LTP est effectivement le support de la mémoire, inhiber la synthèse protéique dans CA3 après un apprentissage de peur au contexte devrait apporter des précisions sur la nécessité de cette synthèse protéique pour l'induction et le maintien de la LTP induite par l'apprentissage au niveau des fibres moussues. Le premier chapitre de cette thèse a donc testé si l'inhibition de la synthèse protéique dans CA3 bloque les phases précoces de la formation de la mémoire à court terme d'un conditionnement de peur au contexte.

Il est probable que les désaccords concernant les mécanismes de la LTP soient dus aux différences expérimentales. La seule manière d'être sûr que la LTP est le support de la mémoire est d'observer directement une LTP induite par un apprentissage chez la souris libre de ses mouvements. Cette perspective permettrait ensuite de creuser les mécanismes de cette LTP « naturelle » à l'aide d'outils pharmacologiques, génétiques, etc... Ainsi, le second chapitre se focalise sur la possibilité d'observer une LTP induite par cet apprentissage (qui présente les avantages d'être rapide et de pouvoir se faire en un seul essai) dans l'hippocampe de la souris libre de ses mouvements.

Chapitre 1 : Etude de l'implication de la synthèse protéique dans CA3 dans la consolidation de la mémoire contextuelle.

Introduction

Dans ce premier chapitre, nous avons évalué l'impact sur les capacités mnésiques d'un traitement susceptible de bloquer la mise en place de la LTP dans l'aire CA3 des souris. Ce traitement a consisté en l'injection locale d'anisomycine, un inhibiteur de la synthèse protéique qui se fixe de manière réversible sur la sous-unité 60S du ribosome et empêche l'élongation de la chaîne polypeptidique (Alberini *et al.*, 2008).

Dans la région CA1 de l'hippocampe, la LTP ne dépend pas de la synthèse protéique pendant ses premières heures (Hagena et Manahan-Vaughan, 2013), mais repose sur la phosphorylation des récepteurs AMPA, grâce à l'activation de la CaMKII (protéine kinase dépendante du complexe calcium-calmoduline) et de la PKC (Protéine Kinase C), ce qui permet une augmentation de leur adressage à la membrane (pour revue, voir Malenka et Bear, 2004). On parle alors de LTP précoce, par opposition à la LTP tardive qui se met en place au bout de quelques heures, peut durer plusieurs mois et dépend de la synthèse protéique (Frey *et al.*, 1988). La LTP précoce serait le support de la mémoire à court terme alors que la LTP tardive permettrait le maintien de la trace mnésique à long terme (Kandel, 2001). Cependant, cette relation LTP/mémoire dépend principalement d'études menées sur la LTP des collatérales de Schaffer, axones reliant la région hippocampique CA3 à la région CA1 (Malenka et Bear, 2004). Or, les mécanismes de la LTP peuvent varier en fonction du type de synapse considéré (Figure 7).

Les neurones pyramidaux de CA3 reçoivent deux types de synapses. Tout d'abord, les collatérales récurrentes sont les projections de CA3 sur la région CA3 et semblent fonctionner de manière similaire aux collatérales de Schaffer. Les fibres moussues, qui sont les axones issus du gyrus denté faisant synapse sur CA3, présentent en revanche une LTP qui dépendrait de la synthèse protéique dès son initiation (Barea-Rodriguez *et al.*, 2000 ; Hagena et Manahan-Vaughan, 2013).

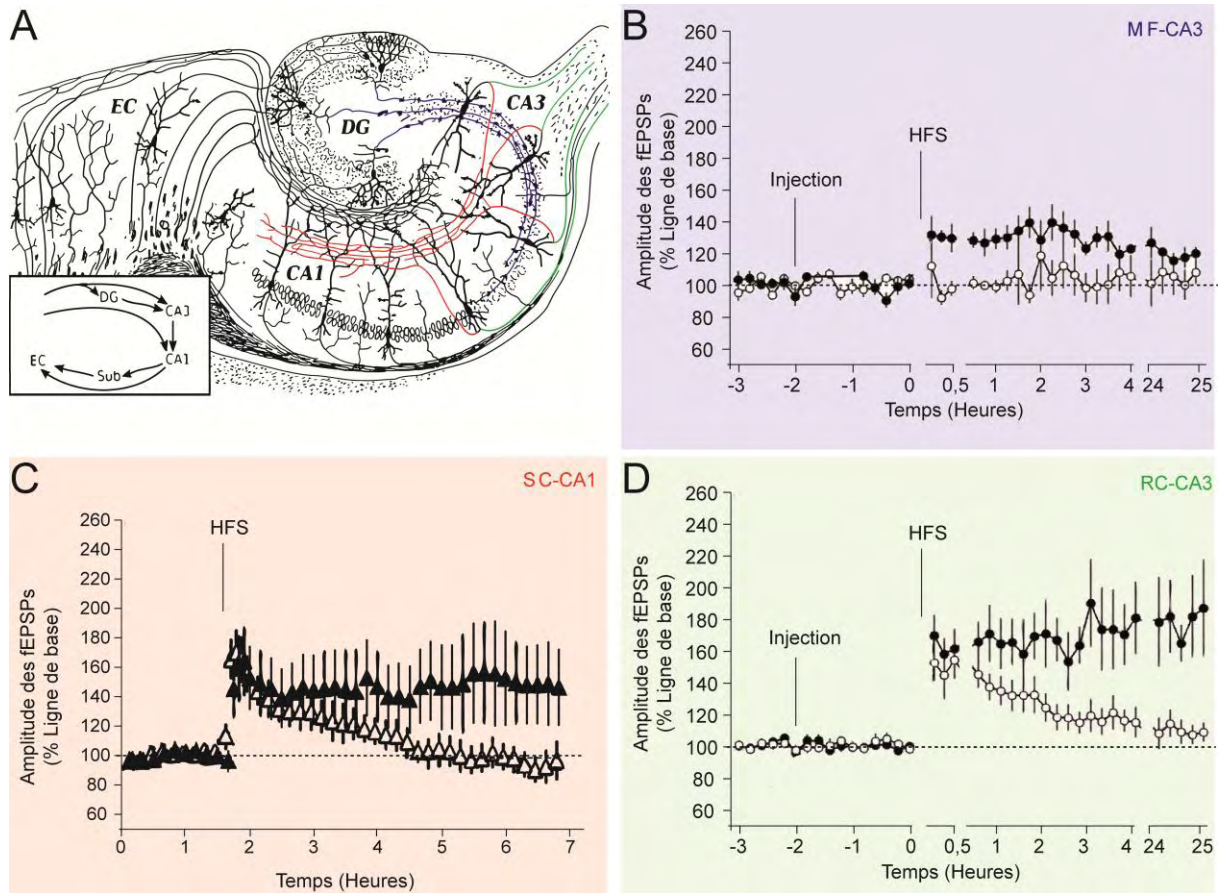


Figure 7 : La voie MF-CA3 diffère du modèle classique en termes de nécessité de synthèse protéique. A : Schéma de la formation hippocampique et des projections du cortex entorhinal (d'après Ramon y Cajal, 1911). Les axones de cellules pyramidales du cortex entorhinal (EC) projettent sur les dendrites du gyrus denté (DG). Les cellules granulaires du gyrus denté envoient leurs efférences (Fibres Moussues, en bleu) vers les cellules pyramidales de l'aire CA3. Les axones de ces neurones se divisent en fibres projetant sur la région CA1 (Collatérales de Schaffer, en rouge) et en fibres auto-associatives qui projettent sur CA3 (Collatérales Récurrentes, en vert). Enfin les neurones pyramidaux de l'aire CA1 envoient leurs efférences vers le cortex entorhinal en passant par le subiculum (Sub). **B**, **C** et **D** : Enregistrements électrophysiologiques de fEPSPs au cours du temps respectivement au niveau de la synapse des fibres moussues sur CA3, des collatérales de Schaffer sur CA1, et des collatérales récurrentes sur CA3 (Adaptés de Shires *et al.*, 2012 et Hagena et Manahan-Vaughan, 2013). La LTP est induite par des HFS, en présence (motifs blancs) ou non (motifs noirs) d'anisomycine. La LTP des fibres moussues sur CA3 dépend de la synthèse protéique dès son induction. Celles des collatérales de Schaffer sur CA1 et des collatérales récurrentes sur CA3 dépendent de la synthèse protéique de manière tardive

Les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe sont toutes les deux nécessaires pour former une mémoire contextuelle et pour associer ce contexte à un stimulus aversif. En effet, il a été montré dans notre équipe que des injections de lidocaïne dans CA1 ou CA3 bloquent à la fois l'acquisition et la consolidation d'un conditionnement de peur au contexte (Damas et al., 2005). De plus, la suppression des récepteurs NMDA par des outils génétiques spécifiquement dans CA1 (Rampon et al., 2000) ou dans CA3 (McHugh et Tonegawa, 2009) empêche la formation de la mémoire du conditionnement de peur au contexte. Lors d'un apprentissage épisodique, le gyrus denté reçoit des informations multisensorielles du cortex entorhinal. Puis la région CA3 semble fonctionner comme un circuit auto-associatif (grâce aux collatérales récurrentes) permettant d'associer rapidement ces stimuli entre eux, alors que la région CA1 permettrait l'orientation spatiale et temporelle et le transfert des informations vers le subiculum (Rolls, 2010).

Par ailleurs, il a été montré que des injections d'inhibiteurs de synthèse protéique dans l'hippocampe dorsal entraînent des déficits de mémoire à long mais pas à court terme du conditionnement de peur au contexte (Igaz *et al.*, 2002, Motanis et Maroun, 2012). Cependant, en observant précisément la localisation des sites d'injection, nous pouvons constater qu'ils ciblent en réalité majoritairement CA1, probablement en raison d'une meilleure accessibilité. Dans le cadre d'un apprentissage spatial en piscine de Morris, il a été montré que l'anisomycine injectée dans CA3 immédiatement après une réactivation ne perturbe pas la mémoire testée 1h après cette réactivation mais perturbe la mémoire 24h après (Artinian *et al.*, 2007), ce qui semble différent des résultats que nous attendons au vu de l'implication de la synthèse protéique dans la formation de la LTP des fibres moussues. Cependant, l'apprentissage en piscine de Morris est un apprentissage long. Tester les performances des animaux 1h après la fin de l'apprentissage revient donc à tester la mémoire plusieurs heures (ou jours) après le début de l'apprentissage. Si, comme nous en faisons l'hypothèse, la LTP au niveau de fibres moussues nécessitant la synthèse de nouvelles protéines intervient lors des minutes qui suivent la première session d'apprentissage, alors l'injection après la fin de la dernière la session d'apprentissage a lieu trop tard pour empêcher l'encodage du contexte dans cette région. De plus, il est envisageable que la région CA3 fonctionne différemment lors d'un apprentissage en piscine de Morris et lors d'un CFC (où l'on parle de « flashbulb memory », cf. Introduction) et que la LTP au niveau des fibres moussues soit particulièrement requise pour l'apprentissage de type « flashbulb memory ». De plus, ces résultats ont été obtenus sur un phénomène de reconsolidation qui peut être différent de la consolidation. A ma connaissance, l'effet d'une injection d'anisomycine dans CA3 juste après l'apprentissage en piscine de Morris sur la mémoire à court terme n'a jamais été testé.

L'effet d'une injection d'un inhibiteur de la synthèse protéique dans CA3 sur un apprentissage en un essai tel que le conditionnement de peur au contexte est encore inconnu. Partant du postulat selon lequel la LTP serait le support de la mémoire, nous avons fait l'hypothèse que le blocage de l'initiation de la LTP des fibres moussues entraînerait un déficit de mémoire à court terme. Nos expériences de pharmacologie locale dans CA3 présentées ci-dessous corroborent cette hypothèse.

Matériels et méthodes

Animaux

Tous les animaux utilisés lors des expériences ont été élevés au CRCA. Il s'agit de souris mâles de la lignée C57BL/6J provenant à l'origine du Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) et étant distribuées en France par Charles River Laboratories International. Les animaux sont âgés de 3 à 5 mois au début des manipulations. Ils ont été placés en stabulation au laboratoire par groupe de 3 à 6 individus par cage, avec de la nourriture et de l'eau disponibles ad libitum, dans une pièce comprenant un cycle jour/nuit de 12h/12h (jour de 8h à 20h) et thermostatée à $21\pm 1^{\circ}\text{C}$. Toutes les expériences ont été réalisées pendant la période de jour.

Chirurgie

La souris est anesthésiée avec un mélange d'hydrate de chloral (Prolabo, 400mg/kg) et de xylozine (Rompun, 15mg/kg). Cet anesthésique a été choisi car il permet de garantir un bon niveau d'anesthésie pendant toute la durée de la chirurgie et qu'utilisé à une faible concentration (40mg/mL) il n'induit pas d'effet indésirable notable sur le système digestif (Vachon *et al.*, 2000) et réduit autant que possible les risques de mortalité postopératoire.

L'animal est ensuite placé sur un appareil de stéréotaxie (La Précision Cinématographique). La peau du crâne est incisée et la surface du crâne est nettoyée. Une pointe permet de prendre précisément les coordonnées tridimensionnelles du Bregma et du Lambda et de marquer l'emplacement des canules (7mm, 24G) à la surface du crâne. Afin de s'assurer de l'horizontalité du crâne, la différence de hauteur entre le Bregma et le Lambda ne doit pas excéder 0,2mm et ils doivent être alignés dans l'axe rostro-caudal. Les coordonnées d'implantation sont 1,8mm postérieur au Bregma, 1,5mm en profondeur (le 0 étant la surface du crâne), 1,5mm en latéral pour les canules permettant l'injection dans CA1, et 2,5mm en latéral pour celles permettant l'injection dans CA3. La profondeur choisie permet le placement des canules juste au dessus du corps calleux, évitant ainsi de léser l'hippocampe. Il suffit par la suite d'ajuster la longueur des injecteurs (plus fins) pour atteindre en profondeur CA1 ou CA3. Ces coordonnées sont choisies en accord avec l'Atlas de Franklin et Paxinos (2001). Une fois les points de repères marqués, le crâne est trépané

puis les canules descendues jusqu'à leur position finale. Du ciment dentaire (polycarboxylate, Sigma) est ensuite appliqué autour des canules pour les fixer au crâne. Enfin elles sont bouchées à l'aide de mandrins en acier inoxydable (A-M Systems) afin d'éviter toute occlusion des canules avant les injections. Les mandrins sont également fixés au crâne avec une seconde couche de ciment dentaire. A la fin de la chirurgie, les animaux sont isolés dans une cage de réveil similaire aux cages d'hébergement habituelles, afin de pouvoir passer la nuit dans de bonnes conditions. Le lendemain matin, les souris sont remplacées avec leurs congénères. Nous les laissons alors récupérer de la chirurgie pendant une semaine au minimum avant de les manipuler.

Dispositif comportemental

Le dispositif du conditionnement de peur au contexte consiste en une boîte cubique de 27cm de côté (Figure 8A). La paroi avant est en plexiglas transparent afin de pouvoir filmer et observer la souris pendant la procédure. Cette paroi peut être ouverte, et permet de placer la souris dans le dispositif. Les parois de chaque côté comprennent des indices visuels proximaux sous la forme de bandes blanches et noires. La paroi du fond est en plexiglas noir opaque. Un haut parleur est fixé au plafond, permettant l'émission d'indices sonores. Le sol de la boîte est constitué de 22 barreaux métalliques ($\varnothing=4\text{mm}$) espacés d'un centimètre, pouvant être électrifiés afin de délivrer un choc au niveau des pattes de l'animal. Des rideaux blancs entourent le dispositif. Ils permettent de l'isoler du reste de la pièce et de mieux contrôler les indices présents dans la périphérie à environ 1m de la souris. Sur ces rideaux sont placés deux panneaux comprenant des indices visuels distaux clairement identifiables par l'animal. Il s'agit d'un carré noir sur fond blanc à gauche et de rayures noires et blanches verticales à droite. L'ensemble du dispositif est éclairé par une source de lumière blanche. La cage est systématiquement nettoyée avec de l'éthanol à 70% avant d'y placer un animal, laissant une odeur susceptible d'être intégrée au contexte par la souris. Ce dispositif est utilisé pour l'apprentissage ainsi que pour le rappel contextuel. Dans le cas du test de généralisation (ou contexte modifié) et du test au son, l'animal est placé dans un nouvel environnement (Figure 8B). Il s'agit d'une boîte en plexiglas triangulaire dont les parois avant et du dessus sont transparentes. Un haut-parleur est fixé au plafond afin de pouvoir émettre des indices sonores. L'animal est inséré par le haut de la boîte. Les autres parois (y compris le sol) sont blanches et opaques. Les rideaux et indices distaux du contexte d'apprentissage sont retirés, la souris a donc une visibilité sur toute la pièce. Une lumière rouge éclaire le dispositif et la cage est nettoyée avec de l'acide acétique (1%) avant chaque procédure.

Procédures comportementales

Environ une semaine après la chirurgie, les cages des souris sont placées dans un caisson d'isolement avant d'effectuer la procédure de conditionnement (Figure 9). Un par un, les animaux sont sortis de ce caisson et sont placés dans le dispositif du conditionnement de peur au contexte (système Panlab s.l. Startfear 1.06). L'animal explore librement ce contexte pendant 2min puis un son (bruit blanc, 85dB) est émis pendant 30s. Ce son se cotermine avec l'application d'un choc électrique (0,7mA, 2s) délivré via les grilles du sol du dispositif. Cette séquence de 2min30 est répétée puis l'animal peut encore explorer la cage pendant 30s avant d'être replacé avec ses congénères (lorsque l'effet de l'injection sur le rappel est testé dans l'expérience 3) ou de subir une injection de NaCl ou d'anisomycine (pour toutes les autres expériences).

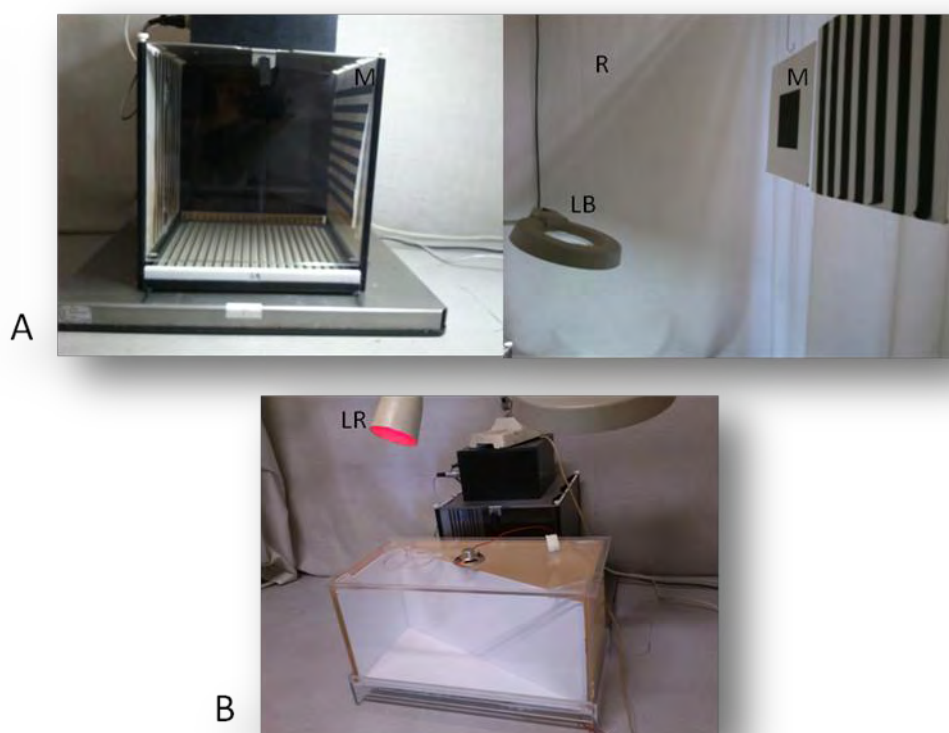


Figure 8 : Dispositif de conditionnement de peur au contexte. **A :** A gauche, cage de conditionnement et de test au contexte. A droite, indices distaux. **B :** Dispositif de test au contexte modifié et au son. M : Motifs, R : Rideau, LB : Lumière Blanche, LR : Lumière Rouge.

Trente minutes, 1h ou 24h après l'apprentissage, la souris est replacée dans la cage d'apprentissage sans son ni choc électrique pendant 4min (test au contexte) afin de mesurer le temps passé en comportement de « freezing », défini comme une immobilité totale exceptée pour les mouvements respiratoires et les battements cardiaques (Blanchard et Blanchard, 1969). Ce comportement reflète la peur de l'animal et, par extension, nous donne un indice du niveau de mémorisation de l'animal.

Environ 2h après le test au contexte, la souris subit le test au contexte modifié. Elle est placée pendant 4min dans ce dispositif. Le temps passé en « freezing » dans le nouveau contexte est mesuré pendant 2min sans le son pour évaluer la généralisation de la peur. Pendant les deux minutes suivantes, le son est présenté, ce qui permet de s'assurer que les animaux ont bien appris l'association indiquée (du son au choc électrique). En effet, cet apprentissage est amygdalo-dépendant et ne devrait pas être perturbé par des injections intra-hippocampiques (Phillips et Ledoux, 1992, Daumas *et al.*, 2004, 2005, 2009, Ceccom *et al.*, 2014).

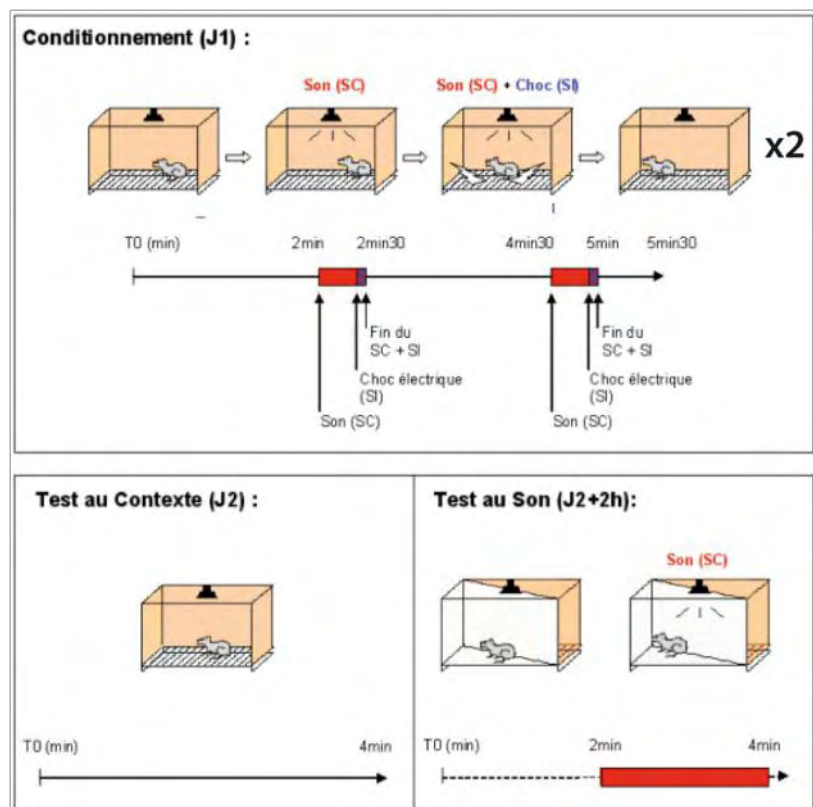


Figure 9 : Protocole expérimental utilisé lors du conditionnement de peur au contexte. SC : Stimulus Conditionnel ; SI : Stimulus Inconditionnel. (Source : mémoire de thèse de Stéphanie Daumas, 2004)

Procédure d'injection

La solution d'anisomycine est préparée en diluant 5mg de poudre dans 6 μ L de HCl (3M), en ajoutant 43,8 μ L de NaCl (pour atteindre la concentration voulue de 100g/L) et 0,2 μ L de NaOH (afin d'obtenir un pH à 7,4). Il a été montré qu'à cette dose, l'anisomycine inhibe plus de 90% de la synthèse protéique pendant les 2 premières heures (Flood *et al.*, 1973; Morris *et al.*, 2006).

Un injecteur (diamètre de 0,25mm, longueur de 7,4mm pour les injections dans CA1 et 7,8mm pour CA3) est relié par un tube flexible en polyéthylène à une seringue Hamilton de 1 μ L. Deux seringues sont ainsi positionnées sur une pompe à micro-injections (Harvard Apparatus). Les mandrins sont sectionnés à l'aide d'une pince coupante pour pouvoir les retirer en laissant le ciment intact. Les injecteurs sont alors placés dans les canules. De chaque côté du cerveau, 0,25 μ L de solution d'anisomycine ou de NaCl (0,9%) sont injectés à la vitesse de 0,1 μ L par minute. Pendant l'injection, la souris est libre de ses mouvements. A la fin de l'injection, on laisse les injecteurs en position pendant encore au moins 1min afin d'éviter tout reflux de la solution et de permettre une meilleure diffusion.

Traitement des données

Le freezing est mesuré en temps réel par un expérimentateur, grâce à une caméra reliée à une télévision située dans la pièce adjacente à celle de comportement. La vidéo est enregistrée pour permettre une autre mesure par un second expérimentateur, en aveugle. La durée du test est divisée en périodes de 5 secondes pour lesquelles la présence ou l'absence de freezing est évaluée.

Pour chaque test comportemental, nous obtenons donc un certain nombre de périodes de freezing sur 48 (test au contexte) ou sur 24 (test au contexte modifié et test au son). Ces données sont converties en pourcentages pour les représentations graphiques.

Réaliser une ANOVA à deux facteurs nécessite que les données soient normales. Or, des pourcentages (ou proportions) suivent par définition une loi binomiale (qui peut être proche de la loi normale mais s'en écarte lorsque les données sont voisines des bornes 0 et 100%). Afin d'être au plus proche de la normalité, nous avons utilisé une transformation classiquement utilisée dans ce cas de figure (Zar, 1999) : les données sont transformées en arcsinus de la racine du pourcentage. Une ANOVA et les tests post hoc appropriés sont ensuite réalisés sur ces données transformées, à l'aide du logiciel Prism (Graphpad).

Contrôle histologique

Afin de s'assurer du bon positionnement des zones d'injection, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale à la fin des tests. Leurs cerveaux sont ensuite récupérés, placés dans un mélange de glutaraldéhyde et de sucrose (10%) pendant toute une nuit à 4°C pour la fixation des tissus, puis transférés dans du sucrose seul (30%) afin de terminer la déshydratation. Après au moins 24h, les cerveaux sont placés sur la plateforme d'un microtome et fixés à l'aide de carboglace avant d'être coupés en tranches de 60µm d'épaisseur. Les coupes sont placées sur des lames gélatinées (1%), colorées à la thionine et déshydratées avec des bains d'éthanol de concentration croissante. Cette coloration marque en violet le cytoplasme des cellules. Cela permet une définition précise des régions hippocampique en faisant apparaître en violet foncé les corps cellulaires et en plus clair les prolongements (axones et dendrites). Pour que la souris soit incluse dans l'étude, la zone d'injection doit être placée dans la région d'intérêt de manière bilatérale.

Résultats

Expérience 1 : La synthèse protéique est nécessaire dans CA1 pour former la mémoire à long terme d'un contexte.

La vérification histologique (Figure 10A et B) révèle que l'injection bilatérale dans CA1 était correcte pour 33 souris, dont les résultats comportementaux ont été intégrés à l'étude. 57 souris présentaient un positionnement inadéquat d'au moins une des deux canules et ont été exclues de l'étude.

Les résultats montrent que l'injection d'anisomycine dans CA1 n'a pas le même effet sur la mémoire à court et à long terme (interaction : $F_{(1,29)}=8,3$, $P<0,008$; effet du traitement : $F_{(1,29)}=13,1$, $P<0,002$; moment du test : $F_{(1,29)}=8,1$, $P<0,009$) (Figure 10C). Les tests post-hoc de Bonferroni montrent que l'injection d'anisomycine dans CA1 bloque la mémoire contextuelle à long terme ($P<0,001$ pour l'anisomycine vs NaCl 24h après l'apprentissage), mais pas la mémoire à court terme ($P>0,05$ pour l'anisomycine vs NaCl 1h après l'apprentissage). L'anisomycine n'a pas d'effet sur le niveau de freezing mesuré dans un nouveau contexte (traitement : $F_{(1,29)}=0,27$, $P=0,61$; moment du test : $F_{(1,29)}=0,79$, $P=0,38$; interaction : $F_{(1,29)}<0,001$, $P=0,98$) (Figure 10D). Il n'y a pas non plus d'effet sur le freezing déclenché par la présentation du son associé au choc électrique (traitement : $F_{(1,29)}=0,61$, $P=0,44$; moment du test : $F_{(1,29)}=0,39$, $P=0,54$; interaction : $F_{(1,29)}=0,98$, $P=0,33$) (Figure 10E), ce qui confirme un effet spécifique sur la mémoire contextuelle. Nous avons donc obtenu un blocage de la mémoire à long terme mais pas à court terme lors d'injections d'anisomycine dans la région CA1 hippocampique.

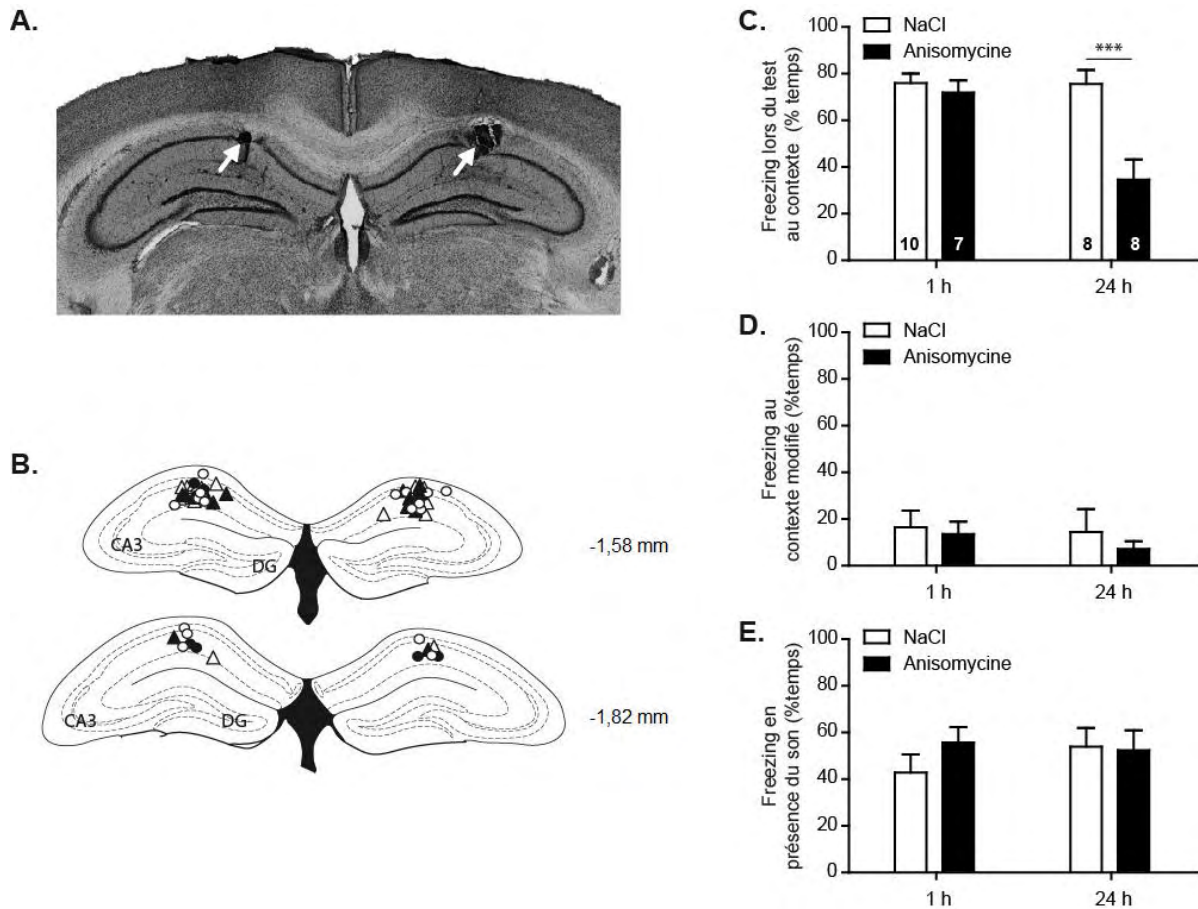


Figure 10 : Les injections d'anisomycine dans la région CA1 hippocampique bloquent la mémoire à long terme mais pas la mémoire à court terme de la peur conditionnée au contexte. **A** : Photographie d'un exemple de contrôle histologique où l'on observe les sites d'injection (flèches blanches) dans CA1. **B** : Schéma des sites d'injection dans CA1 pour les animaux testés à long terme (cercles) ou à court terme (triangles). Les formes vides correspondent aux injections de NaCl alors que les formes pleines représentent les animaux injectés avec de l'anisomycine. **C** : Le temps passé en état de freezing lors du test de rappel du contexte soit 1h soit 24h après l'apprentissage montre que l'anisomycine a bloqué la mémoire à long mais pas à court terme. **D** : Les réponses de freezing à l'exposition à un contexte nouveau sont très faibles pour tous les groupes. **E** : Dans ce nouveau contexte, la présentation du son associé au choc électrique entraîne une forte réponse de freezing pour tous les groupes ; l'anisomycine n'a pas d'effet sur cette association. Les nombres inscrits dans les colonnes indiquent les effectifs pour chaque groupe. *** signifie que $p < 0,001$ pour le test post-hoc de Bonferroni entre les groupes anisomycine et NaCl.

Expérience 2 : La synthèse protéique est nécessaire dans CA3 pour former la mémoire à court et à long terme du contexte.

Après la vérification histologique, 68 animaux ont reçu une injection correcte dans la région CA3 de l'hippocampe, de manière bilatérale (Figure 11A et B). 34 animaux ont présenté une localisation incorrecte d'au moins un site d'injection et ont donc été écartés de l'étude.

L'anisomycine injectée dans CA3 a très clairement bloqué la formation de la mémoire à long terme, testée 24h après l'apprentissage, mais également la formation de la mémoire à court terme, testée 1h après l'apprentissage (traitement : $F(1,35)=89,3$, $P<0,0001$; moment du test : $F(1,35)=0,0003$, $P=0,99$; interaction : $F(1,35)=5,42$, $P=0,026$) (Figure 11C). Les tests post-hoc de Bonferroni ont mis en évidence un net effet de l'anisomycine dans CA3 pour chacun des deux délais (dans les deux cas, le test NaCl vs Anisomycine donne $P<0,001$). Il n'y a pas d'effet de l'injection sur le freezing mesuré dans un nouveau contexte (traitement : $F(1,35)=1,35$, $P=0,25$; moment du test : $F(1,35)=1,08$, $P=0,31$; interaction : $F(1,35)=0,15$, $P=0,70$) (Figure 11D). Il n'y a pas d'effet non plus lors de la présentation du son (traitement : $F(1,35)=0,65$, $P=0,42$; moment du test : $F(1,35)=12,33$, $P=0,001$; interaction : $F(1,35)=0,35$, $P=0,56$) (Figure 11E), ce qui valide la spécificité de l'effet sur la mémoire contextuelle.

Afin de s'assurer du fait que l'anisomycine injectée dans CA3 bloque effectivement la mémoire à court terme, nous avons testé les souris au plus court délai techniquement possible. Nous avons donc mené une expérience similaire à la précédente en testant cette fois-ci les animaux dans le contexte dès 30min après l'apprentissage. Après examen des coupes histologiques, 15 animaux ont été inclus dans cette étude. Les souris traitées dans CA3 avec de l'anisomycine injectée aussitôt après l'apprentissage présentent un niveau de freezing plus faible que les souris contrôles (t-test, $P<0,002$) (Figure 11C). Lors de l'exposition au nouveau contexte 2h plus tard, nous n'avons pas observé de différence de mémorisation entre nos deux groupes (t-test, $P=0,21$) (Figure 11D), ni pour le son associé au renforcement négatif (t-test, $P=0,15$) (Figure 11E). Ces résultats confirment donc un effet de l'anisomycine dans CA3 sur la mémoire contextuelle à court terme.

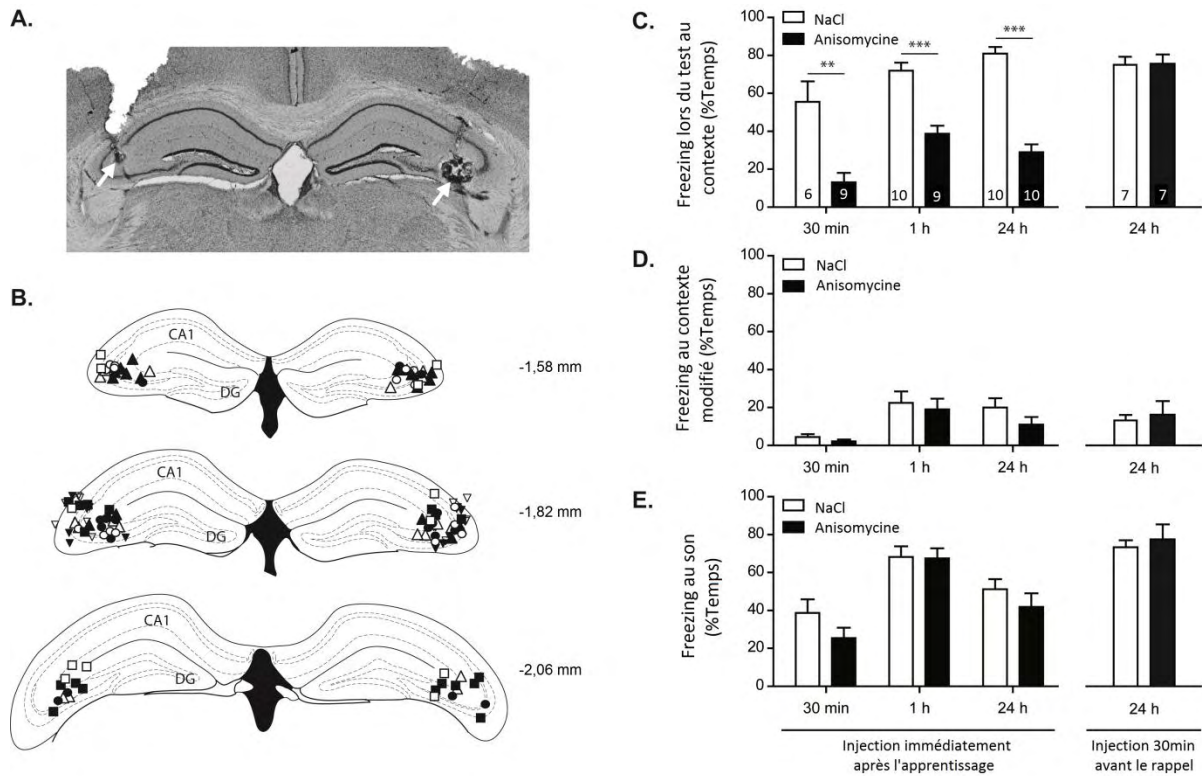


Figure 11 : Les injections d'anisomycine dans la région CA3 hippocampique bloquent la mémoire à long terme ainsi que la mémoire à court terme mais sans affecter le rappel. A : Photographie d'un exemple de contrôle histologique où l'on observe les sites d'injection (flèches blanches) dans CA3. **B :** Schéma des sites d'injection dans CA3 pour les animaux testés à long terme (triangles vers le haut pour les injections post-apprentissage, triangles vers le bas pour les injections avant le rappel), à court terme (cercles pour le test 1h post-apprentissage, carrés pour 30min). Les formes vides correspondent aux injections de NaCl alors que les formes pleines représentent les animaux injectés avec de l'anisomycine. **C :** Le temps passé en état de freezing lors du test de rappel du contexte 30min, 1h ou 24h après l'apprentissage est mesuré. L'anisomycine a bloqué la mémoire à long et à court terme, sans avoir d'effet sur le rappel en lui-même (lorsque l'injection est faite 30min avant le test de rappel 24h post-apprentissage). **D :** Les réponses de freezing à l'exposition à un nouveau contexte sont très faibles pour tous les groupes. **E :** Dans ce nouveau contexte, la présentation du son associé au choc électrique entraîne une forte réponse de freezing pour tous les groupes ; l'anisomycine n'a pas d'effet sur cette association. La taille des effectifs correspond aux nombres écrits dans les colonnes du premier graphique. *** signifie que $p < 0,001$ et ** signifie que $p < 0,002$ pour le test post-hoc de Bonferroni entre les groupe anisomycine et NaCl.

Pour éliminer l'éventualité d'un effet de l'anisomycine sur le rappel lorsque la mémoire est testée 30min ou 1h après l'apprentissage (et donc environ 30min et 1h après l'injection de la drogue), nous avons inclus un autre groupe de souris dans l'étude. Quatorze animaux ont été inclus après contrôle des coupes histologiques (Figure 11A). Ces souris ont reçu une injection d'anisomycine dans CA3 30min avant un rappel effectué 24h après l'apprentissage. Dans ces conditions, l'anisomycine n'a pas eu d'effet sur le taux de freezing des animaux ($P=0,93$ pour le contexte appris, $P=0,71$ pour le nouveau contexte, $P=0,64$ pour le son) (Figure 11C, D et E). Ainsi, l'injection d'anisomycine dans CA3 n'a pas d'influence sur le rappel.

Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que des injections locales d'anisomycine dans les régions CA3 et CA1 hippocampiques n'affectent pas le conditionnement de peur au contexte de la même manière. L'anisomycine dans CA1 empêche la formation de la mémoire à long terme uniquement alors que dans CA3 elle bloque à la fois la mémoire à court et à long terme. A notre connaissance, il s'agit de la première démonstration du rôle de la synthèse protéique dans l'hippocampe sur la mémorisation à court terme. Cette observation est cohérente avec l'idée selon laquelle la phase précoce de la LTP des fibres moussues, qui aurait lieu lors d'un conditionnement de peur au contexte, nécessite une synthèse protéique.

Les souris contrôles ont présenté un taux de freezing élevé lors de l'exposition au contexte d'apprentissage, ce qui n'était pas le cas lors de l'exposition au contexte nouveau. Ainsi, les niveaux de freezing obtenus reflètent bien une mémoire spécifique du contexte associé aux chocs électriques.

Des résultats similaires ont été rapportés lors d'expériences de modulation de la fonction hippocampique par diverses drogues. Par exemple, au laboratoire, il a été montré qu'une injection d'un agoniste des récepteurs métabotropiques au glutamate, le DCG-IV, dans le gyrus denté ou la région CA3 de l'hippocampe (mais pas CA1), juste après un conditionnement de peur au contexte perturbe le test de rappel contextuel effectué 24h après l'apprentissage, sans empêcher la formation de la mémoire du son ni de son association aux chocs électriques (Daumas *et al.*, 2009). Cela témoigne de l'implication des

voies perforantes provenant du cortex entorhinal vers le DG et CA3 dans la construction d'une représentation unifiée d'une mémoire contextuelle. Il a également été montré que l'injection d'anisomycine dans CA1 a un effet sur la mémoire plus important lorsqu'elle est effectuée après le conditionnement plutôt que juste avant, ce qui n'est pas le cas d'une injection dans CA3 (Daumas *et al.*, 2005). Ce résultat suggère que l'activité hippocampique, et plus précisément dans la région CA1, joue un rôle important dans les mécanismes de consolidation d'une mémoire contextuelle. L'ensemble de ces résultats, obtenus au sein de notre équipe au cours des dix dernières années, montre que l'activité de l'hippocampe est impliquée dans la mémorisation d'un contexte. Les afférences multisensorielles en provenance du cortex entorhinal seraient dans un premier temps traitées par le DG et CA3 pour ensuite être consolidées grâce à l'activité de la région CA1.

En revanche, l'anisomycine injectée dans l'hippocampe ne semble pas agir sur la mémoire de l'association du son aux chocs. Or, dans cet apprentissage l'association du son aux stimuli aversifs dépendrait du fonctionnement de l'amygdale (Selden *et al.*, 1991, Kim et Fanselow, 1992, Phillips et LeDoux, 1992, Daumas, Halley et Lassalle, 2004). Cette expérience contrôlée confirme donc que l'injection locale d'anisomycine dans l'hippocampe bloque de manière spécifique la mémorisation contextuelle sans toucher les autres systèmes de mémoire ni les aptitudes cognitives ou motrices.

Les injections d'anisomycine dans CA1 perturbent la formation de la mémoire à long terme sans affecter la mémoire à court terme. Ce résultat est en accord avec la littérature utilisant des injections locales d'anisomycine dans l'hippocampe. Ces études visent en fait principalement la région CA1 (Igaz *et al.*, 2002, Motanis et Maroun, 2012). L'interprétation classique de ces résultats est que la mémoire à court terme repose sur la LTP précoce indépendante de la synthèse protéique alors que la mémoire à long terme dépend de la LTP tardive qui nécessite la synthèse de nouvelles protéines (Kandel, 2001).

Nous avons montré que l'injection d'anisomycine dans CA3 perturbe à la fois la mémoire à long terme et la mémoire à court terme, sans affecter le rappel. Trois types d'afférences arrivent aux cellules pyramidales de CA3 : les collatérales récurrentes qui connectent les cellules de CA3 entre elles, les fibres temporo-amoniques provenant du cortex entorhinal, et les fibres moussues émises par le gyrus denté. Parmi ces différentes voies, les fibres moussues sont particulièrement intéressantes au vu de nos résultats. Tout d'abord, il est admis que les synapses des fibres moussues sur CA3 jouent un rôle crucial dans la mémorisation spatiale et contextuelle. En effet, en utilisant des injections locales de chélateurs de cations bivalents tels que le CaEDTA (Calcium - Acide éthylène diamine tétra-acétique) ou le DEDTC (Diéthylthiocarbamate), il a été montré que la région CA3 de

l'hippocampe joue un rôle important, via un mécanisme dépendant du zinc, dans l'acquisition et les phases précoces de la consolidation d'un conditionnement de peur au contexte (Daumas, Halley, Lassalle, 2004) et d'un apprentissage spatial massé en piscine de Morris (Florian et Rouillet, 2004). Il a également été montré que l'inhibition de la synthèse protéique dans CA3 par une injection locale d'anisomycine bloque la consolidation d'un apprentissage spatial massé en piscine de Morris (Artinian *et al.*, 2007). Cependant, des souris KO pour le récepteur de type 1 de PACAP (Polypeptide Pituitaire Activateur de l'Adénylate Cyclase) présentent un déficit de LTP des fibres moussues sur CA3 ainsi que des troubles mnésiques pour le conditionnement de peur au contexte sans perturbation de la mémoire d'un apprentissage spatial distribué en piscine de Morris ni d'un apprentissage social de préférence de nourriture (Otto *et al.*, 2001). De même, un apprentissage distribué en piscine de Morris n'est pas affecté par la chélation du zinc dans CA3 (Ceccom *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent l'existence de deux modes de fonctionnement de la région CA3. Un apprentissage rapide, tel que le conditionnement de peur au contexte, de type « flashbulb », nécessite la libération de zinc au niveau de la terminaison des fibres moussues, ce qui n'est pas le cas des apprentissages longs. Par ailleurs, une étude mêlant électrophysiologie réalisée sur des tranches de cerveau et imagerie en fluorescence de la dynamique de libération du zinc a montré que la co-libération de ce cation au niveau de la synapse est nécessaire pour l'initiation de la LTP des fibres moussues sur CA3 (Li *et al.*, 2001). Il a également été montré que l'inhibition de la synthèse protéique bloque la phase précoce de la LTP des fibres moussues alors qu'elle ne bloque que la phase tardive de la LTP des collatérales récurrentes (Barea-Rodriguez *et al.*, 2000, Calixto *et al.*, 2003, Hagen et Manahan-Vaughan, 2013). Ainsi, l'explication qui nous semble la plus adaptée concernant l'effet de l'anisomycine sur la mémoire à court terme du conditionnement de peur au contexte est que cette drogue empêche la mise en place de la LTP des fibres moussues dès ses premiers stades.

Il est communément admis que les protéines nécessaires à la LTP ou à la mémoire sont synthétisées dans le corps cellulaire du neurone avant d'être adressées à la synapse. La LTP des fibres moussues de CA3 nécessite la synthèse de protéines au niveau présynaptique (Calixto *et al.*, 2003). Or, le transport axonal antérograde (du corps cellulaire vers l'extrémité de l'axone) des protéines cytosoliques est d'environ 0,1 à 4mm par jour soit au maximum 170µm/h (Perrot et Julien, 2009). Un processus de synthèse protéique dans le corps cellulaire puis de transport des protéines jusqu'aux synapses paraît donc trop lent pour pouvoir soutenir la mise en place de la mémoire à court terme. Cependant, dans la littérature il existe des travaux témoignant de la possibilité d'une traduction d'ARNm pré-existants, dépendante de l'activité neuronale, ayant lieu de manière très locale dans les dendrites (Job

et Eberwine, 2001, Steward et Schuman, 2001). Cinq à 30min seraient alors suffisantes pour fabriquer de nouvelles protéines (Ouyang *et al.*, 1999, Tsokas *et al.*, 2005). Ce déroulement temporel très rapide semble cohérent avec le blocage de la mémoire à court terme que nous avons obtenu en inhibant la transcription dans CA3. Des auteurs ont cependant réalisé des injections sous-cutanées d'anisomycine juste après un conditionnement de peur au contexte sans observer de déficit mnésique à court terme (Bourtchouladze *et al.*, 1998). Il est possible que la synthèse protéique axonale soit déjà commencée au moment où l'anisomycine injectée en systémique atteint la région hippocampique et soit suffisante pour former une mémoire à court terme. Il est intéressant de noter que les synapses des fibres mossues sur CA3 contiennent un très grand nombre de polyribosomes, permettant ainsi la synthèse locale de protéines très rapidement nécessaires au maintien de la LTP (Chicurel *et al.*, 1993).

Bien que la plupart des conclusions basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique aient été, par la suite, confirmées par des approches moléculaires et génétiques (Hernandez et Abel, 2008), des effets secondaires de l'anisomycine ont été rapportés à plusieurs reprises. Notamment, l'anisomycine peut déréguler la libération des monoamines (Canal et Gold, 2007) ou inhiber l'activité des neurones (Namgung *et al.*, 1995, Sharma *et al.*, 2012). En revanche, dans certains cas, des études ont montré que l'anisomycine permet de bloquer de manière spécifique la synthèse protéique, sans affecter la transmission neuronale basale (Frey et Morris, 1998, Barea-Rodriguez *et al.*, 2000, Karpova *et al.*, 2006, Hagen et Manahan-Vaughan, 2013). Ces contradictions dans la littérature peuvent s'expliquer par les différentes doses utilisées. Sharma *et al.* (2012) ont observé une forte inhibition de l'activité neuronale et de la transmission synaptique en utilisant 50µg (ou plus) d'anisomycine par hémisphère, alors que Barea-Rodriguez *et al.* (2000) ont constaté un blocage total de la plasticité synaptique sans affecter la transmission basale en utilisant une dose plus faible d'anisomycine (12µg par côté). Afin de clarifier ce point, Shires *et al.* (2012) ont testé récemment l'effet de différentes doses d'anisomycine sur la transmission synaptique et sur la plasticité. Ils ont observé que des faibles doses (12 ou 25µg/côté) suffisent à empêcher la potentialisation à long terme, sans perturbation de l'activité neuronale basale. Au contraire, à des doses plus importantes (62 à 500µg/côté), l'activité neuronale en elle-même est inhibée. Il apparaît donc qu'utilisée à une dose convenable, l'anisomycine peut bloquer de manière spécifique la synthèse protéique. En tenant compte de ces données, nous ne pouvons pas écarter, dans nos expériences, un effet non spécifique de l'anisomycine. Cependant, les études électrophysiologiques utilisant des doses similaires aux nôtres (25µg/côté) ont montré que l'anisomycine ne bloque pas l'activité neuronale en elle-même (Barea-Rodriguez *et al.*, 2000, Shires *et al.*, 2012, Hagen

et Manahan-Vaughan, 2013). De plus, ces auteurs ont observé un effet différent sur la LTP en fonction de la région ciblée, la LTP de CA1 n'étant bloquée que tardivement alors que celle de CA3 est affectée dès son initiation. Ayant retrouvé cette dichotomie au niveau comportemental, il nous paraît raisonnable de penser que c'est effectivement l'inhibition de la synthèse protéique par l'injection d'anisomycine qui est responsable des effets sur la mémoire observés dans nos expériences.

Au vu des résultats comportementaux présentés dans cette étude, et étant donné les données de la littérature concernant la plasticité synaptique hippocampique (Barea-Rodriguez *et al.*, 2000, Otto *et al.*, 2001, Calixto *et al.*, 2003), nous proposons que la synthèse protéique dans CA3 est nécessaire à l'élaboration rapide d'une représentation unifiée d'un contexte, car elle est impliquée dans l'initiation de la LTP au niveau des fibres moussues. Ainsi, si la construction de cette représentation par CA3 est impossible, elle ne peut pas transiter vers CA1 et la mémoire est bloquée dès ses tous premiers stades. Ce travail conforte ainsi des travaux précédents de l'équipe suggérant un rôle crucial de la LTP au niveau des fibres moussues dans l'élaboration rapide d'une représentation contextuelle unifiée (Daumas *et al.*, 2004, 2005, 2009, Ceccom *et al.*, 2014). A notre connaissance, il paraît probable que cette synthèse protéique ait lieu au niveau de la synapse des fibres moussues sur les cellules pyramidales de CA3 et participe aux premières cascades d'événements moléculaires à l'origine de la LTP à cette synapse. Cependant, il n'est pas exclu que l'anisomycine ait un effet non spécifique. Des travaux supplémentaires, permettant d'identifier les protéines synthétisées à la synapse des fibres moussues après l'induction d'une LTP ou un conditionnement de peur au contexte, seraient donc utiles pour renforcer notre hypothèse. Il serait par exemple intéressant de pouvoir utiliser des outils de protéomique : spectroscopie de masse ou westernblot sur des fractions membranaires synaptiques, en ciblant les protéines pré-synaptiques (l'AMPC par exemple) dont on sait qu'elles sont impliquées dans la LTP au niveau des fibres moussues. Mais ce genre d'approche est difficile à mettre en œuvre. Une alternative serait d'utiliser des souris RiboTag. Ces souris présentent un gène de protéine ribosomique avec un exon c-terminal floxé suivi d'un exon identique taggé avec l'hémagglutinine. Lorsqu'elles sont croisées avec des souris exprimant une recombinase Cre spécifique d'une sous-population cellulaire, chez les descendants, l'expression de la protéine taggée est activée dans cette sous-population. Ainsi, en utilisant des souris Cre spécifiques des cellules du gyrus denté, il serait possible d'extraire les protéines présynaptiques de la synapse des fibres moussues sur CA3 (en ne récupérant que la région CA3), et de les identifier ensuite en spectroscopie de masse.

