HAL
open science

Rôle du sommeil paradoxal dans des formes de mémoire dépendantes de l'hippocampe : une étude chez la souris de la neuromodulation par l'Hormone de Mélano-Concentration et des réseaux corticaux

Léa Le Barillier

To cite this version:

Léa Le Barillier. Rôle du sommeil paradoxal dans des formes de mémoire dépendantes de l'hippocampe : une étude chez la souris de la neuromodulation par l'Hormone de Mélano- Concentration et des réseaux corticaux. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10010 . tel-01276409

HAL Id: tel-01276409

https://theses.hal.science/tel-01276409

Submitted on 19 Feb 2016

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

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

N° d'ordre : 10 - 2015 Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE NEUROSCIENCES ET COGNITION

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 26 janvier 2015

Par

Léa LE BARILLIER

Rôle du sommeil paradoxal dans des formes de mémoire dépendantes de l'hippocampe:

Une étude chez la souris de la neuromodulation par l'Hormone de Mélano-Concentration et des réseaux corticaux.

Membres du Jury

Dr. Fabien PERRIN, président

Dr. Alice GUYON, rapporteur

Dr. Guillaume FERREIRA, rapporteur

Dr. Paul-Antoine SALIN, directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Résumé

Il est maintenant établi que le sommeil paradoxal (SP) facilite certaines formes de mémoires dépendantes de l'hippocampe bien que les mécanismes impliqués restent mal compris. Des résultats de l'équipe et d'autres laboratoires suggèrent toutefois que cet effet facilitateur serait en partie sous-tendu par une modulation de la plasticité synaptique de longue durée dans l'hippocampe. Nos travaux se proposent donc d'étudier ces mécanismes chez la souris, à l'échelle synaptique et systémique. Pour cela nous nous avons privilégié trois approches : 1) La caractérisation comportementale et électrophysiologique du rôle des neurones à Hormone de Mélano-Concentration (MCH), une hormone hypothalamique libérée principalement pendant le SP, qui pourrait être un acteur associé au SP, impliqué dans la formation ou la consolidation de nouveaux apprentissage ; 2) L'étude de la neuromodulation de la transmission synaptique hippocampique induite par la MCH ; 3) Une étude du rôle du SP dans le remodelage des réseaux corticaux de la mémoire prenant place pendant les processus de consolidation à court et long terme d'un conditionnement contextuel à la peur.

Nous avons étudié la transmission et la plasticité synaptique hippocampique chez des souris MCH/ataxine3 chez lesquels les neurones à MCH sont spécifiquement détruits à l'âge adulte. L'induction de la plasticité de longue durée au niveau des synapses entre les aires CA3 et CA1de l'hippocampe a révélé une altération de la phase précoce de la potentialisation (LTP) comme de la dépression à long terme (LTD) due à la perturbation de plusieurs formes de plasticité à court terme. Ces déficits de plasticité sont associés à un retard d'apprentissage dans une tâche de mémoire de référence dans le labyrinthe aquatique de Morris et une altération des performances dans une tâche de mémoire de travail (labyrinthe en T). Les neurones à MCH pourraient donc favoriser la mémoire spatiale à court terme en facilitant la plasticité à court terme dans l'hippocampe suggérant un nouveau rôle du SP dans la préparation des apprentissages du lendemain. Nous avons ensuite cherché à évaluer comment la MCH module les réponses synaptiques hippocampiques. L'application de MCH conduit à une dépression de la transmission synaptique excitatrice entre CA3 et CA1 dépendante de l'activation des récepteurs A1 de l'adénosine. Une série d'expériences pharmacologiques nous a permis de mettre en évidence l'implication des astrocytes dans cet effet inhibiteur. Grâce à une collaboration avec Bernard Lakaye, de l'Université de Liège, nous avons montré que la MCH active des récepteurs de la MCH situés sur la membrane astrocytaire entraînant une augmentation de la libération d'ATP, ensuite rapidement hydrolysé en adénosine, ainsi qu'une diminution de la recapture du glutamate. La modulation par la MCH de ces deux fonctions majeures des astrocytes montre ainsi pour la première fois que la MCH joue un rôle dans la gliotransmission.

Pour évaluer de manière plus directe le rôle du SP post-apprentissage dans la consolidation, nous avons privé des souris sauvages de SP pendant 6h après un conditionnement contextuel à la peur. Celles-ci présentent alors une diminution des performances lors d'un rappel à 30 jours mais pas à 24h. Pour déterminer les réseaux du cortex cérébral impliqués, nous avons étudié l'expression du marqueur indirect d'activité neuronale cFos après le rappel à 24h et à 30 jours. Nous avons montré que la privation de SP post-apprentissage perturbe la réorganisation du réseau entre l'hippocampe et le cortex préfrontal médian qui s'opère progressivement pendant la consolidation à long terme.

L'ensemble de nos résultats indique que le SP, grâce notamment à des effecteurs moléculaires comme la MCH, peut moduler la plasticité synaptique hippocampique et ainsi intervenir aussi bien dans la formation que la consolidation à long terme des souvenirs.