Par ailleurs, à ma connaissance, aucune étude ne permet de savoir si la LTP ou la mise en place de la trace mnésique est sérielle dans l'hippocampe (c'est-à-dire si elle passe de CA3 à CA1) ou si elle peut se mettre en place en parallèle dans CA3 et CA1. Afin de répondre à cette question, il serait intéressant d'inhiber la synthèse protéique dans CA3 tout en mesurant la présence ou non d'une LTP dans CA1. Quelques rares études montrent qu'il est possible d'observer des marqueurs de LTP au niveau de la synapse des fibres moussues sur CA3 en ayant téтанisé une synapse en amont (synapse de la voie perforante sur le gyrus denté). Cette plasticité est appelée plasticité transsynaptique, et suggère la possibilité d'une transmission sérielle de la LTP (Smirnova *et al.*, 1993, Helme-Guizon *et al.*, 1998). Pour savoir s'il est possible d'observer une LTP transsynaptique dans CA1 et si elle dépend de la synthèse protéique de CA3, il faudrait appliquer de l'anisomycine au niveau de la région CA3 et soit étudier la LTP de CA1 induite par un apprentissage, soit induire une LTP au niveau de CA3 par un tetanus des fibres moussues et étudier l'éventuelle LTP transsynaptique qui se mettrait en place au niveau des collatérales de Schaffer dans CA1.

Chapitre 2 : Etude de la LTP induite dans la région CA1 par un apprentissage contextuel

Introduction

Sur le site bibliographique Pubmed, la recherche « LTP hippocampus » fait émerger plus de 5000 articles, c'est dire la quantité de ressources disponibles sur le sujet. Pourtant, il ne tarde pas à apparaître que la majeure partie de ces travaux est effectuée sur l'animal anesthésié ou sur des tranches de cerveau. Ces nombreux articles permettent à ce jour d'avoir une assez bonne vision des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation et le maintien de la LTP.

La littérature montre aussi qu'il existe des liens forts entre la potentialisation à long terme et la mémoire. Par exemple, Morris et ses collaborateurs en 1986 en inhibant les récepteurs NMDA de l'hippocampe à l'aide d'un antagoniste compétitif (APV), ont bloqué à la fois la LTP induite par une stimulation tétanique *in vivo* et un apprentissage spatial. Des expériences sur des souris KO pour les récepteurs NMDA dans CA3 (McHugh et Tonegawa, 2009) ou dans CA1 (Rampon *et al.*, 2000) ont confirmé ce résultat. Une mutation de l'alpha-Ca²⁺-calmoduline-kinase 2 (CaMKII), une enzyme impliquée dans de nombreuses cascades de signalisation intracellulaire, entraîne une inhibition de la LTP induite par des stimulations à haute fréquence et d'un apprentissage spatial (Silva *et al.*, 1992).

Comme rappelé dans l'introduction générale, il est désormais possible de pallier les biais des protocoles artificiels d'induction de la LTP par des stimulations à haute fréquence. En effet, il a été montré qu'un apprentissage peut lui-même induire une LTP observable par des moyens électrophysiologiques (Gruart *et al.*, 2006, Whitlock *et al.*, 2006). L'une de ces études a montré chez le rat que la LTP induite par un apprentissage d'évitement passif et celle induite par un protocole de stimulations à haute fréquence au niveau des collatérales de Schaffer partagent des mécanismes communs (Whitlock *et al.*, 2006). Les chercheurs ont implanté une électrode de stimulation au niveau des collatérales de Schaffer et 8 électrodes d'enregistrement dans la région CA1 chez plusieurs animaux. Après l'apprentissage, ils ont observé une LTP au niveau de 27,3% des électrodes d'enregistrement. Ils ont ensuite effectué plusieurs protocoles de HFS et ont observé un phénomène d'occlusion : les électrodes qui avaient déjà enregistré une LTP à la suite du conditionnement présentaient, en réponse aux HFS, une LTP plus faible que celle des autres électrodes. A ce jour, seules trois équipes ont pu observer une LTP induite dans CA1 par un apprentissage, mais aucune n'a creusé les mécanismes de formation ou de maintien de cette LTP.

Ce second chapitre est constitué de 3 expériences dont le but est d'étudier la LTP induite par l'apprentissage, à l'aide d'outils électrophysiologiques, comportementaux et pharmacologiques. La première expérience consiste en l'observation de la LTP induite, dans l'aire CA1 de la souris, par un apprentissage de peur au contexte. Les expériences suivantes visent à enrichir les connaissances sur cette LTP. Nous nous intéressons notamment à la nécessité de la synthèse protéique, à l'implication de la composante aversive de l'apprentissage et à la répartition des LTP dans l'hippocampe.

Matériels et méthodes

Animaux

Tous les animaux utilisés lors des expériences sont élevés au CRCA. Il s'agit de souris mâles de la lignée C57BL/6J âgés de 3 à 5 mois au début des manipulations. Ces animaux sont placés en stabulation par groupe de 3 à 6 individus par cage, avec de la nourriture et de l'eau disponibles *ad libitum*, dans une pièce comprenant un cycle jour/nuit de 12h/12h (jour de 8h à 20h) et thermostatée à $21\pm 1^\circ\text{C}$. Toutes les expériences sont réalisées pendant la période de jour.

Procédures générales

Le protocole s'étend pour chaque animal sur un mois (Figure 12). La chirurgie est réalisée la première semaine. Après une semaine de récupération, les animaux sont manipulés pendant au moins 3 jours à raison d'environ 2min par jour, afin d'être habitués à l'expérimentateur (« handling »).

A la fin de cette 2^{ème} semaine ou au début de la 3^{ème} (selon la date de la chirurgie), ils sont pour la première fois connectés au poste d'électrophysiologie, pendant 2 jours, au moins 30min par jour. Ces premières connexions permettent une familiarisation de l'animal à cet environnement et à la gêne pouvant être occasionnée par les câbles. Dans le même temps, la qualité du signal enregistré est évaluée, et quelques faibles stimulations permettent d'observer la qualité et l'amplitude des potentiels de champs.

Durant la semaine 3 et pendant deux jours, les souris sont connectées afin d'enregistrer leur signal basal. Une courbe courant-réponse permet de choisir l'intensité de stimulation qui induit des fEPSPs d'une amplitude faisant le tiers de l'amplitude maximale mesurée. On stimule alors toutes les $30\pm 10\text{s}$ les collatérales de Schaffer, pendant au moins 30min pour obtenir une ligne de base et vérifier la stabilité des fEPSPs. Dans l'expérience 3 (pharmacologie couplée à l'électrophysiologie), cette ligne de base est suivie d'une injection SHAM et à nouveau de 30min d'enregistrement des fEPSPs afin de familiariser les animaux à l'injection intracérébroventriculaire (i.c.v.).

La dernière semaine est celle qui comprend les procédures comportementales. Une courbe courant-réponse est d'abord réalisée pour choisir une intensité de stimulation. Puis, on enregistre les fEPSPs pendant 30min (ligne de base) avant de placer les animaux dans leur cage d'élevage pendant 7min. Ils sont ensuite replacés dans la cage d'enregistrement électrophysiologique et les fEPSPs sont mesurés pendant 1h. Cette expérience constitue l'expérience contrôle, elle permet de s'assurer de la stabilité des fEPSPs lorsque l'animal est simplement déconnecté, déplacé, et reconnecté au poste d'électrophysiologie. Dans le cas de l'expérience 3, après la ligne de base, les animaux reçoivent une injection i.c.v. de solution saline, puis leurs fEPSPs sont enregistrés pendant 1h avant de les placer dans leur cage d'élevage (placée dans la pièce voisine) pendant 7min et d'enregistrer à nouveau les fEPSPs pendant 1h. Le lendemain, la même expérience est réalisée en remplaçant l'exposition à la cage d'élevage par un conditionnement de peur au contexte (expériences 1 et 3), ou une exposition à un nouvel environnement (expérience 2). Ces procédures comportementales sont effectuées dans une pièce voisine de celle d'électrophysiologie et seront décrites en détails dans un paragraphe ultérieur (« Procédures comportementales », page (74)).

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
Semaine 1			Chirurgie		
Semaine 2			Handling	Handling	Handling
Semaine 3	Connexion	Connexion		Ligne de base (et SHAM)	Ligne de base (et SHAM)
Semaine 4	Cage d'élevage	Conditionnement de peur au contexte (et TBS) ou exposition au nouveau contexte	Tests comportementaux		

Figure 12 : Planning des expériences mises en place pour chaque animal. Ce protocole individuel dure un mois, il permet d'intercaler des expériences pour 2 à 4 souris par semaine.

Fabrication des électrodes

En dehors de celles utilisées pour les enregistrements multiples (Annexe 1), j'ai fabriqué toutes nos électrodes de la même manière. Les électrodes de stimulation et d'enregistrement sont fabriquées à partir de fil de nickel-chrome (en proportion 80/20) recouvert d'une gaine de téflon. Tout d'abord, deux fils de 50 μ m de diamètre et environ 4cm de long sont torsadés (une dizaine de tours) et maintenus dans cette configuration verticale et rectiligne à l'aide de pinces-clamps. Ils sont ensuite recouverts d'un primaire (loctite 770) puis de cyanolite (loctite 406) avant de sécher dans cette position durant au moins une nuit. Cette période de séchage permet aux fils de rester solidaires et à l'électrode d'être bien rectiligne.

Les fils sont par la suite dénudés aux deux extrémités sur quelques millimètres pour pouvoir être soudés sur des connecteurs 4 voies (Radiospares), puis coupés en leur milieu afin d'obtenir deux électrodes (de 2cm de long chacune). L'extrémité libre de chaque électrode est alors dénudée au scalpel sur environ 250-350 μ m sous une loupe binoculaire dans le but d'obtenir une impédance optimale. Celle-ci est mesurée dans du NaCl, à 100Hz, et doit être comprise entre 30 et 300k Ω . La mesure d'impédance permet également de détecter les faux-contacts entre les 2 fils de chaque électrode et d'y remédier. Par ailleurs, afin de limiter les risques de faux-contact, du vernis est appliqué sur les zones de soudure. Pour les électrodes d'enregistrement, une vis en inox est également reliée au connecteur par du fil d'argent (Advent) afin de servir de référence.

Concernant les électrodes pour les enregistrements multiples (Annexe 1), des fils de tungstène sont utilisés. Sept fils sont passés un par un dans une matrice en plastique où des trous d'environ 100 μ m de diamètre sont espacés de 250 μ m (centre à centre). Ils passent ensuite dans une autre matrice où les trous sont plus espacés, afin d'obtenir une sorte d'éventail. Pour consolider cette structure, du ciment dentaire (Duralay) est apposé sur les fils entre les deux matrices. Après une courte période de séchage, les matrices peuvent être retirées. Les fils sont alors dénudés du côté où ils sont le plus espacés les uns des autres, afin d'être soudés sur deux connecteurs identiques à ceux utilisés pour les électrodes simples. De l'autre côté, ils sont coupés net de sorte que les électrodes soient situées dans un même plan horizontal lors du placement dans l'hippocampe. La voie restante est utilisée pour la vis qui sert de référence.

Chirurgie

La souris est anesthésiée avec un mélange d'hydrate de chloral (Prolabo, 400mg/kg) et de xylazine (Rompun, 15mg/kg) injecté en i.p. Après 15min, l'animal est placé sur un appareil de stéréotaxie (Stoelting). La peau du crâne est alors incisée et la surface du crâne nettoyée. Une pointe posée sur un support adapté permet de prendre précisément les coordonnées stéréotaxiques du Bregma et de marquer l'emplacement des électrodes. Les coordonnées de la ou des électrodes d'enregistrement sont 1,8mm postérieur au Bregma, 1,3mm latéral (à droite) et 1,3mm sous la surface du cerveau. L'électrode de stimulation est placée 0,5mm postérieur et 0,3mm latéral (à gauche) au Bregma, à 2,3mm de profondeur. La vis en inox qui sert de référence est placée approximativement au centre de l'os occipital, au dessus du cervelet. Pour les expériences de pharmacologie (Expérience 3), une canule (24G, 7mm) est également positionnée au dessus du ventricule latéral droit (coordonnées : 0,2mm postérieur au Bregma, 1,1mm en latéralité, et 1,5mm sous la surface du crâne). Le placement des électrodes et canules se fait verticalement, c'est-à-dire perpendiculairement à la surface du crâne.

Afin d'optimiser le placement (notamment en profondeur) des électrodes de stimulation et d'enregistrement, le signal électrophysiologique est testé au cours de la chirurgie. Pour cela, juste après leur positionnement, des courants sont appliqués sur l'électrode de stimulation au moyen d'un stimulateur (A-M Systems modèle 2100). La réponse enregistrée dans CA1 est d'abord pré-amplifiée (Grass) puis amplifiée (Grass P511, gain=1000, filtre passe-bande 0,1- 3kHz). Les bruits liés au secteur sont ensuite éliminés (Humbug 50 Hz Noise Eliminator, QuestScientific), et le signal analogue est converti en signal digital (CED micro 1401-MK3). Le logiciel utilisé afin d'acquérir les données est Spike2 (version 7.00). Cette manipulation de courte durée nous permet d'ajuster la profondeur des électrodes afin d'obtenir des potentiels de champ post-synaptiques excitateurs d'une amplitude et d'une forme optimale.

Lorsque les électrodes sont bien placées, elles sont solidement fixées au crâne par une couche de colle biocompatible (Superbond) puis l'ensemble électrodes-connecteurs et l'éventuelle canule sont maintenus en position par du ciment dentaire (Duralay). A la fin de la chirurgie, les animaux sont isolés dans une cage de réveil similaire aux cages d'hébergement habituelles, afin de pouvoir passer la nuit dans de bonnes conditions.

Le lendemain matin, les souris sont replacées avec leurs congénères. Nous les laissons alors récupérer de la chirurgie pendant une semaine au minimum avant de les manipuler.

Dispositifs d'électrophysiologie

Lors des enregistrements avec une seule électrode, la souris est placée dans une boîte en plexiglas transparent (12/12/15 cm) dont le sol est recouvert de sciure. Celle-ci est elle-même placée à l'intérieur d'une cage de Faraday (16/30/30 cm). Aucune procédure comportementale n'a lieu dans cette zone qui est réservée à l'enregistrement. Deux câbles blindés et flexibles relient les connecteurs placés sur la tête des animaux au stimulateur et à la sonde à haute impédance de l'amplificateur, qui est située au plafond à l'intérieur de la cage de Faraday, afin de procéder aux stimulations et enregistrements tout en laissant l'animal libre de ses déplacements.

Le matériel utilisé pour ces expériences comporte un amplificateur Grass P511 (gain=1000) réglé sur une bande passante de 0,1Hz à 3kHz (Figure 13A). Cet amplificateur est relié à un éliminateur de bruit de secteur (Humbug 50 Hz Noise Eliminator, QuestScientific) puis l'enregistrement est transmis à un convertisseur analogique-digital CED micro 1401 qui permet l'échantillonnage à 10kHz du signal qui sera observé et analysé en direct grâce au logiciel Spike 2 (version 7.00). Toutes les données sont enregistrées sur un disque dur de l'ordinateur afin de pouvoir réaliser des analyses ultérieures. Un stimulateur AM-Systems est utilisé pour induire les fEPSPs par des stimulations carrées, biphasiques, de 100 μ s. Ce stimulateur est commandé par l'ordinateur via Spike 2.

Concernant les enregistrements extracellulaires multiples (Annexe 1), le système AlphaLab Pro (Alpha Omega) est utilisé pour l'acquisition et la sauvegarde des données (Figure 13B pour le dispositif). Les taux d'échantillonnage et filtre passe-bande sont paramétrés de la même manière que le système d'enregistrement unique. Le traitement des données se fait ensuite en convertissant les fichiers en données Spike 2.

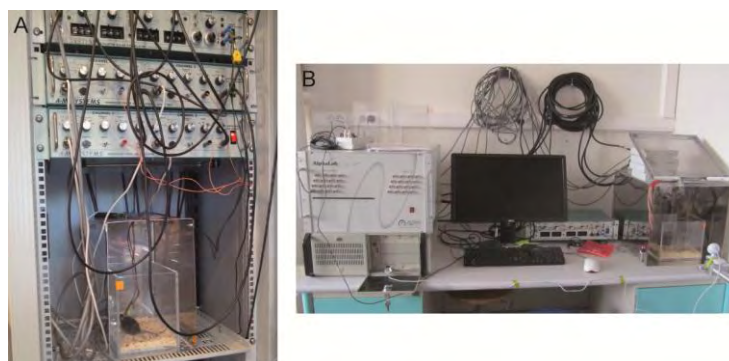


Figure 13 : Photographies des deux postes utilisées pour les enregistrements électrophysiologiques. A : Poste d'électrophysiologie pour les enregistrements à une voie. B : Poste d'électrophysiologie pour les enregistrements multi-voies.

Procédures comportementales

Le dispositif comportemental utilisé est exactement le même que décrit dans le chapitre 1. Seule la procédure change. Le protocole dure 7min. Pendant 1min40s, la souris est libre d'explorer librement le dispositif, puis 5 chocs électriques (0.3mA, 1s) et 5 avertissements sonores (65dB, 1000 Hz, 15s) sont répartis pseudo-aléatoirement durant les dernières minutes (Figure 14). Les souris sont capables d'entendre un son à cette fréquence à partir de 40dB (Ehret, 1974) et sont capables d'associer ce son à des chocs électriques (Trifilieff et al., 2006). Ces deux stimuli ne sont pas concomitants afin de créer un contexte «foreground», correspondant à un apprentissage hippocampo-dépendant essentiellement. Comme dans le chapitre 1, la rétention de la mémoire est testée 24h après l'apprentissage en mesurant le «freezing» des animaux dans le contexte d'apprentissage pendant 4min. Deux heures après ce test, les souris sont testées dans le nouveau contexte sans le son pendant 4min puis avec le son pendant 2min. Dans le cas du test de l'effet d'une pré-exposition contextuelle (Figure 24), les animaux sont pré-exposés au contexte durant 7min (avec le son, mais sans choc électrique). Les animaux «non pré-exposés» sont placés pendant 7min dans un champ ouvert circulaire de 50cm de diamètre, puis replacés dans leur cage d'élevage. Les animaux des deux groupes sont placés le lendemain dans le contexte d'apprentissage durant 20s et reçoivent 1 choc électrique (0,7mA, 1s) 10s après leur introduction dans ce contexte. Les tests au contexte, au contexte modifié et au son sont effectués 24h après cette expérience de «shock-only».

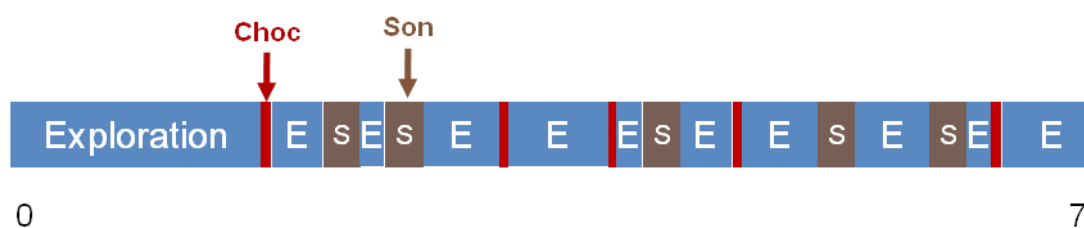


Figure 14 : Schéma du protocole d'apprentissage de peur au contexte. Les périodes d'exploration sont représentées en bleu, les chocs électriques (1s) en rouge, et l'émission d'un son (15s) en marron. Durée de chaque période d'exploration : 100s, 20s, 10s, 30s, 40s, 10s, 20s, 30s, 30s, 10s, 40s.

Protocoles d'induction de LTP « artificielle »

Lors de la mise au point des premières expériences d'électrophysiologie et de celles de pharmacologie couplée à l'électrophysiologie, ainsi que pour saturer la LTP induite par l'apprentissage (Expérience 1), nous avons dû utiliser des protocoles artificiels d'induction de LTP (stimulations tétaniques). Deux familles de protocoles sont classiquement utilisées : les stimulations à haute fréquence (HFS) et les stimulations en « bursts » de rythme thêta (TBS). Les protocoles de HFS sont plus robustes mais peuvent induire des crises d'épilepsie chez l'animal en raison de la forte sollicitation des circuits excitateurs. Les protocoles de TBS sont plus physiologiques et présentent un plus faible risque d'épilepsie car ils sont basés sur le phénomène naturellement observé de couplage des oscillations thêta-gamma (en Anglais, « theta-nested gamma oscillations »), mais induisent plus difficilement une LTP.

Le protocole de HFS utilisé consiste à réaliser 6 fois (une fois par minute) 5 répétitions (une par seconde) de 20 stimulations à 200Hz (Gruart *et al.*, 2006).

Pour les TBS, il s'agit de 4 fois (intervalle de 30s) 4 séries de 5 stimulations à 100Hz (1 toutes les 200ms). L'intensité de stimulation doit être le double de celle utilisée pour la mesure de la transmission synaptique.

Traitement des données

Le signal électrophysiologique brut est d'abord analysé en moyennant les formes d'ondes des fEPSPs toutes les 5min (10 fEPSPs). L'amplitude de cette forme d'onde moyenne est mesurée en mV et notée dans un fichier Excel. Chaque session d'enregistrement commence par une courbe courant-réponse, puis une ligne de base. Cette ligne de base consiste à enregistrer les fEPSPs jusqu'à obtenir au moins 30min de stabilité (soit six fEPSPs moyens). On considère qu'une ligne de base est stable lorsque les fEPSPs moyens qui la constituent présentent tous une amplitude comprise entre 80 et 120% de la moyenne de la ligne de base, et que l'évolution des fEPSPs au cours du temps n'est pas linéaire. Les données sont toutes converties en pourcentage de cette ligne de base. Les résultats sont présentés sous la forme soit des résultats individuels, soit de la moyenne \pm SEM (erreur standard à la moyenne) de chaque groupe, en pourcentage de la ligne de base. Pour déterminer la présence ou non d'une plasticité synaptique au niveau individuel, nous avons fixé un critère-seuil de détection. Il a ainsi été décidé que pour chaque enregistrement, à partir de 3 points consécutifs (c'est-à-dire 15min) dépassant la moyenne

de la ligne de base +2SD (écart-type), l'électrode présente une LTP. Si à l'inverse 3 points consécutifs passent sous le seuil de moyenne-2SD, on parle de LTD. Les autres tests statistiques utilisés sont précisés à chaque expérience. Comme dans le premier chapitre, pour l'analyse statistique des niveaux de freezing, ceux-ci sont convertis en arcsinus de la racine carrée du pourcentage. Ces tests ainsi que les représentations graphiques sont réalisées à l'aide du logiciel Prism 5.0 (Graphpad Software) et les retouches graphiques avec Illustrator CS2 (Adobe). Pour calculer le rapport θ/δ , j'ai écrit un programme exécutable sur le logiciel Spike2 (Annexe 4) qui calcule la transformée de Fourier du signal et en extrait les puissances du θ (4,5 à 12Hz) et du δ (1,5 à 4Hz) qui précèdent chaque stimulation, il mesure également la pente et l'amplitude de chaque fEPSP.

Pharmacologie

Les solutions d'anisomycine sont préparées en diluant 5mg d'anisomycine (Sigma) dans du HCl (3N) et du NaCl (0,9%). Du NaOH (3N) est ensuite ajouté afin de ramener le pH à environ 7,4. Des dilutions en chaîne permettent alors d'obtenir une gamme de concentrations croissantes allant de 1,6 μ g à 50 μ g/0,25 μ L.

La préparation d'aCSF est un mélange de 126mM de NaCl, 2,5mM de KCl, 26mM de NaHCO₃, 1,2mM de NaH₂PO₄, 2,4mM de CaCl₂, 1,3mM de MgCl₂, et 5mM de D-Saccharose. Le pH de la solution est d'environ 7,4. (Kuenzi *et al.*, 2000)

Pour réaliser les injections intracérébroventriculaires, un injecteur (longueur : 7,9mm) est placé dans la canule elle-même implanté dans le cerveau de la souris de façon à ce que l'extrémité de l'injecteur soit dans le ventricule latéral droit (0,9mm plus ventral que la canule). Cet injecteur est relié à une seringue Hamilton (1 μ L) par un tube flexible en polyéthylène. La seringue est placée sur une micro-pompe (Harvard Apparatus) permettant l'injection de 0,25 μ L de solution à une vitesse de 0,5 μ L/min. L'injecteur est retiré une minute après la fin de l'injection afin de s'assurer de la bonne diffusion du produit et éviter les reflux.

Histologie

A la fin des expériences, les souris sont profondément anesthésiées au moyen d'une injection i.p. de pentobarbital sodique (150mg/kg). Elles sont alors perfusées en intracardiaque avec une solution de rinçage (tampon phosphate (PB) 0,1M) pendant 1 à 2min puis une solution de fixation (paraformaldéhyde (PFA) à 4%) durant 5 à 7min. Les cerveaux ainsi fixés sont ensuite prélevés et placés dans du PFA (4%) toute la nuit pour terminer la fixation puis transférés dans du sucrose azide (30%) pendant au moins 24h afin d'achever leur déshydratation.

Pour leur congélation, les cerveaux sont plongés 3 min dans de l'isopentane liquide dont la température est stabilisée entre -40 et -50°C par de la carboglace. Ils sont ensuite entièrement sectionnés au cryostat (Leica) dans une enceinte maintenue à -20°C, en coupes frontales sériées de 40µm d'épaisseur de manière à récupérer au moins tout l'hippocampe dorsal. Les coupes sont placées sur lames gélatinées et colorées à la thionine comme décrit dans le chapitre 1, pour vérifier la position des électrodes et/ou des canules. Dans le cas de l'expérience présentée en annexe 2, les coupes flottantes réalisées au cryostat sont immédiatement recueillies dans une solution de PB 0,1M (à pH=7,4) contenant 0,9% de NaCl (PBS), puis sont rincées deux fois pendant 10min à température ambiante sur agitateur. Si l'immunohistochimie n'est pas réalisée aussitôt, les coupes sont conservées à -20°C dans une solution cryoprotectrice à base d'éthylène glycol (30%) et de glycérol (30%) dans du PB 0,1M.

Résultats et discussion

Expérience 1 : Le conditionnement de peur au contexte induit une potentialisation à long terme dans CA1.

Le but de cette première expérience d'électrophysiologie est de pouvoir mesurer une plasticité induite par un apprentissage. Le conditionnement de peur au contexte, rapide et hippocampo-dépendant, permet l'observation d'une plasticité dans la région des collatérales de Schaffer dès les premières minutes après le début de l'apprentissage. Un groupe de souris a tout d'abord subi une expérience contrôle durant laquelle nous avons mesuré l'amplitude des fEPSPs dans CA1 pendant 30min avant et 1h après avoir placé les animaux dans leur cage d'élevage (pendant 7min) (Figure 15A). Le lendemain, l'expérience est répétée sur les mêmes animaux mais l'exposition à la cage d'élevage est remplacée par un conditionnement de peur au contexte (Figure 15B).

Les données présentent une forte variabilité interindividuelle, surtout pour les résultats observés après l'apprentissage. L'utilisation d'une ANOVA pour des mesures répétées ne semble pas appropriée, son équivalent non paramétrique, le test de Friedman a été utilisé pour analyser les données, pour le groupe « Cage d'élevage » d'une part, puis pour le groupe « Conditionnement » d'autre part. Ce test appliqué aux données contrôles montre qu'il n'y a pas de variation significative des potentiels post-synaptiques au cours du temps ($F=7,735$, $p=0,9719$). En revanche, pour les résultats du conditionnement de peur au contexte les fEPSPs varient de manière significative au cours du temps ($F=31,27$, $p=0,0185$), une LTP semble se mettre en place dans la première demi-heure de suivi.

Cependant, l'amplitude de l'effet est peu importante (moyenne de l'amplitude des fEPSPs entre 105 et 110%). De plus, le test post-hoc de Dunn, permettant de comparer chaque moyenne des points de suivi post-apprentissage avec le dernier point de ligne de base, n'est jamais significatif. Au vu de ces observations et de la forte variabilité interindividuelle, nous avons décidé d'analyser les résultats obtenus sur chaque souris indépendamment. Pour cela, nous avons défini un critère-seuil (cf. « Matériel et méthodes »). Si l'amplitude des fEPSPs moyennée sur 5 minutes dépasse la moyenne de la ligne de base + 2SD pour trois points consécutifs, nous considérons qu'il y a une LTP. Aucun animal ne présente de plasticité synaptique après avoir été replacé 7 minutes dans sa cage d'élevage (Figure 15C). Suite à l'exposition au CFC, quatre animaux sur vingt (autrement dit 4 électrodes sur 20) présentent une LTP et 2 sur 20 présentent une LTD (Figure 15D). Ce résultat est cohérent avec celui observé chez des rats dans le cadre d'un apprentissage d'évitement passif (Whitlock *et al.*, 2006), dans lequel 27% des électrodes présentaient une LTP. En revanche, ces auteurs n'avaient pas observé de LTD, malgré une tendance à la baisse de certains enregistrements, certainement parce qu'ils n'avaient pas pris la peine de définir clairement de critère adapté à la détection de ce phénomène (ils ont simplement considéré que les électrodes dont les fEPSPs étaient au moins 10% plus amples que ceux de la ligne de base présentaient de la LTP).

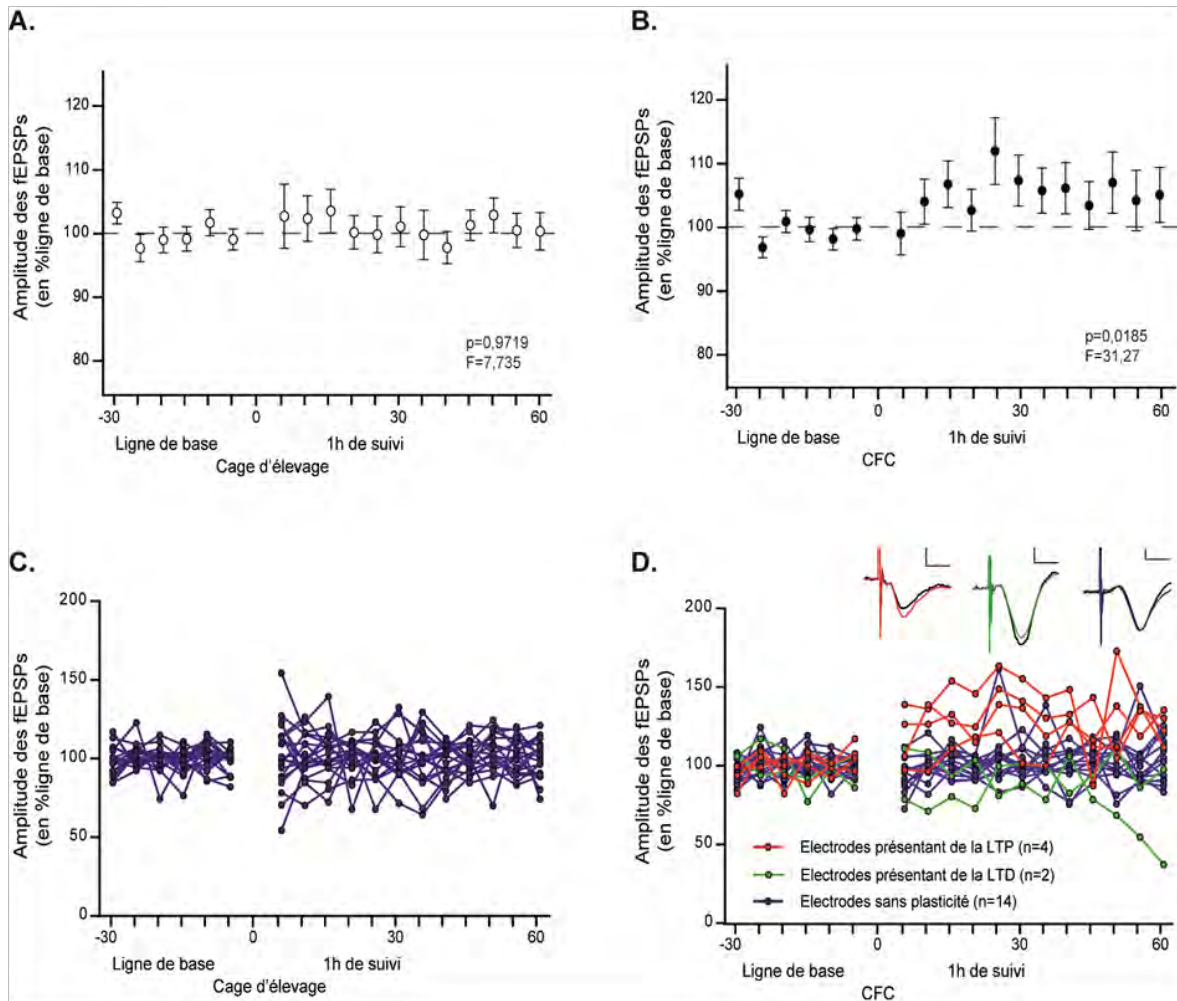


Figure 15 : Le conditionnement de peur au contexte induit une LTP dans la région CA1 de l'hippocampe des souris. A : Moyenne \pm SEM des fEPSPs au cours du temps dans l'expérience contrôle (n=20). Il n'y a pas d'effet du placement des animaux dans leur cage d'élevage sur les fEPSPs. **B :** Moyenne \pm SEM des fEPSPs au cours du temps dans l'expérience d'apprentissage (n=20). L'apprentissage induit une LTP qui dure au moins une heure. **C et D :** Données individuelles pour respectivement A et B. Aucune électrode ne présente de plasticité dans l'expérience contrôle, alors que 4 électrodes sur 20 présentent une LTP et 2 sur 20 présentent une LTD dans l'expérience de conditionnement de peur au contexte. Les tracés bruts présentés au dessus du panneau **D** correspondent au fEPSPs moyens de la ligne de base (noir) et des 30 dernières minutes de suivi post-CFC pour un enregistrement d'une LTP (rouge, échelle : 0,05mV, 5ms), d'une LTD (vert, échelle : 0,1mV, 5ms) et sans plasticité (bleu, échelle : 0,1mV, 5ms).

A la fin de l'enregistrement d'une heure qui suit l'apprentissage de peur au contexte, une expérience de saturation de la LTP est effectuée. Pour cela, 6 séries de TBS sont appliquées au niveau des collatérales de Schaffer. Elles sont espacées les unes des autres par vingt minutes d'enregistrement des fEPSPs afin d'observer l'évolution de la plasticité au cours du temps (Figure 16A). Le but de l'expérience est d'obtenir un plateau dans les amplitudes de fEPSPs, c'est-à-dire d'atteindre une plasticité maximale, qui ne peut plus être augmentée, afin de pouvoir comparer les possibilités de plasticité des différents groupes. Cette expérience de saturation de la LTP hippocampique présente des risques importants de survenue de crises d'épilepsie, or l'épilepsie en elle-même peut bouleverser la plasticité des réseaux neuronaux et provoquer des lésions neuronales. Lors de cette expérience, nous avons observé la survenue d'événements épileptiques suite à la TBS pour 9 souris. Ces événements correspondent dans un premier temps à l'apparition d'une activité électrique ample et de haute fréquence qui dure plusieurs dizaines de secondes, puis le tracé électrophysiologique devient soudainement presque plat et revient progressivement à son amplitude de base pendant les minutes suivantes. Lors de cet épisode épileptique, on n'observe pas souvent de signes comportementaux (agitation, sursaut, etc...), bien que les animaux puissent sembler soudainement absents (ce qui est caractéristique des crises d'épilepsie de faible intensité). Si une stimulation présynaptique est effectuée pendant la période où l'activité électrophysiologique enregistrée est très faible (ce qui est souvent le cas, puisque les crises apparaissent durant le protocole de TBS), le fEPSP évoqué présente une très faible amplitude voire est nul. Il est clair que cette perturbation peut influencer le résultat du protocole de TBS. Les 9 animaux ayant subi une telle crise, ce qui inclut les deux enregistrements qui présentaient une LTD après l'apprentissage, ont donc été exclus de cette étude.

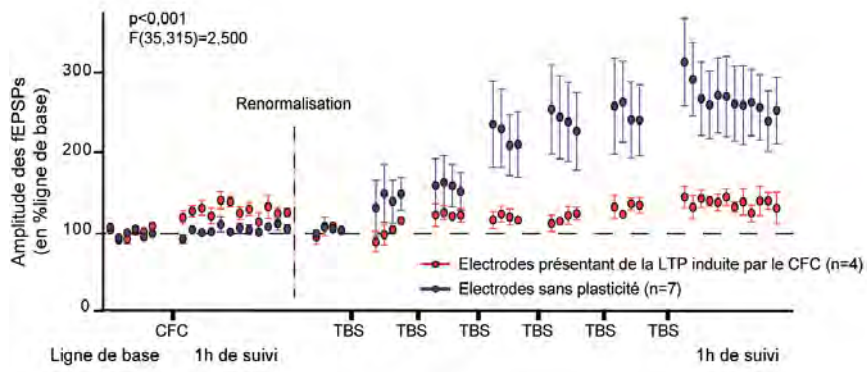
Les données sont présentées pour chaque groupe. Un groupe comprend les électrodes qui ont montré une LTP induite par l'apprentissage, un autre groupe comprend toutes les autres électrodes. Il est impossible, à l'aide des outils statistiques à notre disposition, de prouver que deux moyennes sont identiques. Or, si les deux formes de LTP partagent des mécanismes communs, la saturation de la LTP par les TBS devrait aboutir à un même niveau de LTP maximale pour les deux groupes. Nous avons donc renormalisé les données par rapport aux 20 dernières minutes de l'enregistrement qui suit l'apprentissage afin de pouvoir mettre en évidence une différence statistique entre nos deux groupes.

Une ANOVA à deux facteurs pour mesures répétées effectuée sur les données renormalisées révèle un effet du temps ($F_{(35,315)}=5,343$, $p<0,0001$), une différence marginalement significative entre les deux groupes ($F_{(1,315)}=3,671$, $p=0,0876$), et un effet très

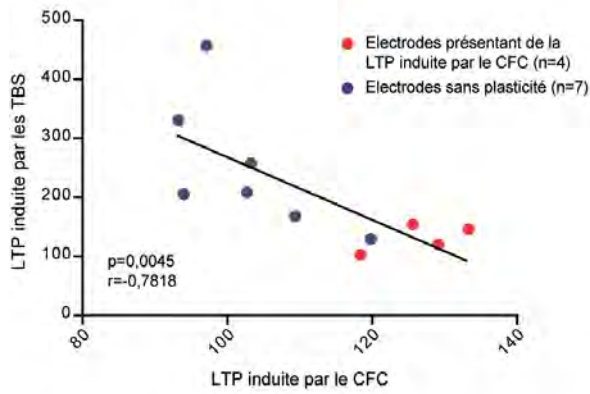
significatif de l'interaction ($F_{(35,315)}=2,501$, $p<0,0001$). Cela signifie que l'effet des TBS est différent selon le groupe, les TBS induisent une LTP plus faible pour le groupe ayant déjà présenté une LTP induite par l'apprentissage. Autrement dit, on observe ici un phénomène d'occlusion de la LTP induite par les TBS par la LTP induite par le conditionnement de peur au contexte. Ce constat permet de mettre en évidence que les deux formes de LTP partagent des mécanismes communs. De plus, les données individuelles calculées en moyennant les 30 dernières minutes d'enregistrement montrent que le niveau de LTP induite par les TBS est inversement corrélé à celui de la LTP induite par l'apprentissage (Test de corrélation de Spearman, $r=-0,7818$, $p=0,0045$, Figure 16B). Ce résultat renforce l'idée d'un lien dans la mise en place de ces deux plasticités. Il est intéressant de noter qu'une ANOVA sur les données non renormalisées ne montre pas de différence significative entre les deux groupes ($F_{(1,315)}=9,57$, $p=0,2207$), bien qu'il existe toujours un effet de l'interaction ($F_{(35,315)}=4,56$, $p=0,0007$), ce qui signifie que la saturation de la LTP ne se fait pas avec le même décours temporel dans les deux groupes mais qu'il n'y a pas de différence significative du niveau final de LTP.

Le lendemain de l'apprentissage, un test de rétention est effectué pour tous les animaux. Chaque indice de rétention mnésique (niveau de freezing) peut ainsi être associé à un enregistrement électrophysiologique. Un test de Mann-Whitney pour comparer les niveaux de freezing des deux groupes (LTP induite par l'apprentissage vs pas de LTP) ne met en évidence aucune différence entre ces deux groupes ($U=23,00$, $p=0,4208$, Figure 16C). De même, les données individuelles ne montrent pas de corrélation entre le niveau de LTP induite par l'apprentissage et le niveau de freezing (Test de corrélation de Pearson, $r=-0,2052$, $p=0,3855$, Figure 16D). Il n'y a pas non plus de corrélation de la LTP avec l'intensité de stimulation (Test de corrélation de Spearman, $r=0,08995$, $p=0,7061$, Figure 16E), ni avec l'amplitude de réponse basale en mV (Test de corrélation de Pearson, $r=-0,2090$, $p=0,3765$, Figure 16F), ni avec l'amplitude de la réponse basale exprimée en fonction de l'amplitude maximale atteinte lors de la courbe courant réponse (Test de corrélation de Pearson, $r=0,04281$, $p=0,8578$, Figure 16G). Il semblerait donc que les facteurs techniques que sont le choix de l'intensité de stimulation et l'amplitude des réponses de base (qui reflètent à la fois la quantité de synapses enregistrées recrutées à chaque stimulation et la force de connexion de ces synapses) ne suffisent pas à prédire la survenue des plasticités, renforçant le rôle de l'apprentissage dans ces plasticités.

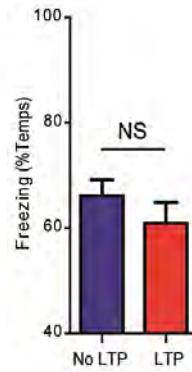
A.



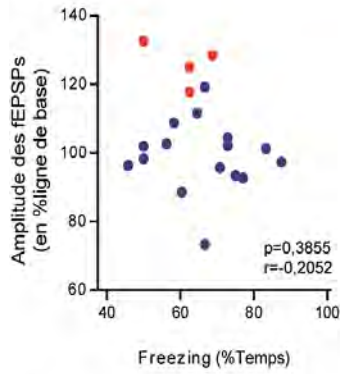
B.



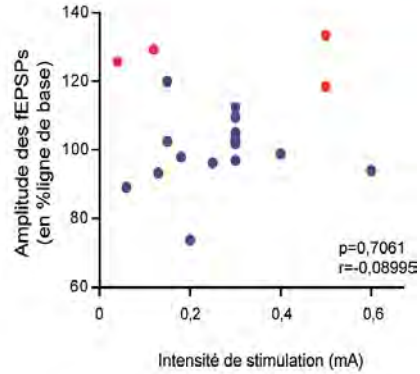
C.



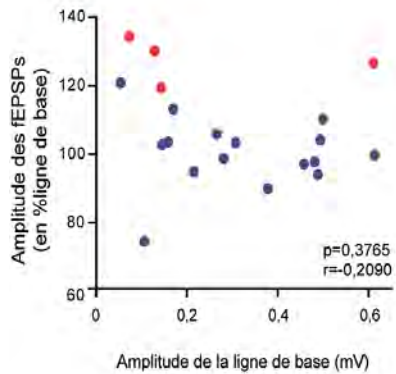
D.



E.



F.



G.

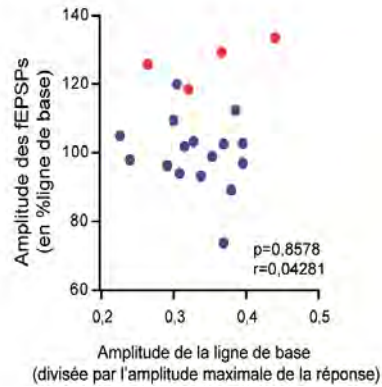


Figure 16 : La LTP induite par le conditionnement de peur au contexte partage des mécanismes avec celle induite par des TBS et n'est pas corrélée au niveau d'apprentissage des animaux. **A** : Occlusion de la LTP induite par les TBS par la LTP induite auparavant par l'apprentissage (en moyenne \pm SEM n=11). **B** : Corrélation négative entre le niveau de LTP individuelle induite par les TBS et celui de LTP induite par l'apprentissage. **C** : Il n'y a pas de différence de niveau de freezing entre les groupes d'animaux dont l'électrode présente (n=4) ou non (n=16) une LTP induite par l'apprentissage. **D** : Absence de corrélation entre le niveau de « freezing » individuel et le niveau de LTP. **E** : Absence de corrélation entre le niveau de LTP et l'intensité de stimulation. **F** : Absence de corrélation entre le niveau de LTP et l'amplitude moyenne des fEPSPs de la ligne de base. **G** : Absence de corrélation entre le niveau de LTP et l'amplitude moyenne des fEPSPs rapportée à l'amplitude maximale obtenue au cours de la courbe courant-réponse.

Un point intéressant de nos résultats est que la saturation de la LTP (mesurée en moyennant les 30 dernières minutes d'enregistrement à la fin des protocoles de TBS) ne semble pas avoir d'impact sur le niveau de freezing des animaux mesuré 24h après ce protocole, c'est-à-dire sur la consolidation (Test de corrélation de Spearman, $r=0,4018$, $p=0,2250$, données non représentées).

Lors de cette première expérience, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une LTP hippocampique induite par un conditionnement de peur au contexte chez 20% de nos souris. Cependant, l'augmentation des fEPSPs ne signifie pas forcément qu'il y a une LTP au niveau des synapses enregistrées. Par exemple, l'état d'éveil d'un animal et plus précisément la présence d'une activité rythmique hippocampique thêta ou delta (respectivement de 4,5 à 12Hz et de 1.5 à 4Hz) peut, de manière transitoire, influencer l'amplitude des potentiels évoqués. En effet, il a été montré que dans le stratum radiatum de la région CA1 de rats, les potentiels évoqués par une stimulation de l'hippocampe controlatéral présentent une amplitude inversement corrélée à la puissance du rythme thêta hippocampique (Segal, 1978). Selon ce même article, le rythme thêta est davantage présent lors des phases exploratoires ou d'activité motrice par rapport aux périodes de sommeil lent ou d'éveil calme. D'autres chercheurs ont entraîné des rats à aller appuyer sur un levier au bout d'un couloir et revenir ensuite chercher une boisson (récompense) au point de départ (Buzsaki *et al.*, 1981). En mesurant des fEPSPs ainsi que des « pop-spike » (réponses post-synaptiques mesurées au niveau des corps cellulaires, et non des dendrites) au niveau de CA1 et du DG, ils ont observé que l'amplitude des « pop-spike » dans CA1 est différente en fonction du comportement (courir > appuyer sur le levier > se toiletter > boire) et que cet ordre est inversé pour les réponses enregistrées au niveau du DG. Ils ont également noté que les rythmes lents thêta dans le DG sont inversement proportionnels à l'amplitude des

réponses dans cette région. Plus récemment, dans le cadre d'un apprentissage d'évitement passif chez des rats, il a été montré que l'amplitude des fEPSPs enregistrés dans CA1 est inversement corrélée au ratio des rythmes thêta/delta. Cependant, dans cette étude, les auteurs montrent que l'influence des rythmes hippocampiques sur les fEPSPs n'est pas suffisante pour expliquer à elle-seule l'augmentation des réponses mesurées dans CA1 suite à l'apprentissage (Whitlock *et al.*, 2006). Il semble donc exister une modulation de l'amplitude de réponses dans l'hippocampe par l'activité de l'animal par le biais du rythme thêta hippocampique. Cette modulation peut n'interférer que faiblement avec le niveau de LTP induite par un apprentissage car il s'agit de modulations de faible amplitude.

Dans notre étude, des raisons techniques nous empêchent de filmer les animaux lors des enregistrements électrophysiologiques. Nous n'avons donc pas de données sur leur comportement au moment des enregistrements. Cependant, les souris semblent toutes être calmes durant les enregistrements, il n'y a donc pas de raison que 20% d'entre elles présentent une augmentation des fEPSPs uniquement due à un état d'éveil particulier. De plus l'amplitude des fEPSPs enregistrés n'est pas corrélée au ratio des rythmes thêta et delta hippocampique au niveau individuel (Figure 17). Les données groupées montrent une corrélation entre l'amplitude des fEPSPs et le ratio thêta/delta, et une régression linéaire montre que la pente de la droite de corrélation optimale n'est pas nulle, mais avec un coefficient r^2 très faible (0,0507), ce qui laisse supposer que la corrélation obtenue est due essentiellement au nombre important de données (un seul enregistrement d'une heure compte 120 points). Nous pouvons donc considérer que la variation des enregistrements n'est pas liée à l'état d'éveil de l'animal.

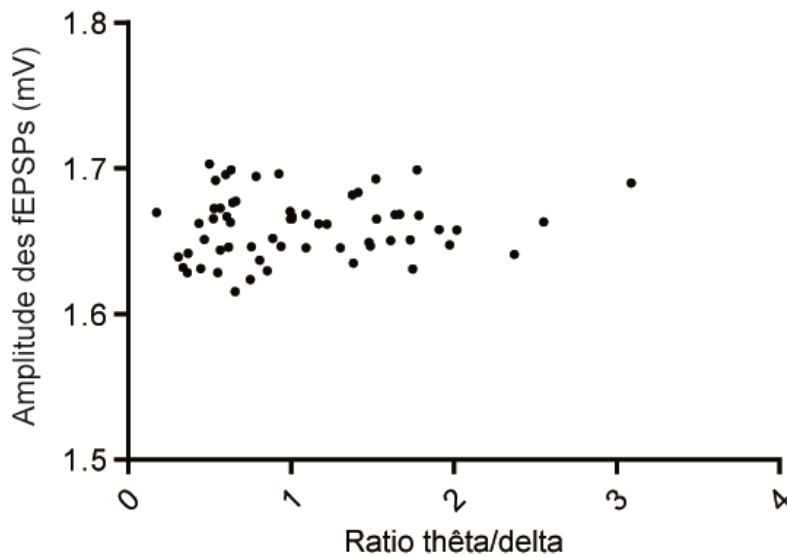


Figure 17 : Absence de corrélation entre la taille des fEPSPs et le rapport des rythmes thêta/delta (exemple d'un seul enregistrement de ligne de base de 30min). Test de Pearson : $R=0,111$, $p=0,3984$.

En outre, il a été montré que la température du cerveau peut modifier la pente des fEPSPs (Moser, Moser et Andersen, 1994). Les auteurs ont enregistré des fEPSPs dans le DG de rats, en mesurant la température cérébrale lorsque les animaux sont placés dans une arène avec 2 objets. En dissociant les phases exploratoires et de repos, ils ont remarqué que lors d'une exploration, la température cérébrale augmente d'environ 4°C en moins de 20min et qu'en parallèle la pente des fEPSPs augmente d'environ 6,5%. La phase de repos qui suit entraîne un retour à la ligne de base de la température cérébrale et de la pente des fEPSPs. Il peut donc exister une corrélation entre le comportement d'exploration, la température cérébrale et les fEPSPs. Bien qu'il aurait été intéressant de mesurer la température cérébrale dans notre étude, les animaux sont habitués à la cage d'enregistrement, ils ne présentent donc qu'un faible comportement exploratoire ne permettant pas d'expliquer à lui seul l'augmentation de l'amplitude des fEPSPs que nous observons.

Des expériences d'occlusion de LTP montrent que ce phénomène est saturable dans un temps défini (Sacchetti *et al.*, 2002, Whitlock *et al.*, 2006). Autrement dit, il existe un maximum de potentialisation au-delà duquel la force des connexions synaptiques ne peut plus augmenter. En appliquant des protocoles de tetanus répétés, nous avons pu saturer la LTP après le conditionnement de peur au contexte. Nous avons observé une occlusion de la LTP induite par les TBS par les modifications induites par l'apprentissage. Cela permet d'affirmer que ces deux phénomènes partagent des mécanismes communs et que le conditionnement de peur au contexte a effectivement induit une LTP dans l'aire CA1 de l'hippocampe des souris.

Certains chercheurs rapportent que la saturation de la LTP hippocampique bloque la consolidation d'un apprentissage spatial en labyrinthe aquatique de Morris (Moser *et al.*, 1998, Barnes *et al.*, 1994). Ces expériences montrent que perturber le réseau neuronal hippocampique en induisant une LTP par des HFS après un apprentissage inhibe la formation d'une mémoire hippocampo-dépendante. Il a également été montré qu'une lésion bilatérale de l'hippocampe de rats jusqu'à 7 jours après un CFC provoque un déficit de mémoire contextuelle (Kim et Fanselow, 1992). Cela démontre l'importance des connexions hippocampiques dans la consolidation ou le rappel de cette mémoire. Nous pourrions ainsi nous attendre à ce que l'expérience d'occlusion, réalisée 1h après le conditionnement de peur au contexte bloque la formation de la mémoire. Or, ce n'est pas le cas dans notre expérience. Ceci suggère que la plasticité au niveau des collatérales de Schaffer est requise pour l'encodage et la consolidation immédiate de la mémoire mais qu'au bout d'une heure, l'information encodée par d'autres structures suffit à maintenir des performances mnésiques correctes.

Il a été montré à plusieurs reprises que le stress peut inhiber au moins partiellement la LTP et favoriser la LTD amygdalienne (Maroun et Richter-Levin, 2003) et hippocampique (Kim, Foy et Thompson, 1996, Maggio et Segal, 2011, Huang *et al.*, 2012). Le stress induit lors du conditionnement de peur au contexte pourrait donc présenter interférer avec nos mesures de plasticité hippocampique. Cependant, dans toutes ces études, les animaux ont subi un protocole d'induction de LTP ou de LTD soit sur tranche, soit sur animal anesthésié, dans les heures qui suivent le stress. Par ailleurs, nous avons observé une occlusion de la LTP induite par les TBS par la LTP induite par l'apprentissage. Les auteurs ayant travaillé sur tranche ou sur animal anesthésié après l'induction du stress n'ont pas pu effectuer de ligne de base avant le stress. Il est envisageable que le protocole de stress en lui-même, qu'on peut assimiler à un conditionnement de peur au contexte, induise une plasticité

hippocampique qui provoque une occlusion de la LTP ou une facilitation de la LTD induites par la suite.

Une étude nous permet de comparer les effets des protocoles de stress à ceux d'un conditionnement de peur au contexte. Les auteurs ont réalisé un conditionnement de peur au contexte avec des rats (Sacchetti *et al.*, 2002). Juste après ce protocole, les rats sont euthanasiés pour pouvoir effectuer des protocoles d'électrophysiologie sur des tranches de cerveaux. Les auteurs enregistrent les fEPSPs de la région CA1 hippocampique. Les résultats montrent que les rats ayant été conditionnés présentent une LTP plus faible au moins jusqu'à un jour après le conditionnement. Cette équipe en conclut que la plasticité (qu'ils n'ont pas pu observer directement) induite au niveau des collatérales de Schaffer par le conditionnement de peur au contexte provoque une occlusion de la plasticité induite ultérieurement par leurs protocoles de stimulation à haute fréquence. Dans leur étude, un groupe contrôle a subi un protocole de choc seul au lieu du CFC, c'est-à-dire qu'ils n'ont été placés que 30s dans la cage de conditionnement, le temps de recevoir 7 chocs électriques. Ces rats présentent par la suite une LTP des collatérales de Schaffer équivalente au groupe contrôle exposé à la cage d'élevage. A partir de ces résultats, nous pouvons supposer que ce n'est pas le stress en lui-même (généré par les chocs électriques) qui induit une LTP dans le cadre d'un CFC, mais son association au contexte. Cette hypothèse fera l'objet de l'expérience 2.

Nous avons pu observer une LTP hippocampique chez 20% des souris enregistrées, pourtant, 100% des animaux apprennent, et il n'y a pas de corrélation entre le niveau de LTP et le niveau d'apprentissage. Si c'est effectivement le CFC qui induit une LTP des collatérales de Schaffer dans notre étude, on peut se demander pourquoi il n'y a pas de corrélation entre le niveau de LTP observé et le niveau d'apprentissage des souris. En effet, en 2006, Gruart et ses collaborateurs ont enregistré des fEPSPs dans la région CA1 de souris en plaçant une électrode d'enregistrement dans CA1 et une électrode de stimulation dans CA3. Ils ont utilisé le paradigme de clignement de l'œil conditionné, qui consiste à associer un clignement de paupière (induit par une stimulation électrique du nerf trigéminal) et un son. Ils ont pu enregistrer une LTP qui se met en place au cours de l'apprentissage (qui dure 10 jours, à raison de 60 essais par jour) et diminue lors de l'extinction (qui dure 5 jours). Cette LTP est corrélée au niveau d'apprentissage des souris, ce qui n'est pas le cas dans notre expérience. Cependant plusieurs points méthodologiques peuvent expliquer ces différences de résultats. Dans leur étude les fEPSPs sont enregistrés dans l'environnement dans lequel les animaux apprennent, et dans l'intervalle entre la présentation du stimulus conditionnel (son) et du stimulus inconditionnel (choc électrique), ce qui crée un biais

important quant à l'état émotionnel de l'animal. Dans cet intervalle de temps, les animaux s'attendent à recevoir un choc électrique (cette idée est corroborée par l'apparition d'une activité musculaire sur l'électromyogramme de leur paupière durant cet intervalle), ce qui les place probablement dans un état de vigilance et de stress élevé. Or, comme décrit précédemment, l'état d'éveil est connu pour entraîner des modifications des fEPSPs dans l'hippocampe de manière transitoire. On peut donc supposer que l'augmentation des fEPSPs enregistrée par cette équipe reflète au moins en partie un état de vigilance et de stress accrus chez leurs animaux. Il est possible qu'il y ait tout de même une LTP induite par cet apprentissage, mais sa détection serait facilitée par l'augmentation transitoire des fEPSPs liée à d'autres facteurs que l'apprentissage.

Pour nous affranchir des biais liés à l'état d'éveil ou de stress des animaux, nous avons enregistré les fEPSPs en dehors de la période de conditionnement et dans un environnement émotionnellement neutre et familier pour l'animal. Si l'augmentation des fEPSPs observée est liée au stress ou à l'état de vigilance de l'animal, elle devrait être présente chez tous les animaux, ce qui n'est pas le cas dans notre expérience.

A ce jour, seule une équipe de chercheurs présente des résultats similaires aux nôtres. Ils ont pu implanter 8 électrodes d'enregistrement au niveau des collatérales de Schaffer de l'hippocampe de rats et mesurer la plasticité induite par un apprentissage d'évitement passif. Ces chercheurs ont remarqué qu'au sein de l'hippocampe d'un même animal, certaines électrodes présentent une LTP, d'autres non (Whitlock *et al.*, 2006). Au total, 12/44 électrodes présentent une LTP, soit environ 27,3%. Ce chiffre est cohérent avec les résultats que nous avons obtenus (4/20 électrodes, soit 20%). Les auteurs émettent l'idée que la plasticité ne serait pas présente partout dans CA1 et qu'elle serait répartie en « hot spots », ce qui signifie qu'au sein d'un même animal, chaque électrode peut enregistrer une zone présentant ou non un « hot spot » de LTP. Puisque nous n'avons implanté qu'une seule électrode d'enregistrement par souris, observer de la LTP dépendrait de la position de l'électrode d'enregistrement au sein de CA1. Bien que dans notre cas, il s'agisse pour chaque électrode d'un animal différent, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la position de l'électrode et la survenue d'une plasticité synaptique, tout comme Whitlock *et al.* (Figure 18), les « hot spots » ne seraient donc pas répartis de la même manière chez tous les animaux. Autrement dit, étant donné que nous n'enregistrons pas l'ensemble des potentiels post-synaptiques de CA1, la LTP induite par le CFC chez un animal peut être située hors de notre champ d'enregistrement. Dans les expériences en annexes 1 et 2 nous avons tenté de confirmer cette hypothèse.

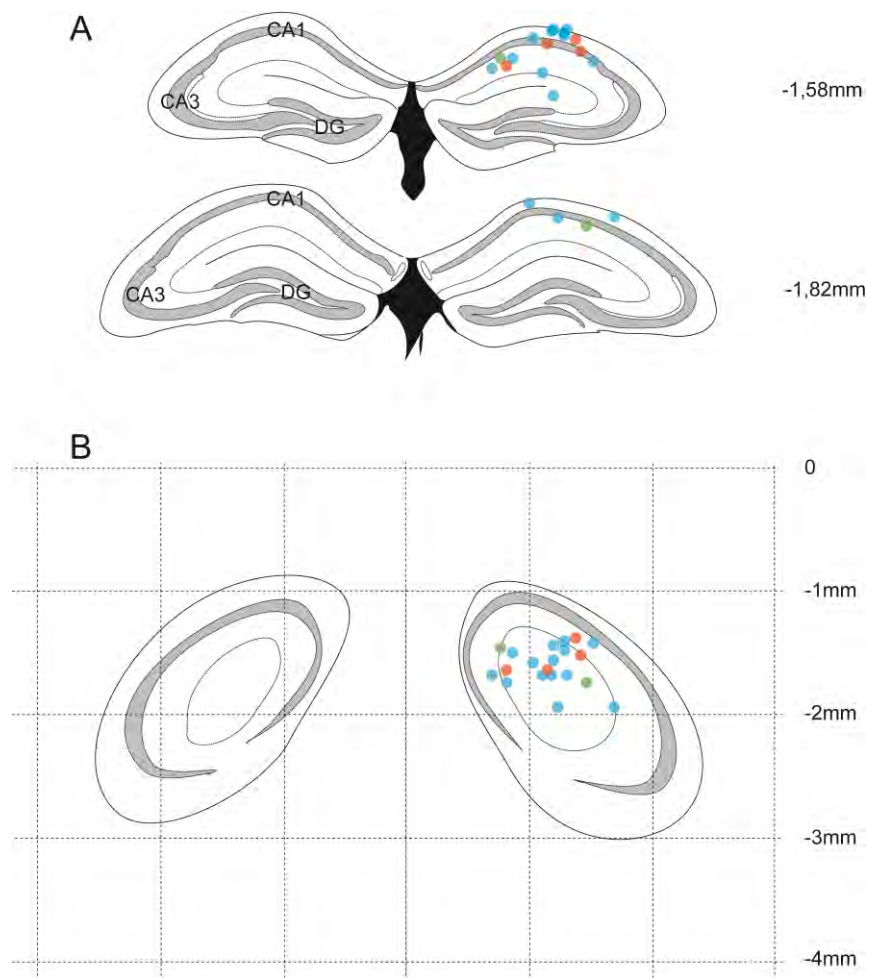


Figure 18 : La position des électrodes d'enregistrement ne semble pas corrélée à la survenue d'une LTP hippocampique. **A** : Schéma des données histologiques vues en coupes transversales d'hippocampe. **B** : Représentation des données histologiques en vue de dessus. Les distances par rapport au Bregma sont exprimées à droite en mm. Les points rouges représentent les sites d'enregistrement présentant de la LTP. En vert est représentée l'apparition d'une LTD. En bleu sont représentés les sites d'enregistrement sans plasticité

Expérience 2 : L'exposition à la nouveauté contextuelle suffit à induire une potentialisation à long terme dans CA1.

La première expérience de ce chapitre suscite des interrogations sur les mécanismes impliqués dans la mise en place de la LTP induite par l'apprentissage. Le but de cette 2ème expérience est de tester l'implication du facteur émotionnel dans la mise en place de la LTP. Afin d'obtenir une indication sur la nécessité du choc aversif pour obtenir une LTP hippocampique, nous avons réalisé le même protocole comportemental que précédemment mais sans délivrer de choc électrique aux animaux durant l'apprentissage. Ce travail a été réalisé en partie avec Fanny Roumier dans le cadre de son stage de première année de Master Biosanté.

Les données électrophysiologiques ont directement été analysées à l'échelle individuelle. En prenant le même critère-seuil que précédemment, aucune électrode ne présente de LTP suite à l'exposition à la cage d'élevage (Figure 19A). En revanche, après une exposition à un nouveau contexte pendant 7 minutes, 11 électrodes sur 20 présentent une potentialisation à long terme (Figure 19B). Ainsi, le choc électrique n'est pas requis pour le déclenchement de la LTP hippocampique.

Une ANOVA à deux facteurs pour mesures répétées appliquée aux données électrophysiologiques des deux groupes comportementaux (CFC vs nouveauté) pour les électrodes qui présentent de la LTP (Figure 19C) montre un effet significatif du temps sur les fEPSPs ($F(17,221)=6,356$, $p<0,0001$), une différence claire entre les deux groupes comportementaux ($F(1,221)=7,744$, $p=0,0155$) et un effet du temps différent en fonction du groupe comportemental ($F(17,221)=1,752$, $p=0,0357$). Cela signifie que la LTP induite par le CFC est plus ample que la LTP induite par la nouveauté. Cependant, cette dernière serait plus fréquente que la LTP induite par le CFC (Figure 19D). Un test de Khi-deux appliqué sur ces données montre un résultat marginalement significatif ($\text{Khi-deux}=5,600$, $p=0,0608$), ce qui témoigne du fait que cette différence de proportion de LTP ne serait pas due au hasard. Cette expérience permet d'émettre l'hypothèse d'une répartition différente de la LTP au sein de la région CA1 hippocampique en fonction de l'apprentissage effectué. Il est également possible que l'aversion pour le choc électrique déclenche des LTD qui contrecarreraient la mise en place de la LTP dans la région CA1 de l'hippocampe.

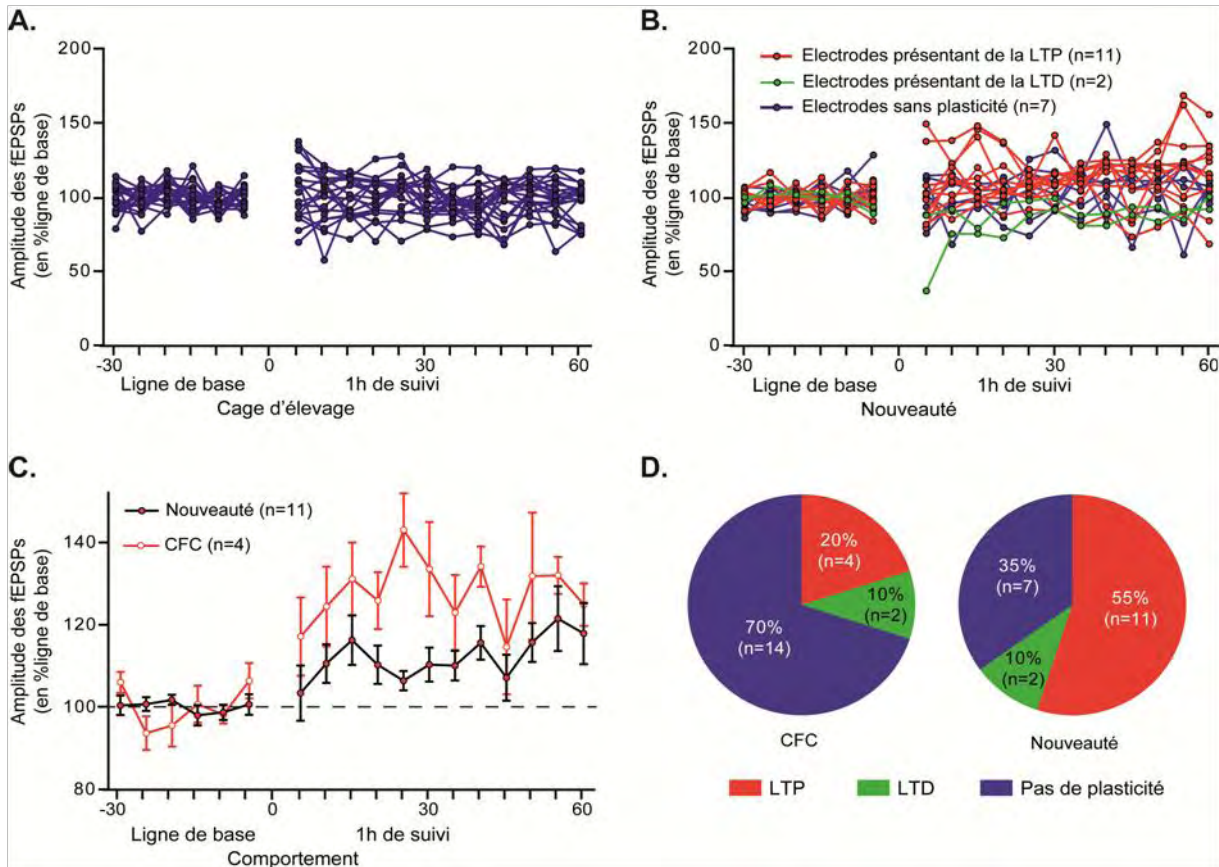


Figure 19 : L'exposition des souris à un nouveau contexte est suffisante pour induire une LTP. **A** : Données individuelles des fEPSPs au cours du temps dans l'expérience contrôlée (n=20). Il n'y a pas d'effet du placement des animaux dans leur cage d'élevage sur les fEPSPs. **B** : Données individuelles des fEPSPs au cours du temps dans l'expérience de nouveauté (n=20). Aucune électrode ne présente de plasticité dans l'expérience contrôlée, alors que 11 électrodes sur 20 présentent une LTP lors de l'exposition des animaux à un nouveau contexte. **C** : La LTP induite par le CFC est de plus grande amplitude (moyenne±SEM) que celle induite par la nouveauté contextuelle ($p=0,0357$, $F_{(17,221)}=1,752$). **D** : Les proportions d'électrodes présentant une plasticité sont différentes pour les deux groupes comportementaux (marginale significatif : $p=0,0608$).

Dans cette étude, nous nous sommes interrogés sur le rôle des chocs électriques délivrés lors d'un CFC sur la LTP hippocampique. Nous avons observé une LTP sur 55% des électrodes.

Chez l'animal, en raison de l'absence de langage articulé, il est a priori impossible de savoir si lors de l'exploration d'un contexte il apprend ou non à reconnaître ce contexte. Cependant, il a déjà été montré qu'un apprentissage de type CFC mais sans choc électrique permet une rétention mnésique du contexte en utilisant une mesure a posteriori. Le protocole consiste à différer l'exposition au contexte et les chocs électriques. En effet, lorsque des rats sont pré-exposés à un contexte puis reçoivent le lendemain un choc électrique lors d'une très brève exposition à ce même contexte (expérience « immediate shock »), ils présentent une bonne mémoire de ce contexte 24h après le choc électrique, ce qui n'est pas le cas des animaux pré-exposés à un contexte différent. Ce phénomène s'appelle l'effet de facilitation par la pré-exposition contextuelle (« Contexte Pre-exposure Facilitation Effect », CPFE). Utilisé dans un premier temps dans le cadre d'un conditionnement gustatif aversif (Miller *et al.*, 1989), il a été utilisé plus récemment pour disséquer l'implication de l'hippocampe et de l'amygdale dans les différentes composantes du conditionnement de peur au contexte.

Une injection d'anisomycine dans l'hippocampe juste après la pré-exposition mais pas juste après le choc électrique perturbe la mémoire à long terme dans le CFC (Barrientos *et al.*, 2002). De même, inhiber l'hippocampe avant la pré-exposition contextuelle entraîne un déficit mnésique du contexte (Schiffino *et al.*, 2011). Cela signifie que l'encodage de l'information contextuelle se fait lors de la pré-exposition au contexte et que l'association du choc au contexte est indépendante de l'hippocampe. L'inactivation de l'amygdale par une injection locale de muscimol juste après un CFC classique, provoque un déficit de mémoire à long terme (Huff *et al.*, 2005). La même équipe a montré que lorsque l'amygdale est inactivée au moment de la pré-exposition mais pas au moment du « immediate shock », les animaux présentent un taux de freezing au contexte plus faible que les contrôles. De plus, une inhibition de la synthèse protéique amygdalienne juste après la pré-exposition contextuelle n'entraîne pas de déficit mnésique alors qu'une injection d'anisomycine dans l'amygdale après la procédure du « immediate shock » provoque un déficit de mémoire à long terme du CFC (Huff et Rudy, 2004). Ces résultats témoignent de la nécessité d'une part de l'activité de l'amygdale pour moduler l'encodage du contexte et d'autre part de sa plasticité pour encoder le choc ou son association au contexte. Lorsque la pré-exposition est trop longue, le phénomène inverse peut être observé. C'est-à-dire que l'animal peut apprendre que ce contexte est sécurisant (puisqu'il ne s'y passe rien) et la session « immediate shock » n'est pas suffisante pour induire une peur du contexte. On parle dans

ce cas d'effet d'inhibition latente (Honey et Good, 1993, Schmajuk et Larrauri, 2005). Dans le cadre de nos expériences d'électrophysiologie, nous avons utilisé un protocole légèrement différent de celui classiquement utilisé pour l'étude de l'effet de facilitation de la pré-exposition contextuelle. Nous avons réalisé une expérience uniquement comportementale en parallèle permettant de vérifier que l'exposition au contexte telle que nous la réalisons est suffisante pour que les souris acquièrent une représentation de ce contexte (Figure 20).

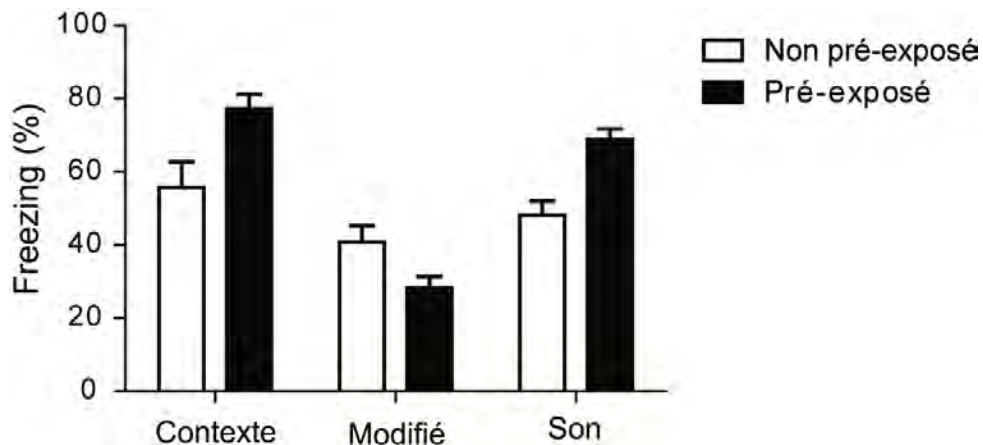


Figure 20 : Une pré-exposition de 7min à un contexte est suffisante pour que les souris apprennent le contexte. Une ANOVA à deux facteurs effectuée sur les valeurs d'arcsinus de la racine des taux de freezing montre un effet du test comportemental effectué ($F(2,32)=57,32$, $p<0,0001$), un effet marginalement significatif de la pré-exposition ($F(1,32)=3,814$, $p=0,0686$) et un effet significatif de l'interaction de ces deux facteurs ($F(2,32)=19,71$, $p<0,0001$). Les animaux non pré-exposés présentent un fort taux de freezing basal et une généralisation qui peut être due à l'absence de familiarisation des animaux dans cette expérience. Chaque groupe est constitué de 9 individus.

Le groupe d'animaux pré-exposés au contexte présente un taux de freezing à ce contexte et au son plus importants que les animaux non pré-exposés (tests post-hoc de Bonferroni, $p<0,01$). Il n'y a pas de différence significative de freezing entre les deux groupes lors du test au contexte modifié, ce qui signifie que le taux de freezing basal est similaire d'un groupe à l'autre. Cependant, le groupe non pré-exposé présente un taux de freezing relativement élevé dans les trois tests. Une ANOVA à un facteur appliquée uniquement aux données de ce groupe ne fait ressortir aucune différence significative entre le freezing au contexte, au contexte modifié et au son, ce qui montre que ce groupe généralise une peur d'un choc électrique à ces environnements, sans associer spécifiquement le choc au contexte dans lequel il a été subi. Nous avons ainsi pu montrer qu'une exposition de 7min à un contexte est suffisante pour apprendre ce contexte, ce qui est en accord avec l'observation de LTP hippocampiques induites par cette exposition.

Dans la publication de Whitlock et collaborateurs (2006), les auteurs ont réalisé une expérience d'exposition au contexte d'évitement passif sans choc électrique (expérience « walk-through ») et n'ont pas observé de LTP. Cependant, dans le cadre de l'évitement passif, l'exposition au contexte est brève (environ 30 secondes), il est donc probable que cette durée soit insuffisante pour induire une rétention du contexte, ce qui peut expliquer l'absence de LTP hippocampique chez ces animaux.

En comparant les données de cette expérience avec celles de l'expérience 1, on remarque qu'une LTP des collatérales de Schaffer est plus souvent détectée lors de l'exposition à la nouveauté contextuelle que lors d'un CFC. Cependant, la LTP mesurée semble être de moins grande amplitude. Le seul facteur qui change entre les deux expériences est la présence ou non de chocs électriques lors de l'apprentissage du contexte. Il est possible que lors de l'exposition à la nouveauté, les sites de LTP des collatérales de Schaffer soient plus nombreux (expliquant une détection de LTP plus fréquente) mais moins ample sur chaque site (expliquant une mesure moins ample de LTP). En reprenant l'hypothèse des « hot spots » formulée dans l'expérience 1, il est également possible que des événements de même amplitude soient tout simplement disséminés de manière plus homogène dans l'hippocampe suite à l'exposition à la nouveauté que lors du CFC. (Figure 21). L'amygdale est une structure qui peut moduler la plasticité hippocampique en fonction des émotions (Huff *et al.*, 2006). Il a notamment été montré qu'une forte activation de l'amygdale baso-latérale modifie la balance LTP/LTD de l'hippocampe au niveau du DG (Nakao *et al.*, 2004), ce qui module peut-être indirectement celles de CA3 et de CA1. Il est donc probable que les afférences amygdaliennes de l'hippocampe soient impliquées dans cette distribution différente de la plasticité dans CA1 lors d'un apprentissage contextuel. Dans le cadre du CFC où le stress est plus important, l'amygdale pourrait contribuer à renforcer la LTP de certains « hot spots » de CA1, au détriment d'autres zones, par rapport à un apprentissage moins aversif. Les annexes 1 et 2 de ma thèse présentent des expériences visant à étayer ces hypothèses encore fragiles.

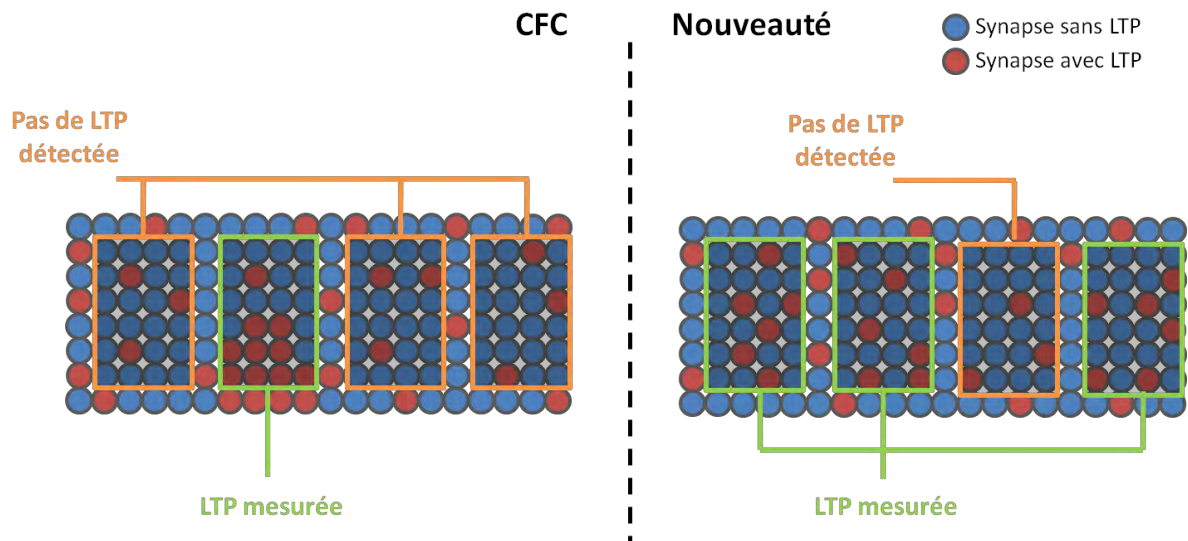


Figure 21 : Représentation schématique de la théorie des « hot spots ». L'ensemble des cercles représente les synapses des collatérales de Schaffer sur la région CA1 hippocampique. En bleu, les synapses sans LTP, en rouge les synapses avec LTP. Les rectangles représentent une zone d'enregistrement pour laquelle une LTP est détectée (vert) ou non (orange). Cette théorie des « hot spots » pourrait expliquer pourquoi lors d'un CFC, les chances d'observer une LTP sont plus faibles que lors de l'exposition à la nouveauté contextuelle, mais avec une amplitude plus importante.

Expérience 3 : Etude pharmacologique de la LTP induite par l'apprentissage

Le but de cette expérience est d'étudier l'implication de la synthèse protéique dans la mise en place et le maintien de la LTP induite au niveau des collatérales de Schaffer par l'apprentissage de peur au contexte. Pour cela, l'anisomycine, un inhibiteur de la synthèse protéique, est injecté en i.c.v. Il a été montré qu'une dose trop importante d'anisomycine provoque l'inhibition de la transmission synaptique (Sharma *et al.* 2012). Cependant, utilisée à une dose modérée, elle n'empêche pas la transmission synaptique tout en étant effective sur la synthèse protéique (Shires *et al.* 2012). Ainsi, une dose d'anisomycine qui ne bloque pas la transmission synaptique mais qui permet de bloquer la LTP tardive doit être déterminée en premier lieu. Pour cela, des courbes doses-réponses sont réalisées afin de sélectionner une dose d'anisomycine optimale. Des doses croissantes d'anisomycine (de 1,6 µg à 50 µg) sont injectées toutes les heures, chacune suivie d'une heure d'enregistrement électrophysiologique. Les résultats obtenus pour 5 souris (Figure 22) permettent de mettre en évidence que les injections d'anisomycine jusqu'à une dose de 50 µg n'inhibent pas l'activité neuronale basale (ANOVA pour mesures répétées $p= 0,5201$). Au contraire, on observe plutôt une tendance à l'augmentation de l'amplitude des potentiels de champs après les injections i.c.v. d'anisomycine. Cependant, il semble que les injections i.c.v. d'acsf ou d'anisomycine altèrent les potentiels de champs enregistrés. En effet, les injections répétées entraînent une forte variabilité de l'amplitude des potentiels de champs par rapport à celle enregistrée lors de la ligne de base sur l'ensemble des individus utilisés pour cette expérience. Ces modifications sont variables en fonction des individus, 40% des animaux présentent une augmentation du signal suite aux injections successives et la même proportion d'individus montre au contraire une diminution du signal. Seules 20% des souris (donc des électrodes) ne présentent pas de différences par rapport à la ligne de base. Le but de cette expérience étant d'identifier la dose maximale injectable en i.c.v. sans inhiber l'activité synaptique, les analyses porteront uniquement sur les données moyennées.

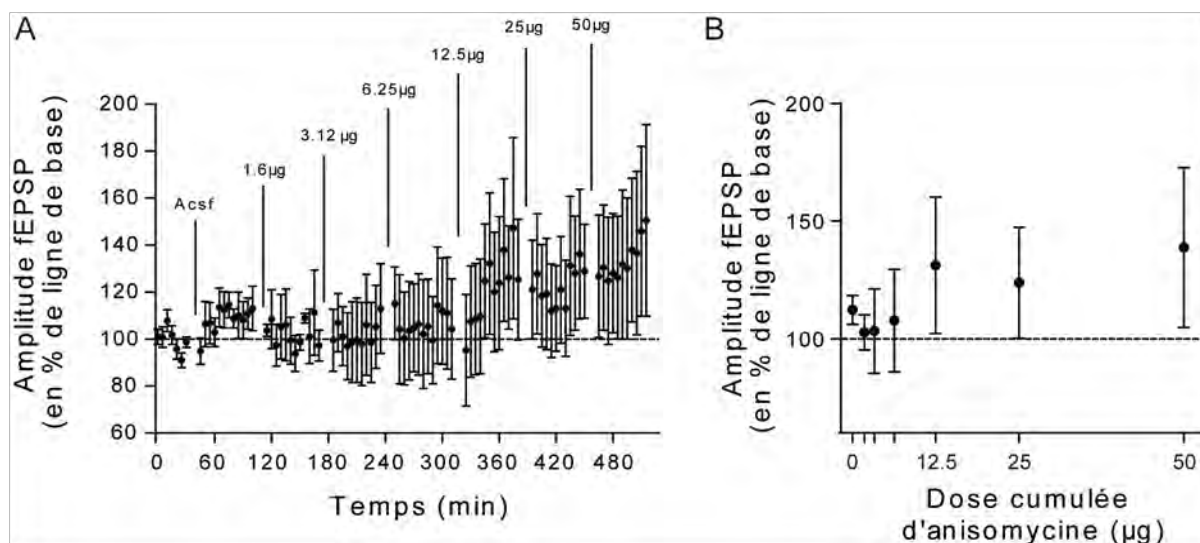


Figure 22 : Courbe dose-réponse de l'anisomycine injectée en i.c.v. A : Moyenne \pm SEM des amplitudes des potentiels de champs (%ligne de base) au cours du temps (n=5). Les doses d'anisomycine indiquées correspondent à des doses cumulées. **B :** Moyenne \pm SEM des amplitudes des potentiels de champs (%ligne de base) mesurés durant les 30 dernières minutes des enregistrements après chaque injection.

Contrairement à l'injection locale d'anisomycine (Sharma *et al.* 2012), l'injection i.c.v. d'anisomycine jusqu'à une dose de 50 µg ne semble pas inhiber la transmission synaptique basale. Nous nous sommes donc appuyés sur la littérature afin de déterminer une dose pour laquelle la phase tardive de la LTP est inhibée chez le rat (Shires *et al.* 2012), ce qui correspond à 12,5µg d'anisomycine. Pour s'assurer que la dose sélectionnée est suffisante pour inhiber la LTP tardive, un protocole de LTP induite par TBS est réalisé.

Au vu des résultats de l'expérience de dose-réponse, nous avons voulu nous assurer que les injections ne provoquent pas de variations significativement différentes de la ligne de base. La comparaison des valeurs des amplitudes de potentiels de champs mesurées lors de la ligne de base avec celles mesurées lors des 30 dernières minutes de suivi post-injection permet de mettre en évidence que l'injection d'ACSF induit une tendance à l'augmentation des potentiels de champs alors qu'au contraire l'injection d'anisomycine provoque une tendance à la diminution du signal (Figure 23). Cependant, ces variations ne sont pas significatives (t-test : $t=1,116$; $df=5$; $p=0,3153$ pour le groupe ACSF et $t=1,901$; $df=6$; $p=0,106$ pour le groupe anisomycine.). Toutes les injections réalisées en i.c.v., y compris les solutions salines semblent avoir au moins un léger effet sur la transmission synaptique basale. L'anisomycine, à une dose de $12,5\mu\text{g}$, ne semble pas avoir d'effet majeur sur cette transmission. En outre, des données obtenues lors d'expériences préalables montrent que l'injection de NaCl provoque une variabilité dans l'enregistrement électrophysiologique moins importante que celle provoquée par l'ACSF. C'est pourquoi dans la suite des expériences, les groupes contrôles reçoivent des injections i.c.v. de NaCl.

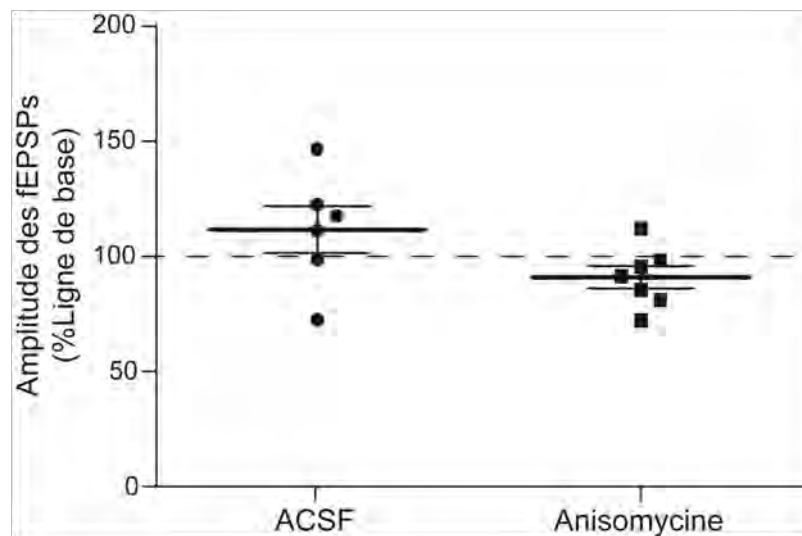


Figure 23 : Comparaison des effets de l'injection d'ACSF et d'anisomycine sur l'amplitude des potentiels de champs. La ligne en pointillés correspond à la valeur basale des amplitudes. Chaque point représente la moyenne de l'ensemble des fEPSPs mesurés lors des 30 dernières minutes du suivi post-injection ($n=6$ pour le groupe ACSF, $n=7$ pour le groupe Anisomycine). T-test : $p=0,3153$ pour le groupe ACSF et $p=0,106$ pour le groupe Anisomycine.

Nous avons ensuite voulu nous assurer que dans nos conditions expérimentales, l'anisomycine injectée en i.c.v. à une dose de 12,5µg bloque la phase tardive d'une LTP induite par un tetanus. Pour cela, 19 animaux ont été utilisés, 3 ont présenté des crises d'épilepsie liée au tetanus et 3 autres ont présenté un signal électrophysiologique non exploitable. Ces animaux ont été écartés de l'étude. L'application de stimulations à hautes fréquences de type thêta burst 1h après avoir injecté de l'ACSF en i.c.v. provoque une augmentation immédiate de l'amplitude des potentiels de champs (ANOVA pour mesures répétées $p < 0,0001$) qui perdure pendant au moins 4h (Figure 24A). La même stimulation appliquée 1h après l'injection d'anisomycine (12,5µg) déclenche aussi une LTP (ANOVA pour mesures répétées $p < 0,0001$) (Figure 24B). Cependant cette augmentation de la transmission synaptique ne dure qu'environ une heure et demie puis le signal revient au niveau de la ligne de base. Nous pouvons donc dire que l'injection d'anisomycine à la dose utilisée n'empêche pas l'induction de LTP précoce mais est suffisante pour inhiber la phase tardive de la LTP. La LTP précoce semble légèrement plus faible pour le groupe anisomycine que pour le groupe contrôle. Une ANOVA à deux facteurs pour mesures répétées appliquée au début de la LTP (la première heure et demie de suivi) ne fait pas ressortir de différence significative entre les deux groupes (effet du groupe : $F_{(1,187)}=1,119$, $p=0,3128$, effet d'interaction : $F_{(17,187)}=0,2622$, $p=0,9987$). Cependant, au vu de la variabilité interindividuelle, l'effectif paraît faible pour pouvoir affirmer qu'il n'y a aucune différence. Il est donc possible que l'anisomycine inhibe partiellement la première phase de la LTP des collatérales de Schaffer. Dans le chapitre 1 de ce manuscrit, nous avons vu que l'injection d'anisomycine dans CA1 ne perturbe pas la formation de la mémoire à court terme du conditionnement de peur au contexte. L'inhibition partielle de la e-LTP de CA1 par l'anisomycine ne serait donc pas suffisante pour empêcher la formation d'une mémoire à court terme.

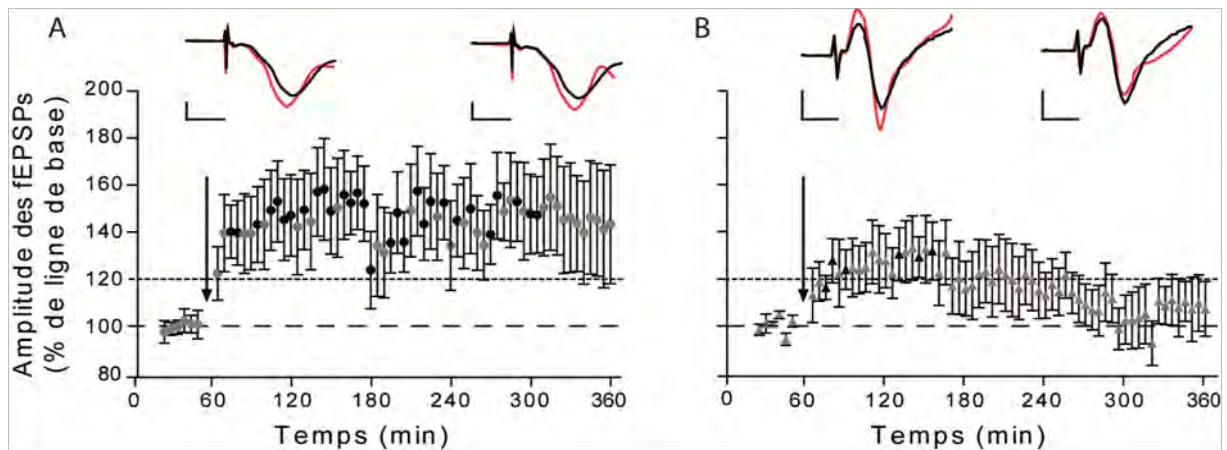


Figure 24 : Induction de LTP par un protocole de TBS appliqué à l'hippocampe de souris contrôles ou injectées en i.c.v. avec de l'anisomyline. **A** : Amplitude des fEPSPs au cours du temps pour le groupe contrôle ayant reçu une injection i.c.v. d'ACSF 1h avant les TBS (n=6). **B** : Amplitude des fEPSPs au cours du temps pour le groupe ayant reçu de l'anisomyline 1h avant les TBS (n=7). La flèche noire correspond au moment où les TBS sont appliquées. Une ANOVA pour mesures répétées montre un effet du temps pour les deux groupes ($p < 0,0001$). Les symboles noirs représentent des valeurs significativement différentes de la ligne de base (t-test : $p < 0,05$). Les tracés représentés au dessus des graphiques montrent, pour chaque condition expérimentale, la superposition de tracés de potentiels de champs enregistrés avant (en noir) et soit 1 heure (à gauche) soit 5 heures (à droite), après les TBS ; échelle : verticale : 0.2 mV, horizontale : 5 ms.

Par la suite, nous avons étudié le rôle de la synthèse protéique dans la mise en place et le maintien de la LTP induite par l'apprentissage. Afin de s'assurer de la stabilité du signal enregistré en absence d'apprentissage, une expérience contrôle est réalisée. Lors de celle-ci, les potentiels de champs de chaque souris sont mesurés pendant 30 minutes après l'injection de NaCl. L'animal est ensuite placé 7 minutes dans sa cage d'élevage avant une nouvelle session d'enregistrement de 5h.

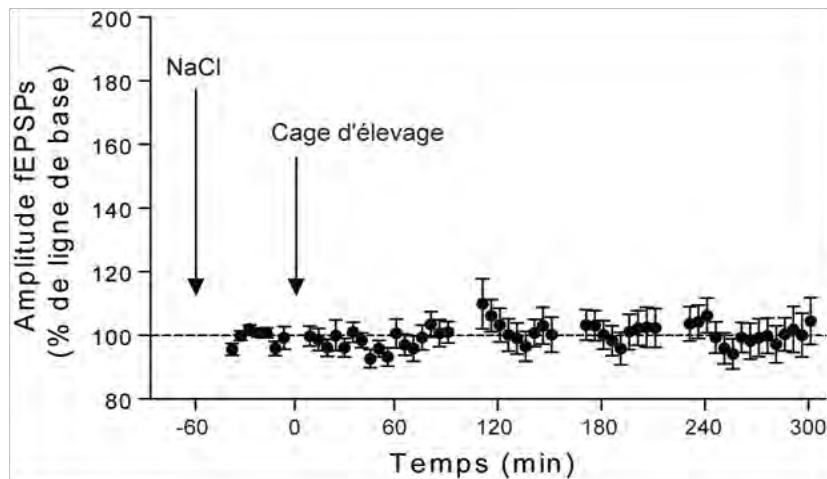


Figure 25 : Evolution des amplitudes des potentiels de champs avant et après l'exposition à la cage d'élevage. Les valeurs représentées sont les moyennes \pm SEM de l'ensemble des souris (n=19). L'exposition à la cage d'élevage est représentée par la flèche noire. ANOVA pour mesures répétées : $F=0,8676$, $p=0,7445$.

L'analyse globale des résultats obtenus sur l'ensemble des souris (Figure 25), suggère une bonne stabilité du signal au cours des 5h (ANOVA pour mesures répétées $F=0,8676$; $p=0,7445$). L'analyse détaillée pour chaque souris donne cependant des résultats moins satisfaisants. L'amplitude des potentiels de champs de chaque souris, durant la première heure suivant le séjour de 7 minutes dans la cage d'élevage montre qu'aucune souris ne présente d'évolution significative par rapport à la ligne de base. Cependant, l'analyse des 5h d'enregistrements électrophysiologiques révèle une forte variabilité interindividuelle (Figure 26A). Seulement un tiers des individus montre une activité synaptique stable sur l'ensemble de la durée des enregistrements (n=6). Un autre tiers (n=6) présente une augmentation du signal et le tiers restant (n=7) présente une diminution. En outre, cette variabilité augmente au cours du temps. Cette variabilité ne semble pas due au hasard car une même souris n'alterne pas diminution et augmentation. Au contraire, à quelques exceptions près, chacune semble montrer une tendance qui s'accroît avec le temps.

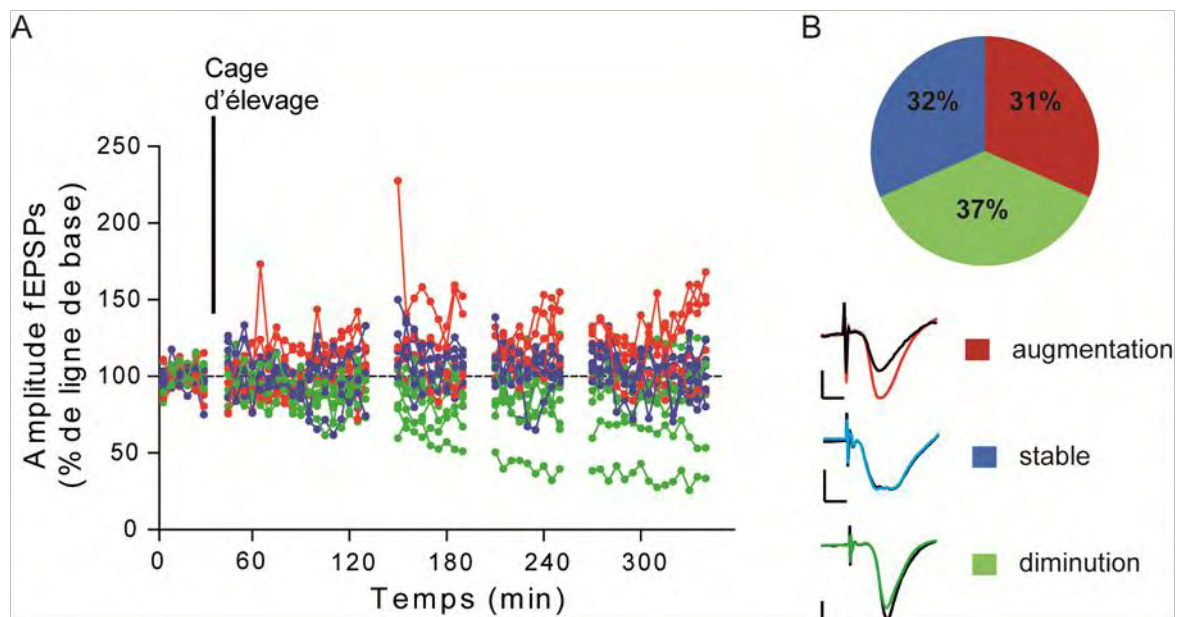


Figure 26 : Evolution sur 5h des amplitudes des fEPSPs avant et après l'exposition à la cage d'élevage pour chaque individu (n=19). **A** : Les tracés rouges représentent les électrodes dont l'amplitude des potentiels de champs augmente significativement suite à l'exposition à la cage d'élevage. Les tracés bleus représentent les enregistrements stables. Les tracés verts représentent les électrodes qui montrent une diminution significative de l'amplitude des fEPSPs suite à l'exposition à la cage d'élevage. **B** : Diagramme représentant la proportion d'individus présentant une augmentation, une diminution ou une stabilité des potentiels de champs mesurés suite à l'exposition à la cage d'élevage. Les tracés représentés en dessous du diagramme montrent la superposition de tracés de potentiels de champs enregistrés avant et après l'exposition à la cage d'élevage ; verticale : 0.2 mV, horizontale : 5 ms.

Cette instabilité des réponses observées pour le groupe contrôle au delà d'une heure d'enregistrement nous empêche de mesurer la LTP induite par l'apprentissage sur le long terme. Nous n'avons donc pas poursuivi cette expérience plus loin. Cependant, nous avons montré qu'il est possible d'analyser des fEPSPs suite à l'injection i.c.v. d'agents pharmacologique sur le court terme (1 heure). A l'avenir il serait donc intéressant de tester sur la e-LTP induite par l'apprentissage l'effet de drogues dont l'action sur la e-LTP artificielle est connue.

L'objectif de cette expérience était de déterminer le rôle de la synthèse protéique dans la mise en place et le maintien de la LTP induite de manière naturelle, c'est-à-dire par l'apprentissage. Pour atteindre cet objectif, nous avons dû réaliser des expériences de mise au point afin d'allier les méthodes d'électrophysiologie que nous maîtrisons déjà et les injections intra-cérébro-ventriculaires d'un inhibiteur de la synthèse protéique : l'anisomycine.

En réalisant une courbe dose-réponse et en nous appuyant sur la littérature (Sharma *et al.* 2012), nous avons déterminé une dose d'anisomycine (12,5 µg) injectée en i.c.v. qui ne modifie pas la transmission synaptique basale. Nous nous sommes ensuite assuré que cette dose d'anisomycine est suffisante pour bloquer la phase tardive de la LTP induite par stimulations téaniques. En appliquant des TBS (stimulations plus proches du rythme hippocampique naturel que les stimulations hautes fréquences de types HFS), nous nous sommes placés dans les conditions optimales pour diminuer la probabilité d'apparition de crises épileptiques. Malgré ces précautions, ce phénomène a retardé l'avancement de nos travaux et réduit l'effectif de souris pour cette expérience. Nous avons tout de même réussi à démontrer que ce protocole de TBS sur nos animaux contrôles déclenche une LTP durable pendant au moins 4h. L'application de la même TBS sur les animaux préalablement traités avec de l'anisomycine, déclenche elle aussi une LTP. Cependant, celle-ci ne dure qu'environ une heure et demie. Ainsi, nous avons montré que l'injection d'anisomycine à une dose de 12,5µg est sûre puisqu'elle ne modifie pas la transmission synaptique mais elle est aussi efficace puisqu'elle permet de bloquer la LTP tardive. Ces résultats malgré un effectif faible, corroborent les données retrouvées dans la littérature chez le rat (Shires *et al.* 2012 ; Neyman et Manahan-Vaughan 2008). Il serait tout de même intéressant de compléter ces données avec un effectif de souris plus important (n=10 dans chaque groupe), afin de valider le maintien de cette LTP durant les 5h de suivi.

Au cours de ces expériences, nous avons pu remarquer que les injections aussi bien d'ACSF que d'anisomycine provoquent l'apparition d'une variabilité non significative dans les potentiels de champs que nous enregistrons. De manière générale, nous avons pu observer tout au long de cette étude que les différentes injections intra-cérébro-ventriculaires d'agents pharmacologiques provoquaient de faibles mais néanmoins présentes variations du signal enregistré lors des suivis post-injection par rapport à la ligne de base. Or, la LTP induite par l'apprentissage consiste en une augmentation de l'amplitude des fEPSPs difficile à détecter. L'augmentation de la variabilité après une injection i.c.v. rend quasiment impossible la détection d'une LTP. Afin d'éviter ces problèmes liés à la pharmacologie et poursuivre l'étude des mécanismes impliqués dans la LTP induite par l'apprentissage, nous proposons d'utiliser des modèles d'animaux transgéniques Knock-Out pour des protéines impliquées dans la mise en place de la LTP induite de manière artificielle. Nous pourrions utiliser le même protocole d'apprentissage sur des souris transgénique KO pour la calmoduline Kinase II (Silva *et al.* 1992) ou pour les récepteurs NMDA (Tsien *et al.* 1996) afin d'étudier la mise en place de la phase précoce de la LTP et des souris transgéniques KO pour le facteur de transcription CREB (Bourtchuladze *et al.* 1994) ou encore pour un gène précoce tel que Zif/268 (Jones *et al.* 2001) afin d'étudier la phase tardive de la LTP.

Il semble important de rappeler que cette variabilité sur le long terme (au moins sur les quatre premières heures de suivi) n'est pas un obstacle pour l'analyse de l'expérience d'induction artificielle de LTP. En effet, l'application de stimulations à haute fréquence provoque pour l'ensemble des animaux une LTP ample au niveau des sites d'enregistrements car elle concerne une augmentation de l'efficacité synaptique d'un grand ensemble de synapses. L'effet induit par les HFS ou TBS étant supérieur à l'effet variabilité, nous pouvons raisonner en termes de moyennes sur l'ensemble de l'effectif et gommer ainsi l'effet de la variabilité individuelle au cours du temps. En revanche, en ce qui concerne la LTP induite par un apprentissage, uniquement un faible pourcentage des électrodes implantées présentent une LTP (Whitlock *et al.*, 2006). Ceci nous oblige à utiliser une méthode d'analyse individuelle. La variabilité du signal au cours du temps est alors un facteur non négligeable. La variabilité observée lors des enregistrements de 5h semble relativement linéaire au cours du temps. Il est possible qu'elle ne soit pas due uniquement aux injections pharmacologiques mais à la durée de l'enregistrement en lui-même. En effet, lors des phases de familiarisation, les animaux ne sont jamais placés pendant si longtemps sur le poste d'électrophysiologie. Connaissant la capacité des animaux à acquérir une composante temporelle (même relative) d'un événement dans un contexte (Roberts *et al.*, 2008), il est tout à fait imaginable que le changement vécu dans la situation d'enregistrement de 5 heures soit perçu comme un élément nouveau, et entraîne une plasticité hippocampique ou un état émotionnel voire physiologique (les souris ne mangent pas ni ne boivent pendant l'enregistrement) particulier qui influencerait l'amplitude des fEPSPs. Afin d'étudier cette question, il faudrait pouvoir contrôler l'état émotionnel et physiologique des animaux au cours de l'enregistrement. Une autre possibilité serait de familiariser les animaux à des enregistrements longs, mais cela ne semble pas réaliste en termes de temps passé à travailler sur chaque animal, le protocole actuel ne permettant d'obtenir des résultats que pour 4 animaux maximum par semaine. Il faudrait, pour être réaliste, augmenter la capacité d'enregistrement pour pouvoir travailler avec au moins 4 souris en parallèle, ce qui n'est pas actuellement le cas au laboratoire.

Cette expérience présentait une difficulté importante, coupler l'enregistrement d'une LTP induite par l'apprentissage à de la pharmacologie intra-cérébroventriculaire. Avec cet outil, il semble possible d'étudier les mécanismes précoces de la LTP mais pas de réaliser de longues périodes d'enregistrement. Par la suite, il serait préférable d'envisager des enregistrements sans fil directement dans la cage d'élevage de l'animal avec de l'eau et de la nourriture à volonté afin d'éviter les biais liés à la faim, la soif, ou le manque de familiarité à l'environnement. Une autre possibilité sera d'utiliser des modèles de souris transgéniques pour s'affranchir des biais liés à l'injection de drogue.

Conclusion

Au cours de ce second chapitre, nous avons pu observer de la LTP des collatérales de Schaffer induite par un conditionnement de peur au contexte chez la souris. Cette LTP semble difficile à étudier sur le long terme, mais les mécanismes de la e-LTP pourront être approfondis à l'avenir en utilisant des approches pharmacologiques, génétiques, etc... Le même paradigme comportemental sans chocs électriques, c'est-à-dire sans stimulus aversif, est suffisant pour induire une trace mnésique du contexte ainsi qu'une LTP dans CA1. En comparant les données de ces deux expériences, et en nous appuyant sur les travaux de Whitlock *et al.* (2006), nous avons suggéré que les différences de probabilité d'observer une LTP et les différences d'amplitude de LTP entre les deux conditions expérimentales pouvaient être dues à une différence de répartition de la plasticité au sein même de la région CA1 hippocampique. Nous discuterons plus en détails cette hypothèse dans la discussion générale de la thèse.