Mots-clefs : plasticité synaptique hippocampique, mémoire dépendante de l'hippocampe, MCH, sommeil paradoxal, consolidation synaptique, astrocytes, gliotransmission, souris

Abstract

It is now established that paradoxical sleep (PS) facilitates some hippocampal-dependent memory forms although mechanisms implied are still not well understood. However, results from our lab and others suggest that part of this facilitating effect is underlined by hippocampal long term synaptic plasticity modulation. Our work investigates these mechanisms in mice, at a synaptic and systemic scale. We opted for three different approaches: 1) A behavioural and electrophysiological characterization of the role of Melanin-Concentrating Hormone (MCH) neurons. Indeed, as this hypothalamic hormone is mainly liberated during PS, it could be a PS associated effector implied in formation or consolidation of new memories ; 2) A study of neuromodulating effects on hippocampal synaptic transmission induced by MCH ; 3) A study of PS role in memory cortical networks remodeling happening during short and long-term consolidation of a contextual fear conditioning task.

We studied hippocampal synaptic transmission and plasticity in MCH/ataxin3 mice with specific deletion of MCH neurons at adult age. Long-term plasticity induction on synapses between CA3 and CA1 hippocampal areas revealed that early phase of both long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) is impaired due to a disruption of several forms of short-term plasticty. These deficits are associated with retardation in acquiring a reference memory task in the Morris water maze and altered performances in a working memory task (T-maze). Thus, MCH may promote spatial short-term memory by facilitating short-term plasticity in hippocampus suggesting a new PS role in preparing the day after's learning. We then sought to assess how MCH may modulate hippocampal synaptic responses. MCH application leads to a depression of excitatory synaptic transmission between CA3 and CA1, dependent on A1 adenosine receptors activation. A set of pharmacological experiments revealed that astrocytes are part of this inhibitory effect. Through collaboration with Bernard Lakaye, from Liege University, we showed that MCH activates MCH receptors located on astrocytes membrane, resulting in an enhancement of ATP release, which is then quickly hydrolyzed in adenosine, and a reduction of glutamate uptake. MCH induced modulation of these two major astrocytes functions demonstrates for the first time a role of MCH in gliotransmission.

To directly assess post-learning PS role in consolidation, we PS-deprived wild type mice during 6h after a contextual fear conditioning. Their performances are decreased when tested 30 days but not at 24 hours after acquisition. We then studied expression of indirect activity marker cFos after recall at 24h and 30 days to identify cerebral cortical networks implied in this deficit. We showed that post-learning PS deprivation disrupts the network reorganization between hippocampus and medial prefrontal cortex which gradually occur during long-term consolidation.

Altogether, our results point out that PS modulates hippocampal synaptic plasticity, notably through molecular effectors such as MCH, and thus takes part in both encoding and long-term consolidation of memories process.

Key words: hippocampal synaptic plasticity, hippocampal-dependent memory, MCH, paradoxical sleep, synaptic consolidation, astrocytes, gliotransmission, mice

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement tous les membres du jury d'avoir bien voulu consacrer une partie de leur temps à l'évaluation de ma thèse.
Merci à Fabien Perrin d'avoir accepté de présider ce jury.
Encore merci à mes deux rapporteurs Guillaume Ferreira et Alice Guyon qui ont accepté de corriger ma thèse pendant leurs vacances de Noël! Merci pour votre disponibilité, votre enthousiasme et vos remarques pertinentes et constructives sur mon manuscrit.
Merci à Gaël, qui a officié pendant toute cette thèse comme mon co-directeur officieux! Merci pour m'avoir formé au comportement, pour ta disponibilité formidable à tout moment, pour nos discussions scientifiques passionnantes et passionnées, pour ta bonne humeur quasi inébranlable, pour ton soutien moral indéfectible (et je t'ai donné du fil à retordre, je le sais bien). Merci enfin pour toutes tes corrections sur les articles et le manuscrit, pour ton esprit de synthèse qui a bien aidé ce manuscrit et pour le temps que tu as donné même à quelques jours du réveillon!
Merci enfin à Paul, mon directeur de thèse pendant toutes ces années de thèse. Merci pour votre passion pour la recherche dont chaque discussion se fait l'écho. C'est cette passion, qui a animé notre premier échange alors que j'avais esquivé les vaches pour quitter ma Normandie et passer un entretien pour un stage de M1 dans votre laboratoire et qui a scellé ces quatre ans de travail à vos côtés. Merci pour vos connaissances immenses que vous êtes toujours prêt à partager ; jamais aucun outil de veille bibliographique ne sera aussi performant que vous !
Merci pour votre disponibilité et pour vos corrections pertinentes et réfléchies lors de l'écriture de ce manuscrit et des articles. Merci enfin pour votre humour pince sans rire et vos jeux de mots tordus qui m'aident à me sentir moins seule (avouez qu'il s'agit d'un critère majeur de recrutement de vos thésards) et merci pour supporter, flegmatique, tous les articles de journaux, dessins et autres panneaux à vocation humoristique que je n'ai cessé de coller sur les portes du domaine de l'électrophysiologie!