Discussion générale

Lors de la première partie de ce travail de thèse, j'ai pu mettre en évidence que la synthèse protéique dans CA3 est nécessaire au maintien en mémoire à court terme du conditionnement de peur au contexte, ce qui suggère un rôle de la plasticité au niveau des fibres moussues dans le maintien à court terme de cette mémoire. Dans une deuxième partie, j'ai pu mettre en évidence une augmentation de potentiels de champs post-synaptiques suite à l'apprentissage de ce conditionnement ainsi que suite à l'exposition simple au même contexte, sans application de chocs électriques. Nous interprétons ces augmentations de potentiels de champs comme la mesure d'une LTP induite par l'apprentissage. Cette interprétation est confortée par l'observation d'une occlusion partielle de la LTP induite par une stimulation en bouffées de thêta par la LTP induite par l'apprentissage. Les différences des résultats électrophysiologiques observés entre conditions CFC et nouveauté suggèrent une différence de répartition des synapses potentialisées.

L'ensemble de ce travail a permis de corroborer le lien entre LTP et mémoire. Ce lien est déjà bien établi, mais j'ai pu constater au cours de ma thèse que le terme LTP peut déranger certains spécialistes du comportement qui lui préfèrent des expressions telles que « plasticité synaptique » ou « remaniement des synapses », reléguant le terme LTP à une mesure de la plasticité synaptique induite par des stimulations à haute fréquence. Le renforcement de la connexion synaptique peut être étudié de différentes manières et à différentes échelles. Il est par exemple possible d'étudier la taille et la forme des épines dendritiques sur des coupes de cerveaux pour des groupes d'animaux ayant subi ou non un apprentissage. On peut également mesurer l'expression de gènes immédiats précoces, dont l'implication dans la plasticité synaptique est connue. Il me paraît important de garder en tête que ce que nous appelons « LTP » ou « augmentation du nombre d'épines dendritiques » reflète en fait un même phénomène, abordé avec une approche expérimentale différente permettant de répondre à des questions qui lui sont propres. L'électrophysiologie présente l'avantage d'observer la dynamique de mise en place de cette plasticité, *in vivo*.

Dans le premier chapitre, nous avons testé l'implication de la synthèse protéique hippocampique dans la formation de la mémoire. Pour cela nous avons injecté l'anisomycine dans CA3 ou CA1 après un conditionnement de peur au contexte. L'obtention d'un déficit de mémoire à court terme lors des injections dans CA3 était inattendue et surprenante car il est communément admis que, contrairement à la mémoire à long terme, la formation de la mémoire à court terme est indépendante de la synthèse protéique. En considérant que la LTP est le support de la formation de la mémoire, celle de la synapse des fibres moussues sur CA3 devrait dépendre de la synthèse protéique dès son initiation. Les résultats de cette

expérience laissent donc supposer que l'anisomycine injectée dans la région CA3 bloquerait la LTP des fibres moussues dès leur initiation, ce qui pourrait empêcher la formation de la mémoire à court terme. Proposer que l'anisomycine injectée dans CA3 bloque la mémoire à court-terme revient à revoir les concepts de mémoire à court et long termes. Jusqu'alors, il était admis qu'une différence entre les deux résidait dans la nécessité d'une synthèse protéique pour pouvoir consolider la mémoire. Une autre manière d'interpréter nos résultats serait d'affirmer que ce que nous observons 30min après l'apprentissage est déjà une forme de mémoire à long terme. Il s'agirait donc d'une mémoire à long terme se formant très rapidement après l'apprentissage. Le CFC présente en effet les particularités d'être un apprentissage très rapide, qui plus est en un essai (notion de « flashbulb memory » dépendante du zinc, cf. Introduction générale) et avec un très fort impact émotionnel. On peut donc envisager que l'émotion accélère les processus de consolidation. En effet, il est admis que l'émotion suscitée par un apprentissage aversif tel que le CFC implique une communication entre l'amygdale et l'hippocampe. Il a été montré par exemple que lors d'un CFC, l'amygdale induit l'expression de gènes immédiats précoces au niveau de l'hippocampe (Huff *et al.*, 2006).

L'hippocampe et l'amygdale sont importants pour la rétention d'un apprentissage de peur au contexte (Selden *et al.*, 1991, Phillips et Ledoux, 1992). Pendant longtemps la dissociation entre la rétention contextuelle et la peur de ce contexte a été impossible. Autrement dit, lorsque les animaux ne présentaient pas de freezing au contexte, il était impossible de dire s'il s'agissait d'un déficit de mémoire contextuelle ou de mémoire émotionnelle. Cependant, des travaux sont parvenus à mettre en évidence le phénomène d'effet de facilitation de la pré-exposition contextuelle (CPFE). L'étude de la cinétique de la facilitation induite par la pré-exposition contextuelle permet de montrer qu'il faut au minimum un intervalle d'une heure entre la pré-exposition et le choc pour observer une association du contexte et du choc électrique (en deçà d'une heure, seul un intervalle de 5min a été testé), et la facilitation est également présente lorsque cet intervalle est de 7 jours ou 28 jours. Plusieurs études se sont basées sur ce protocole pour dissocier l'implication de l'amygdale et de l'hippocampe dans le conditionnement de peur au contexte. Des chercheurs ont inhibé l'hippocampe à l'aide d'injections locales de muscimol (un agoniste des récepteurs GABA-A) chez le rat à différents délais après l'apprentissage et ont observé les effets de cette drogue sur la mémoire à long terme. Ces expériences ont mis en évidence que l'activité hippocampique est nécessaire pendant la pré-exposition, ainsi que pendant le « immediate-shock » et le test de rappel, mais pas dans les heures qui suivent la pré-exposition (Matus-Amat *et al.*, 2004). Barrientos, O'Reilly et Rudy (2002) ont injecté de l'anisomycine dans l'hippocampe du cerveau de rats juste après la pré-exposition ou le choc immédiat. Ils ont

ainsi montré que la synthèse protéique est nécessaire dans cette région pour consolider la mémoire du contexte, mais pas le choc (ou son association au contexte préalablement appris). De plus, une inhibition des récepteurs NMDA de l'hippocampe dorsal juste avant la pré-exposition contextuelle (mais pas après) empêche la formation de la mémoire à long terme (Schiffino *et al.*, 2011), ce qui démontre l'implication précoce de ces récepteurs de l'hippocampe dorsal dans l'acquisition de la mémoire contextuelle. Il a également été montré que lorsque l'amygdale basolatérale est inactivée durant la pré-exposition seulement, par une injection locale de muscimol, soit 1h avant soit immédiatement après la pré-exposition, les rats présentent une diminution de la mémoire à long terme par rapport aux contrôles NaCl (Huff et Rudy, 2004). Cela signifie que l'amygdale est nécessaire pour l'encodage de la mémoire contextuelle à long terme. Le CFC présente les particularités d'être un apprentissage rapide et fortement émotionnel. On peut se demander si ces propriétés sont attribuables ou non à la LTP particulière de la synapse des fibres moussues sur CA3. Afin de tester l'implication de l'émotion dans la consolidation rapide du CFC, nous pourrions utiliser un paradigme de CPFE et bloquer la LTP des fibres moussues en inhibant la synthèse protéique ou en chélatant le zinc dans CA3 après la pré-exposition au contexte. Le point crucial de l'expérience sera de vérifier dans un premier temps s'il est possible d'obtenir un CPFE avec un intervalle de moins d'une heure entre la pré-exposition et le choc électrique, afin de pouvoir tester la mémoire à court terme du contexte. Si c'est l'émotion et donc l'amygdale qui est responsable de la formation rapide d'une mémoire dépendante de la synthèse protéique, on s'attend à un blocage de la mémoire à long mais pas à court terme du contexte. Le CFC est un apprentissage singulier, dans lequel les mécanismes de consolidation mis en jeu ne peuvent pas être extrapolés à tous les types d'apprentissage, en particulier non aversifs ou à plus faible valence émotionnelle. A chaque type d'apprentissage ou de mémoire est associé un type de consolidation qui lui est propre, dépendant ou non de la synthèse protéique. Il sera donc important, avant toute généralisation, de vérifier l'hypothèse testée à l'aide d'autres paradigmes comportementaux.

Une interprétation du résultat obtenu lors des injections d'anisomycine dans CA3 est qu'elle agit en bloquant la LTP des fibres moussues sur CA3 dès son initiation. En effet, la e-LTP des fibres moussues dépendrait de la synthèse de protéines directement au niveau de la synapse grâce à des ARNm pré-existants (Vickers *et al.*, 2005, Bradshaw *et al.*, 2003). Dans cette région, la LTP des collatérales récurrentes ne dépend de la synthèse protéique que pour son maintien et ne devrait donc pas être touchée par l'injection d'anisomycine dans CA3 au cours de la première heure qui suit l'apprentissage. Si tel est le cas, cela signifie que la e-LTP des collatérales récurrentes n'est pas suffisante pour induire la formation d'une mémoire à court terme du contexte. Il serait donc intéressant d'enregistrer une à une les LTP

induites dans CA3 par un apprentissage de peur au contexte en injectant de l'anisomycine dans cette région juste après le CFC. Ceci faisait initialement partie des hypothèses que nous avons proposé de tester à l'aide de l'enregistrement de la LTP induite par l'apprentissage. Cependant, il est difficile d'étudier indépendamment les fEPSPs correspondant à chaque voie afférente à l'aire CA3 à l'aide de stimulations électriques. Cette région reçoit, en plus des collatérales récurrentes et des fibres moussues, des afférences directes du cortex entorhinal via la voie perforante. Ainsi, une stimulation du DG entraîne des réponses post-synaptiques dans CA3 dues à la fois aux fibres moussues et à la voie perforante, ce qui rend l'analyse de ces réponses difficile. Pour cette raison, et étant donné la lourdeur expérimentale de l'approche électrophysiologique chez l'animal en comportement, nous n'avons pas réalisé cette expérience. Afin de s'affranchir de ce problème, nous pourrions utiliser la stimulation optogénétique. Cette technologie permet, à l'aide de souris génétiquement modifiées, de ne stimuler qu'un groupe de neurones précis grâce à un faisceau laser. Nous pourrions ainsi étudier les fEPSPs de la voie des fibres moussues en modifiant génétiquement les cellules granulaires du gyrus denté, la voie perforante en modifiant les cellules du cortex entorhinal ou la voie des collatérales récurrentes en infectant les cellules de l'aire CA3 controlatérale (Goshen, 2014). Si notre hypothèse concernant le lien entre l'émotion et la rapidité de la consolidation est vraie, on s'attend à voir apparaître une LTP des fibres moussues induite par un conditionnement de peur au contexte, dépendante de la synthèse protéique dès son initiation et dépendante du zinc. Lors d'une exposition à un nouveau contexte sans choc électrique, on s'attend à la mise en place d'une LTP sur au niveau des collatérales récurrentes qui serait indépendante du zinc et ne nécessiterait de synthèse protéique que pour son maintien.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la formation de la mémoire, j'ai étudié la LTP induite au niveau des collatérales de Schaffer par un apprentissage. Il est possible d'induire une LTP par des protocoles de stimulations à haute fréquence, de stimulations en rythme thêta, ou de stimulations en fonction de l'activité du neurone post-synaptique (protocoles de « Spike-timing dependent plasticity », STDP). Chaque protocole induit une LTP particulière en activant des voies qui lui sont propres, bien que les différentes LTP présentent tout de même de nombreuses similarités. De plus, un même protocole d'induction peut entraîner des cascades de réactions intracellulaires différentes selon la synapse visée. Il n'existe donc pas une mais des LTP, qui peuvent être étudiées non seulement dans l'hippocampe, mais aussi au niveau du cervelet, de l'amygdale, dans les cortex sensoriels, etc...

L'intérêt de cette étude est de pouvoir comprendre ce qu'il se passe réellement dans la région CA1 en termes de plasticité lors d'un apprentissage. En observant l'amplitude des fEPSPs au cours du temps en moyenne, c'est-à-dire en regroupant les données de tous les animaux, il est difficile de mettre en évidence un réel effet de l'apprentissage. La variation de l'amplitude des fEPSPs est en effet beaucoup moins importante après un apprentissage qu'après un protocole de HFS. Nous avons donc dû définir un critère seuil permettant de dire pour chaque enregistrement s'il y a LTP ou non après l'apprentissage, ce qui nécessite de bien appréhender la part de variabilité dans l'amplitude des réponses uniquement liée au hasard. Il n'existe pas vraiment de consensus sur ce point car les données sont classiquement analysées en moyenne au sein de chaque groupe. On rencontre généralement ce type de problème d'analyse neurone par neurone lorsque l'on analyse les réponses de différents neurones à un stimulus. Dans ce type d'expérience, on s'attend à ce qu'une sous population des neurones d'une structure réponde à un stimulus donné. Dans ce cas de figure, il est commun de réaliser un peri-stimulus time histogram par neurone et d'analyser la réponse de chaque neurone à l'aide d'un seuil déterminé en fonction de la moyenne et de l'écart type de la ligne de base pré-stimulus (Quiroga *et al.*, 2005). Ainsi, en utilisant la même approche, nous avons, pour chaque animal, défini un seuil de détection de la plasticité basé sur la moyenne et l'écart-type de la ligne de base. L'utilisation de ce seuil permet de détecter un peu plus finement la présence d'une LTP induite par l'apprentissage que le seuil d'amplitude (10 % de la ligne de base) utilisé par Whitlock, mais présente quelques inconvénients. Tout d'abord, les résultats obtenus sont une proportion d'enregistrements présentant ou non une LTP, leur analyse statistique nécessite alors de grands effectifs, ce qui rend difficile la comparaison de deux groupes. En effet, l'utilisation d'un test de Khi-deux, demande des effectifs suffisamment importants pour être significatif. Dans la 2^{ème} expérience du second chapitre par exemple, comparer les proportions de LTP entre le groupe CFC et le groupe nouveauté nécessite 20 enregistrements dans chaque groupe, et cela semble encore insuffisant. Par ailleurs, cette méthode de détection n'est pas utilisable pour des enregistrements longs. En effet, le seuil est défini en fonction de la moyenne et de la variabilité d'un enregistrement de 30min (ligne de base), mais lors des enregistrements de 5 heures ou couplés à de la pharmacologie comme dans le chapitre 2, l'amplitude des fEPSPs semble se disperser légèrement au cours du temps. Ainsi, plus les enregistrements sont longs, plus il y a de chances de détecter une variation, sans pouvoir savoir s'il s'agit du hasard ou effectivement d'une LTP. Il est également possible que ces variations soient davantage dues à l'injection i.c.v. qu'au temps. Une façon de contourner cette difficulté serait d'utiliser des modèles de souris KO plutôt que des substances pharmacologiques. Par exemple, nous pourrions tester l'implication des récepteurs NMDA

en utilisant des souris KO pour la sous-unité NR1 (dont on connaît l'implication dans la LTP des collatérales de Schaffer induite par HFS).

Nous avons montré qu'il est possible, chez la souris, de mesurer la LTP hippocampique induite par un apprentissage contextuel dans le cas de deux paradigmes comportementaux : le conditionnement de peur au contexte d'une part, et une exposition à un nouveau contexte sans stimulus aversif d'autre part. Tout comme Whitlock l'avait observé en 2006, nous avons noté une hétérogénéité dans l'apparition des LTP. Ne plaçant qu'une électrode d'enregistrement par animal, il nous est impossible de savoir avec certitude si cette hétérogénéité vient de différences interindividuelles ou de la probabilité de placer l'unique électrode d'enregistrement de chaque animal dans une zone de LTP (« hot spot »). Cependant, au vu des résultats de Whitlock (2006), et de nos résultats comportementaux, la seconde hypothèse nous semble plus vraisemblable. Dans le groupe ayant subi le CFC, nous avons mesuré une LTP pour 4 enregistrements sur 20, contre 11 sur 20 dans le groupe d'animaux ayant été exposés au contexte sans le choc. De plus, il semblerait que la LTP induite par la nouveauté soit moins ample que celle induite par le conditionnement de peur. La seule différence entre ces deux protocoles étant la présence ou non de chocs électriques lors de l'apprentissage, nous nous sommes demandés si l'observation des différences de LTP était fortuite ou non. Autrement dit, la différence de proportion de LTP entre les deux groupes est-elle significative au sens biologique du terme (elle l'est, au sens statistique) ? Est-ce que la présence du choc électrique pourrait être responsable de ces différences de LTP ? Pour pouvoir répondre à ces questions, il faudrait dans un premier temps voir si les « hot spots » existent ou non. Si c'est le cas, il faudrait ensuite s'assurer de la différence de répartition des « hot spots » entre les deux paradigmes.

Pour tenter de mettre en évidence l'existence de « hot spots » chez la souris, nous avons essayé de réaliser des enregistrements multiples au sein de la région CA1 d'un même animal (Annexe 1). S'il existe des zones de LTP et des zones sans LTP lors d'un apprentissage, nous devrions mesurer des LTP uniquement sur une partie des électrodes d'enregistrement. Cependant, comme illustré dans l'annexe 1, implanter plusieurs électrodes dans l'aire CA1 d'une même souris et enregistrer des fEPSPs en réponse à la stimulation de la commissure ventrale hippocampique s'est avéré techniquement très compliqué. Lorsque nous avons réussi à enregistrer des réponses évoquées par la stimulation, les réponses enregistrées sur les différentes électrodes étaient très similaires entre elles. Ceci suggère que la diffusion volumique du signal est telle que nous enregistrons le même groupe de synapses sur plusieurs électrodes. Pour pouvoir conclure quoi que ce soit de ces expériences, il aurait fallu utiliser des électrodes de plus faible diamètre (afin d'enregistrer

des volumes de synapses plus restreints). Cependant, diminuer le diamètre d'une électrode entraîne l'augmentation de son impédance (et une perte non négligeable en qualité du signal). Grâce à une collaboration avec le LAAS, il nous a été possible d'augmenter la conductivité des électrodes d'un facteur 1000 en combinant électrochimie et nanostructuration. Cela permet d'utiliser des électrodes plus petites (50µm) tout en conservant la même impédance (de l'ordre de la dizaine de kΩ) pour conserver une bonne qualité de signal (Annexe 1). Cependant, à l'heure actuelle, nous sommes toujours incapables de réaliser des électrodes permettant des enregistrements multi-sites dans l'aire CA1 de la souris. Nous avons donc utilisé une autre approche ; l'immunohistochimie (Annexe 2). En effet, un autre moyen d'observer une hétérogénéité de LTP au sein d'un même hippocampe pourrait être de cartographier, sur des coupes de cerveaux, des marqueurs de LTP. Pour cela nous avons choisi de nous focaliser sur certains gènes immédiats précoces connus pour leur implication dans la plasticité et la mémoire. Après avoir observé des marquages basaux trop intenses avec c-Fos, et un mauvais rapport signal/bruit d'un marquage Arc, un marquage de p-ERK réalisé à Montpellier dans l'équipe d'Emmanuel Valjent s'est révélé plus intéressant. Les données ne sont pas encore analysées, elles le seront dans les mois qui viennent, mais nous pouvons d'ores-et-déjà noter que ce marquage est quasiment inexistant en conditions contrôles et très diffus dans les conditions CFC et nouveauté. Cependant, le marquage p-ERK est observé surtout au niveau des corps cellulaires et quasiment pas au niveau synaptique. Si les « hot spots », dont on suppose l'existence au niveau synaptique, correspondent à des neurones répartis en clusters de corps cellulaires, le marquage p-ERK devrait permettre de les observer, s'ils existent.

Si le stimulus aversif est bien à l'origine de « hot spots » de plasticité, il serait intéressant de questionner les mécanismes de formation de ces « hot spots ». Plusieurs hypothèses peuvent expliquer une différence de répartition des LTP et LTD. Tout d'abord, les réseaux inhibiteurs locaux peuvent moduler l'amplitude de la plasticité. Il a été montré par exemple sur tranches de cerveaux de rats que l'inhibition des récepteurs GABA_A peut moduler la LTP des collatérales de Schaffer induite par un protocole de TBS mais pas celle obtenue par des HFS (Chapman *et al.*, 1998). On peut alors supposer que les différents motifs d'activation des collatérales de Schaffer obtenus au cours de différents apprentissages peuvent influencer différemment le réseau inhibiteur, ce qui module localement la plasticité. Par ailleurs, puisque le stimulus aversif semble impliqué, il est possible que l'amygdale intervienne dans la régulation de la LTP de CA1 induite par l'apprentissage. En effet, il existe un lien fort entre le stress et la LTP hippocampique. Les expériences comportementales couplées à l'électrophysiologie ne permettent pas de dire si

le stress inhibe la LTP et favorise la LTD ou l'inverse car la plupart des expériences d'électrophysiologie ont été réalisées sur tranches juste après un stress (Kim *et al.*, 1996, pour revue, Garcia, 2001). L'inhibition de la LTP et l'augmentation de la LTD observées après le stress peuvent soit refléter un effet direct du stress sur les mécanismes induisant la plasticité, soit refléter un effet d'occlusion provoquée par une LTP induite lors du stress (pour une discussion sur ce sujet voir Huang *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été montré que différents motifs de stimulations de l'amygdale de rats anesthésiés peuvent inhiber plus ou moins fortement des LTP induites au niveau du gyrus denté ou de la région CA1 de l'hippocampe (Vouimba et Richter-Levin, 2013). Dans notre cas, un moyen de tester l'influence de l'amygdale serait d'inhiber celle-ci lors de l'apprentissage du CFC et de mesurer les plasticités induites dans CA1. Si c'est bien l'émotion liée au stimulus aversif qui, via l'amygdale, module la LTP hippocampique, on s'attend à observer une répartition des plasticités similaire à celle obtenue dans le cadre de l'exposition à la nouveauté contextuelle. On peut également envisager qu'il y ait un rôle de la glie dans la régulation de la plasticité induite par l'apprentissage. En effet, les astrocytes sont connus pour réguler la concentration de glutamate dans la fente synaptique et donc moduler l'activité synaptique locale (Bergles et Jahr, 1998). De plus, il a été montré que les astrocytes peuvent contrôler l'amplitude de la LTP des collatérales de Schaffer par la communication entre un ligand ephrinA3 situé sur les astrocytes et son récepteur Eph (EphA4) situé en post-synaptique sur les cellules pyramidales de CA1 (Filosa *et al.*, 2009). Enfin, s'il existe réellement des « hot spots » de plasticité au niveau des collatérales de Schaffer, il est probable que ce soit un ensemble de facteurs qui en soit à l'origine.

En revanche, si les expériences à venir ne nous permettent pas de mettre en évidence la présence de « hot spots » de LTP au niveau des collatérales de Schaffer, une hypothèse alternative serait que les différences d'expression de LTP sont effectivement des différences interindividuelles. La plasticité de ces synapses ne serait donc pas indispensable pendant l'heure qui suit l'apprentissage pour en former le souvenir. Dans l'introduction générale du manuscrit, nous avons vu qu'au sein du circuit trisynaptique il existe une transmission sérielle des informations (du DG vers CA3, puis de CA3 vers CA1). Il est possible que tout les animaux n'apprennent pas exactement la même chose dans le test du conditionnement de peur au contexte pour arriver au même résultat comportemental. Il en résulterait qu'ils n'utiliseraient pas les mêmes mécanismes neurobiologiques. Pour expliquer nos données électrophysiologiques, il est possible d'imaginer que certaines souris présentent des plasticités au niveau de CA3 et de CA1 au moment de l'apprentissage et pendant l'heure qui suit cet apprentissage, alors que, pour d'autres souris, l'apprentissage ne déclencherait pendant ce laps de temps que de la LTP au niveau de CA3. Les collatérales

récurrentes de CA3 permettent l'auto-activation de cette région et la LTP ayant eu lieu dans CA3 lors de l'apprentissage pourrait permettre aux synapses activées au cours de l'apprentissage d'être réactivées en boucle lors des sharp wave ripples qui apparaissent lors de l'éveil calme ou du sommeil qui suit l'apprentissage et dont on sait qu'elles sont cruciales pour la consolidation mnésique (Girardeau *et al.*, 2009). Cette activité des cellules de CA3, en sollicitant de façon répétée les cellules de CA1 via les collatérales de Schaffer (Skaggs et McNaughton, 1996, Molter *et al.*, 2007), mènerait au déclenchement de plasticités au niveau des synapses des collatérales de Schaffer. Il est également possible que certaines souris ne sollicitent tout simplement pas de plasticité dans l'aire CA1, se contentant de CA3 pour générer la trace mnésique de la représentation contextuelle et de l'association au choc électrique. A ce titre, il est intéressant de noter que les résultats de la première partie de ce travail indiquent que, bien que l'injection d'anisomycine dans CA1 ait un effet sur le taux de freezing moyen à long terme, certains animaux (n=3 sur 8) présentent des taux de freezing similaires à ceux des animaux contrôles (60 à 67%). Au contraire, tous les animaux ayant reçu une injection dans l'aire CA3 présentent des taux de freezing très bas (<46%). Ceci est en accord avec un traitement sériel des informations au niveau de l'hippocampe. Il est ainsi tout à fait possible que certains animaux se passent de LTP dans l'aire de CA1 pour encoder la mémoire du conditionnement de peur au contexte. Pour tester ces hypothèses, il faudrait réaliser des enregistrements électrophysiologiques de la voie des fibres moussues et des collatérales de Schaffer pendant de plus longues périodes afin d'analyser au niveau individuel quels animaux présentent de la LTP au niveau de ces deux synapses pendant les 6h suivant l'apprentissage. Cependant, comme discuté plus haut, tester la voie des fibres moussues nécessite des outils qui ne sont pas à notre disposition au CRCA à l'heure actuelle et, comme nous avons pu le montrer dans l'expérience 3 du chapitre 2 de ce manuscrit, il nous est pour le moment difficile d'obtenir des enregistrements stables sur de longues durées.

Il serait donc souhaitable à l'avenir d'améliorer encore certains aspects techniques. Par exemple, pour optimiser des enregistrements de longue durée, nous pourrions utiliser un système d'enregistrement à distance, sans fil, dont l'équipe vient de faire l'acquisition. Cela permettrait de réaliser des enregistrements directement dans la cage d'élevage des animaux, évitant de devoir familiariser les animaux au poste d'enregistrement ainsi que les biais liés à la perturbation du sommeil ou de l'alimentation des souris. Il serait également utile d'augmenter la rentabilité de chaque animal en utilisant des électrodes multiples. La difficulté serait alors d'utiliser des électrodes suffisamment petites afin d'éviter les recouvrements des champs d'enregistrement mais présentant une impédance suffisamment faible permettant d'obtenir un bon rapport signal/bruit et des fEPSPs exploitables. Enfin, pour

réellement répondre aux questions de variabilité interindividuelle, il faudrait pouvoir travailler sur des cohortes d'animaux encore plus grandes, ce qui pourrait être possible en enregistrant plusieurs animaux en parallèle.

Ce travail de thèse avait pour objectif d'explorer les mécanismes de la formation de la trace mnésique dans l'hippocampe, à travers l'étude de la LTP. L'intérêt de la LTP induite par des protocoles de stimulation est que l'on peut obtenir des résultats assez rapidement. Cela a permis depuis les années 70 d'entrer au cœur des réseaux neuronaux afin de comprendre les mécanismes intracellulaires qui sont à l'origine du renforcement des connexions synaptiques, parfois durable plusieurs jours, mimant assez bien l'image que l'on se fait de ce qu'est la trace mnésique. Malgré l'efficacité et la rentabilité de cette méthode en termes de temps de travail et de difficulté technique, j'aurais trouvé frustrant de ne pas avoir essayé d'enregistrer ce qu'il se passe réellement dans le cerveau d'un animal en situation d'apprentissage. L'étude de la LTP induite par l'apprentissage demande énormément de temps, et présente de nombreuses sources de variabilité liées notamment au fait de travailler sur un animal éveillé et libre de ses mouvements. Etant donné sa faible amplitude, elle est difficile à détecter, et les facteurs de variabilité ne font qu'amplifier cette difficulté. Il n'existe pas encore de consensus pour les méthodes d'analyse de cette LTP. Je me suis inspirée des méthodes de Withlock *et al.*, mais le fait de n'observer que rarement une plasticité conforte difficilement l'idée que ce que nous observons est bien une LTP. Un autre inconvénient de cette approche est que puisque seule une faible proportion des enregistrements présentent une LTP, il est difficile de savoir si un agent pharmacologique bloque ou non cette LTP, à moins d'avoir un effectif très important. En revanche, en dépit de tous les inconvénients qu'elle présente, la LTP induite par l'apprentissage est le reflet en temps réel de la modification des connexions entre deux régions cérébrales d'un être vivant. Avoir mis au point cette technique chez la souris offre de nombreuses possibilités d'utilisation de modèles de souris KO pour des molécules dont on connaît l'implication dans la LTP induite par des stimulations à haute fréquence. L'étude de la LTP induite par l'apprentissage a été fastidieuse et parfois démoralisante. Cependant il me semble que cette approche est féconde car elle nous a permis de nous poser de nouvelles questions concernant les modalités de la mise en place de différents types de LTP lors de diverses tâches comportementales. Il me semble que le couplage avec l'outil optogénétique devrait permettre de répondre à des questions qui ne pourraient être abordées autrement, telles que l'implication respective de la plasticité au niveau de la voie des fibres moussues ou des collatérales récurrentes dans des apprentissages présentant une composante émotionnelle plus ou moins importante.

Références bibliographiques

- Abel, T, P V Nguyen, M Barad, T A Deuel, E R Kandel, and R Bourtchouladze. 1997. "Genetic Demonstration of a Role for PKA in the Late Phase of LTP and in Hippocampus-Based Long-Term Memory." *Cell* 88(5): 615–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054501> (September 8, 2014).
- Abraham, W C, and S E Mason. 1988. "Effects of the NMDA Receptor/channel Antagonists CPP and MK801 on Hippocampal Field Potentials and Long-Term Potentiation in Anesthetized Rats." *Brain research* 462(1): 40–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2846123>.
- Abraham, Wickliffe C, and Anthony Robins. 2005. "Memory Retention--the Synaptic Stability versus Plasticity Dilemma." *Trends in neurosciences* 28(2): 73–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15667929> (September 8, 2014).
- Alberini, C M. 2008. "The Role of Protein Synthesis during the Labile Phases of Memory: Revisiting the Skepticism." *Neurobiol Learn Mem* 89(3): 234–46. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17928243.
- Alberini, Cristina M. 2005. "Mechanisms of Memory Stabilization: Are Consolidation and Reconsolidation Similar or Distinct Processes?" *Trends in neurosciences* 28(1): 51–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15626497> (March 24, 2015).
- Anagnostaras, S G, G D Gale, and M S Fanselow. 2001. "Hippocampus and Contextual Fear Conditioning: Recent Controversies and Advances." *Hippocampus* 11(1): 8–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11261775> (September 8, 2014).
- Artinian, Julien, Xavier De Jaeger, Laetitia Fellini, Paul De Saint Blanquat, and Pascal Roulet. 2007. "Reactivation With a Simple Exposure to the Experimental Environment Is Sufficient to Induce Reconsolidation Requiring Protein Synthesis in the Hippocampal CA3 Region in Mice." *Hippocampus* 191: 181–91.
- Artinian, Julien, Anne-Marie T McGauran, Xavier De Jaeger, Lionel Mouledous, Bernard Frances, and Pascal Roulet. 2008. "Protein Degradation, as with Protein Synthesis, Is Required during Not Only Long-Term Spatial Memory Consolidation but Also Reconsolidation." *The European journal of neuroscience* 27(11): 3009–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588539> (September 8, 2014).
- Ashby, Michael C, Sarah A De La Rue, G Scott Ralph, James Uney, Graham L Collingridge, and Jeremy M Henley. 2004. "Removal of AMPA Receptors (AMPA) from Synapses Is Preceded by Transient Endocytosis of Extrasynaptic AMPARs." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(22): 5172–76. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3309030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 4, 2014).
- Babb, Stephanie J, and Jonathon D Crystal. 2006. "Episodic-like Memory in the Rat." *Current biology : CB* 16(13): 1317–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824919> (September 8, 2014).
- Bailey, C H, M Giustetto, Y Y Huang, R D Hawkins, and E R Kandel. 2000. "Is Heterosynaptic Modulation Essential for Stabilizing Hebbian Plasticity and Memory?" *Nature reviews. Neuroscience* 1(1): 11–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252764> (March 24, 2015).

- Banke, T G, D Bowie, H Lee, R L Huganir, A Schousboe, and S F Traynelis. 2000. "Control of GluR1 AMPA Receptor Function by cAMP-Dependent Protein Kinase." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(1): 89–102. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627585> (September 8, 2014).
- Barea-Rodríguez, E J, D T Rivera, D B Jaffe, and J L Martinez. 2000. "Protein Synthesis Inhibition Blocks the Induction of Mossy Fiber Long-Term Potentiation in Vivo." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(22): 8528–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069960>.
- Barnes, C A. 1995. "Involvement of LTP in Memory: Are We 'Searching under the Street Light'?" *Neuron* 15(4): 751–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576624> (September 8, 2014).
- Barnes, C A, M W Jung, B L McNaughton, D L Korol, K Andreasson, and P F Worley. 1994. "LTP Saturation and Spatial Learning Disruption: Effects of Task Variables and Saturation Levels." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14(10): 5793–5806. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931545> (March 24, 2015).
- Barria, A, D Muller, V Derkach, L C Griffith, and T R Soderling. 1997. "Regulatory Phosphorylation of AMPA-Type Glutamate Receptors by CaM-KII during Long-Term Potentiation." *Science (New York, N. Y.)* 276(5321): 2042–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197267> (September 8, 2014).
- Barria, Andres, and Roberto Malinow. 2002. "Subunit-Specific NMDA Receptor Trafficking to Synapses." *Neuron* 35(2): 345–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160751> (September 8, 2014).
- Barria, Andres, and Roberto Malinow. 2005. "NMDA Receptor Subunit Composition Controls Synaptic Plasticity by Regulating Binding to CaMKII." *Neuron* 48(2): 289–301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16242409> (July 10, 2014).
- Barrientos, R M, E A Higgins, D B Sprunger, L R Watkins, J W Rudy, and S F Maier. 2002. "Memory for Context Is Impaired by a Post Context Exposure Injection of Interleukin-1 Beta into Dorsal Hippocampus." *Behav Brain Res* 134(1-2): 291–98. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12191816.
- Bear, M F. 1995. "Mechanism for a Sliding Synaptic Modification Threshold." *Neuron* 15(1): 1–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7619513> (March 24, 2015).
- Bear, M F, and W C Abraham. 1996. "Long-Term Depression in Hippocampus." *Annual review of neuroscience* 19: 437–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8833450> (March 24, 2015).
- Bear, M F, and R C Malenka. 1994. "Synaptic Plasticity: LTP and LTD." *Current opinion in neurobiology* 4(3): 389–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7919934> (March 24, 2015).
- Bergles, D E, and C E Jahr. 1998. "Glial Contribution to Glutamate Uptake at Schaffer Collateral-Commissural Synapses in the Hippocampus." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(19): 7709–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742141> (February 24, 2015).

- Bevilaqua, L R, J H Medina, I Izquierdo, and M Cammarota. 2005. "Memory Consolidation Induces N-Methyl-D-Aspartic Acid-Receptor- and Ca²⁺/calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Dependent Modifications in Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptor Properties." *Neuroscience* 136(2): 397–403. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182449> (August 4, 2014).
- Bienenstock, E L, L N Cooper, and P W Munro. 1982. "Theory for the Development of Neuron Selectivity: Orientation Specificity and Binocular Interaction in Visual Cortex." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2(1): 32–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7054394> (March 24, 2015).
- Blanchard, R J, and D C Blanchard. 1969. "Passive and Active Reactions to Fear-Eliciting Stimuli." *Journal of comparative and physiological psychology* 68(1): 129–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5793861> (March 24, 2015).
- Bliss, T V, R M Douglas, M L Errington, and M A Lynch. 1986. "Correlation between Long-Term Potentiation and Release of Endogenous Amino Acids from Dentate Gyrus of Anaesthetized Rats." *The Journal of physiology* 377: 391–408. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1182839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Bliss, T V, and G Richter-Levin. 1993. "Spatial Learning and the Saturation of Long-Term Potentiation." *Hippocampus* 3(2): 123–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8353598> (March 24, 2015).
- Bliss, T. V. P., and T Lomo. 1973. "Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path." *Journal of Physiology* 232: 331–56.
- Bontempi, B, C Laurent-Demir, C Destrade, and R Jaffard. 1999. "Time-Dependent Reorganization of Brain Circuitry Underlying Long-Term Memory Storage." *Nature* 400(6745): 671–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458162> (February 18, 2015).
- Bourtchouladze, R, T Abel, N Berman, R Gordon, K Lapidus, and E R Kandel. 1998. "Different Training Procedures Recruit Either One or Two Critical Periods for Contextual Memory Consolidation, Each of Which Requires Protein Synthesis and PKA." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 5(4-5): 365–74. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=311273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Bradshaw, K D, N J Emptage, and T V P Bliss. 2003. "A Role for Dendritic Protein Synthesis in Hippocampal Late LTP." *The European journal of neuroscience* 18(11): 3150–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656312> (September 8, 2014).
- Bramham, C R, and B Srebro. 1987. "Induction of Long-Term Depression and Potentiation by Low- and High-Frequency Stimulation in the Dentate Area of the Anesthetized Rat: Magnitude, Time Course and EEG." *Brain research* 405(1): 100–107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3567587> (March 24, 2015).
- Brown, Roger, and James Kulik. 1977. "Flashbulb Memories." *Cognition* 5(1): 73–99. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001002777790018X> (September 8, 2014).

- Burgess, Neil, Eleanor A Maguire, and John O'Keefe. 2002. "The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory." *Neuron* 35(4): 625–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194864> (August 28, 2014).
- Burwell, R D, M P Witter, and D G Amaral. 1995. "Perirhinal and Postrhinal Cortices of the Rat: A Review of the Neuroanatomical Literature and Comparison with Findings from the Monkey Brain." *Hippocampus* 5(5): 390–408. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8773253> (September 8, 2014).
- Buzsaki, Gyorgy, Endre Grastyan, Janos Czopf, Lorand Kellenyi, and Otto Prohaska. 1981. "Changes in Neuronal Transmission in the Rat Hippocampus during Behavior." *Brain Research* 225: 235–47.
- Calixto, Eduardo, Edda Thiels, Eric Klann, and Germán Barrionuevo. 2003. "Early Maintenance of Hippocampal Mossy Fiber--Long-Term Potentiation Depends on Protein and RNA Synthesis and Presynaptic Granule Cell Integrity." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(12): 4842–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832506>.
- Cammarota, M, R Bernabeu, M Levi De Stein, I Izquierdo, and J H Medina. 1998. "Learning-Specific, Time-Dependent Increases in Hippocampal Ca²⁺/calmodulin-Dependent Protein Kinase II Activity and AMPA GluR1 Subunit Immunoreactivity." *The European journal of neuroscience* 10(8): 2669–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767396> (September 8, 2014).
- Canal, Clinton E, and Paul E Gold. 2007. "Different Temporal Profiles of Amnesia after Intra-Hippocampus and Intra-Amygdala Infusions of Anisomycin." *Behavioral neuroscience* 121(4): 732–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17663598> (September 8, 2014).
- Castro, C A, L H Silbert, B L McNaughton, and C A Barnes. 1989. "Recovery of Spatial Learning Deficits after Decay of Electrically Induced Synaptic Enhancement in the Hippocampus." *Nature* 342(6249): 545–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2586626> (March 24, 2015).
- Ceccom, Johnatan, Hélène Halley, Stéphanie Dumas, and Jean Michel Lassalle. 2014. "A Specific Role for Hippocampal Mossy Fiber's Zinc in Rapid Storage of Emotional Memories." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 21(5): 287–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741109> (September 8, 2014).
- Chapman, C A, Y Perez, and J C Lacaille. 1998. "Effects of GABA(A) Inhibition on the Expression of Long-Term Potentiation in CA1 Pyramidal Cells Are Dependent on Tetanization Parameters." *Hippocampus* 8(3): 289–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662142> (March 24, 2015).
- Chen, G, K S Chen, J Knox, J Inglis, A Bernard, S J Martin, A Justice, L McConlogue, D Games, S B Freedman, and R G Morris. 2000. "A Learning Deficit Related to Age and Beta-Amyloid Plaques in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Nature* 408(6815): 975–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11140684> (September 8, 2014).
- Chicurel, M E, D M Terrian, and H Potter. 1993. "mRNA at the Synapse: Analysis of a Synaptosomal Preparation Enriched in Hippocampal Dendritic Spines." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(9): 4054–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396172> (September 8, 2014).

- Citri, Ami, and Robert C Malenka. 2008. "Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33(1): 18–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728696> (July 13, 2014).
- Clayton, N S, and A Dickinson. 1998. "Episodic-like Memory during Cache Recovery by Scrub Jays." *Nature* 395(6699): 272–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751053> (August 22, 2014).
- Clayton, N S, and A Dickinson. 1999. "Memory for the Content of Caches by Scrub Jays (*Aphelocoma Coerulescens*)." *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes* 25(1): 82–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987859> (September 8, 2014).
- Clayton, N S, D P Griffiths, N J Emery, and a Dickinson. 2001. "Elements of Episodic-like Memory in Animals." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 356(1413): 1483–91. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1088530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Clayton, N S, K S Yu, and A Dickinson. 2001. "Scrub Jays (*Aphelocoma Coerulescens*) Form Integrated Memories of the Multiple Features of Caching Episodes." *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes* 27(1): 17–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199511> (September 8, 2014).
- Clayton, Nicola S, Joanna Dally, James Gilbert, and Anthony Dickinson. 2005. "Food Caching by Western Scrub-Jays (*Aphelocoma Californica*) Is Sensitive to the Conditions at Recovery." *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes* 31(2): 115–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15839770> (September 8, 2014).
- Clayton, Nicola S, Kara Shirley Yu, and Anthony Dickinson. 2003. "Interacting Cache Memories: Evidence for Flexible Memory Use by Western Scrub-Jays (*Aphelocoma Californica*)." *Journal of experimental psychology. Animal behavior processes* 29(1): 14–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12561130> (September 8, 2014).
- Cohen, Neal J., and Larry R. Squire. 1980. "Preserved Learning and Retention of Pattern-Analysing Skill in Amnesia : Dissociation of Knowing How and Knowing That." *Science* 210(4466): 207–10.
- Collingridge, G L, S J Kehl, and H McLennan. 1983. "Excitatory Amino Acids in Synaptic Transmission in the Schaffer Collateral-Commissural Pathway of the Rat Hippocampus." *The Journal of physiology* 334: 33–46. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1197298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Conway, M A, and C W Pleydell-Pearce. 2000. "The Construction of Autobiographical Memories in the Self-Memory System." *Psychological review* 107(2): 261–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10789197> (September 8, 2014).

- Cooke, Sam F, Jianqun Wu, Florian Plattner, Michael Errington, Michael Rowan, Marco Peters, Ayumi Hirano, Karl D Bradshaw, Roger Anwyl, Timothy V P Bliss, and K Peter Giese. 2006. "Autophosphorylation of alphaCaMKII Is Not a General Requirement for NMDA Receptor-Dependent LTP in the Adult Mouse." *The Journal of physiology* 574(Pt 3): 805–18.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1817742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (August 27, 2014).
- Corkin, Suzanne. 1968. "Acquisition of Motor Skill after Bilateral Medial Temporal-Lobe Excision." *Neuropsychologia* 6(3): 255–65.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0028393268900249>.
- Dalton, Gemma L, Dong Chuan Wu, Yu Tian Wang, Stan B Floresco, and Anthony G Phillips. 2012. "NMDA GluN2A and GluN2B Receptors Play Separate Roles in the Induction of LTP and LTD in the Amygdala and in the Acquisition and Extinction of Conditioned Fear." *Neuropharmacology* 62(2): 797–806.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21925518> (March 24, 2015).
- Daumas, Stéphanie, Johnatan Ceccom, Hélène Halley, Bernard Francés, and Jean-Michel Lassalle. 2009. "Activation of Metabotropic Glutamate Receptor Type 2/3 Supports the Involvement of the Hippocampal Mossy Fiber Pathway on Contextual Fear Memory Consolidation." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 16(8): 504–7.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19638469> (September 8, 2014).
- Daumas, Stéphanie, Hélène Halley, Bernard Francés, and Jean-michel Lassalle. 2005. "Encoding , Consolidation , and Retrieval of Contextual Memory : Differential Involvement of Dorsal CA3 and CA1 Hippocampal Subregions." *Learning & Memory*: 375–82.
- Daumas, Stéphanie, Hélène Halley, and Jean-Michel Lassalle. 2004. "Disruption of Hippocampal CA3 Network: Effects on Episodic-like Memory Processing in C57BL/6J Mice." *The European journal of neuroscience* 20(2): 597–600.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233771> (September 8, 2014).
- Davis, Sabrina, Bruno Bozon, and Serge Laroche. 2003. "How Necessary Is the Activation of the Immediate Early Gene zif268 in Synaptic Plasticity and Learning?" *Behavioural brain research* 142(1-2): 17–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798262> (September 8, 2014).
- Day, M, R Langston, and R G M Morris. 2003. "Glutamate-Receptor-Mediated Encoding and Retrieval of Paired-Associate Learning." *Nature* 424(6945): 205–9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853960> (September 8, 2014).
- Debiec, Jacek, Valérie Doyère, Karim Nader, and Joseph E Ledoux. 2006. "Directly Reactivated, but Not Indirectly Reactivated, Memories Undergo Reconsolidation in the Amygdala." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(9): 3428–33.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1413871&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 2, 2015).

- Deupree, David L., Dennis A. Turner, and Carter L. Watters. 1991. "Spatial Performance Correlates with in Vitro Potentiation in Young and Aged Fischer 344 Rats." *Brain Research* 554(1-2): 1–9.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000689939190164Q> (September 8, 2014).
- Dickerson, Bradford C, and Howard Eichenbaum. 2010. "The Episodic Memory System: Neurocircuitry and Disorders." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 35(1): 86–104.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2882963&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (July 15, 2014).
- Doyère, V, F Burette, C R Negro, and S Laroche. 1993. "Long-Term Potentiation of Hippocampal Afferents and Efferents to Prefrontal Cortex: Implications for Associative Learning." *Neuropsychologia* 31(10): 1031–53.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8290021> (January 1, 2015).
- Doyère, V, C Rédini-Del Negro, G Dutrioux, G Le Floch, S Davis, and S Laroche. 1995. "Potentiation or Depression of Synaptic Efficacy in the Dentate Gyrus Is Determined by the Relationship between the Conditioned and Unconditioned Stimulus in a Classical Conditioning Paradigm in Rats." *Behavioural brain research* 70(1): 15–29.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8519425> (March 24, 2015).
- Doyère, V, B Srebro, and S Laroche. 1997. "Heterosynaptic LTD and Depotentiation in the Medial Perforant Path of the Dentate Gyrus in the Freely Moving Rat." *Journal of neurophysiology* 77(2): 571–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9065830> (March 30, 2015).
- Dudek, S M, and M F Bear. 1992. "Homosynaptic Long-Term Depression in Area CA1 of Hippocampus and Effects of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Blockade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(10): 4363–67.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=49082&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Dunwiddie, T, and G Lynch. 1978. "Long-Term Potentiation and Depression of Synaptic Responses in the Rat Hippocampus: Localization and Frequency Dependency." *The Journal of physiology* 276: 353–67.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1282430&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 24, 2015).
- Ehret, G. 1974. "Age-Dependent Hearing Loss in Normal Hearing Mice." *Die Naturwissenschaften* 61(11): 506–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4449570> (March 24, 2015).
- Emery, N J, and N S Clayton. 2001. "Effects of Experience and Social Context on Prospective Caching Strategies by Scrub Jays." *Nature* 414(6862): 443–46.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719804> (August 22, 2014).
- Emery, Nathan J, Joanna M Dally, and Nicola S Clayton. 2004. "Western Scrub-Jays (*Aphelocoma Californica*) Use Cognitive Strategies to Protect Their Caches from Thieving Conspecifics." *Animal cognition* 7(1): 37–43.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12827547> (March 24, 2015).

- Etkin, Amit, Juan Marcos Alarcón, Stuart P Weisberg, Khalid Touzani, Yan You Huang, Alfred Nordheim, and Eric R Kandel. 2006. "A Role in Learning for SRF: Deletion in the Adult Forebrain Disrupts LTD and the Formation of an Immediate Memory of a Novel Context." *Neuron* 50(1): 127–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600861> (March 24, 2015).
- Ferbinteanu, Janina, Pamela J Kennedy, and Matthew L Shapiro. 2006. "Episodic Memory--from Brain to Mind." *Hippocampus* 16(9): 691–703. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906530> (September 8, 2014).
- Filosa, Alessandro, Sónia Paixão, Silke D Honsek, Maria A Carmona, Lore Becker, Berend Feddersen, Louise Gaitanos, York Rudhard, Ralf Schoepfer, Thomas Klopstock, Klas Kullander, Christine R Rose, Elena B Pasquale, and Rüdiger Klein. 2009. "Neuron-Glia Communication via EphA4/ephrin-A3 Modulates LTP through Glial Glutamate Transport." *Nature neuroscience* 12(10): 1285–92. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3922060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 24, 2015).
- Flood, J F, M R Rosenzweig, E L Bennett, and A E Orme. 1973. "The Influence of Duration of Protein Synthesis Inhibition on Memory." *Physiology & behavior* 10(3): 555–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4736141> (September 8, 2014).
- Florian, Cédric, and Pascal Roulet. 2004. "Hippocampal CA3-Region Is Crucial for Acquisition and Memory Consolidation in Morris Water Maze Task in Mice." *Behavioural brain research* 154(2): 365–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313024> (September 1, 2014).
- Fortin, Norbert J, Kara L Agster, and Howard B Eichenbaum. 2002. "Critical Role of the Hippocampus in Memory for Sequences of Events." *Nature neuroscience* 5(5): 458–62. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4053170&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 5, 2014).
- Frankland, Paul W, and Bruno Bontempi. 2005. "The Organization of Recent and Remote Memories." *Nature reviews. Neuroscience* 6(2): 119–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15685217> (July 9, 2014).
- Frankland, Paul W, Hoi-Ki Ding, Eiki Takahashi, Akinobu Suzuki, Satoshi Kida, and Alcino J Silva. "Stability of Recent and Remote Contextual Fear Memory." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N. Y.)* 13(4): 451–57. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1538922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 24, 2015).
- Frerking, Matthew, and Patricia Ohliger-Frerking. 2002. "AMPA Receptors and Kainate Receptors Encode Different Features of Afferent Activity." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(17): 7434–43. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2967721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Frey, U, M Krug, K G Reymann, and H Matthies. 1988. "Anisomycin, an Inhibitor of Protein Synthesis, Blocks Late Phases of LTP Phenomena in the Hippocampal CA1 Region in Vitro." *Brain research* 452(1-2): 57–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3401749>.

- Friedman, D, Y M Cycowicz, and H Gaeta. 2001. "The Novelty P3: An Event-Related Brain Potential (ERP) Sign of the Brain's Evaluation of Novelty." *Neuroscience and biobehavioral reviews* 25(4): 355–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11445140> (September 8, 2014).
- Friedman, D, M Hamberger, and W Ritter. 1993. "Event-Related Potentials as Indicators of Repetition Priming in Young and Older Adults: Amplitude, Duration, and Scalp Distribution." *Psychology and aging* 8(1): 120–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8461109> (September 8, 2014).
- Gall, J F. 1825. "Sur Les Fonctions Du Cerveau et Sur Celles de Chacune de Ses Parties."
- Galván, Emilio J, Kathleen E Cosgrove, Jocelyn C Mauna, J Patrick Card, Edda Thiels, Stephen D Meriney, and Germán Barrionuevo. 2010. "Critical Involvement of Postsynaptic Protein Kinase Activation in Long-Term Potentiation at Hippocampal Mossy Fiber Synapses on CA3 Interneurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(8): 2844–55. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2854556&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Garcia, R. 2001. "Stress, Hippocampal Plasticity, and Spatial Learning." *Synapse (New York, N. Y.)* 40(3): 180–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304755> (March 24, 2015).
- Girardeau, Gabrielle, Karim Benchenane, Sidney I Wiener, György Buzsáki, and Michaël B Zugaro. 2009. "Selective Suppression of Hippocampal Ripples Impairs Spatial Memory." *Nature neuroscience* 12(10): 1222–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19749750> (July 10, 2014).
- Goshen, Inbal. 2014. "The Optogenetic Revolution in Memory Research." *Trends in neurosciences* 37(9): 511–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25022518> (July 17, 2014).
- Goshen, Inbal, Matthew Brodsky, Rohit Prakash, Jenelle Wallace, Viviana Gradinaru, Charu Ramakrishnan, and Karl Deisseroth. 2011. "Dynamics of Retrieval Strategies for Remote Memories." *Cell* 147(3): 678–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019004> (July 11, 2014).
- Griffiths, Daniel, Anthony Dickinson, and Nicola Clayton. 1999. "Episodic Memory: What Can Animals Remember about Their Past?" *Trends in Cognitive Sciences* 3(2): 74–80. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364661398012728> (September 8, 2014).
- Gruart, Agnès, María Dolores Muñoz, and José M Delgado-García. 2006. "Involvement of the CA3-CA1 Synapse in the Acquisition of Associative Learning in Behaving Mice." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(4): 1077–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436593> (February 6, 2014).
- Guzowski, J F, B L McNaughton, C A Barnes, and P F Worley. 1999. "Environment-Specific Expression of the Immediate-Early Gene Arc in Hippocampal Neuronal Ensembles." *Nat Neurosci* 2(12): 1120–24. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10570490.

- Hagena, Hardy, and Denise Manahan-Vaughan. 2013. "Differentiation in the Protein Synthesis-Dependency of Persistent Synaptic Plasticity in Mossy Fiber and Associational/commissural CA3 Synapses in Vivo." *Frontiers in integrative neuroscience* 7(March): 10.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3585440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 18, 2014).
- Harms, Kimberly J, Mengia S Rioult-Pedotti, D Rosy Carter, and Anna Dunaevsky. 2008. "Transient Spine Expansion and Learning-Induced Plasticity in Layer 1 Primary Motor Cortex." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(22): 5686–90.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2793590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 24, 2015).
- Harris, E W, and C W Cotman. 1986. "Long-Term Potentiation of Guinea Pig Mossy Fiber Responses Is Not Blocked by N-Methyl D-Aspartate Antagonists." *Neuroscience letters* 70(1): 132–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3022192> (September 8, 2014).
- Harris, Eric W, Alan H Ganong, and Carl W Cotman. 1984. "Long-Term Potentiation in the Hippocampus Involves Activation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors." *Brain Research* 323: 132–37.
- Helme-Guizon, a, S Davis, M Israel, B Lesbats, J Mallet, S Laroche, and a Hicks. 1998. "Increase in Syntaxin 1B and Glutamate Release in Mossy Fibre Terminals Following Induction of LTP in the Dentate Gyrus: A Candidate Molecular Mechanism Underlying Transsynaptic Plasticity." *The European journal of neuroscience* 10(7): 2231–37.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749751>.
- Hernandez, Pepe J, and Ted Abel. 2008. "The Role of Protein Synthesis in Memory Consolidation: Progress amid Decades of Debate." *Neurobiology of learning and memory* 89(3): 293–311.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2745628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Herry, C, R M Vouimba, and R Garcia. 1999. "Plasticity in the Mediodorsal Thalamo-Prefrontal Cortical Transmission in Behaving Mice." *Journal of neurophysiology* 82(5): 2827–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561450> (March 24, 2015).
- Hölscher, C, R Anwyl, and M J Rowan. 1997. "Stimulation on the Positive Phase of Hippocampal Theta Rhythm Induces Long-Term Potentiation That Can Be Depotentiated by Stimulation on the Negative Phase in Area CA1 in Vivo." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(16): 6470–77.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9236254> (March 24, 2015).
- Honey, R C, and M Good. 1993. "Selective Hippocampal Lesions Abolish the Contextual Specificity of Latent Inhibition and Conditioning." *Behavioral neuroscience* 107(1): 23–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8447955> (September 8, 2014).
- Hu, G Y, O Hvalby, S I Walaas, K A Albert, P Skjeflo, P Andersen, and P Greengard. 1987. "Protein Kinase C Injection into Hippocampal Pyramidal Cells Elicits Features of Long Term Potentiation." *Nature* 328(6129): 426–29.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3614346> (September 8, 2014).

- Huang, Chiung-Chun, Jia-Peng Chen, Che-Ming Yeh, and Kuei-Sen Hsu. 2012. "Sex Difference in Stress-Induced Enhancement of Hippocampal CA1 Long-Term Depression during Puberty." *Hippocampus* 22(7): 1622–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231803> (September 8, 2014).
- Huang, Chiung-Chun, Chih-Hao Yang, and Kuei-Sen Hsu. 2005. "Do Stress and Long-Term Potentiation Share the Same Molecular Mechanisms?" *Molecular neurobiology* 32(3): 223–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385139> (March 24, 2015).
- Huang, Y Y, and E R Kandel. 1995. "D1/D5 Receptor Agonists Induce a Protein Synthesis-Dependent Late Potentiation in the CA1 Region of the Hippocampus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 2446–50. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7708662.
- Huang, Y Y, X C Li, and E R Kandel. 1994. "cAMP Contributes to Mossy Fiber LTP by Initiating Both a Covalently Mediated Early Phase and Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase." *Cell* 79(1): 69–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923379>.
- Huff, N C, and J W Rudy. 2004. "The Amygdala Modulates Hippocampus-Dependent Context Memory Formation and Stores Cue-Shock Associations." *Behav Neurosci* 118(1): 53–62. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14979782.
- Huff, N C, K J Wright-Hardesty, E A Higgins, P Matus-Amat, and J W Rudy. 2005. "Context Pre-Exposure Obscures Amygdala Modulation of Contextual-Fear Conditioning." *Learn Mem* 12(5): 456–60. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16204200.
- Huff, Nicole C, Matthew Frank, Karli Wright-Hardesty, David Sprunger, Patricia Matus-Amat, Emily Higgins, and Jerry W Rudy. 2006. "Amygdala Regulation of Immediate-Early Gene Expression in the Hippocampus Induced by Contextual Fear Conditioning." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(5): 1616–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452685> (August 27, 2014).
- Hulme, Sarah R, Owen D Jones, Clarke R Raymond, Pankaj Sah, and Wickliffe C Abraham. 2014. "Mechanisms of Heterosynaptic Metaplasticity." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 369(1633): 20130148. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3843880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 24, 2015).
- Igaz, L M, M R Vianna, J H Medina, and I Izquierdo. 2002. "Two Time Periods of Hippocampal mRNA Synthesis Are Required for Memory Consolidation of Fear-Motivated Learning." *J Neurosci* 22(15): 6781–89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12151558.
- Ito, M. 1986. "Long-Term Depression as a Memory Process in the Cerebellum." *Neuroscience research* 3(6): 531–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3534647> (March 24, 2015).

- Izaki, Y, and J Arita. 1996. "Long-Term Potentiation in the Rat Hippocampal CA1 Region Is Inhibited Selectively at the Acquisition Stage of Discriminatory Avoidance Learning." *Brain research* 723(1-2): 162–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8813394> (September 8, 2014).
- Izquierdo, I, D M Barros, T Mello e Souza, M M de Souza, L a Izquierdo, and J H Medina. 1998. "Mechanisms for Memory Types Differ." *Nature* 393(6686): 635–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9641675>.
- Izquierdo, I, and J H Medina. 1997. "Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures." *Neurobiology of learning and memory* 68(3): 285–316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398590> (September 30, 2014).
- Jeffery, K J. 1997. "LTP and Spatial Learning--Where to Next?" *Hippocampus* 7(1): 95–110. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9138673> (September 8, 2014).
- Jeffery, K J, and R G Morris. 1993. "Cumulative Long-Term Potentiation in the Rat Dentate Gyrus Correlates With, but Does Not Modify, Performance in the Water Maze." *Hippocampus* 3(2): 133–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8353600> (March 24, 2015).
- Job, C, and J Eberwine. 2001. "Localization and Translation of mRNA in Dendrites and Axons." *Nature reviews. Neuroscience* 2(12): 889–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733796> (September 8, 2014).
- Jones, M W, M L Errington, P J French, A Fine, T V Bliss, S Garel, P Charnay, B Bozon, S Laroche, and S Davis. 2001. "A Requirement for the Immediate Early Gene Zif268 in the Expression of Late LTP and Long-Term Memories." *Nature neuroscience* 4(3): 289–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11224546> (September 8, 2014).
- Kandel, E R. 2001. "The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue between Genes and Synapses." *Science (New York, N.Y.)* 294(5544): 1030–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691980> (July 12, 2014).
- Karpova, A, M Mikhaylova, U Thomas, T Knopfel, and T Behnisch. 2006. "Involvement of Protein Synthesis and Degradation in Long-Term Potentiation of Schaffer Collateral CA1 Synapses." *J Neurosci* 26(18): 4949–55. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16672670.
- Kennedy, M B, T McGuinness, and P Greengard. 1983. "A Calcium/calmodulin-Dependent Protein Kinase from Mammalian Brain That Phosphorylates Synapsin I: Partial Purification and Characterization." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 3(4): 818–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6403674> (September 8, 2014).
- Kim, J J, and M S Fanselow. 1992. "Modality-Specific Retrograde Amnesia of Fear." *Science (New York, N.Y.)* 256(5057): 675–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1585183>.
- Kim, Jeansok J, Michael R Foy, and Richard F Thompson. 1996. "Behavioral Stress Modifies Hippocampal Plasticity through N-Methyl-D-Aspartate Receptor Activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(May): 4750–53.

- Kleschevnikov, A M, and R M Marchbanks. 1993. "Behavioral Parameters of the Spatial Memory Correlate with the Potentiation of the Population Spike, but Not with the Population Excitatory Postsynaptic Potential, of the CA1 Region in Rat Hippocampal Slices." *Neuroscience letters* 152(1-2): 125–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685862> (September 8, 2014).
- Kuenzi, F M, S M Fitzjohn, R A Morton, G L Collingridge, and G R Seabrook. 2000. "Reduced Long-Term Potentiation in Hippocampal Slices Prepared Using Sucrose-Based Artificial Cerebrospinal Fluid." *Journal of neuroscience methods* 100(1-2): 117–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11040373> (September 8, 2014).
- Kuhnt, U, A Mihaly, L Siklos, and F Joo. 1988. "Increased Retention of Calcium in the Dendrites of Long-Term Potentiated CA1 Neurons of the Hippocampal Slice." *Histochemistry* 90: 185–93.
- Kwon, Hyung-Bae, and Pablo E Castillo. 2008. "Long-Term Potentiation Selectively Expressed by NMDA Receptors at Hippocampal Mossy Fiber Synapses." *Neuron* 57(1): 108–20. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2390917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Lee, Jonathan L C, Barry J Everitt, and Kerrie L Thomas. 2004. "Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation." *Science (New York, N. Y.)* 304(5672): 839–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073322> (February 24, 2015).
- Levy, W B, and O Steward. 1983. "Temporal Contiguity Requirements for Long-Term Associative Potentiation/depression in the Hippocampus." *Neuroscience* 8(4): 791–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6306504> (March 24, 2015).
- Li, Y, C J Hough, C J Frederickson, and J M Sarvey. 2001. "Induction of Mossy Fiber --> Ca3 Long-Term Potentiation Requires Translocation of Synaptically Released Zn2+." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(20): 8015–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11588174>.
- Lisman, J E, and M A Goldring. 1988. "Feasibility of Long-Term Storage of Graded Information by the Ca2+/calmodulin-Dependent Protein Kinase Molecules of the Postsynaptic Density." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(14): 5320–24. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=281742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Liu, Xing, Qin-Hua Gu, Kaizheng Duan, and Zheng Li. 2014. "NMDA Receptor-Dependent LTD Is Required for Consolidation but Not Acquisition of Fear Memory." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34(26): 8741–48. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4069352&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 24, 2015).
- Lynch, G S, T Dunwiddie, and V Gribkoff. 1977. "Heterosynaptic Depression: A Postsynaptic Correlate of Long-Term Potentiation." *Nature* 266(5604): 737–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/195211> (March 24, 2015).
- Lynch, M A. 2004. "Long-Term Potentiation and Memory." *Physiological reviews* 84(1): 87–136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715912> (December 9, 2014).

- Lynch, M A, and T. V. P. Bliss. 1986. "Long-Term Potentiation of Synaptic Transmission in the Hippocampus of the Rat; Effect of Calmodulin and Oleoyl-Acetyl-Glycerol on Release of [3H]glutamate." *Neuroscience letters* 65: 171–76.
- Maggio, Nicola, and Menahem Segal. 2011. "Persistent Changes in Ability to Express Long-Term Potentiation/depression in the Rat Hippocampus after Juvenile/adult Stress." *Biological psychiatry* 69(8): 748–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216393> (September 8, 2014).
- Malenka, R C, and R A Nicoll. 1997. "Learning and Memory. Never Fear, LTP Is Hear." *Nature* 390(6660): 552–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403677> (September 8, 2014).
- Malenka, Robert C, and Mark F Bear. 2004. "LTP and LTD: An Embarrassment of Riches." *Neuron* 44(1): 5–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15450156>.
- Malenka, Robert C., Julie A. Kauer, David J. Perkel, Michael D. Mauk, Paul T. Kelly, Roger A. Nicoll, and M. Neal Waxham. 1989. "An Essential Role for Postsynaptic Calmodulin and Protein Kinase Activity in Long-Term Potentiation." *Letters to nature* 340: 554–57.
- Malinow, R, H Schulman, and R W Tsien. 1989. "Inhibition of Postsynaptic PKC or CaMKII Blocks Induction but Not Expression of LTP." *Science (New York, N.Y.)* 245(4920): 862–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549638> (September 8, 2014).
- Malleret, Gaël, Juan M Alarcon, Guillaume Martel, Shuichi Takizawa, Svetlana Vronskaya, Deqi Yin, Irene Z Chen, Eric R Kandel, and Gleb P Shumyatsky. 2010. "Bidirectional Regulation of Hippocampal Long-Term Synaptic Plasticity and Its Influence on Opposing Forms of Memory." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(10): 3813–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220016> (September 8, 2014).
- Manahan-Vaughan, D. 1997. "Group 1 and 2 Metabotropic Glutamate Receptors Play Differential Roles in Hippocampal Long-Term Depression and Long-Term Potentiation in Freely Moving Rats." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(9): 3303–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9096163> (March 24, 2015).
- Maroun, Mouna, and Gal Richter-Levin. 2003. "Exposure to Acute Stress Blocks the Induction of Long-Term Potentiation of the Amygdala-Prefrontal Cortex Pathway in Vivo." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(11): 4406–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805280> (March 24, 2015).
- Marr, D. 1971. "Simple Memory: A Theory for Archicortex." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 262(841): 23–81.
- Matus-Amat, P, E A Higgins, R M Barrientos, and J W Rudy. 2004. "The Role of the Dorsal Hippocampus in the Acquisition and Retrieval of Context Memory Representations." *J Neurosci* 24(10): 2431–39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15014118.
- Mayer, M L, G L Westbrook, and P B Guthrie. 1984. "Voltage-Dependent Block by Mg²⁺ of NMDA Responses in Spinal Cord Neurones." *Nature* 309(5965): 261–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6325946> (September 8, 2014).

- McHugh, Thomas J, and Susumu Tonegawa. 2009. "CA3 NMDA Receptors Are Required for the Rapid Formation of a Salient Contextual Representation." *Hippocampus* 19(12): 1153–58.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2788054&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (August 27, 2014).
- McNaughton, B L, C A Barnes, G Rao, J Baldwin, and M Rasmussen. 1986. "Long-Term Enhancement of Hippocampal Synaptic Transmission and the Acquisition of Spatial Information." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 6(2): 563–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3005525> (March 24, 2015).
- McNaughton, Bruce, and Lynn Nadel. 1990. "Hebb--{M}arr Networks and the Neurobiological Representation of Action Space." In *Neuroscience and Connectionist Theory*, eds. Marc Gluck and David Rummelhart. Hove, UK: Lawrence Erlbaum Associates, 1–63.
 citeulike-article-id:250988.
- Misanin, J R, R R Miller, and D J Lewis. 1968. "Retrograde Amnesia Produced by Electroconvulsive Shock after Reactivation of a Consolidated Memory Trace." *Science (New York, N. Y.)* 160(3827): 554–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5689415> (March 24, 2015).
- Mizuno, T, I Kanazawa, and M Sakurai. 2001. "Differential Induction of LTP and LTD Is Not Determined Solely by Instantaneous Calcium Concentration: An Essential Involvement of a Temporal Factor." *The European journal of neuroscience* 14(4): 701–8.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556894> (March 24, 2015).
- Molter, Colin, Naoyuki Sato, and Yoko Yamaguchi. 2007. "Reactivation of Behavioral Activity during Sharp Waves: A Computational Model for Two Stage Hippocampal Dynamics." *Hippocampus* 17(3): 201–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294461> (March 24, 2015).
- Monfils, M-H, and G C Teskey. 2004. "Skilled-Learning-Induced Potentiation in Rat Sensorimotor Cortex: A Transient Form of Behavioural Long-Term Potentiation." *Neuroscience* 125(2): 329–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15062976> (March 24, 2015).
- Morris, R G, E Anderson, G S Lynch, and M Baudry. 1986. "Selective Impairment of Learning and Blockade of Long-Term Potentiation by an N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist, AP5." *Nature* 319(6056): 774–76.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2869411.
- Morris, R G M. 2006. "Elements of a Neurobiological Theory of Hippocampal Function: The Role of Synaptic Plasticity, Synaptic Tagging and Schemas." *The European journal of neuroscience* 23(11): 2829–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16819972> (July 24, 2014).
- Morris, R G M, P Garrud, J N P Rawlins, and J O'Keefe. 1982. "Place Navigation Impaired in Rats with Hippocampal Lesions." *Nature* 297: 681–83.
- Moser, E I, K A Krobert, M B Moser, and R G Morris. 1998. "Impaired Spatial Learning after Saturation of Long-Term Potentiation." *Science (New York, N. Y.)* 281(5385): 2038–42.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748165> (February 18, 2015).

- Moser, E I, M B Moser, and P Andersen. "Potentiation of Dentate Synapses Initiated by Exploratory Learning in Rats: Dissociation from Brain Temperature, Motor Activity, and Arousal." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N. Y.)* 1(1): 55–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10467586> (March 24, 2015).
- Motanis, Helen, and Mouna Maroun. 2012. "Differential Involvement of Protein Synthesis and Actin Rearrangement in the Reacquisition of Contextual Fear Conditioning." *Hippocampus* 22(3): 494–500. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21240917> (September 8, 2014).
- Nadel, L, and M Moscovitch. 1997. "Memory Consolidation, Retrograde Amnesia and the Hippocampal Complex." *Current opinion in neurobiology* 7(2): 217–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142752> (February 2, 2015).
- Nakao, Kazuhito, Koji Matsuyama, Norio Matsuki, and Yuji Ikegaya. 2004. "Amygdala Stimulation Modulates Hippocampal Synaptic Plasticity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(39): 14270–75. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=521145&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (August 23, 2014).
- Namgung, U, E Valcourt, and A Routtenberg. 1995. "Long-Term Potentiation in Vivo in the Intact Mouse Hippocampus." *Brain Res* 689(1): 85–92. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8528709.
- Naqshbandi, Mariam, Miranda C Feeney, Tammy L B McKenzie, and William A Roberts. 2007. "Testing for Episodic-like Memory in Rats in the Absence of Time of Day Cues: Replication of Babb and Crystal." *Behavioural processes* 74(2): 217–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118573> (September 8, 2014).
- Neyman, Sergey, and Denise Manahan-Vaughan. 2008. "Metabotropic Glutamate Receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) Regulate Late Phases of LTP and LTD in the Hippocampal CA1 Region in Vitro." *The European journal of neuroscience* 27(6): 1345–52. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2327219&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (August 27, 2014).
- Nguyen, Peter V, Ted Abel, and Eric R Kandel. 1994. "Requirement of a Critical Period of Transcription for Induction of a Late Phase of LTP." *Science* 265: 1104–7.
- Nicoll, R a, J a Kauer, and R C Malenka. 1988. "The Current Excitement in Long-Term Potentiation." *Neuron* 1(2): 97–103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2856092>.
- Nicoll, R A, and R C Malenka. 1995. "Contrasting Properties of Two Forms of Long-Term Potentiation in the Hippocampus." *Nature* 377(6545): 115–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7675078> (September 3, 2014).
- Nicoll, Roger A, and Dietmar Schmitz. 2005. "Synaptic Plasticity at Hippocampal Mossy Fibre Synapses." *Nature reviews. Neuroscience* 6(11): 863–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16261180> (July 11, 2014).
- Nishiyama, M, K Hong, K Mikoshiba, M M Poo, and K Kato. 2000. "Calcium Stores Regulate the Polarity and Input Specificity of Synaptic Modification." *Nature* 408(6812): 584–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11117745> (March 24, 2015).

- Nowak, L, P Bregestovski, P Ascher, A Herbet, and A Prochiantz. 1984. "Magnesium Gates Glutamate-Activated Channels in Mouse Central Neurones." *Nature* 307(5950): 462–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6320006> (September 8, 2014).
- O'Keefe, John, and Lynn Nadel. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*.
- Otani, S, and W C Abraham. 1989. "Inhibition of Protein Synthesis in the Dentate Gyrus, but Not the Entorhinal Cortex, Blocks Maintenance of Long-Term Potentiation in Rats." *Neuroscience Letters* 106(1-2): 175–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2586822> (September 8, 2014).
- Otto, C, Y Kovalchuk, D P Wolfer, P Gass, M Martin, W Zuschratter, H J Gröne, C Kellendonk, F Tronche, R Maldonado, H P Lipp, a Konnerth, and G Schütz. 2001. "Impairment of Mossy Fiber Long-Term Potentiation and Associative Learning in Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Type I Receptor-Deficient Mice." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(15): 5520–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11466423>.
- Ouyang, Y, A Rosenstein, G Kreiman, E M Schuman, and M B Kennedy. 1999. "Tetanic Stimulation Leads to Increased Accumulation of Ca(2+)/calmodulin-Dependent Protein Kinase II via Dendritic Protein Synthesis in Hippocampal Neurons." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(18): 7823–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10479685> (September 8, 2014).
- Pan, Enhui, Xiao-an Zhang, Zhen Huang, Artur Krezel, Min Zhao, Christine E Tinberg, Stephen J Lippard, and James O McNamara. 2011. "Vesicular Zinc Promotes Presynaptic and Inhibits Postsynaptic Long-Term Potentiation of Mossy Fiber-CA3 Synapse." *Neuron* 71(6): 1116–26. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3184234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Paxinos, George, and Keith B J Franklin. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Perrot, Rodolphe, and Jean-Pierre Julien. 2009. "Real-Time Imaging Reveals Defects of Fast Axonal Transport Induced by Disorganization of Intermediate Filaments." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(9): 3213–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19451279> (September 8, 2014).
- Pfeiffer, Brad E, and David J Foster. 2013. "Hippocampal Place-Cell Sequences Depict Future Paths to Remembered Goals." *Nature* 497(7447): 74–79. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12112>.
- Pfeiffer, Brad E, and Kimberly M Huber. 2006. "Current Advances in Local Protein Synthesis and Synaptic Plasticity." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(27): 7147–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822970> (August 20, 2014).
- Phillips, R G, and J E LeDoux. 1992. "Differential Contribution of Amygdala and Hippocampus to Cued and Contextual Fear Conditioning." *Behav Neurosci* 106(2): 274–85. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1590953.

- Plath, Niels, Ora Ohana, Björn Dammermann, Mick L Errington, Dietmar Schmitz, Christina Gross, Xiaosong Mao, Arne Engelsberg, Claudia Mahlke, Hans Welzl, Ursula Kobalz, Anastasia Stawrakakis, Esperanza Fernandez, Robert Waltereit, Anika Bick-Sander, Eric Therstappen, Sam F Cooke, Veronique Blanquet, Wolfgang Wurst, Benedikt Salmen, Michael R Bösl, Hans-Peter Lipp, Seth G N Grant, Tim V P Bliss, David P Wolfer, and Dietmar Kuhl. 2006. "Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories." *Neuron* 52(3): 437–44.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088210> (July 9, 2014).
- Pöschel, Beatrice, and Patric K Stanton. 2007. "Comparison of Cellular Mechanisms of Long-Term Depression of Synaptic Strength at Perforant Path-Granule Cell and Schaffer Collateral-CA1 Synapses." *Progress in brain research* 163: 473–500.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765734> (March 24, 2015).
- Przybylski, J, and S J Sara. 1997. "Reconsolidation of Memory after Its Reactivation." *Behavioural brain research* 84(1-2): 241–46.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9079788> (March 24, 2015).
- Quillfeldt, J a, P K Schmitz, R Walz, M Bianchin, M S Zanatta, J H Medina, and I Izquierdo. 1994. "CNQX Infused into Entorhinal Cortex Blocks Memory Expression, and AMPA Reverses the Effect." *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 48(2): 437–40.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522331>.
- Quinlan, Elizabeth M, David Lebel, Inbar Brosh, and Edi Barkai. 2004. "A Molecular Mechanism for Stabilization of Learning-Induced Synaptic Modifications." *Neuron* 41(2): 185–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741100> (March 24, 2015).
- Quiroga, R Quian, L Reddy, G Kreiman, C Koch, and I Fried. 2005. "Invariant Visual Representation by Single Neurons in the Human Brain." *Nature* 435(7045): 1102–7.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973409> (July 9, 2014).
- Ramirez, Steve, Xu Liu, Pei-Ann Lin, Junghyup Suh, Michele Pignatelli, Roger L Redondo, Tomás J Ryan, and Susumu Tonegawa. 2013. "Creating a False Memory in the Hippocampus." *Science (New York, N.Y.)* 341(6144): 387–91.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23888038> (July 11, 2014).
- Ramón y Cajal, Santiago (1852-1934). "Histologie Du Système Nerveux de L'homme et Des Vertébrés. Généralités, Moëlle, Ganglions Rachidiens, Bulbe et Protubérances / Par S. Ramon Cajal,..." <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k62147775> (March 24, 2015).
- Rampon, C, Y P Tang, J Goodhouse, E Shimizu, M Kyin, and J Z Tsien. 2000. "Enrichment Induces Structural Changes and Recovery from Nonspatial Memory Deficits in CA1 NMDAR1-Knockout Mice." *Nature neuroscience* 3(3): 238–44.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700255> (September 8, 2014).
- Rebola, Nelson, Rafael Lujan, Rodrigo A Cunha, and Christophe Mulle. 2008. "Adenosine A2A Receptors Are Essential for Long-Term Potentiation of NMDA-EPSCs at Hippocampal Mossy Fiber Synapses." *Neuron* 57(1): 121–34.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18184569> (August 3, 2014).
- Redondo, Roger L, and Richard G M Morris. 2011. "Making Memories Last: The Synaptic Tagging and Capture Hypothesis." *Nature reviews. Neuroscience* 12(1): 17–30.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21170072> (July 10, 2014).

- Reymann, K G, H K Matthies, U Frey, V S Vorobyev, and H Matthies. 1986. "Calcium-Induced Long-Term Potentiation in the Hippocampal Slice: Characterization of the Time Course and Conditions." *Brain research bulletin* 17(3): 291–96.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3021291>.
- Rioutl-Pedotti, M S, D Friedman, and J P Donoghue. 2000. "Learning-Induced LTP in Neocortex." *Science (New York, N.Y.)* 290(5491): 533–36.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11039938> (August 25, 2014).
- Roberts, William A, Miranda C Feeney, Krista Macpherson, Mark Petter, Neil McMillan, and Evanya Musolino. 2008. "Episodic-like Memory in Rats: Is It Based on When or How Long Ago?" *Science (New York, N.Y.)* 320(5872): 113–15.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18388296> (September 3, 2014).
- Rolls, Edmund T. 2010. "A Computational Theory of Episodic Memory Formation in the Hippocampus." *Behavioural brain research* 215(2): 180–96.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307583> (July 15, 2014).
- Roulet, P, and S Sara. "Consolidation of Memory after Its Reactivation: Involvement of Beta Noradrenergic Receptors in the Late Phase." *Neural plasticity* 6(3): 63–68.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2565312&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 24, 2015).
- Sacchetti, Benedetto, Carlo Ambrogi Lorenzini, Elisabetta Baldi, Corrado Bucherelli, Marisa Roberto, Giovanna Tassoni, and Marcello Brunelli. 2002. "Time-Dependent Inhibition of Hippocampal LTP in Vitro Following Contextual Fear Conditioning in the Rat." *The European journal of neuroscience* 15(1): 143–50.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860514>.
- Salter, Michael W, and Lorraine V Kalia. 2004. "Src Kinases: A Hub for NMDA Receptor Regulation." *Nature reviews. Neuroscience* 5(4): 317–28.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034556> (July 12, 2014).
- Schacter, Daniel L. 1999. "The Seven Sins of Memory Insights From Psychology and Cognitive Neuroscience." *American Psychologist* 54(3): 182–203.
- Schafe, G E, K Nader, H T Blair, and J E LeDoux. 2001. "Memory Consolidation of Pavlovian Fear Conditioning: A Cellular and Molecular Perspective." *Trends in neurosciences* 24(9): 540–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506888> (October 20, 2014).
- Schiffino, Felipe L, Nathen J Murawski, Jeffrey B Rosen, and Mark E Stanton. 2011. "Ontogeny and Neural Substrates of the Context Preexposure Facilitation Effect." *Neurobiology of learning and memory* 95(2): 190–98.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3918451&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 18, 2014).
- Schmajuk, N a, J a Gray, and J a Larrauri. 2005. "A Pre-Clinical Study Showing How Dopaminergic Drugs Administered during Pre-Exposure Can Impair or Facilitate Latent Inhibition." *Psychopharmacology* 177(3): 272–79.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15316712> (March 18, 2014).

- Schmitz, Dietmar, Jack Mellor, Joerg Breustedt, and Roger A Nicoll. 2003. "Presynaptic Kainate Receptors Impart an Associative Property to Hippocampal Mossy Fiber Long-Term Potentiation." *Nature neuroscience* 6(10): 1058–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12947409> (August 19, 2014).
- Scoville, William Beecher, and Brenda Milner. 1957. "Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesions." *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 20: 11–21.
- Segal, Menahem. 1978. "A Correlation between Hippocampal Responses to Interhemispheric Stimulation, Hippocampal Slow Rythmic Activity and Behaviour." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 45: 409–11.
- Selden, N R, B J Everitt, L E Jarrard, and T W Robbins. 1991. "Complementary Roles for the Amygdala and Hippocampus in Aversive Conditioning to Explicit and Contextual Cues." *Neuroscience* 42(2): 335–50. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1832750.
- Sharma, A V, F E Nargang, and C T Dickson. 2012. "Neurosilence: Profound Suppression of Neural Activity Following Intracerebral Administration of the Protein Synthesis Inhibitor Anisomycin." *J Neurosci* 32(7): 2377–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22396412.
- Shi, S H, Y Hayashi, R S Petralia, S H Zaman, R J Wenthold, K Svoboda, and R Malinow. 1999. "Rapid Spine Delivery and Redistribution of AMPA Receptors after Synaptic NMDA Receptor Activation." *Science (New York, N.Y.)* 284(5421): 1811–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364548> (September 8, 2014).
- Shires, K L, B M Da Silva, J P Hawthorne, R G Morris, and S J Martin. 2012. "Synaptic Tagging and Capture in the Living Rat." *Nat Commun* 3: 1246. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23212375.
- Silva, A J, J H Kogan, P W Frankland, and S Kida. 1998. "CREB and Memory." *Annual review of neuroscience* 21: 127–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9530494> (September 8, 2014).
- Silva, A J, R Paylor, J M Wehner, and S Tonegawa. 1992. "Impaired Spatial Learning in Alpha-Calcium-Calmodulin Kinase II Mutant Mice." *Science (New York, N.Y.)* 257(5067): 206–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321493> (March 13, 2015).
- Sindreu, Carlos Balet, Hélène Varoqui, Jeffrey D Erickson, and Jesús Pérez-Clausell. 2003. "Boutons Containing Vesicular Zinc Define a Subpopulation of Synapses with Low AMPAR Content in Rat Hippocampus." *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 13(8): 823–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853368> (September 8, 2014).
- Sivakumaran, Sudhir, Majid H Mohajerani, and Enrico Cherubini. 2009. "At Immature Mossy-Fiber-CA3 Synapses, Correlated Presynaptic and Postsynaptic Activity Persistently Enhances GABA Release and Network Excitability via BDNF and cAMP-Dependent PKA." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(8): 2637–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244539> (September 8, 2014).

- Skaggs, W E, and B L McNaughton. 1996. "Replay of Neuronal Firing Sequences in Rat Hippocampus during Sleep Following Spatial Experience." *Science (New York, N. Y.)* 271(5257): 1870–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596957> (February 25, 2015).
- Smirnova, T, S Laroche, M L Errington, A A Hicks, T V Bliss, and J Mallet. 1993. "Transsynaptic Expression of a Presynaptic Glutamate Receptor during Hippocampal Long-Term Potentiation." *Science (New York, N. Y.)* 262(5132): 433–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8105538> (September 8, 2014).
- Soulé, Jonathan, Maria Alme, Craig Myrum, Manja Schubert, Tambudzai Kanhema, and Clive R Bramham. 2012. "Balancing Arc Synthesis, mRNA Decay, and Proteasomal Degradation: Maximal Protein Expression Triggered by Rapid Eye Movement Sleep-like Bursts of Muscarinic Cholinergic Receptor Stimulation." *The Journal of biological chemistry* 287(26): 22354–66. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3381195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 24, 2015).
- Squire, Larry R. 1984. "Mechanisms of Memory." *Science* 232(1983).
- Squire, Larry R. 2004. "Memory Systems of the Brain: A Brief History and Current Perspective." *Neurobiology of learning and memory* 82(3): 171–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464402> (July 10, 2014).
- Stanton, P K, and J M Sarvey. 1984. "Blockade of Long-Term Potentiation in Rat Hippocampal CA1 Region by Inhibitors of Protein Synthesis." *J Neurosci* 4(12): 3080–88. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6502226.
- Steele, R J, and R G Morris. 1999. "Delay-Dependent Impairment of a Matching-to-Place Task with Chronic and Intrahippocampal Infusion of the NMDA-Antagonist D-AP5." *Hippocampus* 9(2): 118–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226773> (September 8, 2014).
- Steward, O, and E M Schuman. 2001. "Protein Synthesis at Synaptic Sites on Dendrites." *Annual review of neuroscience* 24: 299–325. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283313> (September 8, 2014).
- Stratton, G. M. 1919. "Retroactive Hyperamnesia and Other Emotional Effects on Memory."
- Tonkikh, Alexander, Christopher Janus, Hossam El-Beheiry, Peter S Pennefather, Marina Samoilova, Patrick McDonald, Aviv Ouanounou, and Peter L Carlen. 2006. "Calcium Chelation Improves Spatial Learning and Synaptic Plasticity in Aged Rats." *Experimental neurology* 197(2): 291–300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16039651> (September 8, 2014).
- Trannoy, Séverine, Christelle Redt-Clouet, Jean-Maurice Dura, and Thomas Preat. 2011. "Parallel Processing of Appetitive Short- and Long-Term Memories in *Drosophila*." *Current biology : CB* 21(19): 1647–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962716> (September 8, 2014).

- Trifilieff, Pierre, Cyril Herry, Peter Vanhoutte, Jocelyne Caboche, Aline Desmedt, Gernot Riedel, Nicole Mons, and Jacques Micheau. 2006. "Foreground Contextual Fear Memory Consolidation Requires Two Independent Phases of Hippocampal ERK/CREB Activation." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N. Y.)* 13(3): 349–58. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1475817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (February 4, 2014).
- Tsien, J Z, P T Huerta, and S Tonegawa. 1996. "The Essential Role of Hippocampal CA1 NMDA Receptor-Dependent Synaptic Plasticity in Spatial Memory." *Cell* 87(7): 1327–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980238> (August 22, 2014).
- Tsien, R Y. 1980. "New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures." *Biochemistry* 19(11): 2396–2404. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6770893> (September 8, 2014).
- Tsokas, Panayiotis, Elizabeth A Grace, Pokman Chan, Tao Ma, Stuart C Sealfon, Ravi Iyengar, Emmanuel M Landau, and Robert D Blitzer. 2005. "Local Protein Synthesis Mediates a Rapid Increase in Dendritic Elongation Factor 1A after Induction of Late Long-Term Potentiation." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(24): 5833–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958750> (March 24, 2015).
- Tulving, Endel. 1972. "Episodic and Semantic Memory." In *Organization of Memory*, , 381–402.
- Tulving, Endel. 2000. "Episodic Memory : From Mind to Brain." *Annual Review of Psychology* 51: 571–98.
- Vachon, P, S Faubert, D Blais, A Comtois, and J G Bienvenu. 2000. "A Pathophysiological Study of Abdominal Organs Following Intraperitoneal Injections of Chloral Hydrate in Rats: Comparison between Two Anaesthesia Protocols." *Laboratory animals* 34(1): 84–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759371> (March 24, 2015).
- Vickers, Catherine A, Kirsten S Dickson, and David J A Wyllie. 2005. "Induction and Maintenance of Late-Phase Long-Term Potentiation in Isolated Dendrites of Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurones." *The Journal of physiology* 568(Pt 3): 803–13. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1464174&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Vouimba, Rose-Marie, and Gal Richter-Levin. 2013. "Different Patterns of Amygdala Priming Differentially Affect Dentate Gyrus Plasticity and Corticosterone, but Not CA1 Plasticity." *Frontiers in neural circuits* 7: 80. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3642501&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (March 23, 2015).
- Wade, Kimberley a, Maryanne Garry, J Don Read, and D Stephen Lindsay. 2002. "A Picture Is Worth a Thousand Lies: Using False Photographs to Create False Childhood Memories." *Psychonomic bulletin & review* 9(3): 597–603. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12412902>.

- Whitlock, Jonathan R, Arnold J Heynen, Marshall G Shuler, and Mark F Bear. 2006. "Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus." *Science (New York, N. Y.)* 313(5790): 1093–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931756> (January 21, 2014).
- Winocur, Gordon, Morris Moscovitch, and Bruno Bontempi. 2010. "Memory Formation and Long-Term Retention in Humans and Animals: Convergence towards a Transformation Account of Hippocampal-Neocortical Interactions." *Neuropsychologia* 48(8): 2339–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430044> (March 24, 2015).
- Wittstock, S, H H Kaatz, and R Menzel. 1993. "Inhibition of Brain Protein Synthesis by Cycloheximide Does Not Affect Formation of Long-Term Memory in Honeybees after Olfactory Conditioning." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13(4): 1379–86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463826> (September 8, 2014).
- Wüstenberg, D, B Gerber, and R Menzel. 1998. "Short Communication: Long- but Not Medium-Term Retention of Olfactory Memories in Honeybees Is Impaired by Actinomycin D and Anisomycin." *The European journal of neuroscience* 10(8): 2742–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767405> (September 8, 2014).
- Xu, Lin, Roger Anwyl, and Michael J. Rowan. 1997. "Behavioural Stress Facilitates the Induction of Long-Term Depression in the Hippocampus." *Letters to nature* 387: 497–500.
- Yang, S N, Y G Tang, and R S Zucker. 1999. "Selective Induction of LTP and LTD by Postsynaptic [Ca²⁺]_i Elevation." *Journal of neurophysiology* 81(2): 781–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036277> (February 28, 2015).
- Yeckel, M F, A Kapur, and D Johnston. 1999. "Multiple Forms of LTP in Hippocampal CA3 Neurons Use a Common Postsynaptic Mechanism." *Nature neuroscience* 2(7): 625–33. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2951317&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (September 8, 2014).
- Zalutsky, R A, and R A Nicoll. 1990. "Comparison of Two Forms of Long-Term Potentiation in Single Hippocampal Neurons." *Science (New York, N. Y.)* 248(4963): 1619–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2114039> (September 8, 2014).
- Zar, Jerrold H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. http://books.google.co.in/books/about/Biostatistical_Analysis.html?id=edxqAAAAMAAJ&pgis=1 (March 4, 2015).
- Zhou, Qiang, Koichi J Homma, and Mu-ming Poo. 2004. "Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses." *Neuron* 44(5): 749–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572107> (August 6, 2014).

Annexes

Annexe 1 : Des enregistrements multiples pour observer la répartition de la plasticité induite dans CA1 par le CFC.

Jusqu'à présent, nous n'avons enregistré qu'un fEPSPs dans la région CA1 de chaque souris, ce qui correspond probablement à une relativement faible proportion de synapses (bien que personne n'ait à ce jour quantifié l'étendue de la zone enregistrée par une électrode). Afin de tester l'hypothèse de la présence de « hot spots » de LTP au sein de la région CA1 de chaque animal, il faudrait enregistrer plusieurs sites, c'est-à-dire plusieurs fEPSPs distincts les uns des autres. Pour tenter d'observer cette hétérogénéité dans la répartition des synapses ayant subi une LTP induite par l'apprentissage, une expérience avec l'implantation de plusieurs électrodes d'enregistrement au sein de l'hippocampe d'un même animal est réalisée. Cette expérience nécessite de nombreuses mises au point, effectuées avec l'aide de Thomas Genais lors de son stage facultatif de L3 et d'Emilie Dia dans le cadre de son stage de fin de DUT.

Les électrodes pour les enregistrements multiples sont élaborées au laboratoire. Avant de parvenir à obtenir les électrodes présentées dans la partie « matériels et méthodes », la première technique employée fut la même que pour les électrodes simples mais en torsadant davantage de fils entre eux. Les électrodes de stimulation sont fabriquées de la même manière que dans les autres expériences. Les enregistrements multiples nécessitent l'utilisation d'un matériel d'acquisition différent, conçu spécialement à cet effet (Figure 13B). Avant toute expérimentation, il est nécessaire de fabriquer des adaptateurs permettant de relier nos électrodes à ce matériel. Le stimulateur fourni avec ce matériel produit un puissant bruit de secteur (50Hz). Il est compliqué de s'en affranchir avec des éliminateurs de bruit car il faudrait en placer un sur chaque voie d'enregistrement. Nous décidons alors d'utiliser un de nos stimulateurs habituels (AM-Systems).

Les tracés obtenus sur les différentes électrodes au sein d'un même hippocampe semblent très similaires en forme et en amplitude, comme si les enregistrements se recoupaient. Ce problème pouvant venir du fait que les électrodes sont dénudées, il faudrait pouvoir obtenir une impédance (capacité à laisser passer un courant) d'électrode correcte sans avoir à les dénuder. Une équipe du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes de Toulouse (LAAS-CNRS) travaille justement sur l'amélioration des performances d'électrodes par un processus de nanostructuration. Avec Emeline Descamps et sa doctorante Valentina Castagnola, nous avons donc essayé de modifier des électrodes non dénudées par une polymérisation de PEDOT-PSS (poly(3,4-éthylènedioxythiophène)-

poly(styrène sulfonate) de sodium). Notre première approche a consisté à utiliser nos fils habituels de Nickel-Chrome, mais la polymérisation est trop hétérogène sur ce matériau. Des fils de tungstène gainés de polytétrafluoroéthylène (Téflon) ($\text{\O}50\mu\text{m}$, Advent) sont donc utilisés avec la même technique de fabrication.

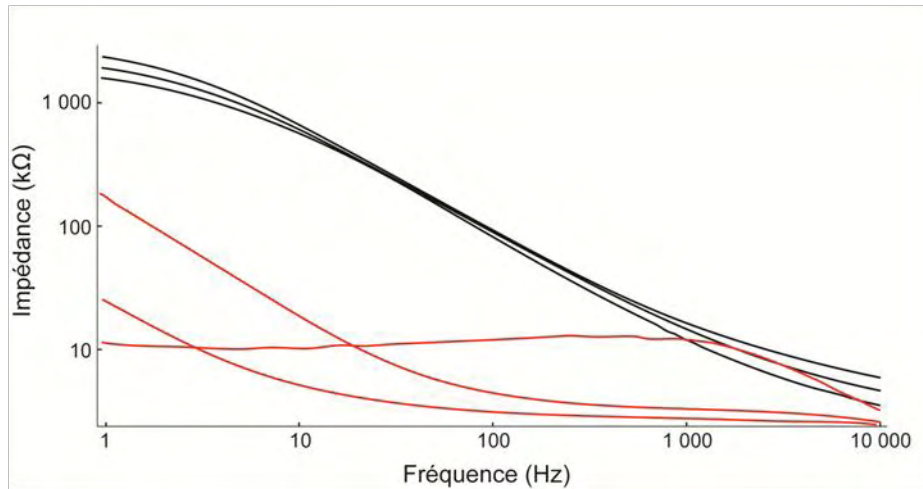


Figure 27 : La polymérisation des électrodes avec du PEDOT-PSS permet de diminuer l'impédance des électrodes. L'impédance est mesurée pour trois électrodes (ayant subi un protocole de polymérisation différent) pour différentes fréquences, avant (noir) et après (rouge) la polymérisation.

Après différents protocoles de polymérisation testés au LAAS et permettant de diminuer l'impédance des électrodes (Figure 27), celles-ci sont implantées pour des tests électrophysiologiques au niveau de l'hippocampe de 4 animaux. Les résultats obtenus avec le traitement des électrodes sont inattendus ; des électrodes non traitées présentent un signal aussi bon que des électrodes traitées. Il s'avère en fait que la polymérisation des électrodes provoque des courts-circuits entre elles. Malgré nos efforts, les fils sont initialement trop proches les uns des autres. Il faudrait donc que les fils soient indépendants les uns des autres. Pour ce faire, tout en gardant une répartition régulière sur une surface de moins d'un millimètre carré, une fine matrice de pvc est utilisée. Nous utilisons des fils de tungstène ($50\mu\text{m}$), plus souples que le Nickel-Chrome et extrêmement solides. En raison d'une gaine plus élastique, ils sont plus difficiles à dénuder, la longueur de l'extrémité dénudée des électrodes est donc moins précise mais nous décidons tout de même d'implanter quelques souris.

Les tracés obtenus sont analysés à l'aide d'un script en raison du grand nombre de données et de la redondance de l'analyse manuelle. Les résultats montrent dans un premier temps que sur les différentes électrodes d'un même animal, la forme des potentiels de champs est très proche (Figure 28A). De plus, les signaux obtenus au sein d'un même hippocampe évoluent en amplitude de la même manière au cours du temps (Figure 28B). Ces deux résultats montrent que nos électrodes enregistrent des signaux proches, c'est-à-dire que les « volumes » de synapses enregistrées par nos électrodes se recoupent au moins partiellement. Par conséquent, s'il y a des « hot spots » de LTP induite par l'apprentissage, ils seront difficilement détectables. Il faudrait pour cela utiliser des électrodes présentant une plus petite surface de contact avec le cerveau, mais possédant tout de même une faible impédance, tout en étant placées à des distances faibles et régulières les unes des autres. La manière idéale de répondre à nos requêtes et de faire face aux problèmes rencontrés au cours de cette expérience semble être l'achat du matériel le plus adapté au système d'acquisition dont nous disposons. Il serait avantageux notamment d'acheter des électrodes multiples commerciales, plus régulières, facilement connectables aux appareils d'enregistrement et stimulation, et dont de nombreux paramètres de fabrication peuvent être choisis par l'expérimentateur (taille, espacement, impédance, forme de l'extrémité, etc...). Cela représente malheureusement un coût non négligeable qui n'était pas prévu dans le budget consacré à mon travail de thèse.

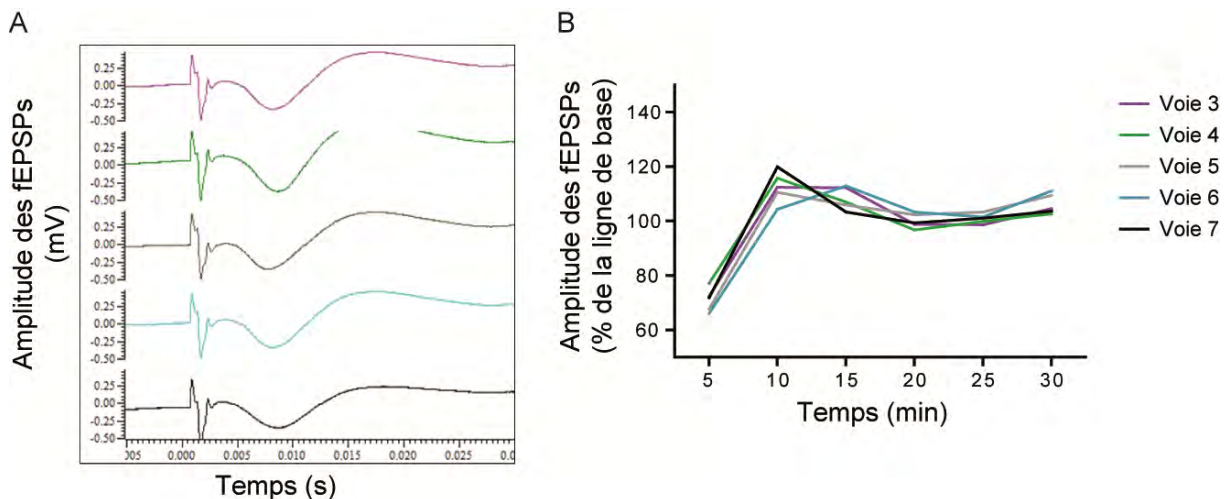


Figure 28 : Les électrodes implantées au sein d'un animal présentent des enregistrements qui se recoupent au moins en partie. A : Exemples de fEPSPs obtenus en même temps sur 5 voies différentes. La forme et l'amplitude de ces fEPSPs varient peu. **B :** Amplitude des fEPSPs enregistrés sur 5 voies différentes d'un même animal au cours d'une ligne de base de 30min. Les tracés évoluent quasiment en parallèle.

Annexe 2 : Cartographie des LTP dans CA1

Dans cette expérience, nous cherchons à cartographier les cellules de CA1 dont les dendrites présentent des synapses potentialisées, à l'aide de marquages immunohistochimiques réalisés sur coupes flottantes de cerveaux. Cette expérience consiste simplement à réaliser trois groupes comportementaux (3 animaux par groupe), sans chirurgie au préalable. Les animaux subissent seulement des expériences pendant un jour (après avoir été manipulés pendant une semaine pour la familiarisation à l'expérimentateur). Les animaux du groupe contrôle restent dans leur cage d'élevage, ceux du groupe « CFC » subissent le conditionnement de peur au contexte décrit précédemment mais avec 5 chocs électriques et 5 présentations du son, et ceux du groupe « nouveauté » sont exposés au nouveau contexte avec le son mais sans les chocs électriques. A différents délais après les apprentissages (selon le délai d'expression de la molécule recherchée), les souris sont perfusées puis les cerveaux récupérés, fixés, déshydratés et congelés de la même manière que décrit précédemment.

Pour marquer la plasticité dans CA1, trois marqueurs sont testés. Les gènes immédiats précoces c-Fos et Arc (Activity-Regulated-Cytoskeleton-associated protein), connus pour intervenir dans les phénomènes d'apprentissage et de plasticité cérébrale sont marqués respectivement en visible et en fluorescence. La protéine ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) phosphorylée (ERK-p) intervient dans les premières cascades moléculaires de la plasticité synaptique. Elle est observée rapidement après un apprentissage, pour cette expérience les perfusions sont donc faites 15min après la tâche comportementale. L'immunohistochimie de cette kinase n'étant pas maîtrisée au laboratoire, je suis allée apprendre la technique sur les cerveaux fixés de mes souris à l'Institut de Génétique Fonctionnelle de Montpellier, sous l'encadrement d'Emmanuel Valjent et de ses étudiants.

Marquage de la protéine c-Fos en visible

Les animaux sont perfusés 1h30 après la fin de l'apprentissage. Toutes les incubations se déroulent sous agitation orbitale à température ambiante (sauf autre indication).

Le premier jour, les cerveaux sont coupés au cryostat en tranches de 40µm d'épaisseur et trois rinçages de 10min dans du PBS contenant du Triton-X-100 (PBST) sont effectués. Le Triton-X-100 est un détergent utilisé pour perméabiliser les membranes afin de permettre l'accès des anticorps aux épitopes antigéniques. Les peroxydases endogènes

sont alors bloquées pendant 15min dans une solution de PBS1X, d'H₂O₂ (3%) et de MeOH (10%). Après 2 nouveaux rinçages de 15min (PBST), les sites aspécifiques de l'anticorps primaire sont bloqués pendant une heure dans un mélange de PBST azide et de sérum de chèvre (NGS 5%). Enfin, les coupes sont placées avec l'anticorps primaire monoclonal de lapin anti-c-Fos dilué (1/4000) dans le mélange précédent, pendant 2 nuits sous agitation à 4°C.

Le dernier jour commence par 3 rinçages pendant 10min dans du PBST. Puis les coupes sont plongées dans une solution comprenant l'anticorps biotinylé secondaire de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de lapin (dilué à 1/400 dans du PBST) pendant 1h30 sous agitation à température ambiante. Après deux rinçages de 15min dans du PBST, les coupes sont immergées pendant 1h30 dans un kit ABC (1/400 dans du PBST) permettant la formation d'un complexe peroxydase-avidine-biotine sur l'anticorps secondaire. De nouveau, les coupes sont rincées dans du PBST pendant 2 fois 15min puis révélées dans une solution de DAB (1/3), nickel (1%), H₂O₂ (0,1‰) dilués dans de l'eau distillée. La DAB, ou diaminobenzidine-tétrahydrochloride est oxydée en présence d'H₂O₂ par les peroxydases présentes sur les anticorps secondaires, ce qui lui donne une couleur marron. Le nickel permet de marquer en noir plutôt qu'en marron les sites antigéniques ainsi révélés. Lorsque le rapport signal/bruit de fond est jugé optimal, cette réaction est stoppée par deux rinçages dans une solution de PBST-azide (0,1%) qui inactive la réaction enzymatique. Les coupes sont montées sur des lames gélatinées suivant l'axe rostrocaudal, puis séchées à température ambiante pendant 48h avant d'être observées au microscope.

Marquage de la protéine Arc en fluorescence

Pour pouvoir marquer la protéine Arc, les animaux sont perfusés 1h30 après la fin de l'apprentissage. Ce délai est choisi en fonction du pic d'expression de la protéine (Soulé *et al.*, 2012).

La plupart des étapes du protocole sont similaires à celle de l'immunohistochimie en visible pour c-fos, je ne détaillerai donc que les points qui diffèrent. Le blocage des sites aspécifiques des anticorps se fait pendant 30min (au lieu d'une heure) dans un mélange de PBST azide et de NDS (sérum d'âne, 5%). L'anticorps monoclonal primaire de lapin anti-Arc est dilué à 1/2000 dans la solution précédente, l'incubation dure toute la nuit à température ambiante. Le lendemain, après 3 rinçages d'une dizaine de minutes dans du PBST, les coupes sont incubées dans l'anticorps secondaire d'âne dirigé contre les immunoglobulines de lapin. Cet anticorps est équipé d'une sonde fluorescente à 555nm (Alexa Fluor) qui

permettra ensuite la visualisation des sites marqués. Les fluorochromes étant sensibles à la lumière, la suite des étapes se fait au maximum dans l'obscurité. Les coupes sont rincées dans du PBST puis déposées sur lame avant d'être fixées à l'aide d'un mélange de polymère (Mowiol) et de hoechst permettant la fluorescence des noyaux de toutes les cellules en bleu.

Marquage de la protéine ERK phosphorylée (ERK-p)

Pour marquer ERK-p, les souris sont perfusées 15min après l'apprentissage, directement avec du PFA afin d'éviter la déphosphorylation de la protéine (Trifilieff *et al.*, 2006). Les cerveaux sont coupés à Montpellier avec un vibratome, cela présente l'avantage de ne pas congeler les cerveaux et de les conserver dans un milieu aqueux. Un marquage en fluorescence a d'abord été effectué, mais les résultats obtenus étant décevants et le protocole étant très proche du marquage de la protéine Arc, je ne le détaillerai pas ici. En revanche, nous avons ensuite effectué un marquage en visible de cette protéine.

Les premières étapes du protocole sont similaires à l'immunohistochimie visible c-fos, excepté que la solution de PBS contient du NaF qui permet d'inhiber les phosphatases. L'anticorps primaire est un anticorps monoclonal de lapin. Il est dilué au millième dans un mélange contenant de l'albumine bovine sérique (BSA, 3%). L'incubation dure toute la nuit et s'effectue en chambre froide (4°C).

Le lendemain, après des rinçages (sans NaF), les coupes sont plongées dans une solution comprenant l'anticorps biotinylé secondaire de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de lapin (dilué à 1/500 dans une solution contenant 3% de BSA) pendant 45min sous agitation à température ambiante. Après plusieurs lavages dans des solutions tampons, les coupes sont incubées dans un kit ABC (1/400 dans du PBST), révélée avec la DAB et montées sur lames pour l'observation au microscope.