Merci à tous les membres du laboratoire qui m'ont aidé et qui ont participé à l'élaboration de ce travail!
Merci à Pierre-Hervé Luppi pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. A Val, la fourmi silencieuse qui fait tourner tout le labo malgré les mises à jour intempestives des logiciels de gestion et les demandes pressantes et parfois contradictoires de nous tous! Merci de ta gentillesse et de ta prévenance toujours au rendez-vous! Aux inséparables Paul-Antoine et Seb pour votre aide précieuse et votre énorme disponibilité! A Lucienne pour ta gentillesse et ton amour du cidre normand!
Enfin merci à tous les thésards, compagnons d'(in?)fortune dans cette grande aventure qu'est la thèse! Merci tout d'abord aux deux sensei : Olivier et Leslie! Vous nous avez donné la map du labo, des congrès et de l'Ecole doctorale! Avec des indications allant de "Comment ne pas s'arracher les cheveux sur Illustrator" à "Quels buffets squatter à Laennec"! Merci de votre humour! Olivier, par contre, il est temps de partir, tes cheveux sont déjà pratiquement blancs! ^^ Merci à Sara, pour ta tornade de bonne humeur espagnole (enfin le plus souvent! ^^), pour ton rire si communicatif et pour avoir fait de l'opération Repas presque Parfait, un vrai challenge! =) A Francesca pour ton amour acharné du chocolat et du papier bulle! A Julien pour son paing qu'il ramène demaing (et ses rillettes vachement bonnes)! A Mahdy pour tous ses Commmmmmeeeeeennnnt?????? intempestifs. A Mickel, pour m'avoir prouvé qu'écrire sa thèse en avance était possible. A Christophe pour toutes les découvertes de série TV bien chouette et l'aide dans les moments de galère en électrophy. A Nico, une sorte de karité kid à l'humour jamais en berne, pour les soirées cinoch et la fête de la bière! C'est Jean-François de Nantes! A Alexis, le maestro du labo, qui joue aussi bien du piano et qu'il rate ses paris sur la

Coupe du Monde de Football. A Marius, le second de la Team musique, sorte de François Perrusse de la composition musicale, mon ex-CME émancipé! Contente je suis de ne pas t'avoir fait fuir de ce labo pendant ce temps où je fus ton pécore référent! Merci pour tout ton travail et tes idées sur le projet MCH quand tu étais en M1 et sur le projet privation que nous partageons désormais! Merci de m'avoir épargné des heures de Mercator! ;)

Un grand merci à ma famille, à vous tous qui avaient fait de moi ce que je suis aujourd'hui et sans qui je ne serais sans doute pas là. Merci de votre amour, de vos conseils et encouragements, je ne pourrais jamais assez vous remercier... Pendant ces longs mois de rédaction, merci à ma mère pour m'avoir sans cesse soutenue, le combiné du téléphone scotché à l'oreille, et à ma grand-mère pour m'avoir envoyé des colis de bons petits plats à réchauffer pour tenir le coup pendant cette période d'autarcie. Merci. Merci à mon papi, qui m'a donné l'envie d'explorer et de toujours repousser les limites et dont la présence m'accompagne toujours dans mon esprit. Même si tu n'es plus là pour me le dire, je sais que tu aurais été fier en cet instant et que quelque part ton ombre sera assise dans les rangs le jour de la soutenance. Cette thèse, elle est pour toi et aussi un peu de toi.

Merci enfin à tous mes amis! Ca y est, ce manuscrit, relié d'un très beau bleu ecchymose, est fini. Il clôt une période de ma vie dans laquelle vous avez tous compté! Merci à vous tous pour ces belles années que vous m'avez offertes!
Mais ces deux derniers mois d'intense maïeutique auraient débouché sur un mort-né sans l'aide des quelques un d'entre vous qui ont eu l'immense privilège de me côtoyer pendant ma transformation en grizzli grincheux! Un enoooOOOrrrrme calinou à la force d'attraction d'un trou noir à mon soutien logistique, moral et alimentation Anouck et à ma Buchete préférée pour les dégrippages répétés, le prêt d'instruments de sage-femme, les menaces à coup de fermes pédagogiques et pour avoir amené Noël à moi. Merci à Maeva pour le soutien moral à coup de Mario et de coups de pieds dans le cul métaphoriques! Merci à ma louloute Chloé pour m'avoir écouté patiemment me répéter comme un vieux CD rayé lors de mes entraînements pour l'oral et aussi pour ses conseils avisés! Merci à Marine, Saïd, Sünny, Léo, Marianne, Mathieu et Clem pour les godets salvateurs, sous forme de binouze, thé ou tisanes à m'écouter déblatérer sans fin sur ma thèse! Merci à Ouazna d'être venue, enceinte jusqu'aux dents, m'encourager et me soutenir tout de même! Merci enfin à Chapi pour avoir partagé en non-montagnounettes mes derniers moments d'air pur avant l'autarcie complète et à Sakina pour nos longues discussions bienvenues qui ont peuplé les premiers instants d'écriture! Je n'oublierai pas ce beau boulet au curry! =)

Sommaire

Sommaire **1**

Introduction générale **5**

Rappel Bibliographique **7**

1. Les réseaux neurobiologiques de la mémoire 7

1.1. Les différentes catégories de mémoires et leur dépendance à l'hippocampe 8

1.2. Anatomie du circuit hippocampique du rongeur 10

1.3. Rôle de l'hippocampe dans la mémoire spatiale chez le rongeur 11

1.4. La mémoire émotionnelle 14

1.4.1. Le conditionnement à la peur 14

1.4.2. Le circuit hippocampo-amygdalien 15

1.5. La composante temporelle de la mémoire 17

1.6. La consolidation mnésique 21

1.6.1. Consolidation synaptique et consolidation systémique 22

1.6.2. La théorie standard de la consolidation 23

1.6.3. La théorie des traces multiples 24

2. Rôle du sommeil sur la mémoire 24

2.1. Le cycle veille-sommeil 25

2.1.1. Sommeil lent et sommeil paradoxal 25

2.1.2. Neuromodulation des états de vigilance 27

2.2. Rôle du sommeil dans les processus de mémorisation 28

2.2.1. Mise en évidence d'un lien entre sommeil et mémoire 28

2.2.2. Modèles intégrés de la contribution du sommeil dans la mémoire 30

2.2.3. Sommeil paradoxal et mémoire émotionnelle 37

3. Un modèle cellulaire de la mémoire : plasticité synaptique dans l'hippocampe 40

3.1. La plasticité synaptique comme substrat cellulaire de la mémoire 41

3.2. Plasticité à long terme dans les réseaux excitateurs de l'hippocampe 42

3.2.1. La potentialisation à long terme de la transmission synaptique (LTP) 43

3.2.2. La phase précoce de la LTP 45

3.2.3. La phase tardive de la LTP 47

3.2.4. La dépression à long terme (LTD) 49

3.3. Plasticité synaptique à court terme 52

3.3.1. Mécanismes de potentialisation à court terme de la transmission excitatrice 53

3.3.2. Mécanismes de dépression à court terme de la transmission excitatrice 55

3.3.3. Fonctions possibles 55

3.4. Neuromodulation de la plasticité synaptique hippocampique et consolidation mnésique pendant le SP 56

3.4.1. La plasticité à long terme est modulée par le SP 56

3.4.2. Acétylcholine, plasticité synaptique, sommeil et mémoire 57

3.4.3. Adénosine, plasticité synaptique, sommeil et mémoire 58

4. L'Hormone de Mélano-Concentration (MCH) : lien moléculaire entre sommeil et mémoire ? 59

4.1. Présentation du système à MCH 59

4.1.1. Le neuropeptide MCH 59

4.1.2. Les neurones à MCH 60

4.2. Rôles physiologiques de la MCH 62

4.2.1. La MCH régule l'homéostasie énergétique 63

4.2.2. La MCH est un facteur hypnogène 64

4.2.3. MCH et mémoire 66

Objectifs 69

Objectif 1 : Déterminer le rôle des neurones à MCH sur la mémoire hippocampo-dépendante et la plasticité synaptique hippocampique 69

Objectif 2 : Caractériser les effets neuromodulateurs de la MCH sur les réponses synaptiques hippocampiques 70

Objectif 3 : Déterminer le rôle du SP dans l'activation des réseaux corticaux pendant les processus de consolidation à court et long terme lors d'un conditionnement contextuel à la peur 71

CHAPITRE I : 73

Rôle des neurones à MCH, actifs pendant le SP, sur la mémoire hippocampo-dépendante et la plasticité synaptique hippocampique 73

1. Contexte 73
2. Article 1 74

CHAPITRE II : 98

Etude des effets neuromodulateurs du peptide MCH sur les réponses synaptiques hippocampiques. 98

1. Contexte 98
2. Article 2 99

CHAPITRE III : 124

Rôle du SP dans l'activation des réseaux corticaux pendant les processus de consolidation à court et long terme lors d'un conditionnement contextuel à la peur 124

1. Introduction 124
2. Matériel et méthodes 126
   - 2.1. Animaux et procédures chirurgicales 126
   - 2.2. Enregistrements polysomnographiques 127
   - 2.3. Méthode de privation de SP 128
   - 2.4. Conditionnement contextuel à la peur 130
   - 2.5. Neuroanatomie fonctionnelle 131
     - *2.5.1. Perfusion et coupe des cerveaux 131*
     - *2.5.2. Protocole d'immunohistochimie 132*
     - *2.5.3. Quantification du marquage immunohistochimique 134*

2.6. Analyse des données 135

3. Résultats 135

4. Discussion 146

Discussion générale 153

1. Résumé des principaux résultats obtenus 153

2. Interprétations fonctionnelles 154

2.1. Le SP contribue, via la régulation de mécanismes synaptiques dans l'hippocampe par la MCH, à l'effet facilitateur du sommeil sur la mémoire. 155

2.1.1. La MCH pourrait, en synergie avec l'acétylcholine, contribuer à l'élaboration, pendant le SP, d'un état privilégié pour la consolidation synaptique dans l'hippocampe 156

2.1.2. La MCH, en participant à une homéostasie locale du sommeil dans l'hippocampe, pourrait favoriser la consolidation des traces mnésiques. 158