Comme le suggèrent nos expériences d'électrophysiologie, ainsi que la publication de Whitlock (2006), un apprentissage entraînerait dans la région CA1 de l'hippocampe la formation de LTP répartie de manière hétérogène. A ce jour, personne n'a pu observer directement cette répartition supposée en « hot spots » de la LTP. Le but de cette expérience est donc de déterminer si les « hot spots » sont visibles, en utilisant différents marquages d'immunohistochimie sur des coupes de cerveaux d'animaux ayant subi ou non un apprentissage.

Il est admis que la formation de la mémoire et la LTP nécessitent l'expression de gènes immédiats précoces (IEG) et une synthèse protéique, notamment dans la région CA1 hippocampique (Stanton et Sarvey, 1984, Huang et Kandel, 1995, Guzowski *et al.*, 1999). Cependant, la plupart des études sont quantitatives et aucune ne s'intéresse à l'observation d'une distribution particulière de la plasticité dans CA1. Or la comparaison quantitative de données moyennées d'un groupe contrôle et d'un groupe d'animaux conditionnés ne permet pas l'observation de « hot spots » à l'échelle individuelle. Pour remédier à cela, il faudrait dans un premier temps pouvoir qualifier à l'échelle individuelle la distribution des synapses ou des neurones post-synaptiques présentant une plasticité. Dans un second temps il serait nécessaire de pouvoir quantifier une éventuelle différence qualitative entre deux groupes d'individus, c'est-à-dire pouvoir dire si la plasticité est plus ou moins distribuée en fonction des groupes comportementaux. Afin d'étayer ce sujet, nous avons décidé de réaliser des marquages pour les IEG c-Fos et Arc, connus pour être impliqués dans les phénomènes de plasticité (Davis, Bozon et Laroche, 2003, Plath *et al.*, 2006).

L'immunohistochimie pour c-Fos, réalisée en visible, révèle une expression massive de la protéine cfos suite à l'apprentissage. (Figure 29). Ce type d'expression ne permet pas de visualiser des « hot spots », même s'ils existent. Ceci peut s'expliquer par le fait que cfos est d'avantage un marqueur d'activité que de plasticité. Nous nous sommes donc tourné vers un marquage plus spécifique de la plasticité : Arc. Ce marquage a été réalisé avec des fluorophores car ils donnent en général un marquage plus fin et parce qu'elles auraient permis de réaliser ultérieurement un double marquage de Arc et de la localisation des électrodes (en les imprégnant de DiO avant leur implantation) Cependant, cette immunohistochimie fonctionne surtout pour le DG et la région CA3 de l'hippocampe. Dans CA1, malgré plusieurs essais, nous n'obtenons qu'un très faible rapport signal/bruit, ce qui rend extrêmement difficile la tâche de repérage des cellules marquées.

Nous avons ensuite réalisé le marquage de la protéine ERK-p qui semble être beaucoup plus sensible. Les résultats obtenus pour cette expérience sont encore préliminaires et nécessiteront d'autres analyses ultérieurement. Cependant, il semblerait que

des regroupements de cellules ERK-p positives, possiblement des « hot spots » soient observables dans la région CA1 (Figure 30) pour les animaux ayant subi un conditionnement de peur au contexte, ce qui n'est pas le cas pour le groupe d'animaux restés dans leur cage d'élevage. Le groupe exposé au nouveau contexte sans choc électrique présente également une expression de ERK-p plus importante que le groupe contrôle. Il faudra cependant encore augmenter les effectifs et terminer les analyses permettant de quantifier la différence de répartition de ERK-p entre nos trois groupes, plus particulièrement entre les groupes « nouveauté » et « CFC » qui présentent tous les deux une forte expression de la protéine phosphorylée.

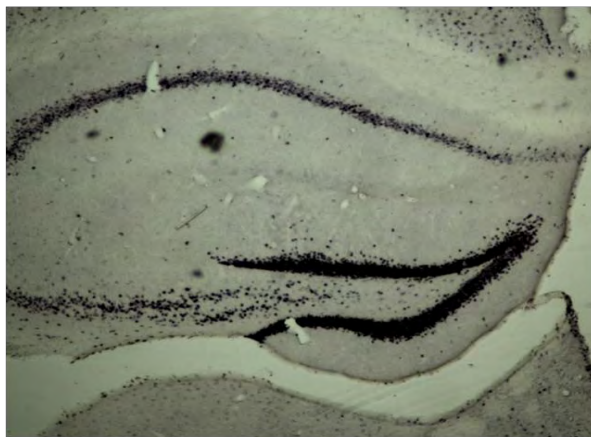


Figure 29 : Photographie d'une immunohistochimie c-Fos d'un cerveau de souris (hippocampe unilatéral, grossissement x40). La protéine c-Fos est présente dans de nombreuses cellules hippocampique après un apprentissage. Cette distribution ne permet pas de visualiser des hot spots.

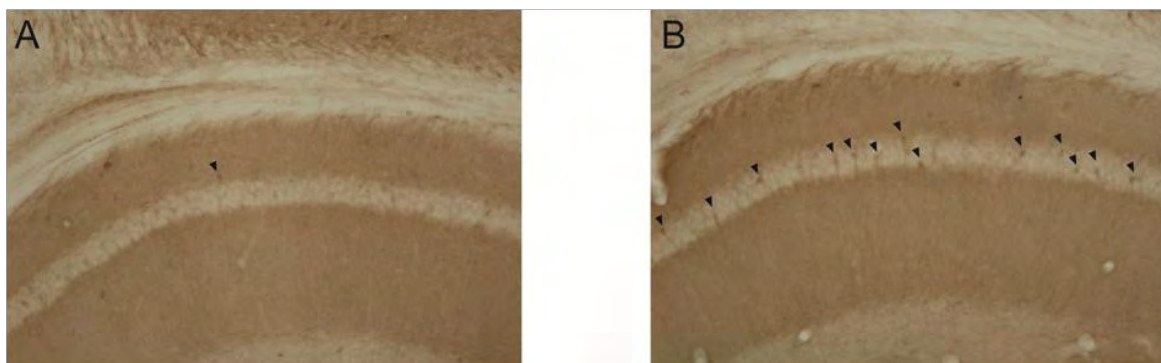


Figure 30 : Photographies d'immunohistochimie ERK-p d'un cerveau de souris (région CA1 unilatérale, grossissement x100). **A :** Coupe issue d'un animal contrôle (exposé à sa cage d'élevage). **B :** Coupe issue d'un animal ayant subi un conditionnement de peur au contexte. L'animal conditionné présente un marquage ERK-p plus important et qui semble réparti en hot spots.

Annexe 3 : L'électrophysiologie « pour les nuls »

Une part importante de mon temps passé au laboratoire (depuis mon stage de M1) a consisté à mettre en place et rendre fonctionnels des postes d'électrophysiologie. Les quelques paragraphes qui suivent énoncent une méthode qui s'est structurée au fur et à mesure de mon expérience. Non pas que je pense avoir percé tous les secrets de l'électrophysiologie mais il me semble qu'un novice pourrait gagner un temps certain en lisant ces lignes avant de se lancer.

Je pense également qu'il a été essentiel pour moi de suivre le leitmotiv suivant : ne JAMAIS se décourager (l'absence de résultat en deçà d'une durée de 6 mois n'est pas une raison valable). Dans cette phrase, « ne pas se décourager » ne veut pas dire « s'obstiner » mais invite plutôt à être plastique, à s'adapter, à ne pas rester figé et de mauvaise humeur lorsque quelque chose ne fonctionne pas. Si je mets cette idée en avant, c'est VRAIMENT parce que c'est ce qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, voici un peu de vocabulaire qui peut s'avérer utile :

- **Cage de Faraday** : boîte ou cage métallique imperméable aux ondes électriques et électromagnétiques.
- **Ame et gaine** d'un fil électrique : respectivement centre et pourtour du câble (certains câbles contiennent une âme métallique isolée par du plastique puis entourée d'une gaine métallique isolée elle aussi par du plastique)
- **Fréquence/Taux d'échantillonnage** : nombre de valeurs par seconde mesurées par le système. Tout comme nous ne pouvons percevoir que 24 images par seconde, un logiciel d'acquisition (ou un oscilloscope) ne retranscrira pas un signal en entier mais un ensemble de points. Plus l'échantillonnage est élevé, plus le signal obtenu est proche du signal réel, mais un taux d'échantillonnage élevé produit des fichiers plus lourds.
- **Transformée de Fourier** : Formule magique des physiciens, utilisée avec amour par les biologistes permettant de transformer un signal représenté au cours du temps en une représentation en puissance de fréquences. Chaque signal est en effet constitué d'un ensemble d'oscillations, de fréquence et de puissance variable au cours du temps. La transformée permet, sur une période donnée, de mesurer la puissance de chaque fréquence constituant le signal. Cet outil est utilisé par exemple pour déterminer la puissance de certains rythmes cérébraux, caractéristiques des différentes phases du cycle veille-sommeil.

- **Aliasing** : c'est ce que vous risquez si vous choisissez un taux d'échantillonnage trop faible. Il s'agit d'une image erronée du signal réel. Pour l'éviter, il faut choisir un échantillonnage d'une fréquence au moins double de la fréquence maximale pouvant être contenue dans le signal (Figure 1).
- **Filtre** (passe-bas, passe-haut, passe-bande, coupe-bande) : circuit qui traite le signal en éliminant certaines fréquences (passe-bas, il laisse passer les fréquences inférieures à celle définie, inversement pour passe-haut, passe-bande il laisse passer les fréquences situées dans l'intervalle entre les deux fréquences définies, coupe-bande il enlève toutes les fréquences de l'intervalle, c'est le cas du « notch » par exemple). Attention à leur utilisation, un filtre passe-bas à 1000Hz par exemple aura un effet maximal à 1000Hz mais risque d'éliminer au moins en partie les fréquences autour de 1000Hz, la coupure n'est pas nette.
- **Impédance** : mesure de l'opposition d'un circuit au passage d'un courant alternatif, elle s'exprime en ohms et est très proche de la notion de résistance. En bref, plus l'impédance est élevée, moins le courant passe.
- **Rythme thêta** : oscillations cérébrales dont la fréquence est comprise environ (les limites peuvent varier légèrement d'une étude à l'autre) entre 5 et 12 Hz.

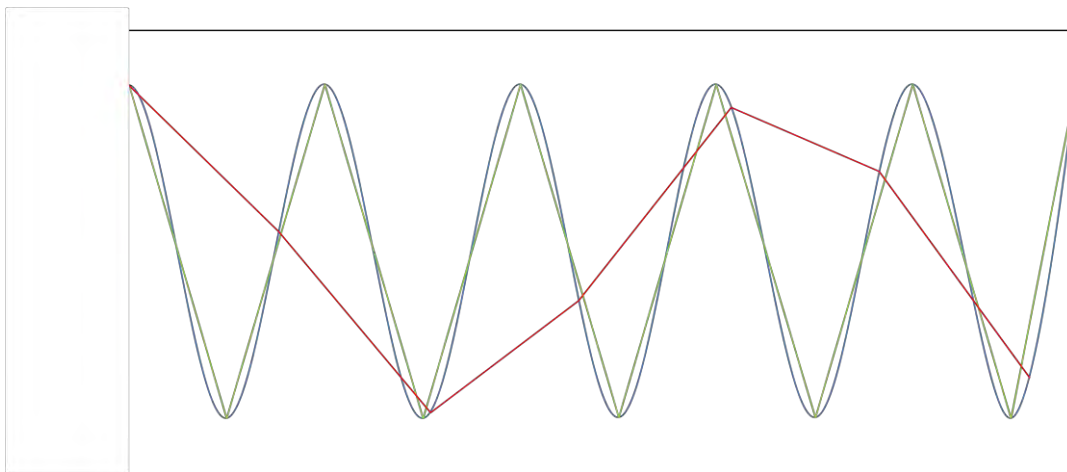


Figure 1 : Schéma représentant un aliasing. Le trait noir est l'échelle de temps (1s). En bleu : signal réel (sinusoïde de 5Hz), en vert : signal obtenu avec un échantillonnage à 10Hz (fréquence minimale pour que le signal observé soit correct), en rouge : signal obtenu avec un échantillonnage à un peu moins de 7Hz (un aliasing est observé).

La connexion du matériel (ou comment se mettre au courant)

Dans cette première étape, il s'agit de connecter les différents éléments du rack entre eux à l'aide de câbles (souvent BNC).

Le signal capté par l'électrode d'enregistrement arrive d'abord à un pré-amplificateur ou directement à un amplificateur. La sortie du pré-amplificateur est donc connectée à l'entrée de l'amplificateur. Leur rôle est comme leur nom l'indique d'amplifier le signal (la présence d'un pré-amplificateur améliore le rapport signal/bruit).

Ensuite, le signal doit pouvoir être visualisé sur l'ordinateur. Pour cela, il est possible de commencer par limiter le 50Hz (fréquence émise par les appareils électriques, appelée aussi « fréquence secteur ») en reliant la cage de Faraday à la terre (via la tige qui ressort au niveau d'une prise électrique) et éventuellement en reliant la sortie de l'amplificateur à l'entrée d'un éliminateur de fréquence (Hum Bug, principe : à la différence d'un filtre qui entraîne une perte du signal, le Hum Bug émet du 50Hz à une puissance qu'il détermine en fonction du signal reçu, en antiphase avec le 50Hz présent dans ce signal, ce qui permet de l'annuler au moins en partie).

Puis la sortie du Hum Bug est reliée à l'entrée « ADC input » d'un convertisseur analogique-numérique (aussi appelé convertisseur analogique-digital ou analog-to-digital converter en anglais) qui permet de convertir le signal électrique (analogique) en un signal binaire (digital) pouvant donc être informatisé. Il suffit alors de connecter la sortie de ce CAN (ou ADC en anglais) à une entrée de l'ordinateur (sur les modèles récents de CAN, la connexion se fait simplement par un branchement USB).

NB : Plusieurs Hum Bug ou amplificateurs peuvent être connectés à un même CAN.

Si vous souhaitez également réaliser des stimulations, la sortie « Trig » du stimulateur doit être reliée à l'entrée « Event input » du CAN ainsi qu'à sa sortie « Digital outputs ». Cela permet d'envoyer l'ordre de stimuler depuis un logiciel et de recevoir un signal qui informe le logiciel que la stimulation a bien été envoyée (et donc d'avoir un tracé synchronisé avec le signal qui indique quand ont lieu les stimulations).

La connexion des électrodes au système (cas des enregistrements 1 voie)

C'est ici que la fabrication de câbles d'enregistrement et de stimulation entre en jeu. Dans notre cas, les électrodes sont reliées à ces câbles par des nappes (cela dépend des connecteurs utilisés pour la fabrication des électrodes), cette linéarité peut entraîner des erreurs dans la fabrication des câbles donc n'hésitez pas à faire des schémas. Ainsi, la pinoche 1 du connecteur de l'électrode (par convention, la pinoche 1 est toujours du côté de l'encoche) sera reliée à la pinoche 4 du connecteur du câble, la 2 sera reliée à la 3, etc (Figure 2).

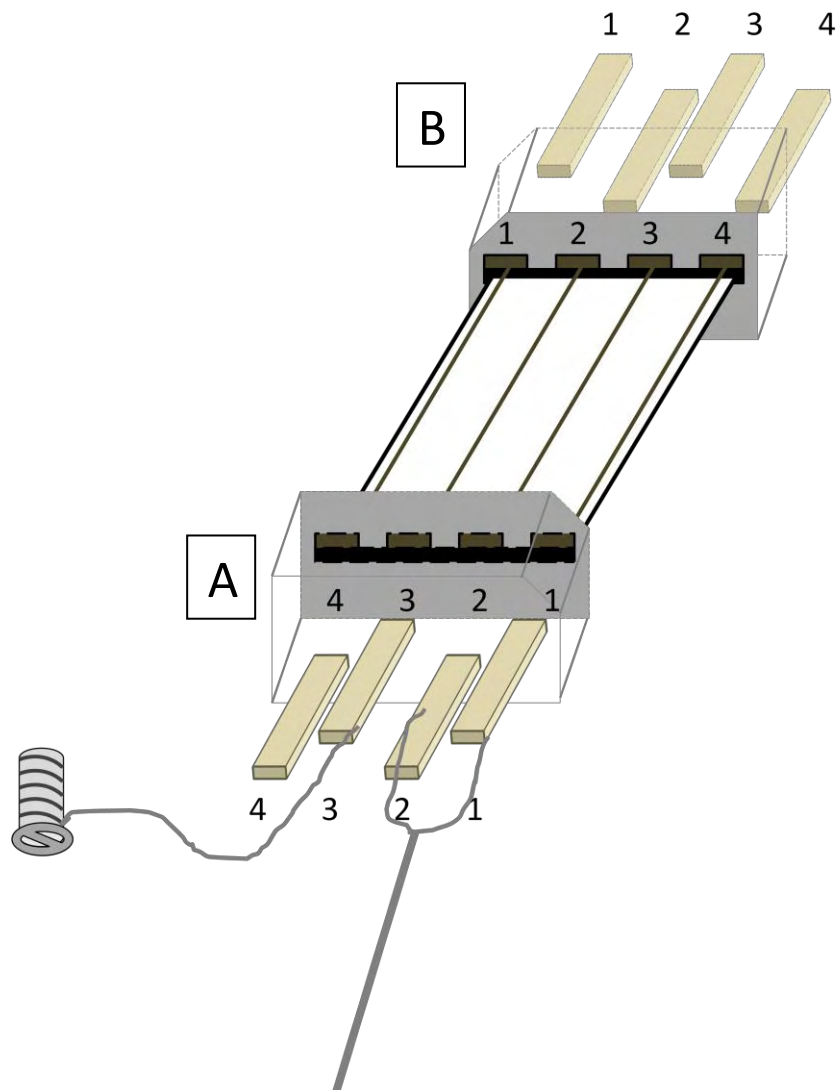


Figure 2 : Schéma de la connexion de l'électrode (A) au connecteur du câble d'enregistrement (B).

Lors de la fabrication des câbles d'enregistrement, il faut donc relier la pinoche 2 à la gaine et les pinoches 3 ou 4 à l'âme, qui sont ensuite reliés respectivement au « Ground » (« Terre ») et à la « Probe » (G1) du pré-amplificateur (la probe G2 du pré-amplificateur étant, dans notre cas, déjà elle-même reliée à la terre). Pour les câbles de stimulation, les pinoches 3 et 4 sont reliées par l'âme aux pinoches branchées sur les sorties rouge et noire du stimulateur, les gaines des deux câbles sont soudées entre elles et reliées à la terre.

La configuration du logiciel Spike2 (ou comment devenir fan de C.E.D.)

Spike2 est un logiciel à l'interface plutôt intuitive, tout en restant malléable. Il est donc facile d'utilisation et peut également ravir les informaticiens chevronnés (possibilité de rédaction et d'exécution de scripts, de partage d'expérience entre utilisateurs sur internet, etc...). Le système d'aide en ligne de Cambridge Electronic Design (C.E.D.) peut s'avérer très utile, d'autant plus que le support technique répond rapidement aux mails.

Pour débiter, il faut ouvrir le logiciel et aller dans le menu « Sample » puis « Sampling configuration ». L'onglet « Channels » permet de créer et modifier des voies d'enregistrement. Pour créer une voie d'enregistrement, cliquez sur « New... », vous pouvez alors choisir un numéro de voie (peu importe), un type de voie (exemples : « Waveform » est une forme d'onde type électroencéphalogramme, « Event+ » peut être utilisé pour créer une voie d'évènements, vous pouvez créer une voie « Marker » pour pouvoir écrire au dessus du tracé en direct), un nom de voie, et écrire des commentaires pour éventuellement la décrire un peu plus.

En fonction du type de voie sélectionnée, plusieurs informations peuvent être requises. Dans « 1401 port », vous devez choisir le port du CAN auquel correspond la voie. Pour ce qui est du « Ideal waveform sampling » ou « Max event rate », il s'agit de définir un taux d'échantillonnage qui permette d'éviter un aliasing (cf. définitions au début du préambule) dans le premier cas et de donner le maximum d'évènements possibles (en Hz) dans le second.

Dans l'onglet « Resolution », après avoir créé toutes les voies désirées vous pouvez modifier les taux d'échantillonnage pour que le logiciel ne soit pas « débordé » (les erreurs s'affichent en couleur).

A partir de ce point, vous devriez pouvoir lancer l'enregistrement (en sauvegardant vos modifications et en cliquant sur « Run now » puis « Start »).

Pour pouvoir stimuler à partir de l'interface (et non pas en appuyant sur le bouton du stimulateur à chaque fois), vous devez aller dans l'onglet « Sequencer » de « Sampling configuration ». Dans « Output selection », choisir « Use graphical editor ». Cet éditeur graphique (accessible en bas à gauche) permet de créer des patterns de stimulation, et de les exécuter manuellement ou automatiquement les uns à la suite des autres. La liste « Jump control » vous permet de choisir comment exécuter les patterns, via le clavier de l'ordinateur ou/et en cliquant sur un bouton de l'interface pendant l'expérience.

Afin de ne pas trop allonger ce texte je ne vais pas décrire en détail l'utilisation de l'éditeur graphique, sachez simplement que la ligne bleue représente la durée de votre pattern, et que sur la ligne noire vous pouvez placer les différents éléments (pulse carré par exemple) pour ensuite les définir en bas avec du texte (dans « Key », entrez une lettre, chiffre ou symbole qui servira à déclencher ce pattern lors d'un enregistrement).

Le débogage du poste (ou comment presque croire en la magie)

Avant de connecter un animal sur le poste, il faut s'assurer de la propreté d'un signal censé être nul. Pour cela, vous devez réaliser quelques tests dans un bécher de NaCl, c'est-à-dire placer les électrodes (stimulation et enregistrement) dans du NaCl (0,9%) à l'emplacement où devrait être la souris, et les connecter.

Vous pouvez alors démarrer l'enregistrement, les objectifs à atteindre sont d'avoir un signal très peu bruité et un artefact de stimulation très court (moins de 4ms dans notre cas puisque la réponse est attendue autour de 5-10ms après la stimulation).

NB : le « notch » (filtre 50Hz) de l'amplificateur doit être positionné sur « out », sans quoi un artefact long ressemblera à un potentiel de champ, et il n'y a normalement pas de potentiel de champ dans un bécher de NaCl.

Désormais, le chemin se fait à tâtons. Il existe cependant quelques paramètres qui permettent de contrôler (au moins en partie) le bruitage du signal :

- Relier la cage de Faraday à la terre
- Gainer le plus possible les câbles et relier ces gaines à la terre (ou à la cage de Faraday)

- Faire des câbles courts
- Faire passer les câbles le plus possible dans la cage de Faraday
- La configuration spatiale du câblage peut jouer un rôle important (par exemple, une boucle entraîne la formation d'un champ magnétique perpendiculaire au rayon de la boucle, ce champ magnétique peut être capté par un câble et créer du bruit sur le signal).
- Jouer avec les filtres passe-bas et passe-haut de l'amplificateur (en tenant compte des fréquences théoriques que comporte le signal étudié), ainsi que sur le gain.
- Essayer de déterminer d'où vient le bruit, en éteignant voire débranchant un à un le stimulateur, le câble de stimulation, les appareils électriques environnants, ou même en sortant le Humbug du circuit (on ne sait jamais...).
- La diminution du bruit devrait également entraîner une diminution de la durée de l'artefact de stimulation, mais vous pouvez aussi moduler la durée de la stimulation pour modifier ce paramètre.

N.B. : Penser à ne modifier qu'un seul paramètre à la fois. Il arrive qu'en tentant d'améliorer le signal, on le détériore, il faut pouvoir faire machine arrière facilement...

Une fois que le signal semble correct dans le NaCl, vous pouvez remplacer le bécher par une souris ! A priori, si vous enregistrez à nouveau du bruit, il doit être lié aux mouvements de l'animal (les artefacts de mouvements peuvent aussi être observés dans le bécher, en s'approchant des fils, en soufflant dessus, en les bougeant, ou en sautillant près du poste à la manière de Pascal Roulet !).

Les enregistrements sur animal freely-moving

Lors des premières connexions, l'animal peut être agité, et ce pour plusieurs raisons. Il a probablement peur de cet environnement qu'il connaît peu et du casque qui lui maintient la tête, il est possible aussi qu'il explore simplement le dispositif. Il faut donc attendre quelques minutes qu'il se calme avant de procéder aux premières stimulations.

C'est lors des premières connexions que l'on se rend compte du confort de l'animal. Il faut donc essayer d'améliorer la configuration du dispositif pour qu'il soit le plus confortable possible. On peut modifier la position/longueur des fils, leur rigidité (prendre des fils plus fins par exemple), leur mobilité, tout en vérifiant que le signal reste correct. Il faut également s'assurer que l'animal peut se déplacer dans l'ensemble de la boîte sans trop de difficulté et

sans avoir une position anormale (regarder la position de la tête par rapport au reste du corps, elle ne doit pas sembler enfouie dans la litière ni tirée vers le haut, l'animal ne doit pas trop pencher la tête sur le côté, mais ce facteur dépend aussi de la qualité du casque fabriqué lors de la chirurgie).

Si vous observez un fort 50Hz (qui domine sur le reste du signal), il est probable que votre électrode d'enregistrement soit cassée ou dessoudée (vérifier l'impédance), ou que vous ayez oublié de débrancher un appareil qui crée ce bruit (c'était le cas par exemple de la lampe LCD que j'utilisais lors de mes chirurgies).

Normalement, l'électrode d'enregistrement bien placée (dans l'hippocampe) doit enregistrer du rythme thêta. Le problème c'est que ce thêta peut également être capté autour de l'hippocampe (en plus faible puissance, mais la puissance est relative donc il est difficile de se servir de cela comme seul indicateur). En réalité, je pense que le meilleur moyen de savoir dans quelle région on se trouve (en dehors de l'histologie post-mortem), c'est de stimuler et d'observer la forme de la réponse (si vous avez un joli « V » qui apparaît entre 5 et 10ms après l'artefact, c'est plutôt bon signe si vous voulez enregistrer les potentiels de champs des collatérales de Schaffer).

S'il n'y a pas de réponse à la stimulation, il faut dans l'ordre :

- Vérifier que le courant passe comme il devrait. Si ce n'est pas le cas, le voyant rouge du stimulateur s'allume, et il y a des chances pour que l'impédance de l'électrode de stimulation soit trop haute (électrode cassée ou mal dénudée par exemple), à vérifier à l'impédancemètre.
- Si le courant passe bien dans l'électrode (voyant vert lors de la stimulation), il est possible qu'il ne passe pas à travers le tissu, c'est-à-dire qu'il passe directement d'un fil de l'électrode à l'autre (court-circuit), ceci est vérifiable également à l'impédancemètre.
- Augmenter l'intensité de stimulation (personnellement, je m'autorise un maximum de 1,5mA sachant que c'est encore sous le seuil qui crée des lésions et au-dessus des intensités nécessaires pour observer une réponse en général).
- Changer de voie d'enregistrement (l'ampli Grass ne peut enregistrer qu'une voie en même temps, mais l'électrode d'enregistrement est double, il est donc possible de fabriquer un câble d'enregistrement pour chaque voie).
- Si vous ne voyez toujours pas de réponse, il y a des chances que vos électrodes ne soient pas placées au bon endroit, ceci est à vérifier par histologie.

Annexe 4 : Programme Spike2 pour analyser les rythmes et fEPSPs

'Ce script permet d'analyser les rythmes delta (colonne 1) et thêta (colonne 2) d'une forme d'onde comprenant une voie d'événements.
 'Il mesure aussi la pente et amplitude des fEPSPs.
 'Le calcul de ces rythmes se fait pour les 10s après et les 10s avant chaque événement.

'Pré-requis pour ce script :
 'Lorsqu'on demande de créer 4 curseurs, il faut placer les 1 et 3 avant le premier événement à analyser, le 2 n'importe où au milieu, le 4 après le dernier événement.

```

var virtual%;
var trigger%;
var rythm[1000][7];
var fft%;
var cur1;
var cur2;
var cur3;
var cur4;
var pdt%;
var fin%;
var tps%;
var cur5;
var cur6;
var cur7;
var cur8;
var safety;
var max%;
var buffer;
var mem%;
var fichier;
var file$;

file$:=Input$("Quel fichier veux-tu analyser ?", "C:\\Users\\");
if file$="C:\\Users\\" then
  Message ("Ok, on s'arrete ici alors");
  halt;
endif;
fichier:=FileOpen(file$, 0, 3);
FrontView(fichier);
ChanHide(-2);
ChanShow(10, 31);
XRange(0, MaxTime());
'Le fichier à analyser est ouvert, on mesure sa durée

CursorSet(0);
buffer:=Input("As-tu besoin de créer une voie d'événements (0 pour oui, 1 pour non)", 1, 0, 1);
trigger%:=Input("Quel est ton trigger? (401 si tu veux créer une voie d'événements)", 2, 1, 1000);

if buffer=0 then
  max%:=MaxTime(1);
  mem%:=MemChan(3);
  ChanShow(mem%);
  CursorNew(0, 1);
  CursorNew(max%, 2);
  CursorActive(0, 4, 1, 1, "", "", 1);
  CursorActive(1, 4, 1, "Cursor(0)", "Cursor(2)", "", 1);
  Repeat
    CursorSearch(0);
    MemSetItem(trigger%, 0, Cursor(1));
  until CursorValid(1)=0;
endif;

Repeat
  virtual%:=Input("Quelle voie analyser (0 pour arrêter)?", 3, 0, 150);
if virtual%=0 then
  Message ("Cool, enfin fini pour ce fichier!");
  FileClose(-1, -1);
  halt;
endif;
CursorSet(0);
CursorNew(0, 3);
CursorNew(1, 1);
CursorNew(100, 2);

```



```

CursorNew(100,5);
max%:=MaxTime(virtual%);
CursorNew(max%,4);
Interact("Vérifie la position des curseurs et clique sur OK quand c'est fait",128); 'La voie
d'intérêt est définie, les curseurs sont placés sur la zone à analyser

fin%:=ChanMeasure(trigger%,1,Cursor(3),Cursor(4)); 'Mesure le nombre d'événements ou stimulations
dans la zone à analyser et l'indique dans la fenêtre log
printLog(fin%);

CursorActive(0,14,trigger%,1,"",1);
CursorActive(2,14,trigger%,"Cursor(3)","Cursor(4)","",1);
CursorSearch(0);
Cursor(1,Cursor(2)-5);
Cursor(5,Cursor(2)+1); 'Place les curseurs sur le premier événement
fft%:=SetPower(virtual%,34000);
WindowVisible(1);
Process(View(-1).Cursor(1),View(-1).Cursor(2),1,1,0,trigger%,10,10); 'Calcule la transformée de
Fourier
CursorNew(1.5,1);
CursorNew(4,2);
CursorNew(4.5,3);
CursorNew(12,4);
cur1:=Cursor(1); 'Les curseurs sont placés pour mesurer le delta et theta, on les nomme cur1 à cur4
cur2:=Cursor(2);
cur3:=Cursor(3);
cur4:=Cursor(4);

rythm[0][0]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2))); 'Mesure le delta et le note
dans la première colonne de la fenêtre de sortie
rythm[0][1]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4))); 'Mesure le theta et le place
dans la seconde colonne
rythm[0][2]:=30; 'Note le temps approximatif en
secondes dans la 3ème colonne
WindowVisible(0);

Process(View(-1).Cursor(2),View(-1).Cursor(4),1,1,0,trigger%,10,-10);
CursorNew(1.5,1);
CursorNew(4,2);
CursorNew(4.5,3);
CursorNew(12,4);
cur1:=Cursor(1);
cur2:=Cursor(2);
cur3:=Cursor(3);
cur4:=Cursor(4);

rythm[0][3]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));
rythm[0][4]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4))); 'Mesure les rythmes
post-événements et les place en colonne 5 et 6

FileClose(0,-1);

SetAverage(virtual%,1000,0.01,trigger%,1,1);
Process(View(-1).Cursor(1),View(-1).Cursor(5),1,1,0);
CursorNew(0.05,1);
CursorNew(0.05,2);
CursorNew(0.05,3);
CursorNew(0.05,4);
WindowVisible(1);
safety:=Input("Y a t-il une erreur de moyennage ? 0 pour oui, 1 pour non",1,0,1); 'Affiche le
fEPSP moyen du premier événement
if safety=0 then
    Message("Ok, alors on arrête là et on recommence");
    halt;
endif;

Interact("Déplace les curseurs 1 et 2 (pente) et 3 et 4 (amplitude) et clique sur 'OK' quand tu
es prêt(e)",128);
cur5:=Cursor(1);
cur6:=Cursor(2);
cur7:=Cursor(3);
cur8:=Cursor(4);
rythm[0][5]:=ChanMeasure(1,3,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));
rythm[0][6]:=ChanMeasure(1,10,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4))); 'Mesure la pente et

```

l'amplitude du fEPSP et les note en colonne 6 et 7

```
FileClose(0,-1);
```

```
for pdt%:=1 to fin% step 1 do 'Initiation de la boucle qui va répéter ces opérations pour  
tous les événements de la zone à analyser en conservant les paramètres de mesure
```

```
CursorActive(2,14,trigger%,"Cursor(3)","Cursor(4)","",pdt%+1);  
CursorSearch(0);  
Cursor(1,Cursor(2)-10);  
Cursor(5,Cursor(2)+1);  
fft%:=SetPower(virtual%,34000);  
Process(View(-1).Cursor(1),View(-1).Cursor(2),1,1,0,trigger%,10,10);  
CursorNew(cur1,1);  
CursorNew(cur2,2);  
CursorNew(cur3,3);  
CursorNew(cur4,4);  
rythm[pdt%][0]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));  
rythm[pdt%][1]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));  
rythm[pdt%][2]:=30+30*pdt%;  
FileClose(0,-1);
```

```
fft%:=SetPower(virtual%,34000);  
Process(View(-1).Cursor(2),View(-1).Cursor(4),1,1,0,trigger%,10,-10);  
CursorNew(cur1,1);  
CursorNew(cur2,2);  
CursorNew(cur3,3);  
CursorNew(cur4,4);  
rythm[pdt%][3]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));  
rythm[pdt%][4]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));  
FileClose(0,-1);
```

```
SetAverage(virtual%,1000,0.01,trigger%,1,1);  
Process(View(-1).Cursor(1),View(-1).Cursor(5),1,1,0);  
CursorNew(cur5,1);  
CursorNew(cur6,2);  
CursorNew(cur7,3);  
CursorNew(cur8,4);  
rythm[pdt%][5]:=ChanMeasure(1,3,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));  
rythm[pdt%][6]:=ChanMeasure(1,10,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));
```

```
FileClose(0,-1);
```

```
next;  
printLog(rythm);  
until virtual%=0;
```

```
Repeat
```

```
file$:=Input$("Quel fichier veux-tu analyser ?", "C:\\Users\\"); 'créé une boucle pour répéter  
toutes ces opérations sur d autres fichiers
```

```
fichier:=FileOpen(file$,0,3);  
FrontView(fichier);  
ChanHide(-2);  
ChanShow(1,2);  
XRange(0,MaxTime());
```

```
CursorSet(0);  
buffer:=Input("As-tu besoin de créer une voie d'événements (0 pour oui, 1 pour non)",1,0,1);  
trigger%:=Input("Quel est ton trigger? (401 si tu veux créer une voie d'événements)",2,1,1000);
```

```
if buffer=0 then  
max%:=MaxTime(1);  
mem%:=MemChan(3);  
ChanShow(mem%);
```

```

CursorNew(0,1);
CursorNew(max%,2);
CursorActive(0,4,1,1,"","",1);
CursorActive(1,4,1,"Cursor(0)","Cursor(2)","",1);
Repeat
    CursorSearch(0);
    MemSetItem(trigger%,0,Cursor(1));
    until CursorValid(1)=0;
endif;

Repeat
    virtual%:=Input("Quelle voie analyser (0 pour arrêter)?",3,0,150);
if virtual%=0 then
    Message ("Cool, enfin fini pour ce fichier!");
    FileClose(-1,-1);
    halt;
endif;
CursorSet(0);
CursorNew(0,3);
CursorNew(1,1);
CursorNew(100,2);
CursorNew(100,5);
max%:=MaxTime(virtual%);
CursorNew(max%,4);
Interact("Vérifie la position des curseurs et clique sur OK quand c'est fait",128);

fin%:=ChanMeasure(trigger%,1,Cursor(3),Cursor(4));
printLog(fin%);

CursorActive(0,14,trigger%,1,"","",1);
CursorActive(2,14,trigger%,"Cursor(3)","Cursor(4)","",1);
CursorSearch(0);
Cursor(1,Cursor(2)-10);
Cursor(5,Cursor(2)+1);
fft%:=SetPower(virtual%,34000);
WindowVisible(1);
Process(View(-1).Cursor(1),View(-1).Cursor(2),1,1,0,trigger%,10,10);
CursorNew(cur1,1);
CursorNew(cur2,2);
CursorNew(cur3,3);
CursorNew(cur4,4);

rythm[0][0]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));
rythm[0][1]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));
rythm[0][2]:=30;
WindowVisible(0);

Process(View(-1).Cursor(2),View(-1).Cursor(4),1,1,0,trigger%,10,-10);
CursorNew(cur1,1);
CursorNew(cur2,2);
CursorNew(cur3,3);
CursorNew(cur4,4);

rythm[0][3]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));
rythm[0][4]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));

FileClose(0,-1);

SetAverage(virtual%,1000,0.01,trigger%,1,1);
Process(View(-1).Cursor(1),View(-1).Cursor(5),1,1,0);
CursorNew(cur5,1);
CursorNew(cur6,2);
CursorNew(cur7,3);
CursorNew(cur8,4);
WindowVisible(1);
safety:=Input("Y a t-il une erreur de moyennage ? 0 pour oui, 1 pour non",1,0,1);
if safety=0 then
    Message("Ok, alors on arrête là et on recommence");
    halt;
endif;

Interact("Déplace les curseurs 1 et 2 (pente) et 3 et 4 (amplitude) et clique sur 'OK' quand tu

```



```

es prêt(e)",128);

rythm[0][5]:=ChanMeasure(1,3,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));
rythm[0][6]:=ChanMeasure(1,10,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));

FileClose(0,-1);

for pdt%:=1 to fin% step 1 do

    CursorActive(2,14,trigger%,"Cursor(3)","Cursor(4)","",pdt%+1);
    CursorSearch(0);
    Cursor(1,Cursor(2)-10);
    Cursor(5,Cursor(2)+1);
    fft%:=SetPower(virtual%,34000);
    Process(View(-1).Cursor(1),View(-1).Cursor(2),1,1,0,trigger%,10,10);
    CursorNew(cur1,1);
    CursorNew(cur2,2);
    CursorNew(cur3,3);
    CursorNew(cur4,4);
    rythm[pdt%][0]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));
    rythm[pdt%][1]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));
    rythm[pdt%][2]:=30+30*pdt%;
    FileClose(0,-1);

fft%:=SetPower(virtual%,34000);
Process(View(-1).Cursor(2),View(-1).Cursor(4),1,1,0,trigger%,10,-10);
CursorNew(cur1,1);
CursorNew(cur2,2);
CursorNew(cur3,3);
CursorNew(cur4,4);
rythm[pdt%][3]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));
rythm[pdt%][4]:=ChanMeasure(1,4,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));
FileClose(0,-1);

SetAverage(virtual%,1000,0.01,trigger%,1,1);
Process(View(-1).Cursor(1),View(-1).Cursor(5),1,1,0);
CursorNew(cur5,1);
CursorNew(cur6,2);
CursorNew(cur7,3);
CursorNew(cur8,4);
rythm[pdt%][5]:=ChanMeasure(1,3,BinToX(Cursor(1)),BinToX(Cursor(2)));
rythm[pdt%][6]:=ChanMeasure(1,10,BinToX(Cursor(3)),BinToX(Cursor(4)));

FileClose(0,-1);

    next;
printLog(rythm);
until virtual%=0;
until file$="C:\\Users\\" ;
Message ("Wow ! Quel boulot de dingue !!"); 'Message de fin, les données peuvent être
récupérées dans la fenêtre Log et copiées sur Excel, on a un joli tableau
halt;

```

Brief Communication

Anisomycin injection in area CA3 of the hippocampus impairs both short-term and long-term memories of contextual fear

Jessica Remaud,^{1,2,3} Johnatan Ceccom,^{1,2,3} Julien Carponcy,^{1,2} Laura Dugué,^{1,2} Gregory Menchon,^{1,2} Stéphane Pech,^{1,2} Helene Halley,^{1,2} Bernard Francés,^{1,2} and Lionel Dahan^{1,2,4}

¹Université de Toulouse (UPS), Centre de Recherches sur la Cognition Animale, 31062 Toulouse, France; ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Centre de Recherches sur la Cognition Animale, 31062 Toulouse, France

Protein synthesis is involved in the consolidation of short-term memory into long-term memory. Previous electrophysiological data concerning LTP in CA3 suggest that protein synthesis in that region might also be necessary for short-term memory. We tested this hypothesis by locally injecting the protein synthesis inhibitor anisomycin in hippocampal area CA1 or CA3 immediately after contextual fear conditioning. As previously shown, injections in CA1 impaired long-term memory but spared short-term memory. Conversely, injections in CA3 impaired both long-term and short-term memories. We conclude that early steps of experience-induced plasticity occurring in CA3 and underlying short-term memory require protein synthesis.

Memory formation is conventionally described by the succession of two steps. First comes a short-term memory that lasts a few hours and is independent of de novo protein synthesis; then comes a long-term memory, requiring the synthesis of new proteins (Davis and Squire 1984). Long-term potentiation (LTP) is a key mechanism for memory formation at the synaptic level (Bliss et al. 2006). Strikingly, LTP also displays a short-lived phase (termed early LTP) independent of protein synthesis, and a late LTP requiring de novo protein synthesis that lasts for months (Frey et al. 1993). Short-term memory is thus thought to rely on early LTP, while long-term memory formation would stand on late LTP (Kandel 2001). Importantly, the distinction between early and late LTP on the basis of the requirement for protein synthesis mainly relies on observations of LTP occurring at the Schaffer collateral synapses, corresponding to the CA3 pyramidal terminals onto area CA1 of the hippocampus (Malenka and Bear 2004). However, the mechanisms responsible for LTP can vary depending on the type of synapse considered. The properties of LTP occurring at the mossy fiber synapses, which are axon terminals given off by dentate gyrus granule cells and projecting to CA3 pyramidal neurons, are very different from the canonical LTP occurring at the Schaffer collaterals (Malenka and Bear 2004). In particular, some studies claim that LTP at mossy fiber synapses requires de novo protein synthesis from its initiation (Barea-Rodriguez et al. 2000; Hagena and Manahan-Vaughan 2013; but see Huang et al. 1994). Thus, protein synthesis seems to be required for LTP at the mossy fiber synapses, at least during its first hour. Given the putative aforementioned causal relationship between early LTP establishment and short-term memory formation, these observations indicate that protein synthesis should be required for the formation of any short-term memory relying

on the plasticity of the mossy fibers. Thus, the inhibition of protein synthesis in CA3 should impair short-term memory.

Contextual fear conditioning is a very common learning paradigm in which rodents have to quickly build a conjunctive representation of a context and to associate this context with an electric footshock. In this kind of declarative memory, the representation of the context is processed by the hippocampus while the amygdala is responsible for the association between the context and the aversive stimulus (Selden et al. 1991; Kim and Fanselow 1992; Phillips and LeDoux 1992; Barrientos et al. 2002). Hippocampal computational models and theories have emphasized a unique function in memory for each hippocampal subregion, with the CA3 area acting as an autoassociative memory network and the CA1 area as a critical output structure (Rolls and Treves 1996). Using local injections of lidocaine in dorsal CA1 or CA3, we previously showed that CA3 is necessary for the rapid elaboration of a unified representation of the context while CA1 is rather involved in the consolidation process of contextual memory (Daumas et al. 2005). Contextual fear conditioning can also be impaired by specific mutations interfering with plasticity at the Schaffer collateral synapses on CA1 (Rampon et al. 2000) or at the recurrent collaterals or mossy fiber synapses on CA3 pyramidal neurons (Otto et al. 2001; McHugh and Tonegawa 2009). This strongly suggests that contextual fear conditioning requires LTP in both subregions of the hippocampus. Local injections of protein synthesis inhibitors into the dorsal hippocampus have been shown to induce deficits in long-term, but not short-term, contextual fear memory (Igaz et al. 2002; Motanis and Maroun 2012). However, experiments assessing the role of the protein

³These authors contributed equally to this work.

⁴Corresponding author
E-mail lionel.dahan@univ-tlse3.fr

Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.033969.113>.

© 2014 Remaud et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first 12 months after the full-issue publication date (see <http://learnmem.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

synthesis in the hippocampus mainly targeted the CA1 subregion. To our knowledge, the requirement for protein synthesis specifically in CA3 in contextual fear conditioning has never been assessed.

We hypothesized that, if protein synthesis is required for the early stages of mossy fiber LTP (Barea-Rodriguez et al. 2000; Hagena and Manahan-Vaughan 2013), then the inhibition of protein synthesis in CA3 should impair both short-term and long-term contextual fear memory. Conversely, since protein synthesis is not required for early LTP in CA1, its inhibition in this structure should only impair long-term memory.

Protein synthesis inhibitor anisomycin was injected bilaterally in dorsal CA3 immediately after a contextual fear conditioning (CFC) session, and short- or long-term memory was measured. The same experiment was performed in another group of mice with local injection taking place in CA1. Ten to 15 d before the conditioning, male C57BL/6J mice (10- to 16-wk old, obtained from Charles River) were implanted bilaterally with guide cannulae above CA1 or above CA3. Surgery for cannulae implantation and intracerebral anisomycin administration was performed as previously described in Artinian et al. (2008). The behavioral procedures for contextual fear conditioning and analysis of behavioral data were performed as described in Daumas et al. (2004). Briefly, contextual fear conditioning (performed using the Panlab s.l. Startfear 1.06 system) consisted of a single train-

ing session with two trials, consisting of a tone (85 dB, 30 sec) associated with an electric shock (0.7 mA, 2 sec), separated by an inter-trial interval (ITI) of 120 sec. Immediately after the training session, injectors were lowered through the guide cannulae and mice received 0.25 μ L of anisomycin (100 μ g/ μ L) per side at a rate of 0.1 μ L per minute. Contextual short-term or long-term memory was tested in different groups of mice, respectively, 1 h or 24 h after training by measuring the percentage of time spent freezing during the exposition to the context previously associated with the shock (4 min). Two hours later, mice were placed in a different context and the percentage of time spent freezing was measured (2 min) in order to evaluate nonspecific freezing and the degree of generalization of the fear to another context. Then, in that different context, the freezing induced by the presentation of the tone (2 min) was measured in order to test for cued fear conditioning that is supposed to depend on the amygdala and should not be disturbed by intra-hippocampal injections. Animal surgery and experimentation were approved by the French Animal Care and Use Committee (MP 02/02/02/06). All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC). Data were analyzed using two way ANOVA (treatment: NaCl or anisomycin; testing time: 1 h or 24 h after conditioning). After examination of coronal sections, 33 mice were considered correctly injected bilaterally in CA1 (Fig. 1A,B). As expected, the effects of anisomycin

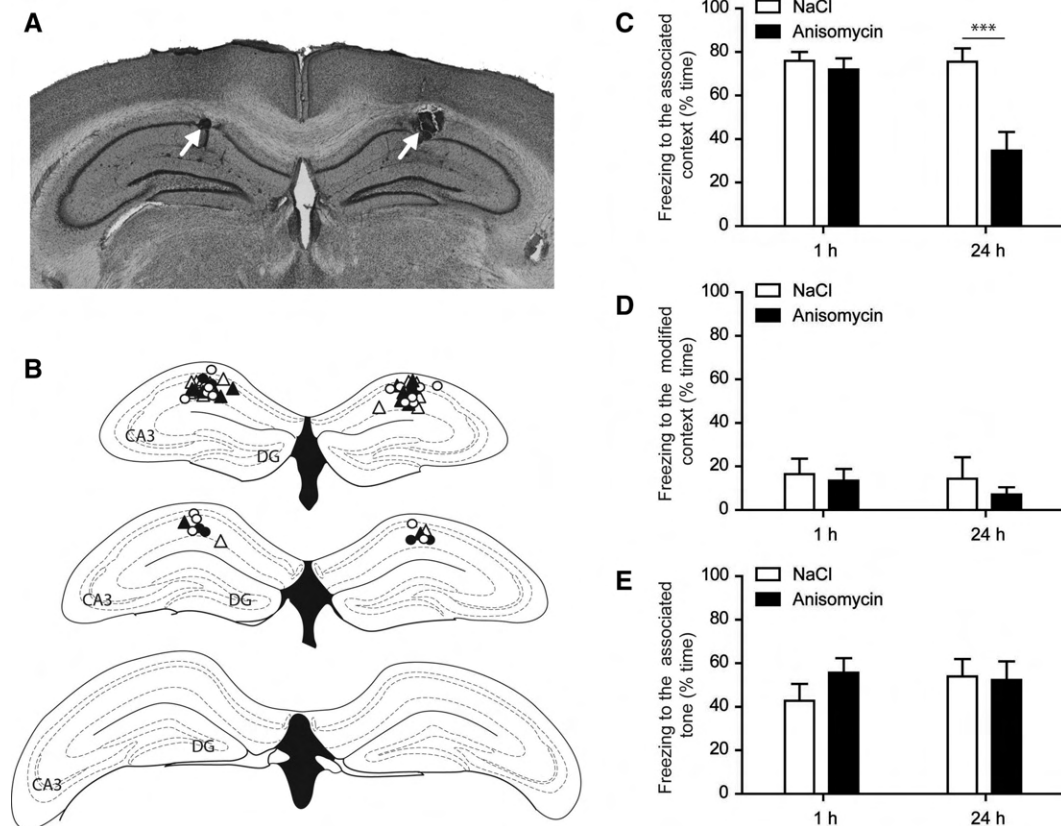


Figure 1. Anisomycin injection in the CA1 region of the hippocampus impairs long-term but not short-term contextual fear memory. (A) Representative picture showing the location of injection sites (white arrows) in CA1. (B) Injection sites in CA1 for mice tested for short-term (triangles) or long-term (circles) memory. Open shapes correspond to saline injections while full shapes correspond to anisomycin injections. (C) One hour or 24 h after training, the percentage of time spent freezing was measured while mice were exposed to the context associated with the shock. Anisomycin injection impaired long-term but not short-term memory. (D) Freezing response to the exposure to a different context. All groups presented very low freezing levels to this context. (E) Freezing response to the presentation of the tone previously associated to the shock. Anisomycin had no effect on the freezing related to the novel environment or to the tone. Sample size: NaCl/1 h: 10 mice; anisomycin/1 h: seven mice; NaCl/24 h: eight mice; anisomycin/24 h: eight mice. (***) $P < 0.001$ for anisomycin vs. NaCl according to a Bonferroni post hoc test.

injection in CA1 on the memory for the context were dependent on the testing time (treatment: $F_{(1,29)} = 13.1$, $P < 0.002$; testing time: $F_{(1,29)} = 8.1$, $P < 0.009$; interaction: $F_{(1,29)} = 8.3$, $P < 0.008$) (Fig. 1C). Bonferroni post hoc tests revealed that anisomycin injection in CA1 impairs long-term memory ($P < 0.001$ for anisomycin vs. NaCl 24 h after conditioning), but not short-term memory ($P > 0.05$ for anisomycin vs. NaCl 1 h after conditioning). There was no effect of anisomycin injection in CA1 on freezing levels measured in a different context (treatment: $F_{(1,29)} = 0.27$, $P = 0.61$; testing time: $F_{(1,29)} = 0.79$, $P = 0.38$; interaction: $F_{(1,29)} < 0.001$, $P = 0.98$) (Fig. 1D) or when the tone was presented (treatment: $F_{(1,29)} = 0.61$, $P = 0.44$; testing time: $F_{(1,29)} = 0.39$, $P = 0.54$; interaction: $F_{(1,29)} = 0.98$, $P = 0.33$) (Fig. 1E), confirming a specific effect on contextual memory.

After examination of coronal sections, 39 mice were considered correctly injected bilaterally in CA3 (Fig. 2A,B). The effect of anisomycin injection in CA3 on the memory for the context was clear and significant, but this memory deficit was similar when tested 1 h or 24 h after conditioning (treatment: $F_{(1,35)} = 89.3$, $P < 0.0001$; testing time: $F_{(1,35)} = 0.0003$, $P = 0.99$; interaction: $F_{(1,35)} = 5.42$, $P = 0.026$) (Fig. 2C). Bonferroni post hoc tests show that the injection of anisomycin in CA3 induced

a prominent deficit in both short-term and long-term memory ($P < 0.001$ for anisomycin vs. NaCl 1 h and 24 h after conditioning) (Fig. 2C). There was no effect of the injection of anisomycin in CA3 on freezing levels measured in a different context (treatment: $F_{(1,35)} = 1.35$, $P = 0.25$; testing time: $F_{(1,35)} = 1.08$, $P = 0.31$; interaction: $F_{(1,35)} = 0.15$, $P = 0.70$) (Fig. 2D) or when the tone was presented (treatment: $F_{(1,35)} = 0.65$, $P = 0.42$; testing time: $F_{(1,35)} = 12.33$, $P = 0.001$; interaction: $F_{(1,35)} = 0.35$, $P = 0.56$) (Fig. 2E), confirming a specific effect on contextual memory.