2.1.3. Le SP pourrait il préparer aux apprentissage du lendemain via la MCH ? 159

2.2. Le SP post-apprentissage exerce un rôle critique dans la consolidation à long terme 163

2.2.1. Le recrutement du gyrus denté pendant le SP post-apprentissage pourrait être requis pour la mise en place de "marquages synaptiques" essentiels à la consolidation systémique à long terme 163

2.2.2. Quid de la MCH ? 166

Conclusion et perspectives 167

Bibliographie 170

Introduction générale

En moyenne nous passons 27 années de notre vie à dormir... Un tiers de notre vie, consacrée à une activité dont on ne connait pas vraiment la fonction! Pourtant, dormir est vital. En témoignent tous ces réveils difficiles où nous avons du mal à quitter notre lit après une nuit trop courte. En témoigne aussi la conservation phylogénétique impressionnante du sommeil à travers les espèces. Elle s'étend presque à l'ensemble du règne animal. Des phases d'inactivité ou de repos partageant certains critères propres au sommeil (régulation circadienne et homéostatique, seuil d'éveil élevé), ont été ainsi mis en évidence chez des Invertébrés comme la mouche Drosophile (Greenspan et al., 2001) ou même le nématode *Caenorhabditis elegans* (Lewis, 2014). Et cela, alors que le sommeil correspond à un état d'inconscience, qui se traduit par une période de vulnérabilité accrue surtout chez les espèces herbivores qui peuvent être ainsi à la merci des prédateurs. Son utilité physiologique doit donc être fondamentale.

Outre son rôle dans le développement, la maturation cérébrale ou la régulation thermique, le sommeil pourrait aider à la mémorisation. En effet, une privation de sommeil, comme nous avons tous pu le constater, affecte en premier lieu nos capacités cognitives, en provoquant des difficultés à se concentrer, des difficultés à se souvenir... Le sommeil n'est pas un état uniforme. Depuis les années 50, deux phases de sommeil ont été identifiées : le sommeil lent et le sommeil paradoxal. Le sommeil paradoxal est caractérisé à l'électroencéphalographie par une activité cérébrale proche de l'éveil. Cet état de sommeil a alors été considéré par Eugen Aserinski, Nathaniel Kleitman, William Dement et Michel Jouvet comme le sommeil du rêve. Et depuis longtemps, on prête à l'activité onirique un rôle dans nos capacités mnésiques...

Le but de cette thèse était d'étudier chez la souris, le rôle du sommeil paradoxal et particulièrement d'une substance libérée pendant cet état, l'Hormone de Mélano-Concentration (MCH) dans les mécanismes de consolidation synaptiques qui prennent place dans l'hippocampe, une structure essentielle à la mémoire, et dans le stockage à long terme de l'information. Nous commencerons ce manuscrit par un rappel bibliographique sur la mémoire puis nous présenterons des travaux en faveur d'un rôle facilitateur du sommeil paradoxal sur les mémoires hippocampo-dépendantes. Nous nous intéresserons ensuite à la plasticité synaptique, considérée comme le corrélat cellulaire de la mémoire, et à la modulation qu'exerce le sommeil paradoxal sur ces mécanismes dans l'hippocampe. Enfin, nous présenterons la littérature concernant le peptide MCH dont l'action sur le sommeil et la

mémoire, le désigne comme un possible vecteur moléculaire du rôle facilitateur du sommeil dans la mémoire. Nous conclurons notre introduction par l'exposition des objectifs des travaux réalisés durant cette thèse et les approches expérimentales que nous avons adoptées afin d'y répondre.

Rappel Bibliographique

1. Les réseaux neurobiologiques de la mémoire

D'après le Larousse, la mémoire consiste en une "activité biologique et psychique qui permet d'emmagasiner, de conserver et de restituer des informations". Les bases de cette définition ont été posées au XIXe siècle par des psychologues tels qu'Ebbinghaus grâce à l'essor de l'approche expérimentale. En établissant la courbe de rétention de listes de mots, ces psychologues définirent la mémoire comme l'encodage d'une trace mnésique, qui serait ensuite stockée plus ou moins longtemps pour un rappel ultérieur. Cette trace mnésique est susceptible aux interférences engendrées par les nouvelles informations traitées par le cerveau au cours du temps et doit donc être renforcée, "consolidée" afin de passer d'une mémoire primaire, à court terme, à une mémoire secondaire ou mémoire à long-terme (James, 1890). Après la seconde guerre mondiale, les études de cas cliniques présentant une amnésie rétrograde, c'est-à-dire une perte des souvenirs formés avant leurs lésions cérébrales, ont appuyé ce découpage temporel de la mémoire en deux compartiments distincts. Cette approche lésionnelle permettait aussi d'aborder la question de la localisation des réseaux neurobiologiques de la mémoire. L'étude du patient HM (Scoville et Milner, 1957 ; Squire, 2009) a montré qu'une résection bilatérale du lobe temporal médial (LTM) où se trouve l'hippocampe, entraînait à la fois une amnésie antérograde et rétrograde. Ce patient était incapable de former de nouveaux souvenirs bien qu'il présentât une mémoire à court à terme normale tant que son attention restait centrée sur la tâche en cours. D'autre part, son amnésie rétrograde était limitée à quelques années. Il pouvait, en effet, se remémorer des souvenirs de son enfance mais pas d'évènements plus récents. Cette observation suggérait ainsi que l'hippocampe jouait un rôle crucial dans la consolidation des traces mnésiques en assurant leur transfert d'une mémoire à court terme vers une mémoire à long terme qui pourrait devenir avec le temps indépendante de l'hippocampe. De nombreuses études chez l'animal ont alors cherché à caractériser les processus de consolidation mnésique et d'identifier les différents réseaux neuronaux sous-jacents. Il a alors été montré que la dynamique de consolidation tout comme les réseaux engagés différaient selon le type de mémoire.

1.1. Les différentes catégories de mémoires et leur dépendance à l'hippocampe

La mémoire est ainsi classiquement divisée en deux grandes catégories : la mémoire déclarative et la mémoire non-déclarative (Squire et Zola, 1996). La mémoire déclarative concerne les souvenirs accessibles de manière consciente et qui peuvent être verbalisés ("déclarés"). La mémoire déclarative peut elle même être subdivisée en, d'une part, une mémoire épisodique qui correspond à la capacité à se remémorer des épisodes ou évènements passés de notre vie dans leur contexte spatio-temporel propre (ex : j'ai regardé l'élection du président Hollande chez moi avec ma sœur en 2012) et, d'autre part, une mémoire sémantique qui correspond aux connaissances générales ("faits") (ex : le président actuel est François Hollande) (Tulving, 1972). La mémoire non déclarative, quant à elle, regroupe de manière hétérogène toutes les mémoires dites inconsciente issues de l'expérience et permettant le développement d'une habilité particulière. La plus étudiée, la mémoire procédurale correspond aux compétences motrices acquises via une pratique répétée comme apprendre à faire du vélo ou à jouer du piano. Cette catégorisation de la mémoire rejoint la classification de Schacter qui distingue la mémoire explicite, assimilée à la mémoire déclarative, à laquelle on peut accéder de manière intentionnelle, de la mémoire implicite, assimilée à la mémoire non-déclarative, où la récupération des souvenirs est automatique (Schacter, 1987).

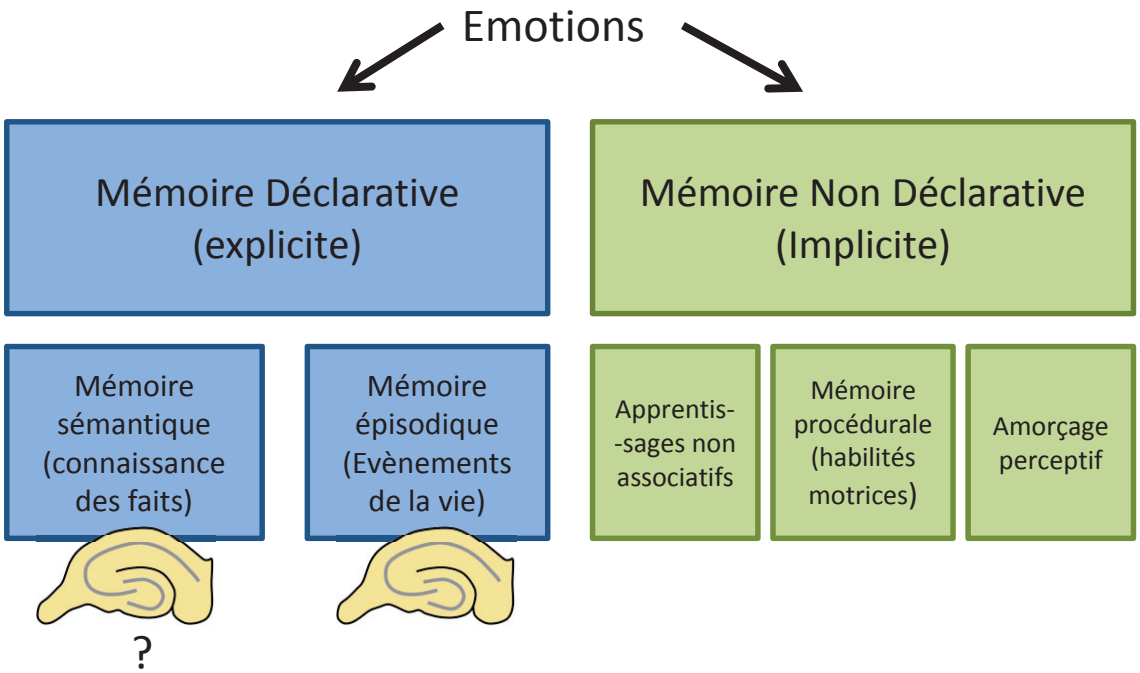


Figure 1. Classification des principales formes de mémoire. La mémoire déclarative comprend les souvenirs que l'on peut rappeler à la conscience, comme les épisodes autobiographiques. La mémoire non déclarative comprend les habiletés qui peuvent être récupérées de façon non consciente..