In order to confirm that anisomycin injection in CA3 was able to impair short-term memory, we tested the animals at the earliest possible time point. We ran a similar experiment in which mice were injected with anisomycin in CA3 immediately after contextual fear conditioning and tested for contextual fear 30 min after the training session. After examination of coronal sections, 15 mice were included in this experiment. Animals treated with anisomycin exhibited less freezing to the context than animals treated with NaCl (t -test, $P < 0.002$) (Fig. 2C). No difference was observed concerning freezing levels for a different context (t -test, $P = 0.21$) (Fig. 2D) or for the associated tone (t -test, $P = 0.15$) (Fig. 2E) when tested 2 h later. Altogether, these data show

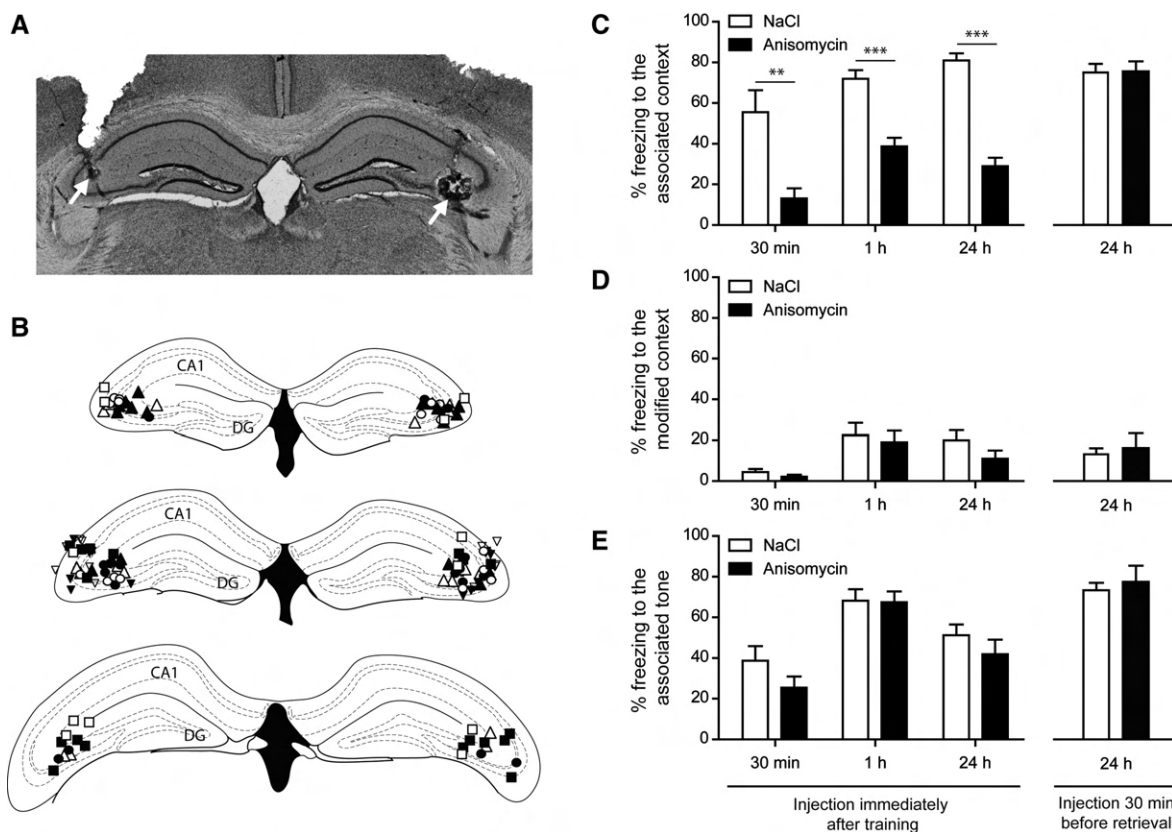


Figure 2. Anisomycin injection in the CA3 region of the hippocampus impairs both long-term and short-term contextual memory but not retrieval. (A) Representative picture showing the location of injection sites (white arrows) in CA3. (B) Injection sites in CA3 for mice tested 30 min (squares), 1 h (circles), or 24 h (upward triangles) for injection after training, downward triangles for injections 30 min before retrieval test) after training. Open shapes correspond to saline injections while full shapes correspond to anisomycin injections. (C) Thirty minutes, 1 h, or 24 h after training, the percentage of time spent freezing was measured while mice were exposed to the context associated with the shock. The local injection of anisomycin in CA3 immediately after the training impaired both long-term and short-term memory but had no effect when the injection was done 30 min before the retrieval session at 24 h. (D) Freezing response to the exposure to a different context. All groups presented very low freezing levels to this context. (E) Freezing response to the presentation of the tone previously associated to the shock. Anisomycin had no effect on the freezing related to the novel environment or to the tone. Sample size: NaCl/30 min: six mice; anisomycin/30 min: nine mice; NaCl/1 h: 10 mice; anisomycin/1 h: nine mice; NaCl/24 h: 10 mice; anisomycin/24 h: 10 mice; NaCl/retrieval: seven mice; anisomycin/retrieval: seven mice. (**) $P < 0.002$ and (***) $P < 0.001$ for anisomycin vs. NaCl according to a Bonferroni post hoc test.

that anisomycin injection in CA3 impairs both short-term and long-term memories.

In order to determine if the freezing impairments observed at 30 and 60 min are due to a failure to form short-term memory or to disruption of retrieval, a separate group of mice was injected with anisomycin in CA3 30 min before retrieval at 24 h. After examination of coronal sections, 14 mice were included in this experiment (NaCl, $n = 7$; anisomycin, $n = 7$). In these conditions anisomycin did not alter the freezing ($P = 0.93$ for the context, $P = 0.71$ for the different context, $P = 0.64$ for the tone). Thus, the injection of anisomycin in CA3 does not alter the retrieval of fear conditioning.

Here we show that anisomycin local injections in CA1 or CA3 do not affect contextual fear conditioning the same way. Injections in CA1 impaired long-term memory but had no effect on short-term memory. Conversely, the administration in CA3 impaired both short- and long-term memories. To our knowledge, this is the first study reporting an effect of protein synthesis inhibition in the hippocampus on short-term memory. This observation supports the idea that the early phase of synaptic plasticity occurring at mossy fiber terminals during contextual fear conditioning requires protein synthesis.

Control mice exhibited a prominent freezing behavior when placed in the context previously paired with the shock but not when placed in another context. Thus the freezing levels in the paired context specifically reflect memory of the context. Independent of the experimental conditions, the injection of anisomycin did not modify the freezing elicited by the tone previously paired with the shock. Similar results have been reported with different treatments interfering with the hippocampal function. This indicates that the hippocampus is involved in contextual memory while the freezing induced by the tone relies exclusively on an amygdala-dependent conditioning (Selden et al. 1991; Kim and Fanselow 1992; Phillips and LeDoux 1992; Daumas et al. 2004, 2005, 2009; Ceccom et al. 2013). This control experiment confirms that the local injections of anisomycin specifically blocked contextual memory while sparing other memory or cognitive systems.

Anisomycin injection in CA1 impaired long-term memory but not short-term memory. This result is consistent with previous studies using anisomycin local injections in the hippocampus that actually mainly targeted the CA1 area (Igaz et al. 2002; Motanis and Maroun 2012). The usual interpretation for these results is that short-term memory is due to protein synthesis-independent early LTP while protein synthesis-dependent late LTP supports long-term memory (Kandel 2001). Conversely, we demonstrated that anisomycin injected in the CA3 area impairs both short-term and long-term memory. Pyramidal cells of the CA3 area receive three main inputs: recurrent collaterals interconnecting CA3 neurons, temporo-ammonic fibers arising from the entorhinal cortex, and mossy fibers coming from the dentate gyrus. Among these pathways, the mossy fibers are of particular interest when considering these results. On the one hand, the input of mossy fibers on CA3 plays a crucial role in contextual fear conditioning and is thought to participate in rapidly creating a conjunctive representation of a context (Otto et al. 2001; Daumas et al. 2004, 2009). On the other hand, protein synthesis inhibition blocks early LTP at mossy fibers while inhibiting only the late phase of the LTP occurring at the recurrent collaterals (Barea-Rodriguez et al. 2000; Calixto et al. 2003; Hagen and Manahan-Vaughan 2013). Thus, the most straightforward explanation for the effect of anisomycin on short-term memory is a blockade of the first stages of LTP at mossy fibers.

It is usually thought that new proteins necessary for LTP or memory are synthesized in the cell body of the neuron and then shipped to the synapse. Such a process seems too slow to account

for a role of protein synthesis in short-term memory. However, activity dependent translation of preexisting mRNA can occur locally in the dendrites (Job and Eberwine 2001; Steward and Schuman 2001) within 5 min to 30 min (Ouyang et al. 1999; Tsokas et al. 2005). This quick time course is consistent with the observed short-term memory impairment and might explain why systemic injections of anisomycin after the training, which might not be quick enough to block the translation of preexisting mRNA, do not impair short-term memory (Bourtchouladze et al. 1998). Noticeably, the spines of the mossy fiber-CA3 hippocampal synapses contain a particularly large number of polyribosomes, allowing local synthesis of proteins necessary to the maintenance of LTP (Chicurel et al. 1993) and early maintenance of LTP at mossy fibers has been shown to rely in part on local protein synthesis as well as transcription-dependent mechanism in the soma of presynaptic neurons (Calixto et al. 2003).

Although most of the conclusions that were based on the use of protein synthesis inhibitors have been subsequently confirmed by molecular and genetic approaches (Hernandez and Abel 2008), serious concerns have been raised about the side effects of anisomycin. Notably, anisomycin is able to dysregulate monoamine release (Canal et al. 2007) or to inhibit the neuronal activity itself (Namgung et al. 1995; Sharma et al. 2012). Conversely, other studies showed that anisomycin was able to specifically block synaptic plasticity without interfering with neuronal activity (Frey and Morris 1998; Barea-Rodriguez et al. 2000; Karpova et al. 2006; Hagen and Manahan-Vaughan 2013). The discrepancies between these studies can be explained by the different doses used. Sharma et al. (2012) observed a strong inhibition of neuronal activity and synaptic transmission when using 50 μg of anisomycin per hemisphere (or higher doses), while Barea-Rodriguez et al. (2000) observed a complete suppression of synaptic plasticity at mossy fibers without any effect on synaptic transmission per se by injecting a lower dose (12 $\mu\text{g}/\text{side}$). In order to clarify this issue, Shires et al. (2012) recently tested the effect of different doses of anisomycin on synaptic transmission and plasticity. They showed that low doses (12 or 25 $\mu\text{g}/\text{side}$) did not suppress neuronal activity but prevented long-term potentiation while higher doses (62–500 $\mu\text{g}/\text{side}$) clearly reduced the neuronal activity. It thus seems clear that when used at the appropriate dose, anisomycin is able to specifically block protein synthesis. Considering these data, we cannot rule out a possible nonspecific effect of anisomycin. However, we used a low dose of anisomycin (25 $\mu\text{g}/\text{side}$) and observed a differential effect depending on the injection area (CA1 or CA3). A previous electrophysiological experiment using similar doses showed a similar differential effect on synaptic plasticity (early LTP was affected only in CA3, late LTP both in CA1 and CA3) without any impairment of the neuronal activity per se (Barea-Rodriguez et al. 2000; Shires et al. 2012; Hagen and Manahan-Vaughan 2013). Thus, it seems reasonable to consider that protein synthesis inhibition is responsible for the observed behavioral effects of anisomycin injections.

Given the behavioral results presented in this study and given available data concerning synaptic plasticity in the hippocampus (Barea-Rodriguez et al. 2000; Otto et al. 2001; Calixto et al. 2003), we propose that protein synthesis in CA3 is required for the rapid elaboration of a unified representation of the context which involves LTP at mossy fibers. If this unified representation of the context is not built in CA3, it cannot be passed on to CA1 and memory is impaired from its very first stages.

In conclusion, this study shows that the rapid elaboration of a unified representation of a context requires protein synthesis specifically in area CA3 of the hippocampus. To our knowledge, it seems likely that the required protein synthesis occurs at the mossy fiber synapse on CA3 pyramidal cells and participates in the first molecular events underlying LTP at this peculiar synapse.

However, we cannot completely exclude a possible nonspecific effect of anisomycin and additional work, identifying the proteins synthesized at the mossy fibers synapse following both LTP induction and contextual fear conditioning, is needed to strengthen this hypothesis.

Acknowledgments

We thank Clayton Dickson for helpful feedback on the discussion.

References

- Artinian J, McGauran AMT, De Jaeger X, Mouledous L, Frances B, Roulet P. 2008. Protein degradation, as with protein synthesis, is required during not only long-term spatial memory consolidation but also reconsolidation. *Eur J Neurosci* **27**: 3009–3019.
- Barea-Rodriguez EJ, Rivera DT, Jaffe DB, Martinez JL. 2000. Protein synthesis inhibition blocks the induction of mossy fiber long-term potentiation in vivo. *J Neurosci* **20**: 8528–8532.
- Barrientos RM, O'Reilly RC, Rudy JW. 2002. Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. *Behav Brain Res* **134**: 299–306.
- Bliss TV, Collingridge GL, Laroche S. 2006. Neuroscience. ZAP and ZIP, a story to forget. *Science* **313**: 1058–1059.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. 1998. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* **5**: 365–374.
- Calixto E, Thiels E, Klann E, Barriouveau G. 2003. Early maintenance of hippocampal mossy fiber-long-term potentiation depends on protein and RNA synthesis and presynaptic granule cell integrity. *J Neurosci* **23**: 4842–4849.
- Canal CE, Chang Q, Gold PE. 2007. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 12500–12505.
- Ceccom J, Bouhsira E, Halley H, Daumas S, Lassalle JM. 2013. Differential needs of zinc in the CA3 area of dorsal hippocampus for the consolidation of contextual fear and spatial memories. *Learn Mem* **20**: 348–351.
- Chicurel ME, Terrian DM, Potter H. 1993. mRNA at the synapse: analysis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampal dendritic spines. *J Neurosci* **13**: 4054–4063.
- Daumas S, Halley H, Lassalle JM. 2004. Disruption of hippocampal CA3 network: effects on episodic-like memory processing in C57BL/6J mice. *Eur J Neurosci* **20**: 597–600.
- Daumas S, Halley H, Frances B, Lassalle JM. 2005. Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* **12**: 375–382.
- Daumas S, Ceccom J, Halley H, Frances B, Lassalle JM. 2009. Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 supports the involvement of the hippocampal mossy fiber pathway on contextual fear memory consolidation. *Learn Mem* **16**: 504–507.
- Davis HP, Squire LR. 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* **96**: 518–559.
- Frey U, Morris RG. 1998. Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology* **37**: 545–552.
- Frey U, Huang YY, Kandel ER. 1993. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* **260**: 1661–1664.
- Hagena H, Manahan-Vaughan D. 2013. Differentiation in the protein synthesis-dependency of persistent synaptic plasticity in mossy fiber and associational/commissural CA3 synapses in vivo. *Front Integr Neurosci* **7**: 10.
- Hernandez PJ, Abel T. 2008. The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 293–311.
- Huang YY, Li XC, Kandel ER. 1994. cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell* **79**: 69–79.
- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* **22**: 6781–6789.
- Job C, Eberwine J. 2001. Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat Rev Neurosci* **2**: 889–898.
- Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science* **294**: 1030–1038.
- Karpova A, Mikhaylova M, Thomas U, Knopfel T, Behnisch T. 2006. Involvement of protein synthesis and degradation in long-term potentiation of Schaffer collateral CA1 synapses. *J Neurosci* **26**: 4949–4955.
- Kim JJ, Fanselow MS. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* **256**: 675–677.
- Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**: 5–21.
- McHugh TJ, Tonegawa S. 2009. CA3 NMDA receptors are required for the rapid formation of a salient contextual representation. *Hippocampus* **19**: 1153–1158.
- Motanis H, Maroun M. 2012. Differential involvement of protein synthesis and actin rearrangement in the reacquisition of contextual fear conditioning. *Hippocampus* **22**: 494–500.
- Namkung U, Valcourt E, Routtenberg A. 1995. Long-term potentiation in vivo in the intact mouse hippocampus. *Brain Res* **689**: 85–92.
- Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, et al. 2001. Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci* **21**: 5520–5527.
- Ouyang Y, Rosenstein A, Kreiman G, Schuman EM, Kennedy MB. 1999. Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II via dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* **19**: 7823–7833.
- Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **106**: 274–285.
- Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ. 2000. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* **3**: 238–244.
- Rolls ET, Treves A. 1996. The hippocampus and memory. In *Neural networks and brain function*, pp. 95–135. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Selden NR, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW. 1991. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience* **42**: 335–350.
- Sharma AV, Nargang FE, Dickson CT. 2012. Neurosilence: profound suppression of neural activity following intracerebral administration of the protein synthesis inhibitor anisomycin. *J Neurosci* **32**: 2377–2387.
- Shires KL, Da Silva BM, Hawthorne JP, Morris RG, Martin SJ. 2012. Synaptic tagging and capture in the living rat. *Nat Commun* **3**: 1246.
- Steward O, Schuman EM. 2001. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* **24**: 299–325.
- Tsokas P, Grace EA, Chan P, Ma T, Sealfon SC, Iyengar R, Landau EM, Blitzer RD. 2005. Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation. *J Neurosci* **25**: 5833–5843.

Received November 25, 2013; accepted in revised form April 8, 2014.

Parylene-based flexible neural probes with PEDOT coated surface for brain stimulation and recording

V. Castagnola^{a,b,*}, E. Descamps^{a,b}, A. Lecestre^{a,b}, L. Dahan^c, J. Remaud^c, L. G. Nowak^d, C. Bergaud^{a,b}

^a*CNRS, LAAS, 7 avenue du colonel Roche, F-31400, Toulouse, France*

^b*Univ of Toulouse, LAAS, F-31400 Toulouse, France*

^c*Centre de Recherche sur la Cognition Animale (CRCA), Univ of Toulouse, France*

^d*Centre de Recherche Cerveau et Cognition (CerCo), CNRS, Toulouse, France*

Abstract

Implantable neural prosthetics devices offer a promising opportunity for the restoration of lost functions in patients affected by brain or spinal cord injury, by providing the brain with a non-muscular channel able to link machines to the nervous system. Nevertheless current neural microelectrodes suffer from high initial impedance and low charge-transfer capacity because of their small-feature geometry[1, 2]. In this work we have developed PEDOT-modified neural probes based on flexible substrate capable to answer to the three critical requirements for neuroprosthetic device: efficiency, lifetime and biocompatibility. We propose a simple procedure for the fabrication of neural electrodes fully made of Parylene-C, followed by an electropolymerization of the active area with the conductive polymer PEDOT that is shown to greatly enhance the electrical performances of the device. In addition, the biocompatibility and the very high SNR exhibited during signal recording, make our device suitable for long-term implantation.

Keywords: Parylene, neural probes, PEDOT, flexible

*Corresponding author

Email addresses: vcastagn@laas.fr (V. Castagnola), edescamp@laas.fr (E. Descamps), alecestr@laas.fr (A. Lecestre), lionel.dahan@univ-tlse3.fr (L. Dahan), jessica.remaud@univ-tlse3.fr (J. Remaud), lionel.nowak@cerco.ups-tlse.fr (L. G. Nowak), bergaud@laas.fr (C. Bergaud)

1. Introduction

Many different disorders can disrupt the communication of the brain with the external environment. Neuroprosthetics may offer the possibility to restore sensory or motor functions by providing the brain with an external communication and control channel, as in the Brain Computer Interface (BCI). Moreover neural probes are employed for the treatment of numerous diseases such as Parkinsons disease, dystonia and chronic pain[3, 4]. The implantation of neural interfaces for long periods of time has rapidly becoming an invaluable clinical and diagnostic tool[5]. Although neural electrodes have been successfully used and demonstrated clinical relevance (deep brain stimulation, cochlear implants) some issues remain to be addressed. In particular, the efficiency, the biocompatibility and the stability of the implanted electrodes are far from being optimized; in many cases, penetrating recording electrodes fail within weeks or months[6] because the recording capability usually deteriorates over time. This lack of long-term reliability must be improved to make these technologies viable for widespread use[7]. The degradation of signal quality in chronically implanted microelectrodes is attributed to both biotic factors, such as the hypothesis that the glial scar, constituted primarily by astrocytes and microglia, encapsulates the electrodes[8], functionally insulating the recording surfaces, and to abiotic factors, such as insulation delamination, corrosion and strain due to micromotions[9, 10]. Another reason for electrode failure can be breakage of electrode leads caused by mechanical stress. Moreover, a common hypothesis is that micromotions or rather microforces between the implanted probe and the tissue cause small injuries that constantly maintain an inflammatory process[7]. Histological studies[10, 11] report that the strain induced immune response, caused by the rigid tethering of the electrode to the skull, lead to an increase in microglial activity in the implanted tissue as compared to untethered electrodes[12]. Quantitative studies have shown that electrode with low Young's modulus material or redefined geometry for high compliance can provide front-end strain relief and polymers such as polyimide and parylene-C,

with their good biocompatibility, have been the choice of researchers for electrode substrate materials[13, 14, 15, 16, 17, 18]. Furthermore it is well known that the miniaturization of the electrode size is a critical requirement for single neuron recording and for electrical stimulation restricted to small populations of neuronal elements. In fact, a single square millimeter of brain tissue contains approximately one million neurons. To match this number and density, future BMIs must feature smaller and denser electrode arrays in order to precisely monitor and control neural circuit activity. Unfortunately a significant reduction in electrode size greatly increases electrode impedance, limiting the recording sensitivity and the maximum stimulating current deliverable through the electrode-tissue interface. Chronic implantable microelectrodes should exhibit low impedance for recording or safe charge injection for stimulation to ensure a good quality of bidirectional communication with the neural tissue. In order to address these issues, a reduction in electrode size should not be done at the expense of electrode function and the interface, where the physical contact between the brain and the neuroprosthesis occurs, is then the key element of the device.

Conductive polymers, serving as stable electron- and ion-conducting biomaterials, are widely used as interfaces with nerve cells for recording their activities [1, 19, 20]. Among conductive polymers, poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) has been the subject of much interest because of its well-known properties such as high-conductivity, biocompatibility, excellent stability and transparency in its doped state [21]. Yamato et al.[22] reported that PEDOT:PSS was more chemically stable than PPy:PSS (Polypyrrole).

In this work we propose a simple fabrication procedure for neural probes fully made of parylene-C in which, for the first time on a highly flexible multielectrode device, the active electrode area is electrochemically modified with PEDOT, in order to enhance the electrical properties and the stability at the electrode-tissue interface. By combining the capability of parylene-C to conform to living tissue with the modification of the electrode interface, we propose an answer to the

major critical requirements for long-term implantation of a neural probe.

2. Experimental

2.1. Materials

The Parylene C (PXC) dimer was provided by Comelec SA. Both the 3,4-ethylene dioxythiophene (EDOT) and the Poly (sodium 4-styrenesulfonate) (NaPSS, average Mw = 70,000) were provided by Sigma Aldrich and used as received. Deionized water was used to prepare all solutions. Dulbeccos Modified Eagle Media (D-MEM), Horse Serum (Heat Inactivated), Fetal Bovine Serum, AntibioticAntimycotic (containing penicillin-streptomycin), and Trypsin were purchased from Thermo Scientific (HyClone). SH-SY5Y cell line was kindly provided by the Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) of Toulouse. The LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells was purchased from Invitrogen.

2.2. Fabrication of Parylene-based neural probes

The implantable microelectrodes fabrication process is schematized in Fig.1:

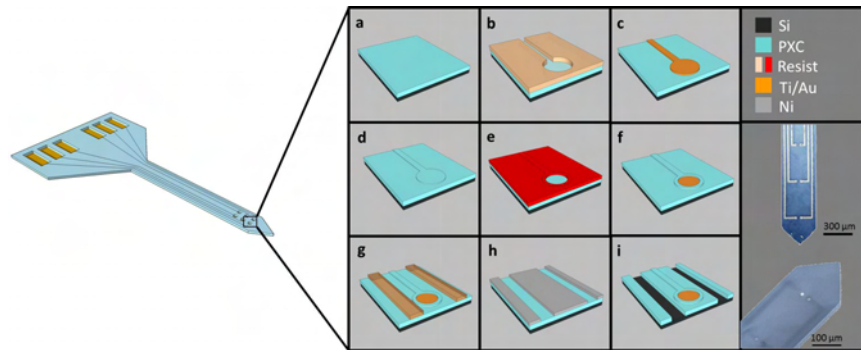


Figure 1: Schematic illustration of the main steps to fabricate the Parylene-based microelectrodes.

A standard 4 p-type silicon wafer of (100) orientation with a thickness of 525 μm was used as a substrate for the whole process. Parylene-C (Fig.1.a) was deposited through thermally activated CVD machine C30S, provided by

Comelec SA at the pyrolysis temperature of 700°C. The thickness of the deposition, measured each time by standard Profilometer (KLA Tencor), is directly related to the mass of precursor dimer loaded in the sublimation chamber. A 23 μm -thick PXC (parylene-C) film was obtained starting from 80 g of precursor. It will constitute the substrate of the final device.

Gold (Au) circular electrodes were patterned on the PXC surface thanks to a metallization followed by a lift-off process. First, a negative photoresist (AZ-nLOF 2035, MicroChemicals) was patterned on the wafer (Fig.1.b), using a Mask Aligner MA150 (Karl Suss), then a 200 nm-thick Au layer was evaporated on the wafer (a 50 nm-thick Ti layer, also obtained by evaporation, was used to improve adhesion between PXC surface and Au). The electron beam physical vapour deposition was performed using the equipment EVA 600 (Alliance Concept) at room temperature ($20\pm 1^\circ\text{C}$) at a working pressure of 2×10^{-7} mbar, leading to a deposition rate of 1 nm/s both for Au and Ti. A lift-off process was performed after the Ti/Au evaporation by dipping the wafer in an acetone bath overnight (Fig.1.c). After the Au electrode patterning, a thin layer of PXC (about 800 nm obtained from 1.6 g of precursor) is deposited on top of the wafer as a passivation layer (Fig.1.d). The electrode surfaces and the contacts were opened by dry etching of the PXC using a photoresist mask (AZ-ECI 3027, MicroChemicals) with a thickness of about 2 μm (Fig.1.e). The plasma etching has been performed using a Plasma equipment RIE-ICP (Trikon Omega 201). The etching parameters have been optimized as follow: $T = 10^\circ\text{C}$, $\text{O}_2 = 20$ sccm; $P_r = 20$ mT; $P_{ICP} = 500$ W; $P_{bias} = 10$ W. The etching rate of PCX with these parameters was found to be 350 nm/min, where the etching rate of AZ-ECI photoresist is about 450 nm/min (Fig.1.f). The wafer surface was previously patterned with AZ-nLOF 2035 photoresist (Fig.1.g), then a layer of 100 nm of Nickel (Ni) was deposited by electron beam physical vapour deposition on top of it, at a working pressure of 2×10^{-7} mbar, leading to a deposition rate of 0.2 nm/s, and a second lift-off procedure was performed in order to use the Ni layer as a hard mask for the second etching process (Fig.1.h). The plasma oxygen etching was performed as described above during a time duration (roughly up

to 70 min) long enough to allow the cutting of the 24 μm -thick layer of PXC. The Ni layer was then chemically etched in a mixture of HCl (20%) and H_2O_2 (10%) in deionized water (Fig.1.i). Finally the PXC on the edge of the Si wafer was scratched with tweezers and the electrode structures were easily peeled-off from the Si surface, keeping their planar shape, without the use of any sacrificial layer.

2.3. Electrochemical polymerization

In a classical three-electrodes cell, 200 nm-thick circular gold electrodes with a diameter ranging from 10 μm to 50 μm were used as working electrodes, a platinum wire was used as the counter electrode and a standard calomel electrode (SCE) as the reference. The solutions were de-aerated by bubbling N_2 for 20 minute prior to all electrochemical experiments, which were successively carried out under N_2 atmosphere. For the electropolymerization of PEDOT, monomer/electrolyte solutions at different concentrations were used as well as different parameters for the cyclic voltammetry (CV), depending on the electrode size. A range of solutions from PEDOT 0.1% / PSS 0.8% to PEDOT 0.25% / PSS 0.2% in deionized water was used as starting monomer solution for the electropolymerization. Different potentials ranging from -0.9 V to 1.1 V were used for the CV at scan rates between 0.05 and 0.01 V/s.

2.4. Characterization

Cyclic Voltammetry (CV) and Electrochemical Impedance spectroscopy (EIS) measurements were carried out using a VMP3 Biologic potentiostat coupled with EClab Software at room temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$). A solution of NaCl 0.9% was used as the electrolyte in the cell. The impedance spectra were recorded at fifty discrete frequencies, by applying 0.05 V RMS sine wave with frequencies varied logarithmically over a frequency range of 1- 10^4 Hz. CV was performed with the same apparatus by voltage sweeping between 0.6 V and -0.6 V vs. SCE, with a scan rate of 0.05 V/s. All the Scanning Electron Microscopy images were performed with a SEM Hitachi S-4800 while all the optical microscope images

were performed with a Hirox Microscope HI-SCOPE Advanced KH-3000. Cell observation after staining was carried out with a fluorescence microscope DMIRB (Leica), using a Lumencor (Optoprim) as light source. The fluorescence images were treated with the software ImageJ.

2.5. Cell Culture

SH-SY5Y human neuroblastoma cell lines were cultured in Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin and passaged using a solution of 0.25% trypsin. Cells were maintained at 37°C in a humid 5% CO₂ atmosphere and were passaged at least three times after defrosting before any test procedure was applied. For the LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity, SH-SY5Y cells were cultivated in Petri dishes and after 24h, 72h and 168h, a solution of 2 μ M calcein AM and 2M EthD-1 in PBS was added. Samples were incubated at 37°C for 30 min light protected, then, after rinsing 2 times with PBS, the samples were observed at the fluorescence microscope. The fixation procedure for SEM observation was performed as follows: 1 ml of glutaraldehyde solution (4% in H₂O) was added for each sample, leaving them in the fridge overnight. The fixation was followed by a dehydration procedure, achieved by a sequential adding of Ethanol at different concentration in H₂O (25%, 50%, 70%, 90%, 100%). The sample was left 15 min in each Ethanol solution then rinsed three times with PBS.

2.6. *In vitro* electrophysiological recordings

The protocol for *in vitro* brain slice preparation was adapted from Nowak and Bullier[23] and is briefly summarized here. Adult (> 2 month old) female mice were deeply anesthetized with isoflurane and killed by decapitation. The scalp, skull and dura mater were taken off and the brain was removed. These operations were made in the presence of ice-cold, modified artificial cerebrospinal fluid (ACSF composition in mM: NaCl 124, NaHCO₃ 26, KCl 3.5, MgSO₄ 1, MgCl₂ 9, NaH₂PO₄ 1.25, and glucose 10). Brain slices (400 μ m thick) were cut

on a vibratome (752M vibroslice, Campden Instrument, UK). Once obtained, the slices were kept at room temperature for at least one hour in a storage chamber filled with an *in vivo*-like artificial cerebrospinal fluid (ACSF, composition in mM: NaCl 124, NaHCO₃ 26, KCl 3.5, MgSO₄ 1, NaH₂PO₄ 1.25, CaCl₂ 1.2, and glucose 10). The ACSF was aerated with a 95% O₂-5% CO₂ mixture (pH 7.4). For recording, one slice was placed on the net of a submersion recording chamber (Scientific System Design, Mississauga, Ontario, Canada). The temperature was maintained at 33-34°C. The ACSF was gravity fed at a flow rate of 2.5-3.5 ml/min. Extracellular recordings of spontaneously active neurons were performed in the hippocampus (CA1, CA3). Signals were amplified and filtered with a Neurolog recording system (gain x10³ or x10⁴), and digitized with a 1401plus interface (CED Systems, Cambridge, UK) with a digitization rate of 20-40 kHz. On-line visualization and Off-line analysis were achieved using Spike2 (CED Systems) software.

2.7. In vivo electrophysiological recordings

Two male C57BL/6J mice (10 to 16 weeks old, obtained from Charles River) were deeply anaesthetized with vetoflurane (2%) and secured to a stereotaxic apparatus placed in a faraday cage. Lidocaine was applied before (subcutaneous) and after skin incision. A craniotomy was performed to allow unilateral access to the hippocampus. The parylene hex-trode (scheme in Fig.1-Supplemental Information) was then lowered in the hippocampus (1.8 mm posterior, 1.3 lateral and 1.1 ventral to the Bregma) and a stainless steel screw was placed through the occipital bone to serve as a reference and ground electrode. Electrophysiological recordings were made using each electrode of the hex-trode. The signal was filtered and amplified (0.3 Hz-3 kHz; P511, Grass Instruments, West Warwick, USA) fed to a 50 Hz noise eliminator (Hum-Bug, Quest Scientific, Vancouver, Canada) before being digitalized at 10 kHz (1401Plus, CED Systems, Cambridge, UK) and visualized and analyzed using Spike2 software (CED Systems).

3. Results and Discussion

3.1. Probe Structure

Nowadays the most common commercially available implantable neural microprobes are silicon-based[24]; however, imperfect contact and poor conformity to the curved surface of target tissues have been reported during the use of penetrating electrode arrays based on rigid substrate[25, 26]. The use of a flexible substrate can reduce the risk of injury during and after implantation, when the electrode is subjected to the brain movements. Moreover it improves the mechanical compliance with the brain tissue and promotes an intimate contact between electrodes and neural cells. To that purpose, parylene C (PXC) represents one of the most promising materials due to its adequate mechanical properties, high biocompatibility (ISO 10993, United States Pharmacopeia (USP) Class VI material) and stability in wet microfabrication processes.

3.2. Electrochemical polymerization of PEDOT on the electrode surface

The use of microelectrodes (in our case with a diameter ranging from 10 μm to 50 μm) minimizes the reactive cell response and provides high density of electrode sites but, as the electrode dimensions decrease, the impedance increases affecting the quality of signal recordings[2]. Signal transduction at the electrode/tissue interface is indeed a complex function of electrode properties and tissue characteristics. Transduction between the ionically conducting tissue and the electronically conducting electrode primarily takes place through capacitive and/or Faradaic currents from reversible reduction-oxidation reactions at the electrode surface.

Since the electrode/tissue interface plays a key role in this context, we modified the gold electrode surface with the conducting polymer Poly (3,4-ethylene) dioxothiophene (PEDOT) that has emerged as an interesting candidate for neuroelectronic interfaces thanks to its excellent conductivity, stability properties and its good compatibility with biological structures[27, 28, 21]. Cui et al.[29] established that electrochemical polymerization can be used to deposit coatings of electrically conducting polymers directly onto metal neural electrode

sites; moreover this technique allows to obtain very homogeneous, stable and resistant depositions. Poly(styrene sulfonate) (PSS), that has been chosen as counterion for PEDOT, plays the role of supporting electrolyte, also providing a better dissolution of EDOT monomer in H₂O[30]. The electropolymerization of PEDOT takes place through the oxidation of the monomer that leads to a radical coupling; when the oligomers chains are long enough, they precipitate onto the electrode, generating the first polymer nuclei. During this step the process is controlled by the diffusion of the monomers; later, different nuclei combine together forming polymer globules. In the nucleation stage, the expansion of the polymer chains and the growth of globules on the electrode surface are the prevailing processes and, when the oxidation potential is applied for a certain period, globules begin to overlap until a full coverage of the surface with polymer globules is reached. Based on several studies[30], the potentiodynamic route of polymerization has been chosen to get high homogeneity and good electrical performances. The polymerization parameters vary with the electrode size. For 10 μm -diameter electrodes a cyclic voltammetry was performed in a classical three-electrodes cell configuration by applying a potential scan from -0.7 V vs to 1 V vs SCN at a scan rate of 0.01 V/s. Deaeration was obtained by purging the solution with nitrogen during 20 min. The oxidation of the monomer starts at 0.75 V and the anodic current reaches a peak value at 0.9 V. In the reverse scan the current decreases with a crossover at about 0.7 V; this "nucleation loop" reveals the nucleation process of the polymer film. The voltammogram also reveals a quasi-reversible signal at a potential close to -0.4 V corresponding to the redox activity of the polymer[31](see Fig.4-Supplemental Information).

3.3. Morphology of the PEDOT deposition

Many parameters, such as temperature, monomer concentration, applied voltage, scan rate, etc., influence the resulting morphology of the PEDOT electrodeposition. For 10 μm -diameter electrodes, the use of lower concentrations of monomer, lower upper vertex potentials and lower scan rates leads to a more homogeneous deposition and better performances in terms of impedance prop-

erties.

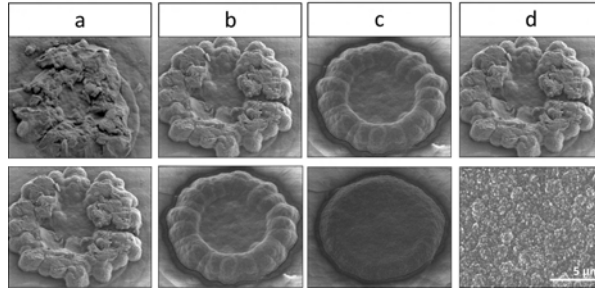


Figure 2: SEM images of different morphologies of PEDOT:PSS layers related to different electrochemical deposition parameters: a) 10 μm diameter electrode not cleaned (above) and cleaned (below) in H_2SO_4 , b) 0.1% of EDOT (above) and 0.025% of EDOT (below), c) upper maximum potential at 1.1 V (above) and 1 V (below) d) 10 μm diameter electrode (above) and 50 μm diameter electrode (below).

3.4. Probe electrical properties

Fig.3 depicts Bode graphs of the impedance magnitude over a frequency range of $1\text{-}10^4$ Hz, for a gold electrode of 10 μm in diameter, before and after polymerization of PEDOT:PSS. The impedances of the electrode at 1 kHz were used for comparison purposes as action potentials have a characteristic frequency band centred at that frequency. The mean impedance at 1 KHz for the unmodified gold electrodes was around 700 k Ω , while after PEDOT electrochemical deposition, the mean impedance fell to ca. 10 k Ω . A CV with a scan of potential between -0.6 V and 0.6 V, at a scan rate of 0.05 V/s, was performed for comparing the charge injection capacity between the uncoated gold electrodes and the PEDOT-modified electrodes. High charge capacity, which is the measurement of charge transfer efficiency, should greatly improve recording of action potentials and stimulation of neuronal elements at a lower charge density at the device-tissue interface.

In a previous work[30] the electrical stability of of this deposition, after thermal accelerated ageing precess, has been shown.

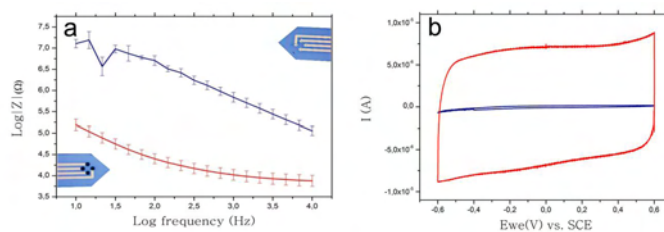


Figure 3: a) Electrochemical mean impedance spectroscopy over a range of $10\text{-}10^4$ Hz and related error bar and b) charge capacity for the pristine gold electrode (blue) and for the PEDOT-modified electrode (red) for a $10\ \mu\text{m}$ diameter electrode in a NaCl 0.9% solution.

3.5. *In vitro* biocompatibility assay

The materials we used (PXC, PEDOT:PSS and gold) have been especially chosen for their properties of biocompatibility with living systems in order to design a device suitable for long-term implantation. PXC, as we mentioned in Section 3.1, has a certified biocompatibility of CLASS VI, and the cytotoxicity of PEDOT:PSS[27, 32] and gold[33, 34] have been investigated in the literature. For example, Asplund et al.[27] indicate a non-cytotoxic of PEDOT:heparin surfaces and show no marked difference in immunological response in cortical tissue compared to pure platinum controls. Through cell viability assay, we set the preliminary objective to establish the non-cytotoxicity of the produced devices, after the clean room process, and further investigations on biocompatibility are scheduled in the near future. Therefore, we first carried out *in vitro* experiments to ensure that any harmful chemical product remains on the wafer after the fabrication process and the electropolymerization.

To this purpose, SH-SY5Y cells were cultured in Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin added. Cells were seeded in a Petri dish containing the PXC microelectrode with half of the active areas PEDOT-modified, as in the scheme in Fig.1-Supplemental Information. A $100\ \mu\text{l}$ drop of culture medium containing 10000 cells was deposited on the electrode surface and, after 4h (the time required for cell adherence), 2 ml of culture medium was added, giving a cell

concentration of 5000 cells/ml (see Fig.5-Supplemental Information). In this way, the cells were concentrated over the region of interest.

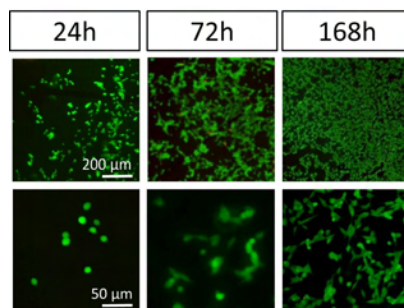


Figure 4: Calcein-AM fluorescent images showing SH-SY5Y cultivated on top of the device for 24h, 48h and 168h.

A viability assay was performed after 24h, 72h and 168h using the LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Assay Kit. The kit provides a two-color fluorescence cell viability assay that is based on the simultaneous determination of live and dead cells with two probes that measure recognized parameters of cell viability: intracellular esterase activity and plasma membrane integrity. The polyanionic dye calcein is well retained within live cells, producing an intense uniform green fluorescence in live cells. Ethidium homodimer-1 (EthD-1) enters cells with damaged membranes and undergoes a 40-fold enhancement of fluorescence upon binding to nucleic acids, thereby producing a bright red fluorescence in dead cells. EthD-1 is excluded by the intact plasma membrane of live cells. Fluorescence photos of SH-SY5Y cells cultured on PEDOT-modified PXC based microelectrodes are shown in Fig.4. Cells appear to have spread homogeneously and to have proliferated quickly, demonstrating a good viability on our substrate.

3.6. Cells morphology assessment

The morphology of the cells on the electrode substrate was assessed through SEM. SH-SY5Y cells were seeded in a Petri dish as described above and cul-

tured for 48h and 168h, then the fixation procedure was performed. Before proceeding to the SEM observation, the samples were sputtered with 10 nm of Au in order to avoid charging effect. Individual cells can be recognized in Fig.6-Supplemental Information. The cells display extensive processes and appear to be well attached on the surface of our electrodes. Importantly, they do not show a particular preference for different materials and, as can be observed, they spread homogeneously both on PXC substrate and on PEDOT-modified electrode surface.

Neural recording and stimulating devices communicate with neurons via electrical signals[35], in particular, extracellular microelectrodes record the voltages produced by ionic current flow around neurons as their cell membranes depolarize as the result of inputs received from other cells. The attachment of cells on our electrode substrate shown in SEM images means that it is possible to get direct, long-term functional contact with the target tissue that is required to the implanted device to operate properly.

4. *In vivo* and *in vitro* signal recording

During an electrophysiological measurement, several noise sources, both biological and non-biological, can affect the recording. In particular, the non biological sources include the thermal noise, the electronic noise due to the amplifier, and the noise associated to the double layer interface[36]. Thermal noise is thought to be the dominant noise source encountered when performing cortical microelectrode recordings, it is directly related to the electrode impedance and as a consequence, it is also related to the surface area of the electrode contact[37]. This contribution to the noise can therefore be easily reduced by the increment in surface/area ratio given by PEDOT nanostructuration. Another effect of the PEDOT modification could be found in the removal of the electric hum at 50 Hz. The noise in signals obtained through commercially available microelectrodes (alphaOmega, FHC from the same batch, with identical characteristics) some of them used as received and the others coated with

PEDOT, was evaluated. Fig.5.a shows unfiltered records obtained the same day and in the same experimental conditions (the same brain slice). Electric hum was considerable when recordings were performed through non-nanostructured electrodes, as shown on the red trace in Fig.5.a. In comparison, the hum was largely reduced with the nanostructured microelectrodes (violet curve in Fig.5.a). This is further quantitatively evidenced when examining the power spectra (Fig.5.b) computed from a few seconds of the same recordings. The prominent peak at 50 Hz observed for the non-modified microelectrode is hardly visible for the PEDOT-modified one. The same recording in presence and absence of the Hum-Bug line noise eliminator is shown in Fig.5.c and 5.d. This comparison allows us to evaluate the noise component related to the double layer interface in the presence of PEDOT[38]. As we can see, also from the ratio of the power with and without PEDOT coating (lower part of the figure), the noise is reduced by PEDOT coating in both cases, especially at low frequencies, and, without the Humbug filter, the 50 Hz hum is reduced by a factor 10 through the PEDOT coating.

An additional validation of the PEDOT coating consisted in determining whether PEDOT coated microelectrodes allowed recording neuronal activity with a signal quality comparable to, or better than that achieved with non-coated electrodes. Figure 7-Supplemental Information shows action potentials recorded in area CA3 of the mouse hippocampus. The excellent signal-to-noise ratio of the PEDOT-modified microelectrode allowed us to obtain well segregated signals from three neighbouring neurons. This establishes that neuronal activity can be recorded with PEDOT coated microelectrodes with a quality at least comparable to that of non-coated microelectrodes. A quantitative comparison of single unit isolation quality with pristine and PEDOT-coated electrode is currently under-way.

The implantation of parylene based electrodes in the brain of anaesthetized mice confirmed the improvement of the recording quality produced by PEDOT

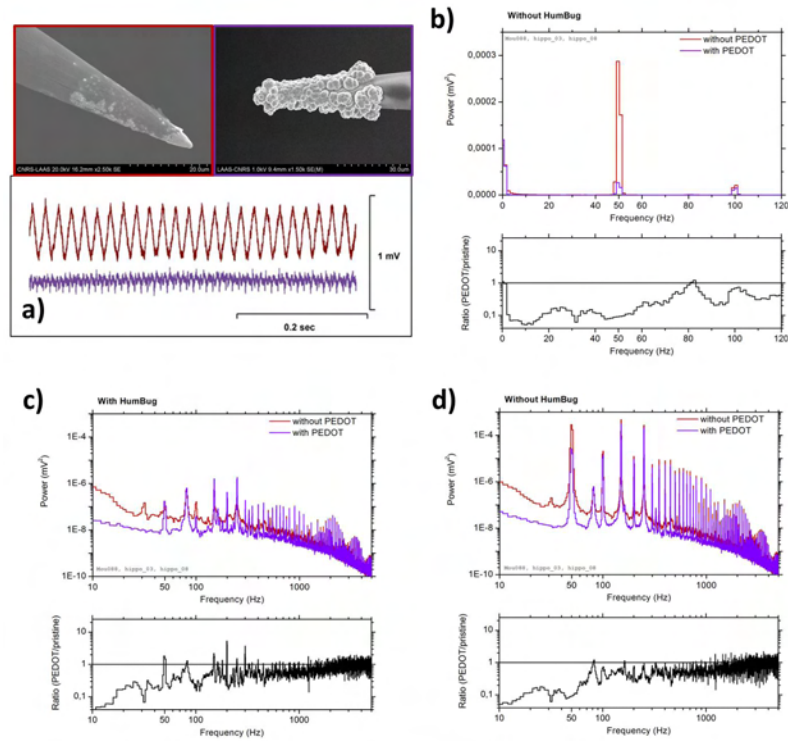


Figure 5: a) Comparison of electric hum recorded in a mouse brain slice maintained *in vitro*, using identical commercial microelectrodes: pristine (red) and nanostructured (violet). The signal was obtained by bypassing the HumBug, the device normally used to remove it. The 50 Hz hum is nearly negligible after nanostructuring. b) The power spectra computed from a few seconds of the same recordings shows a prominent peak at 50 Hz when the recording was obtained with the non-nanostructured electrode. Noise power spectrum between 10 Hz and 5000 Hz c) with and d) without the HumBug, and related ratio of the power without/with PEDOT coating.

nanostructuring. As shown in Fig.6.b, the signal obtained with the pristine gold electrode is mainly composed of 50 Hz electromagnetic noise, with an amplitude comparable to that usually obtained before inserting the electrode in the brain or when the electrode is faulty. This is most likely a consequence of the small diameter of the electrode active area (20 μm), which resulted in a high impedance. On the opposite, lowering the impedance of the very same

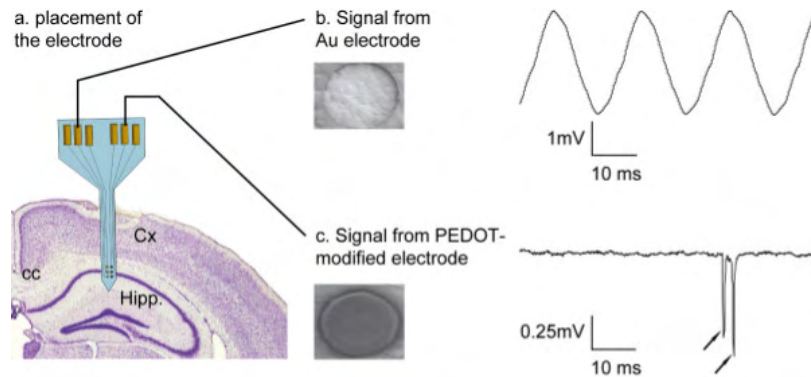


Figure 6: The hex-trode with 3 pristine electrodes and 3 PEDOT-modified electrodes was placed across the pyramidal layer of area CA1. Recordings were made from each electrode of the hex trode. b) Electrophysiological signal obtained with a pristine gold electrode: note the prominent 50 Hz electromagnetic noise which completely occludes any biological signal. c) Electrophysiological signal obtained with a PEDOT-modified electrode: note the two spontaneous extracellular action potentials (arrows) and the complete lack of 50 Hz noise. Cx: Cortex, cc: corpus colosum, Hipp.: hippocampus.

electrodes with PEDOT nanostructuration enabled the recording of very good electrophysiological signals with very high S.N.R. (Fig.6.c).

5. Conclusion

In conclusion, a simple fabrication protocol of implantable microelectrodes fully made of Parylene-C is reported. The cytotoxicity of the device has been also investigated *in vitro* after the fabrication procedure. We demonstrated that the electrochemical modification of the electrode active area with PEDOT greatly decreases the electrical impedance and our preliminary electrophysiological data suggest that PEDOT enhances the S.N.R. during *in vivo* and *in vitro* recording. This should allow a significant improvement of neurophysiological recordings quality. Signal recordings over several months are planned in the near future and will allow us to evaluate the electrical stability of our probes. The high biocompatibility of the proposed materials, the high degree of conformity provided by the soft substrate, the enhanced electrical properties

and the stability of the PEDOT coating are an encouraging starting point for application in the field of medical diagnostic, treatment of several diseases and for the long-term implantation in disable patients. Signal recordings over several months are planned in the near future and will allow us to evaluate the electrical stability of our probes.

Acknowledgments

Part of this work was financially supported by the project NEUROSTIM from the University of Toulouse and the PIR-CNRS project NEURO-IC. This work was partly supported by the French RENATECH network.

References

- [1] M. R. Abidian, J. M. Corey, D. R. Kipke, D. C. Martin, *Small* 6 (2010) 421–429.
- [2] X. T. Cui, D. D. Zhou, *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 15 (2007) 502–508.
- [3] L. R. Hochberg, M. D. Serruya, G. M. Friehs, J. A. Mukand, M. Saleh, A. H. Caplan, A. Branner, D. Chen, R. D. Penn, J. P. Donoghue, *Nature* 442 (2006) 164–171.
- [4] A. B. Schwartz, X. T. Cui, D. J. Weber, D. W. Moran, *Neuron* 52 (2006) 205–220.
- [5] D. R. Kipke, W. Shain, G. Buzsáki, E. Fetz, J. M. Henderson, J. F. Hetke, G. Schalk, *The Journal of Neuroscience* 28 (2008) 11830–11838.
- [6] R. W. Griffith, D. R. Humphrey, *Neuroscience Letters* 406 (2006) 81–86.
- [7] V. S. Polikov, P. a. Tresco, W. M. Reichert, *Journal of Neuroscience Methods* 148 (2005) 1–18.

- [8] N. A. Kotov, J. O. Winter, I. P. Clements, E. Jan, B. P. Timko, S. Campidelli, S. Pathak, A. Mazzatenta, C. M. Lieber, M. Prato, R. V. Bellamkonda, G. a. Silva, N. W. S. Kam, F. Patolsky, L. Ballerini, *Advanced Materials* 21 (2009) 3970–4004.
- [9] B. W. J. Streit, V. Sankar, E. Knott, A. Dyer, J. R. Reynolds, T. Nishida, G. P. Shaw, J. C. Sanchez, *Electrode Failure*, *IEEE Pulse* 3 (2012) 30–33.
- [10] R. Biran, D. C. Martin, P. A. Tresco, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 82 (2007) 169–178.
- [11] Y.-T. Kim, R. W. Hitchcock, M. J. Bridge, P. A. Tresco, *Biomaterials* 25 (2004) 2229–2237.
- [12] A. Gilletti, J. Muthuswamy, *Journal of Neural Engineering* 3 (2006) 189–195.
- [13] V. Sankar, J. C. Sanchez, E. McCumiskey, N. Brown, C. R. Taylor, G. J. Ehlert, H. a. Sodano, T. Nishida, *Frontiers in Neurology* 4 (2013) 1–11.
- [14] J. Seymour, N. Langhals, D. Anderson, D. Kipke, *Biomedical Microdevices* 13 (2011) 441–451.
- [15] D. Ziegler, T. Suzuki, S. Takeuchi, *Microelectromechanical Systems, Journal of* 15 (2006) 1477–1482.
- [16] B. J. Kim, J. T. W. Kuo, S. A. Hara, C. D. Lee, L. Yu, C. A. Gutierrez, T. Q. Hoang, V. Pikov, E. Meng, *Journal of Neural Engineering* 10 (2013) 045002.
- [17] D. C. Rodger, A. J. Fong, W. Li, H. Ameri, A. K. Ahuja, C. Gutierrez, I. Lavrov, H. Zhong, P. R. Menon, E. Meng, J. W. Burdick, R. R. Roy, V. R. Edgerton, J. D. Weiland, M. S. Humayun, Y.-C. Tai, *Sensors and Actuators B: Chemical* 132 (2008) 449 – 460.
- [18] C. Metallo, R. D. White, B. A. Trimmer, *Journal of Neuroscience Methods* 195 (2011) 176 – 184.

- [19] M. Asplund, T. Nyberg, O. Inganäs, *Polym. Chem.* 1 (2010) 1374–1391.
- [20] A. R. Harris, S. J. Morgan, J. Chen, R. M. I. Kapsa, G. G. Wallace, A. G. Paolini, *Journal of Neural Engineering* 10 (2013) 016004.
- [21] U. A. Aregueta-Robles, A. J. Woolley, L. A. Poole-Warren, N. H. Lovell, R. A. Green, *Frontiers in Neuroengineering* 7 (2014) 1–18.
- [22] H. Yamato, M. Ohwa, W. Wernet, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 397 (1995) 163–170.
- [23] L. Nowak, J. Bullier, *Journal of Neuroscience Methods* 67 (1996) 237–248.
- [24] P. J. Rousche, R. A. Normann, *Journal of Neuroscience Methods* 82 (1998) 1–15.
- [25] G. Lind, C. E. Linsmeier, J. Schouenborg, *Scientific Reports* 3 (2013) 1–7.
- [26] V. S. Polikov, M. L. Block, J.-M. Fellous, J.-S. Hong, W. M. Reichert, *Biomaterials* 27 (2006) 5368–5376.
- [27] M. Asplund, E. Thaning, J. Lundberg, A. C. Sandberg-Nordqvist, B. Kostyszyn, O. Inganäs, H. V. Holst, *Biomedical Materials* 4 (2009) 045009.
- [28] Y. Xiao, D. C. Martin, X. Cui, M. Shenai, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 128 (2006) 117–129.
- [29] X. Cui, V. a. Lee, Y. Raphael, J. a. Wiler, J. F. Hetke, D. J. Anderson, D. C. Martin, *Journal of biomedical materials research* 56 (2001) 261–72.
- [30] V. Castagnola, C. Bayon, E. Descamps, C. Bergaud, *Synthetic Metals* 189 (2014) 7–16.
- [31] F. Sekli-Belaidi, P. Temple-Boyer, P. Gros, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 647 (2010) 159–168.
- [32] S. M. Richardson-Burns, J. L. Hendricks, B. Foster, L. K. Povlich, D.-H. Kim, D. C. Martin, *Biomaterials* 28 (2007) 1539 – 1552.