Cette séparation en mémoires déclarative et non-déclarative résulte de l'observation de plusieurs patients amnésiques comme le patient HM. En effet, si ce dernier était incapable de se rappeler des nouvelles personnes qu'il rencontrait ou les lieux dans lesquels il se rendait, il pouvait toutefois apprendre une nouvelle tâche motrice, par exemple à copier de plus en plus efficacement une forme donnée en ayant comme seul retour visuel le reflet de sa main dans un miroir. Néanmoins, étonnamment, HM oubliait au fur à mesure avoir pratiqué cette tâche et était donc inconscient de l'avoir apprise. Sa mémoire procédurale était ainsi intacte contrairement à sa mémoire déclarative (Squire, 2009). L'atteinte importante du LTM dont souffrait HM laissait donc penser que cette aire cérébrale pourrait faire partie du réseau de structures responsable du stockage des informations en mémoire déclarative. Cette implication du LTM, et particulièrement de l'hippocampe, dans la mémoire déclarative a été depuis très bien démontrée chez l'homme par de nombreuses études (Cohen and Squire, 1980 ; Eichenbaum, 2004 ; Squire et al., 1990). Au contraire, la mémoire procédurale semble essentiellement dépendante d'autres structures cérébrales telles que le striatum ou le cervelet (Squire, 2004). Cependant, différentes vues s'opposent toujours aujourd'hui sur les relations qu'entretiennent mémoires sémantique et épisodique et le rôle différentiel joué par le circuit impliquant le LTM dans ces dernières. En effet, certains soutiennent que la mémoire sémantique serait issue de la mémoire épisodique dans le sens où une information serait graduellement libérée de son contexte (dé-contextualisée) pour devenir purement factuelle (Baddeley, 2001) ; d'autres avancent au contraire, que la mémoire serait encodée de manière séquentielle, d'abord de manière sémantique, avant de devenir progressivement épisodique en y associant au fur et à mesure les informations du contexte spatio-temporel (Tulving, 1972). Ces deux conceptions s'appuient sur des réseaux différents au sein du LTM avec une participation différentielle de l'hippocampe et des régions parahippocampiques, que nous ne discuterons pas (modèles unitaire de Squire et hiérarchique de Mishkin, pour revue : de Haan et al., 2006 ; van Strien et al., 2009). Nous retiendrons que l'hippocampe joue, chez l'homme, un rôle certain dans la mémoire épisodique mais que son rôle dans la mémoire sémantique reste incertain.

L'hippocampe est donc un acteur important du réseau de la mémoire déclarative, mais par quel processus, tant au niveau cellulaire que systémique, ce dernier participe-t-il à l'élaboration des souvenirs ? Afin de répondre à ces questions qui concernent directement nos travaux, l'utilisation de modèles animaux s'impose. Cependant, la définition même de mémoire déclarative repose sur la capacité à verbaliser ou non les souvenirs, capacité absente

chez l'animal. De plus, l'idée même de conscience, importante pour définir cette forme de mémoire, est particulièrement difficile à évaluer chez l'animal. Les différents systèmes de mémoire que nous venons de définir existent ils donc chez l'animal ? Parler de mémoire déclarative chez le rongeur a-t-il un sens ? On considère que la mémoire sémantique pourrait correspondre à l'acquisition de nouvelles règles dont la maîtrise et la compréhension serait nécessaire à l'accomplissement de certaines tâches mnésiques facile à évaluer chez l'animal (Olton et al., 1979). La mémoire épisodique, quant à elle, se compose de trois éléments dont l'association permet de se remémorer l'évènement dans son ensemble : quoi, où et quand (O'Keefe et Nadel, 1979). Or certains oiseaux qui stockent leur nourriture pour l'hiver, sont capables de se souvenir du type de nourriture stocké (quoi), le lieu de stockage (où) et depuis combien de temps (quand) (Clayton et al., 2001) ce qui suggère que la mémoire épisodique existerait bien chez l'animal. Cependant l'existence de cette notion du "quand" est délicate à démontrer chez les rongeurs et est encore sujette à débat (Eacott et Norman, 2004 ; Easton et al., 2012), on préfère donc parler chez l'animal de mémoire "*episodic-like*".

1.2. Anatomie du circuit hippocampique du rongeur

Pour essayer de comprendre ce qui peut se passer au niveau de l'hippocampe du rongeur, il est nécessaire de connaître son anatomie (Pour une description détaillée : Amaral et Lavenex, 2006 ; van Strien et al., 2009). L'hippocampe fait partie d'une structure plus large, la formation hippocampique, dont les différentes régions forment un circuit neuronal fonctionnel. Souvent, par abus de langage, le terme hippocampe est utilisé pour désigner la formation hippocampique. Cette structure corticale, située dans la partie caudale du cerveau, occupe une place privilégiée pour réaliser l'intégration d'informations puisqu'elle reçoit et envoie de nombreuses connections vers les régions néocorticales traitant les modalités sensorielles via la structure para-hippocampique. La formation hippocampique est composée d'une structure d'entrée des informations, le cortex entorhinal (CE), d'une structure de sortie, le subiculum auquel on peut adjoindre le presubiculum et le parasubiculum, et enfin le gyrus denté ou dentelé (GD). L'hippocampe proprement dit est aussi appelé corne d'Ammon (CA), il est d'ailleurs subdivisé en trois aires nommées CA1, CA2 et CA3. Le cortex formant l'hippocampe, le GD et le subiculum possède trois couches. La plus profonde, appelée *hilus* dans le GD et *stratum oriens* dans l'hippocampe, est composée d'un mélange de fibres afférentes et efférentes et d'interneurones. La seconde regroupe les corps cellulaires des neurones principaux. On la nomme *stratum pyramidale* dans l'hippocampe et le subiculum et couche granulaire dans le GD d'après la forme des neurones qui la compose. Enfin la couche

la plus superficielle, le *stratum moleculare,* correspond principalement aux dendrites des neurones et aux axones de la voie perforante.

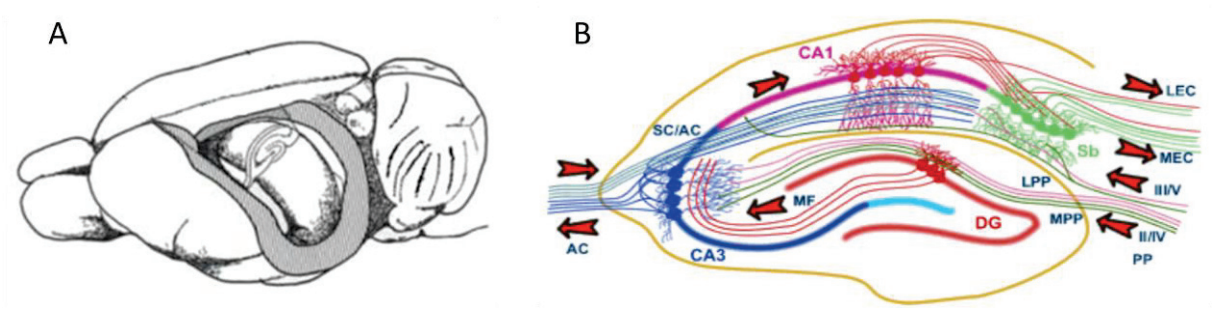


Figure 2. Représentations schématiques de l'hippocampe. A. Localisation de l'hippocampe dorsal dans le cerveau entier de rongeur (D'après Amaral et Lavenex, 2006). **B.** Circuit trisynaptique de l'hippocampe sur une coupe transversale d'hippocampe dorsal. Les axones du cortex entorhinal forment la voie perforantes (PP) médiane (MPP, vert) et latérale (LPP, rose) projettent sur les neurones granulaires du gyrus denté (GD) et les neurones pyramidaux de CA3. Les neurones du DG projettent sur CA3 via les fibres moussues (MF, rouge) puis les neurones de CA3 projettent à leur tour sur CA1 via les collatérales de Schaffer (SC, bleu clair). Les neurones de CA1 envoient leurs axones vers le subiculum (Sb). Ce dernier représente la principale voie de sortie de l'hippocampe et projettent vers le cortex entorhinal médian (MEC) et latéral (LEC).

La majeure partie des informations entrant dans la formation hippocampique passe par la voie perforante correspondant aux projections du cortex entorhinal sur les cellules granulaires du GD (couche granulaire) et les cellules pyramidales de l'hippocampe (*stratum pyramidale*). Les neurones granulaires du GD envoient alors des axones, les fibres moussues, faire synapse sur les neurones pyramidaux de l'aire CA3 qui innervent à leur tour les cellules pyramidales de CA1 par l'intermédiaire des collatérales de Schaffer. Ce réseau de connexions CE ➔GD ➔ CA3 ➔ CA1 forme le circuit trisynaptique de l'hippocampe (Andersen et al., 1971) (**Fig.2**). Les informations traitées dans le circuit sortent alors par le subiculum, passent à nouveau dans le CE, avant d'être redistribuées vers les différentes aires du néocortex. Ce circuit trisynaptique, entièrement excitateur, ne représente qu'une fraction simplifiée du circuit hippocampique qui compte aussi des circuits récurrents notamment dans CA3, de multiples connections inhibitrices (Freund and Buzsáki, 1996) et d'autres projections hippocampo-corticales.

1.3. Rôle de l'hippocampe dans la mémoire spatiale chez le rongeur

Afin de tenter de reproduire les amnésies observées chez l'homme, des lésions de la formation hippocampique ont été réalisées chez le rongeur dès les années 1960 (Squire, 1992). Ces animaux lésés se montraient moins performants à réaliser des tâches mnésiques quand celles-ci étaient de nature spatiale (labyrinthes par exemple). Or, la dimension spatiale est, comme

on l'a vu, essentielle à la définition même de mémoire épisodique. L'hippocampe semble donc bien impliqué chez le rongeur aussi dans les mémoires déclaratives.

En 1971, O'keefe et Dostrovsky découvrent des neurones particuliers dans CA1 appelés cellules de lieu ou "*place cells*" qui vont révolutionner le regard porté sur la fonction de l'hippocampe dans la mémoire (O'Keefe et Dostrovsky, 1971). L'enregistrement électrophysiologique de l'activité unitaire de ces neurones lors d'une tâche d'exploration libre a montré que ceux-ci avaient tendance à décharger uniquement si l