- [33] H. Zitter, H. Plenk, *Journal of Biomedical Materials Research* 21 (1987) 881–896.
- [34] E. R. Edelman, P. Seifert, A. Groothuis, A. Morss, D. Bornstein, C. Rogers, *Circulation* 103 (2001) 429–434.
- [35] S. M. Richardson-Burns, J. L. Hendricks, D. C. Martin, *Journal of Neural Engineering* 4 (2007) L6–L13.
- [36] G. Baranauskas, E. Maggiolini, E. Castagnola, A. Ansaldo, A. Mazzoni, G. N. Angotzi, A. Vato, D. Ricci, S. Panzeri, L. Fadiga, *Journal of Neural Engineering* 8 (6) (2011) 066013.
- [37] S. Lempka, M. Johnson, D. Barnett, M. Moffitt, K. Otto, D. Kipke, C. McIntyre, in: *Engineering in Medicine and Biology Society, 2006. EMBS '06. 28th Annual International Conference of the IEEE, 2006*, pp. 3361–3364.
- [38] T. D. Y. Kozai, N. B. Langhals, P. R. Patel, X. Deng, H. Zhang, K. L. Smith, J. Laham, K. N. A., D. R. Kipke, *Nature Materials* 11 (2012) 1065–1073.

RESEARCH ARTICLE

Early Onset of Hypersynchronous Network Activity and Expression of a Marker of Chronic Seizures in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease

Charlotte Bezzina^{1,2}, Laure Verret^{1,2}, Cécile Juan^{1,2}, Jessica Remaud^{1,2}, Hélène Halley^{1,2}, Claire Rampon^{1,2} , Lionel Dahan^{1,2} *

1 Université de Toulouse; UPS; Centre de Recherches sur la Cognition Animale; 118 route de Narbonne, F-31062, Toulouse, Cedex 09, France, **2** CNRS, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, F-31062, Toulouse, France

 These authors contributed equally to this work.

* lionel.dahan@univ-tlse3.fr



 OPEN ACCESS

Citation: Bezzina C, Verret L, Juan C, Remaud J, Halley H, Rampon C, et al. (2015) Early Onset of Hypersynchronous Network Activity and Expression of a Marker of Chronic Seizures in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. PLoS ONE 10(3): e0119910. doi:10.1371/journal.pone.0119910

Academic Editor: Yann Herault, IGBMC/ICS, FRANCE

Received: August 19, 2014

Accepted: January 17, 2015

Published: March 13, 2015

Copyright: © 2015 Bezzina et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors acknowledge the support of the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-05-MALZ to CR); the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, PEPS to LD), the University of Toulouse. C.Bezzina was supported by the Agence Régionale de Santé and J. Remaud was supported by the French Ministry of Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Cortical and hippocampal hypersynchrony of neuronal networks seems to be an early event in Alzheimer's disease pathogenesis. Many mouse models of the disease also present neuronal network hypersynchrony, as evidenced by higher susceptibility to pharmacologically-induced seizures, electroencephalographic seizures accompanied by spontaneous interictal spikes and expression of markers of chronic seizures such as neuropeptide Y ectopic expression in mossy fibers. This network hypersynchrony is thought to contribute to memory deficits, but whether it precedes the onset of memory deficits or not in mouse models remains unknown. The earliest memory impairments in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease have been observed at 3 months of age. We thus assessed network hypersynchrony in Tg2576 and non-transgenic male mice at 1.5, 3 and 6 months of age. As soon as 1.5 months of age, Tg2576 mice presented higher seizure susceptibility to systemic injection of a GABA_A receptor antagonist. They also displayed spontaneous interictal spikes on EEG recordings. Some Tg2576 mice presented hippocampal ectopic expression of neuropeptide Y which incidence seems to increase with age among the Tg2576 population. Our data reveal that network hypersynchrony appears very early in Tg2576 mice, before any demonstrated memory impairments.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by several cognitive and behavioral troubles attacking particularly memory functions. Most of AD patients develop detectable symptoms after 65 year-old (sporadic cases). However, in familial forms of the disease representing less than 1% of AD cases, severe cognitive and memory deficits develop earlier,

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

due to the presence of mutated forms of the Amyloid Precursor Protein (APP) or Presenilin (PS-1 or PS-2) genes [1,2,3,4]. Transgenic mouse models of AD, that overexpress at least one of these human mutated genes, reproduce the amyloidopathy and some anatomical and behavioral abnormalities found in AD patients [5], and thereby help to provide insights into the mechanisms underlying memory deficits.

Recently, new hypothesis have emerged about the contribution of network hypersynchrony in memory dysfunction in AD. Multiple lines of evidence point out an increased incidence of spontaneous seizures in patients with AD. In sporadic AD, an estimated 10 to 22% of patients exhibit unprovoked seizures [6,7,8]. In familial forms of AD or diseases in which APP gene is duplicated, 30 to 60% of patients develop seizures [9,10,11]. In patients diagnosed for both epilepsy and AD (or amnesic Mild Cognitively Impairment, aMCI), seizure onset preceded or coincided with the diagnosis of the disease in 83% of patients, suggesting an early onset of epilepsy in AD [12]. Using fMRI during a task involving the hippocampus, Bakker and colleagues showed that aMCI subjects displayed hippocampal hyperactivity [13]. Interestingly, in the same study, the antiepileptic drug levetiracetam reduced hippocampal hyperactivity and improved memory performances, suggesting a causal link between network hyperactivity and memory deficits [13].

Similar to human pathology, several mouse models of AD present a combination of features revealing network hypersynchrony and epilepsy. Initially, sporadic spontaneous seizures or behavioral stereotypies were fortuitously observed during behavioral phenotyping of AD transgenic lines [14,15]. Pro-convulsant agents that exacerbate neuronal excitation (kainate) or suppress inhibitory control (GABA_A receptor antagonist pentylenetetrazole, PTZ) trigger more severe seizures in several AD transgenic mice (TgCRND8, hAPPJ20, hAPPJ9) than in their respective non-transgenic (NTg) littermates [16,17,18,19]. Although very infrequent, spontaneous seizures in AD mice have also been objectively evidenced by using electroencephalographic (EEG) recordings [17,20,21,22]. Typically, chronic EEG recordings over very long period of time are required for observing a significant occurrence of seizures. For instance, 25% of APP_{swe}xPS1_{ΔE9} mice present seizures when recorded for 2 weeks [20], and about 10% of hAPPJ20 mice display seizures when recorded for 24 hours [23]. However, the vast majority—if not all—of the recorded hAPPJ20 and APP_{swe}xPS1_{ΔE9} mice show interictal spikes consisting of frequent high-voltage sharp events [17,20].

Aside from electroencephalographic markers of neuronal network hypersynchrony, neuropeptide Y (NPY) expression pattern has been proposed as a marker for chronic seizures. NPY is an inhibitory neuromodulator normally expressed by a subset of hippocampal interneurons, which can be expressed ectopically in mossy fibers after chronic seizures in animal models of epilepsy [24]. Such ectopic expression of NPY has been reported in Tg2576 [25,26,27], hAPPJ20 [17,28], and APP_{swe}xPS1_{ΔE9} mice [20], arguing for the existence of epilepsy in these AD models. Interestingly, chronic administration of the antiepileptic drug levetiracetam suppresses epileptiform activity and improves memory performances in hAPPJ20 mice, but also normalizes the expression of NPY in the mossy fibers [28].

In AD mouse models, neuropathological processes and memory deficits progress with age. So far, the presence of network hypersynchrony has been assessed when mice were old enough to exhibit memory deficits. We thus do not know if this abnormal brain activity occurs before, concomitantly or after the onset of memory dysfunction in AD mouse models. Learning and memory deficits have been extensively described at different ages in Tg2576 mice, which express a human APP (hAPP) gene carrying the double Swedish mutation (HuAPP696swe) [29]. No memory disorder has been reported at 1.5–2 months [30,31,32], while a few studies have evidenced impairments at 3 months [30,33,34,35], and most of authors agree on clear memory deficits after 6 months [32,36,37,38,39]. Interestingly, network hypersynchrony has not been

evaluated before 6 months of age in Tg2576 mice. We thus gauged network hypersynchrony of Tg2576 mice at different ages (1.5, 3 and 6 months old) by assessing their seizure susceptibility to PTZ, and evaluating their spontaneous epileptiform activity through EEG recordings and hippocampal expression pattern of NPY. We show that Tg2576 mice display aberrant network activity as early as 1.5 month-old, that is to say before the onset of memory deficits.

Methods

Ethics statement

All experiments were performed in strict accordance with the policies of the European Union (86/609/EEC), the French National Committee of Ethics (87/848), and the local committee's recommendations (C 31–555–11, Direction départementale de la protection des populations) for the care and use of laboratory animals. Animal facility of the CRCA is fully accredited by the French Direction of Veterinary Services (C 31–555–11, Feb 9, 2011) and animal surgery and experimentation conducted in this study were authorized by the French Direction of Veterinary Services (#31–1155521, 2002). All efforts were made to improve animals' welfare and minimize animals' suffering.

Mouse Line

Experiments were performed on male mice from the transgenic line Tg2576 [15,29] from our in-house colony [25,26,40], at 1.5, 3 and 6 months of age. Tg2576 mice overexpress a double mutant form of human APP695 (Lys670-Asn, Met671-Leu [K670N, M671L]), driven by a hamster prion protein promoter. Tg2576 males were bred with C57B6/SJL F1 females (Charles River, L'Arbresle, France) and the offspring was genotyped for the hAPP transgene using DNA obtained from postweaning tail biopsies. Polymerase chain reaction products were analyzed to confirm the presence of hAPP DNA sequence in offspring. Mice were maintained on a 12 hours light/12 hours dark cycle with free access to food and water.

PTZ injection

Seizure susceptibility was assessed by behavioral scoring of the severity of seizures induced pharmacologically (NTg 1.5 month-old (*mo*): $n = 16$, 3 *mo*: $n = 15$ and 6 *mo*: $n = 16$; Tg2576 1.5 *mo*: $n = 15$, 3 *mo*: $n = 16$ and 6 *mo*: $n = 11$). Mice received a single i.p injection of PTZ at 40 mg/kg (PTZ, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Some mice accidentally received a lower PTZ dose and thus were excluded of the study (Tg2576 3 *mo*: $n = 1$ and 6 *mo*: $n = 1$). After drug administration, each mouse was placed in a new cage and its behavior was videotaped for 20 minutes. Mice were sacrificed immediately after (as described below) in order to minimize suffering. Two mice were excluded because they presented a liver hypertrophy at autopsy that might have resulted in modifications of the drug pharmacokinetics (NTg 6 *mo*: $n = 2$).

Seizure severity scoring

Two investigators blind to the experimental conditions quantified the maximal seizure severity during the 20 minutes recording session, according to a published scale [17]. Seizure severity scores were as follows: 0 = normal exploratory behavior, 1 = immobility, 2 = generalized spasm, tremble, or twitch, 3 = tail extension, 4 = forelimb clonus, 5 = generalized clonic activity, 6 = bouncing or running seizures, 7 = full tonic extension, 8 = death. If seizure severity was not clear-cut, an intermediate score was given. Given the ordinal nature of the seizure severity scale, we performed non-parametric statistical tests. Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's post-hoc tests to assess genotype effect in each group of age.

Implantation of EEG electrodes

Tg2576 mice and non-transgenic littermates free from any pharmacological treatment were used for EEG recordings (NTg 1.5 mo: $n = 12$, 3 mo: $n = 10$ and 6 mo: $n = 8$; Tg2576 1.5 mo: $n = 10$, 3 mo: $n = 13$ and 6 mo: $n = 7$). Mice were anesthetized with isoflurane (2%), an incision was performed on the scalp and a local anesthetic (lidocaine 5%) was applied on it. Body temperature was maintained throughout the surgery using a mouse heating pad (Ugo Basile, Gemonio, Italy). A veterinary ophthalmic gel (Ocrygel, Laboratoire TVM, Lempdes, France) was applied on the eyes to avoid dryness. Then, the skull was drilled and two silver electrodes were placed bilaterally over the parietal cortices, and one screw was positioned through the occipital bone over the cerebellum to serve as reference and ground electrode. One EMG electrode was placed in neck muscles. Electrodes were fixed to the skull with dental cement and plugged into a miniature connector (PlasticsOne, Roanoke, NC, USA). Then, lidocaine was applied on the flesh before suturing the skin. The animals were then allowed to recover for at least 1 week during which their health status was checked every day.

EEG recordings

One to 5 days before the recording session, mice were habituated to the recording chamber which consisted of a Plexiglas chamber (21x20x25cm) with available food and water, placed in a Faraday cage. They were first placed in the recording chamber for 15 minutes without being connected to the EEG recording system through the cable and brought back to their home cage for at least 15 minutes. They were then placed again in the recording chamber and connected with the EEG cable for 2.5 hours under the supervision of an experimenter. On the recording day, mice EEG were monitored during 2.5 hours. For this purpose, they were connected with a six-channel cable (PlasticsOne) and head-staged with a home-made tension follower. This cable was connected to a multichannel commutator (PlasticsOne) that allows mice to freely move. EEG and EMG signals were amplified and band-pass filtered (for EEG: 0.3–100 Hz; for EMG: 3 Hz–20 kHz) using a AM system 3500 amplifier (A-M system, Sequim, WA, USA) and sampled at 1kHz (Power 1401 mk-II, CED, Cambridge, UK). EEG recordings were analyzed using Spike 2 V7.11 software. After EEG recordings, mice were sacrificed as described below.

Detection of epileptiform abnormalities on EEG traces

Each digitized EEG file was screened for epileptiform activity by an investigator blind to experimental conditions. Epileptiform activity is described as the occurrence of interictal spikes, defined as sharp (2 to 50 ms) positive and/or negative deflections with amplitudes exceeding twice the baseline EEG recording [20]. Specifically, all EEG deflections that reached a two-fold baseline threshold were automatically detected using Spike 2 software. Were considered as interictal spikes only the events matching both morphological and temporal criteria (2 to 50 ms). Then, for each mouse, an average of the spike waveform was calculated and the spike duration was measured between the start of the negative deflection and the peak of the positive deflection. Epileptiform activity quantification consisted in counting the number of interictal spikes per minute during the last hour of recordings, when mice have become habituated to the recording setup. We excluded four animals because of movements artifacts on EEG traces (NTg 1.5 mo: $n = 2$, 3 mo: $n = 1$ and 6 mo: $n = 1$). Statistical analysis of the frequency of interictal spikes (spikes/minute) was performed using a two-way ANOVA, followed by a Bonferroni post-hoc test.

Tissue processing and NPY immunohistochemistry

Mice that underwent PTZ or EEG experiments were deeply anesthetized using pentobarbital and transcardially perfused with 0.9% saline solution (NTg 1.5 mo: n = 20, 3 mo: n = 25 and 6 mo: n = 24; Tg2576 1.5 mo: n = 19, 3 mo: n = 29 and 6 mo: n = 18). The brains were post-fixed for 2 days in 4% paraformaldehyde and transferred into 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer containing 0.1% sodium azide before being cut into 30 μ m thick cryostat coronal sections. The sections were then stored at -20°C in a cryoprotectant solution until use. Free-floating brain sections were rinsed in phosphate-buffered saline containing 0.25% Triton X-100 (PBST). Sections were quenched 15 minutes for endogenous peroxidases with 3% H₂O₂ in 10% methanol/phosphate-buffered saline, then they were incubated overnight in primary antibody rabbit anti-NPY (1:5,000; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) in PBST containing 0.1% sodium azide with 5% normal goat serum. The next day, the sections were incubated for 90 minutes in biotinylated goat anti-rabbit antiserum (1:250; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) in PBST, followed by 90 minutes in avidin-biotin-peroxidase complex (1:400; ABC kit, Vector Labs) in PBST. The peroxidase immunolabeling was developed in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.025% 3,3'-diaminobenzidine-4 HCl (DAB; Sigma Aldrich), 0.003% H₂O₂ and 0.06% nickel ammonium sulfate. The reaction was stopped by extensive rinses in PBST containing 0.1% sodium azide. The sections were mounted onto subbed slides, dehydrated through alcohols, and coverslipped.

Qualitative assessment of NPY ectopic expression and statistical analysis

NPY ectopic expression was visually assessed by two independent observers blinded to the mouse genotype. The presence of ectopic expression was revealed by a strong immunoreactivity in the hilus and stratum lucidum regions, where mossy fibers extend their axonal processes. Twenty four out of 135 mice were excluded for the following reasons: 2 had hypertrophied liver (NTg, 6 mo: n = 2), 13 for cryostat cutting problems (Tg2576: 1.5 mo: n = 1, 3 mo: n = 4, 6mo: n = 3; NTg: 3 mo: n = 2, 6mo: n = 3), 7 for sample conservation issues (Tg2576: 1.5 mo: n = 1, 3 mo: n = 2, 6mo: n = 3; NTg: 6mo: n = 1), 2 mice died prior to sacrifice (Tg2576, 3 mo: n = 2). The proportion of animals showing NPY ectopic expression was compared between non-transgenic and transgenic animals, at each age using the Fisher exact test. The proportion of Tg2576 mice showing NPY ectopic expression at different ages was compared using the Chi square test for trend.

All statistical analysis were performed using the Prism 5 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Results

Tg2576 mice show higher susceptibility to pharmacologically-induced seizures from early age on

First, we determined seizure susceptibility of Tg2576 mice and their NTg littermates at ages of 1.5, 3 and 6 months. Injection of the GABA_A receptor antagonist PTZ, at the dose of 40 mg/kg, induced more severe seizures in Tg2576 mice than in NTg littermates at 1.5 and 6 months of age (Fig. 1A, Kruskal-Wallis: p<0.0001, Dunn's post hoc tests: p<0.05 for NTg vs Tg2576 at 1.5 and 6 month-old). At 3 months of age, the difference in seizure severity between NTg and Tg2576 mice did not reach statistical significance as NTg mice showed higher seizure susceptibility than at 1.5 months of age (Dunn's post hoc test: p<0.01; Fig. 1A). Some Tg2576 animals showed lethal seizures, whilst this was never observed among NTg animals (Fig. 1B). In

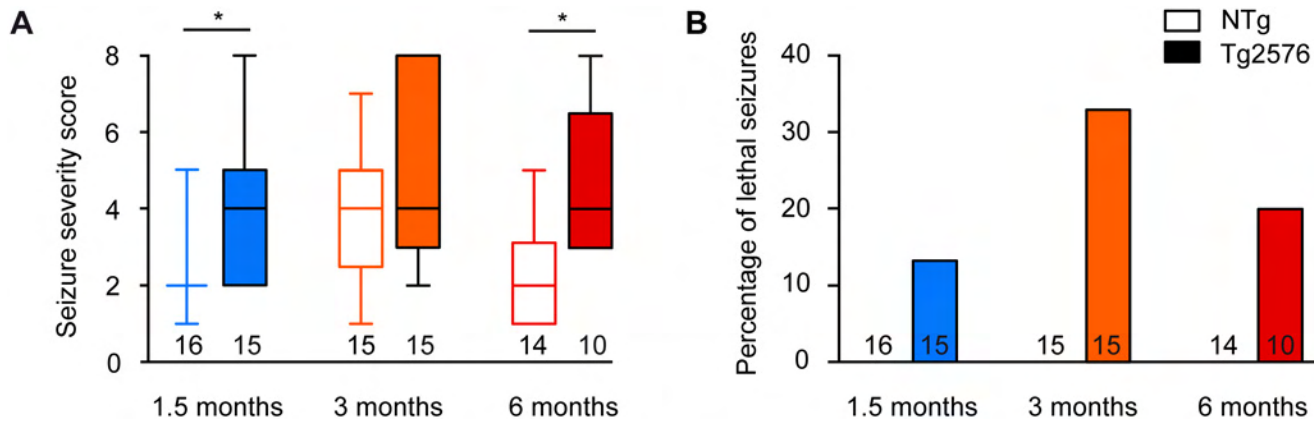


Fig 1. Tg2576 mice show high susceptibility to pharmacologically-induced seizures from early age on. (A) Seizure severity score of 1.5, 3 and 6 month-old Tg2576 male mice and non-transgenic (NTg) age-matched littermates. Whiskers boxes represent the interquartile distribution. Number of mice in each group is indicated below the boxes. Tg2576 mice exhibit more severe seizures than NTg at 1.5 and 6 months of age (Dunn's tests: $p < 0.05$ for Tg2576 vs NTg at 1.5 and 6 month-old). (B) Proportion of animals that died during PTZ-induced seizures in 1.5, 3 and 6 month-old Tg2576 and NTg mice. Note that only transgenic animals exhibit lethal seizures. Numbers over the horizontal axis indicate the number of mice used in each experimental group.

doi:10.1371/journal.pone.0119910.g001

summary, as early as 1.5 months of age, Tg2576 mice exhibit a higher susceptibility to pharmacological seizures than NTg littermates.

Tg2576 mice exhibit spontaneous epileptiform activity as young as 1.5 months of age

Then, we examined to which extent such susceptibility might be associated to spontaneous electroencephalographic (EEG) abnormalities in Tg2576 mice. We recorded cortical EEG in Tg2576 and NTg mice at 1.5, 3 and 6 months of age. During the recording session, we did not observe any electroencephalographic seizures in NTg nor in Tg2576 mice. Since spontaneous seizures are relatively rare events in other mouse models of Alzheimer's disease [20, 23] and given our recording time window, this was highly expected. Nevertheless, interictal spikes were observed in most of Tg2576 mice (63% of mice, regardless of their age). These events lasted 21.2 ± 2.6 ms and displayed the characteristic shape of interictal spikes [20] (Fig. 2A). In NTg mice, only 1 mouse out of 26 displayed spikes at a very low frequency (0.01 spike/minute) (Fig. 2B). Spike frequency was significantly influenced by the genotype but not by the age of the animals (Fig. 2B, two-way ANOVA; transgene effect: $p = 0.013$; age effect: $p = 0.4091$; interaction: $p = 0.3865$). These results clearly show that spontaneous epileptiform activity is already present in Tg2576 mice as early as 1.5 months of age.

Ectopic expression of NPY in the mossy fibers of young Tg2576 mice

To assess the occurrence of chronic seizures in Tg2576 mice, we looked for NPY ectopic expression in mossy fibers of the dentate gyrus by using NPY immunohistochemistry (Fig. 3). While never observed in the mossy fibers of NTg animals, NPY ectopic expression was found in a significant proportion of Tg2576 animals (Table 1, Chi square test for genotypes, regardless of the age: $p = 0.0002$). NPY ectopic expression was observed as young as 1.5 month of age. The proportion of mice showing NPY ectopic expression was significantly higher in Tg2576 than in NTg littermates at 3 and 6 months of age but not at 1.5 months of age (Table 1). Although not statistically significant in this sample, the proportion of Tg2576 mice showing NPY ectopic expression seemed to increase with age (Table 1, Chi square test for trend: $p = 0.16$).

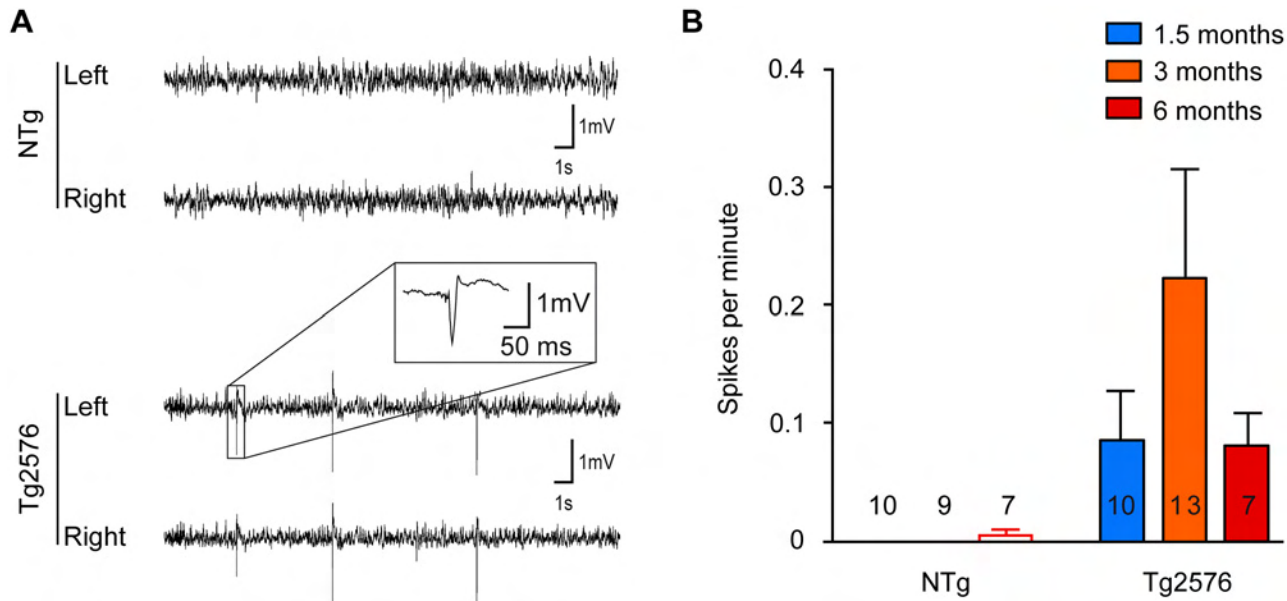


Fig 2. Tg2576 mice exhibit spontaneous epileptiform activity as young as 1.5 months of age. (A) Representative electroencephalographic (EEG) traces from non-transgenic (NTg) (top) and Tg2576 (bottom) mice from left and right parietal cortices. Note that only transgenic animals displayed sharp, high-voltage spikes that characterize epileptiform activity (inset). (B) Quantitative analysis of the frequency of interictal spikes (mean ± SEM). Two-way ANOVA shows a significant genotype effect ($p = 0.013$) but no age effect ($p = 0.4091$) and no interaction ($p = 0.3865$). Numbers over the horizontal axis indicate the number of mice used in each experimental group.

doi:10.1371/journal.pone.0119910.g002

These results suggest that chronic seizures occur at very early stages in the course of the disease, and that their incidence likely increases with age among the Tg2576 population.

Discussion

This study reports that at 1.5, 3 and 6 months of age, Tg2576 mice exhibit high susceptibility to pharmacologically-induced seizures, EEG epileptiform activity and NPY ectopic expression in mossy fibers, this later marker of chronic seizures showing an increased incidence with age. Our work provides the first evidence that such network dysfunction precedes the onset of memory deficits.

A few studies have previously assessed network hypersynchrony in the Tg2576 mouse line. To date, there is no data concerning the sensitivity of Tg2576 mice to convulsive agents, except a study showing an increased sensitivity to PTZ in Tg2576 mice bred on a pure C57bl/6 background, which exhibit an unusually high mortality rate (40% died before they reached 2 months of age) and thus cannot be considered as a typical Tg2576 line [41]. In the original Tg2576 line, EEG abnormalities were reported at 5–7 months of age but were not clearly described. The authors related longer durations of “higher frequency brain activity” (6 to 10 Hz), which they interpret as an increased synchrony, but did not report any obvious spike or seizure [27]. Thus, our data constitute the first clear demonstration of higher sensitivity to convulsive agents and occurrence of spontaneous interictal spikes in this mouse line. Ectopic expression of NPY in the mossy fibers has often been associated with epileptic activity in the hippocampus or with the occurrence of a generalized seizure in the days before sacrifice and can thus be used as a marker for chronic seizures [24,42]. Ectopic expression of NPY in the Tg2576 mice was evidenced at 5–7 months of age [27] and previous data from our group showed that the proportion of mice presenting this marker of chronic seizures increases with age (11% at 3 months, 60% at 18 months) [25]. Our present data confirm this observation and further point out that

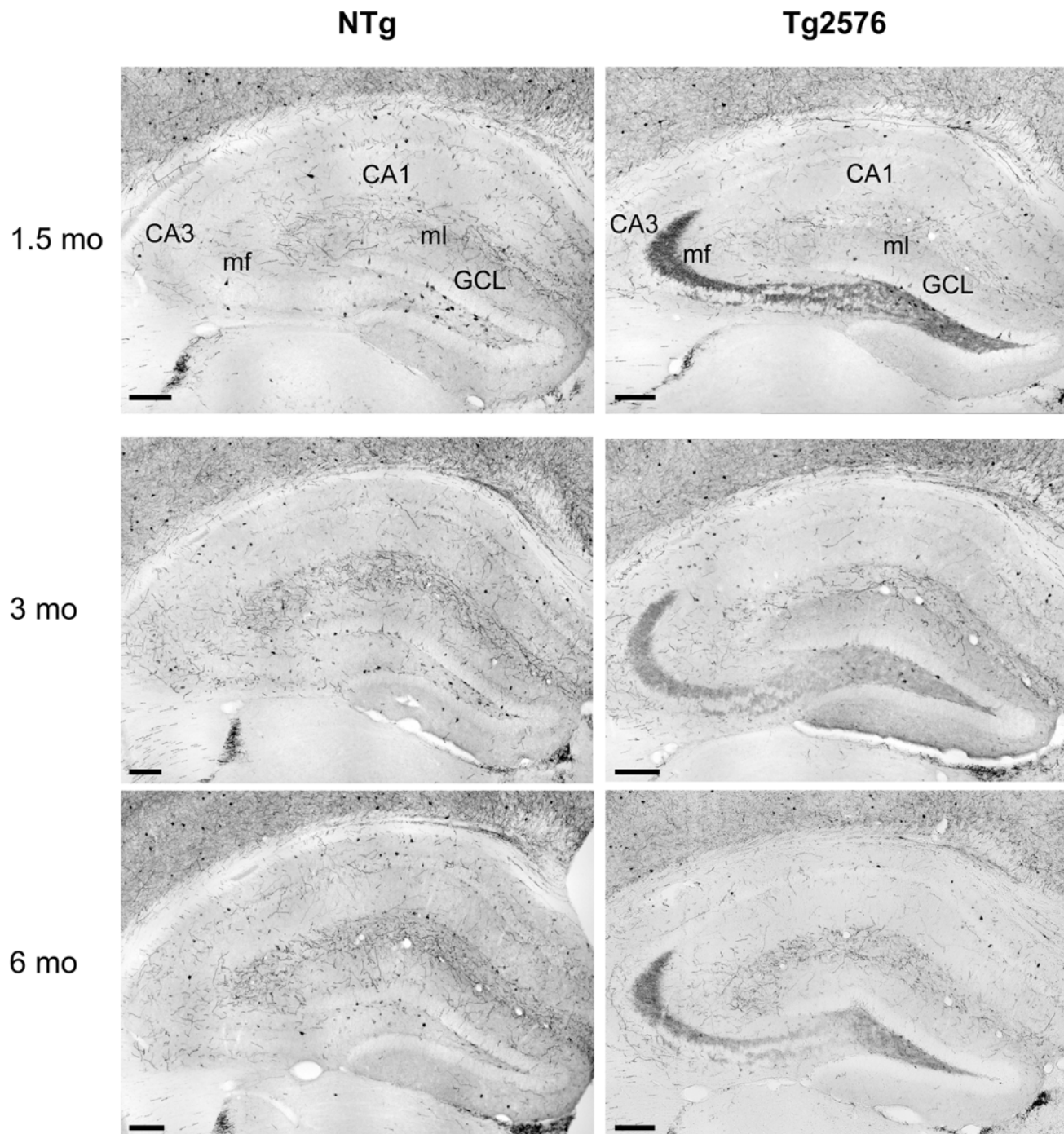


Fig 3. Ectopic expression of NPY in the mossy fibers of young Tg2576 mice. Photographs of the dorsal hippocampus immunostained for NPY in 1.5, 3 and 6 month-old non-transgenic (NTg) and Tg2576 mice. Left: In NTg animals, NPY staining is visible in the soma of hilar interneurons. Their axons display a faint staining visible in the molecular layer (ml), where these axons form synapses onto the dendrites of granular cells. Right: Typical ectopic NPY expression in the mossy fibers (in *hilus* and *stratum lucidum*) of a Tg2576 mouse. CA1 and 3, *Cornu Ammonis* 1 and 3, GCL: Granular Cell Layer, mf: mossy fibers, ml: molecular layer. Scale bar: 200 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0119910.g003

Table 1. Proportion of mice with NPY ectopic expression among Tg2576 mice and NTg littermates.

Age (months)	NTg	Tg2576	Fisher exact test for NTg vs Tg2576
1.5	0/20 (0%)	2/17 (11.7%)	p = 0.204
3	0/23 (0%)	4/21 (19.0%)	p = 0.044
6	0/18 (0%)	4/12 (33.3%)	p = 0.018

Data represent the number of animals with NPY ectopic expression in mossy fibers compared to the total number of animals in each group. Note that only Tg2576 mice present aberrant NPY expression.

doi:10.1371/journal.pone.0119910.t001

this marker can already be observed as soon as 1.5 months of age. Altogether, our data strongly suggest that Tg2576 mice present a precocious epileptic phenotype. Interestingly, previous work showed that Tg2576 exhibit normal memory performances at 1.5–2 months of age [30,31], memory deficits appearing in this mouse line between 3 and 6 months of age [30,31,32]. Thus, network hypersynchrony and expression of markers of chronic seizures occur before the onset of memory deficits in Tg2576 mice.

Network hypersynchrony and hyperexcitability have been described in other mouse models of AD. In the TgCRND8 line, seizure susceptibility to PTZ was evidenced at 6–8 weeks of age [16] when these mice already present memory deficits [43]. In APP_{Swe}xPS1_{ΔE9} mice, electroencephalographic seizures and epileptiform activity were found at 3–4 months of age [20], corresponding to the earliest description of memory deficits in this mouse line [44]. In hAPPJ20 mice, susceptibility to pharmacological seizures, spontaneous seizures, interictal spikes and NPY ectopic expression were described at 4–7 months of age [17,18,23,28], when mice already exhibit memory deficits from 2–3 months of age [45]. Thus, although it has never been assessed, network hypersynchrony might also happen before the onset of memory deficits in these models. Interestingly, this is also supported by data from human cases suggesting that epileptic events can precede the onset of memory impairments in AD and aMCI [12].

Several hypotheses can be proposed to explain the precocity of epileptic activity in Tg2576 mice. The Tg2576 mouse model expresses a mutated form of hAPP inducing an excessive production of Aβ1–42 peptide and its accumulation into amyloid plaques [46]. In the APP_{Swe}xPS1_{G384A} mice model, neurons located in the vicinity of amyloid plaques were reported to be hyperactive [47]. However, Tg2576 mice are completely devoid of amyloid plaques at 1.5 months of age [46], ruling out the possibility that plaques could be responsible for the early onset of network hyperactivity nor hypersynchrony in these mice. Nevertheless, the brains of new born Tg2576 mice, but not of NTg mice, already contain soluble Aβ1–42 [48]. At the cellular level, soluble Aβ1–42 species were suggested to play a role in neuronal hyperexcitability of AD mice. For instance, bath application of soluble Aβ decreases depolarization threshold and thus increases excitability of pyramidal cortical neurons or granule cells of the dentate gyrus [20,21] and intra-hippocampal injection of Aβ oligomers was found to increase population spikes evoked by perforant path stimulation in rats [49]. However, the molecular and cellular mechanisms underlying the effects of Aβ on neuronal hyperexcitability are still unclear. Recently, Lee et al. reported that Aβ disturb mitochondrial function in 1.5 month-old Tg2576 mice, leading to a slower decay of Ca²⁺ transients in granule cells of the dentate gyrus [50]. Further work is needed to determine if this increase in intracellular Ca²⁺ signal in granule cells could participate to network hypersynchrony in 1.5 month-old Tg2576 mice.

Interestingly, the role of Aβ in network hypersynchrony has been recently challenged. The APP_{Swe/Lon}xPS1_{M146V} mouse line, which produces high amounts of Aβ, does not exhibit any epileptiform activity even as late as 23 months of age [22]. Born and colleagues proposed that

mutant APP itself could be involved in network hypersynchrony. Indeed, APP is a transmembrane protein cleaved by secretases as the β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1). In transgenic models of AD that overexpress mutant APP, excessive levels of this full-length APP may hijack a significant portion of BACE1, thus reducing its ability to process other substrates such as sodium channels subunits. Indeed, BACE1 cleaves the Nav β 2 subunit of Nav1.1 channels, which regulates the expression of the functional α -subunits of these channels [51] that control excitability of parvalbumin-expressing interneurons [52]. Reduced levels of Nav1.1 channels were reported in association with impaired function of interneurons leading to network hypersynchrony and memory deficits in hAPPJ20 [23] and 5- to 7-month-old Tg2576 mice [27]. To which extent high levels of mutant APP reduce Nav1.1 levels in parvalbumin-expressing interneurons in young Tg2576 mice remains to be determined.

Recent studies clearly suggest a role of network hypersynchrony in memory deficits. In aMCI subjects, the antiepileptic drug levetiracetam improves memory performances [13]. In hAPPJ20 mice, one month of chronic levetiracetam treatment suppresses epileptiform activity, normalizes hippocampal NPY expression and improves memory performances [28]. The beneficial effect of levetiracetam on memory performances in hAPPJ20 mice may result from the suppression of epileptiform activity or the normalization of NPY expression in the hippocampus or both. In a rat model of epilepsy and epileptic patients, hippocampal interictal spikes occurring during memory retrieval impair memory performances [53,54]. Here we report epileptiform activity in 1.5 month-old Tg2576 mice, an age when these mice present normal memory performances [30,31]. Thus, memory deficits may not result from hypersynchrony and epileptiform activity themselves, but rather from the consequences of their chronicity. Chronic hypersynchrony triggers seizures which incidence increases with age as reported in the APP_{swe}xPS1_{dE9} model of AD (15% of mice had seizures at 3 months vs 50% at 4 months of age) [20]. Consistent with these results, the present study and previous data from our laboratory [25] report an age-related increase in the incidence of NPY ectopic expression which is significant from NTg mice at 3 months and clearly rises around 6 months of age. This parallels the progression of memory deficits, which begin at 3 months, and progressively worsen with age [30,31,32]. Expression of NPY in granule cells decreases glutamatergic synaptic transmission [55,56]. If it prevents a spread of neuronal overexcitation in a context of chronic seizures, it could also impair hippocampal function required for learning and memory processes. Thus, early network hypersynchrony induces seizures which in turn trigger neuroadaptations in the hippocampus, including NPY ectopic expression, which might cause a progressive degradation of hippocampal function explaining the age-dependent decline in memory performances in AD mice [57].

Network hypersynchrony could also cause memory impairment by altering neurogenesis. Adult hippocampal neurogenesis, a process by which new granule cells of the dentate gyrus are generated throughout life, contributes to learning and memory [58,59]. In AD mice, altered neurogenesis seems to be an early event in the course of the disease [25,60]. We recently described an impairment of adult hippocampal neurogenesis at 3 months of age in Tg2576 mice [25]. At this specific age, adult-generated neurons of Tg2576 mice exhibit impaired neuronal maturation and reduced dendritic spine density and dendritic length. Similar observations were made in hAPPJ20 mice [61]. In Tg2576 mice and hAPPJ20, altered neurogenesis has been described at the onset of memory deficits at 3 months of age, but it cannot be excluded that such alterations may begin earlier. In hAPPJ20 mice, Sun and colleagues showed that the excitation/inhibition imbalance contributes to adult neurogenesis impairments [61]. Whether alteration of hippocampal neurogenesis is present before memory deficits and whether it relates to hypersynchrony in Tg2576 mice remains to be established.

Conclusion

Here we evidence network hypersynchrony before the onset of memory deficits in Tg2576 mice and an age-related increase of the incidence of ectopic NPY in the mossy fibers of Tg2576 mice revealing an increasing frequency of seizures with age. This early network dysfunction could initiate progressive modifications of hippocampal network leading *in fine* to overt memory dysfunction. In human, network hypersynchrony would thus potentially represent an early diagnosis marker to predict memory decline. However, extrapolations of these findings to sporadic forms of the disease still remain to be investigated.

Acknowledgments

We thank A. Krezymon and E. DiDonato for their help and technical support. We also thank the ABC facility and ANEXPLO for housing mice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB CR LD. Performed the experiments: CB CJ HH LD. Analyzed the data: CB LV JR CR LD. Wrote the paper: CB LV CR LD.

References

1. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995; 269: 973–977. PMID: [7638622](#)
2. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995; 375: 754–760. PMID: [7596406](#)
3. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1992; 1: 345–347. PMID: [1302033](#)
4. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991; 349: 704–706. PMID: [1671712](#)
5. Higgins GA, Jacobsen H. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav Pharmacol*. 2003; 14: 419–438. PMID: [14501255](#)
6. Mendez MF, Catanzaro P, Doss RC, R AR, Frey WH, 2nd. Seizures in Alzheimer's disease: clinico-pathologic study. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 1994; 7: 230–233. PMID: [7826492](#)
7. Forstl H, Burns A, Levy R, Cairns N, Luthert P, Lantos P. Neurologic signs in Alzheimer's disease. Results of a prospective clinical and neuropathologic study. *Arch Neurol*. 1992; 49: 1038–1042. PMID: [1417511](#)
8. Sjogren T, Sjogren H, Lindgren AG. Morbus Alzheimer and morbus Pick; a genetic, clinical and patho-anatomical study. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl*. 1952; 82: 1–152. PMID: [13171126](#)
9. Mann DM, Pickering-Brown SM, Takeuchi A, Iwatsubo T. Amyloid angiopathy and variability in amyloid beta deposition is determined by mutation position in presenilin-1-linked Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2001; 158: 2165–2175. PMID: [11395394](#)
10. Jayadev S, Leverenz JB, Steinbart E, Stahl J, Klunk W, Yu CE, et al. Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain*. 2010; 133: 1143–1154. doi: [10.1093/brain/awq033](#) PMID: [20375137](#)
11. Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Vercelletto M, De la Fourniere F, Thomas-Anterion C, et al. Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain*. 2006; 129: 2966–2976. PMID: [16959815](#)
12. Vossel KA, Beagle AJ, Rabinovici GD, Shu H, Lee SE, Naasan G, et al. Seizures and epileptiform activity in the early stages of Alzheimer disease. *JAMA Neurol*. 2013; 70: 1158–1166. doi: [10.1001/jamaneurol.2013.136](#) PMID: [23835471](#)
13. Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE, et al. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron*. 2012; 74: 467–474. doi: [10.1016/j.neuron.2012.03.023](#) PMID: [22578498](#)

14. Lalonde R, Dumont M, Staufenbiel M, Strazielle C. Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res.* 2005; 157: 91–98. PMID: [15617775](#)
15. Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron.* 1995; 15: 1203–1218. PMID: [7576662](#)
16. Del Vecchio RA, Gold LH, Novick SJ, Wong G, Hyde LA. Increased seizure threshold and severity in young transgenic CRND8 mice. *Neurosci Lett.* 2004; 367: 164–167. PMID: [15331144](#)
17. Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron.* 2007; 55: 697–711. PMID: [17785178](#)
18. Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science.* 2007; 316: 750–754. PMID: [17478722](#)
19. Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, et al. Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011; 31: 700–711. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4152-10.2011](#) PMID: [21228179](#)
20. Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fulop L, et al. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci.* 2009; 29: 3453–3462. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5215-08.2009](#) PMID: [19295151](#)
21. Zilberter M, Ivanov A, Ziyatdinova S, Mukhtarov M, Malkov A, Alpar A, et al. Dietary energy substrates reverse early neuronal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2013; 125: 157–171. doi: [10.1111/jnc.12127](#) PMID: [23241062](#)
22. Born HA, Kim JY, Savjani RR, Das P, Dabaghian YA, Guo Q, et al. Genetic Suppression of Transgenic APP Rescues Hypersynchronous Network Activity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2014; 34: 3826–3840. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5171-13.2014](#) PMID: [24623762](#)
23. Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, et al. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell.* 2012; 149: 708–721. doi: [10.1016/j.cell.2012.02.046](#) PMID: [22541439](#)
24. Vezzani A, Schwarz C, Lothman EW, Williamson J, Sperk G. Functional changes in somatostatin and neuropeptide Y containing neurons in the rat hippocampus in chronic models of limbic seizures. *Epilepsy Res.* 1996; 26: 267–279. PMID: [8985706](#)
25. Krezymon A, Richetin K, Halley H, Roybon L, Lassalle JM, Frances B, et al. Modifications of hippocampal circuits and early disruption of adult neurogenesis in the tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013; 8: e76497. doi: [10.1371/journal.pone.0076497](#) PMID: [24086745](#)
26. Verret L, Krezymon A, Halley H, Trouche S, Zerwas M, Lazouret M, et al. Transient enriched housing before amyloidosis onset sustains cognitive improvement in Tg2576 mice. *Neurobiol Aging.* 2013; 34: 211–225. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.013](#) PMID: [22727275](#)
27. Corbett BF, Leiser SC, Ling HP, Nagy R, Breyse N, Zhang X, et al. Sodium channel cleavage is associated with aberrant neuronal activity and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2013; 33: 7020–7026. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2325-12.2013](#) PMID: [23595759](#)
28. Sanchez PE, Zhu L, Verret L, Vossel KA, Orr AG, Cirrito JR, et al. Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: E2895–2903. doi: [10.1073/pnas.1121081109](#) PMID: [22869752](#)
29. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996; 274: 99–102. PMID: [8810256](#)
30. D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, et al. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2011; 14: 69–76. doi: [10.1038/nn.2709](#) PMID: [21151119](#)
31. Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, et al. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 5161–5166. PMID: [16549764](#)
32. Stewart S, Cacucci F, Lever C. Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. *J Alzheimers Dis.* 2011; 26: 105–126. doi: [10.3233/JAD-2011-0066](#) PMID: [21971455](#)
33. Duffy AM, Morales-Corraliza J, Bermudes-Hernandez KM, Schaner MJ, Magagna-Poveda A, Mathews PM, et al. Entorhinal cortical defects in Tg2576 mice are present as early as 2–4 months of age. *Neurobiol Aging.* 2015; 36: 134–148. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.001](#) PMID: [25109765](#)

34. King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 1999; 103: 145–162. PMID: [10513583](#)
35. Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med.* 1998; 4: 97–100. PMID: [9427614](#)
36. Perez-Cruz C, Nolte MW, van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, et al. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011; 31: 3926–3934. doi: [10.1523/JNEUROSCI.6142-10.2011](#) PMID: [21389247](#)
37. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, et al. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002; 22: 1858–1867. PMID: [11880515](#)
38. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature.* 2006; 440: 352–357. PMID: [16541076](#)
39. Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T, Nabeshima T. Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *FASEB J.* 2007; 21: 2135–2148. PMID: [17341681](#)
40. Lassalle JM, Halley H, Dumas S, Verret L, Frances B. Effects of the genetic background on cognitive performances of TG2576 mice. *Behav Brain Res.* 2008; 191: 104–110. doi: [10.1016/j.bbr.2008.03.017](#) PMID: [18433892](#)
41. Westmark CJ, Westmark PR, Beard AM, Hildebrandt SM, Malter JS. Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein. *Int J Clin Exp Pathol.* 2008; 1: 157–168. PMID: [18784809](#)
42. Sperk G, Marksteiner J, Gruber B, Bellmann R, Mahata M, Ortler M. Functional changes in neuropeptide Y- and somatostatin-containing neurons induced by limbic seizures in the rat. *Neuroscience.* 1992; 50: 831–846. PMID: [1360155](#)
43. Francis BM, Kim J, Barakat ME, Fraenkl S, Yucel YH, Peng S, et al. Object recognition memory and BDNF expression are reduced in young TgCRND8 mice. *Neurobiol Aging.* 2012; 33: 555–563. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.003](#) PMID: [20447730](#)
44. Vegh MJ, Heldring CM, Kamphuis W, Hijazi S, Timmerman AJ, Li K, et al. Reducing hippocampal extracellular matrix reverses early memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014; 2: 76. doi: [10.1186/s40478-014-0076-z](#) PMID: [24974208](#)
45. Harris JA, Devidze N, Halabisky B, Lo I, Thwin MT, Yu GQ, et al. Many neuronal and behavioral impairments in transgenic mouse models of Alzheimer's disease are independent of caspase cleavage of the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 2010; 30: 372–381. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5341-09.2010](#) PMID: [20053918](#)
46. Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001; 21: 372–381. PMID: [11160418](#)
47. Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold KH, Haass C, et al. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science.* 2008; 321: 1686–1689. doi: [10.1126/science.1162844](#) PMID: [18802001](#)
48. Trushina E, Nemutlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2012; 7: e32737. doi: [10.1371/journal.pone.0032737](#) PMID: [22393443](#)
49. Orban G, Volgyi K, Juhasz G, Penke B, Kekesi KA, Kardos J, et al. Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats. *Brain Res.* 2010; 1354: 227–235. doi: [10.1016/j.brainres.2010.07.061](#) PMID: [20659435](#)
50. Lee SH, Kim KR, Ryu SY, Son S, Hong HS, Mook-Jung I, et al. Impaired short-term plasticity in mossy fiber synapses caused by mitochondrial dysfunction of dentate granule cells is the earliest synaptic deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2012; 32: 5953–5963. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0465-12.2012](#) PMID: [22539855](#)
51. Kim DY, Carey BW, Wang H, Ingano LA, Binshtok AM, Wertz MH, et al. BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 755–764. PMID: [17576410](#)
52. Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J Neurosci.* 2007; 27: 5903–5914. PMID: [17537961](#)

53. Kleen JK, Scott RC, Holmes GL, Lenck-Santini PP. Hippocampal interictal spikes disrupt cognition in rats. *Ann Neurol*. 2010; 67: 250–257. doi: [10.1002/ana.21896](https://doi.org/10.1002/ana.21896) PMID: [20225290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20225290/)
54. Kleen JK, Scott RC, Holmes GL, Roberts DW, Rundle MM, Testorf M, et al. Hippocampal interictal epileptiform activity disrupts cognition in humans. *Neurology*. 2013; 81: 18–24. doi: [10.1212/WNL.0b013e318297ee50](https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318297ee50) PMID: [23685931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23685931/)
55. Klapstein GJ, Colmers WF. On the sites of presynaptic inhibition by neuropeptide Y in rat hippocampus in vitro. *Hippocampus*. 1993; 3: 103–111. PMID: [8395947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8395947/)
56. Colmers WF, Bleakman D. Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends Neurosci*. 1994; 17: 373–379. PMID: [7529442](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7529442/)
57. Palop JJ, Mucke L. Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2009; 66: 435–440. doi: [10.1001/archneurol.2009.15](https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.15) PMID: [19204149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19204149/)
58. Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, Roulet P, et al. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience*. 2010; 171: 769–778. doi: [10.1016/j.neuroscience.2010.09.047](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.047) PMID: [20883747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20883747/)
59. Trouche S, Bontempi B, Roulet P, Rampon C. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 5919–5924. doi: [10.1073/pnas.0811054106](https://doi.org/10.1073/pnas.0811054106) PMID: [19321751](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19321751/)
60. Demars M, Hu YS, Gadadhar A, Lazarov O. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2010; 88: 2103–2117. doi: [10.1002/jnr.22387](https://doi.org/10.1002/jnr.22387) PMID: [20209626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20209626/)
61. Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, et al. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 624–633. doi: [10.1016/j.stem.2009.10.003](https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.10.003) PMID: [19951690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951690/)

TITLE: Contextual learning-induced hippocampal synaptic plasticity.

ABSTRACT

Long term potentiation (LTP) is a process by which the strength of the connection between neurons is increased when they are synchronously and repeatedly activated. This process has been well studied in mammals, especially in a brain region involved in contextual memory: the hippocampus. Literature tends to show a direct link between memory and LTP, but their mechanisms are not clear and there is only a few studies evidencing that LTP actually occurs during learning.

In this work, we evidenced that the hippocampus could quickly form a representation of the context to which mice were exposed, this had never been reported before.

Then, using electrophysiological tools, we were able to record for the first time LTP in the hippocampus after a learning task with mice. We showed that not all the connections are potentiated during memory formation; LTP is spread in the hippocampus. This repartition of LTP seems to differ between learning tasks.

We showed that the hippocampus is needed to rapidly encode a new context, and we validated a method to reliably record learning-induced LTP in mice.

AUTEUR : Jessica REMAUD

TITRE : Étude de la plasticité synaptique hippocampique induite par un apprentissage contextuel.

DIRECTEURS DE THESE : Bernard FRANCÉS, Lionel DAHAN

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse le 23 Octobre 2014

RÉSUMÉ

La potentialisation à long terme (PLT) est l'augmentation de la force de connexion entre des neurones lorsqu'ils sont activés de manière synchrone et répétée. Ce processus a été très étudié chez les mammifères, particulièrement dans une région cérébrale impliquée dans la mémorisation contextuelle : l'hippocampe. La littérature montre un lien entre mémoire et PLT, mais leurs mécanismes sont discutés et seules quelques études ont montré qu'il y a réellement de la PLT pendant un apprentissage.

Dans ce travail, nous avons d'abord montré chez la souris que l'hippocampe peut rapidement former une représentation contextuelle de l'environnement.

Ensuite, à l'aide d'outils électrophysiologiques, nous avons pu enregistrer pour la première fois de la PLT induite par l'apprentissage chez la souris. Nous avons montré que toutes les connexions ne sont pas potentialisées ; la PLT est répartie dans l'hippocampe. Cette répartition semble être différente selon l'apprentissage utilisé.

Nous avons donc montré que l'hippocampe est nécessaire pour encoder rapidement un nouveau contexte et avons validé une méthode fiable d'enregistrement de la PLT induite par l'apprentissage chez la souris.

MOTS-CLES : Potentialisation à long terme, Conditionnement de peur au contexte, Hippocampe, Plasticité, Apprentissage, Mémoire.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Neurosciences

LABORATOIRE : Centre de Recherches sur la Cognition Animale (UMR5169, CNRS-Université Paul Sabatier) – Bâtiment 4R3 (3^{ème} étage), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse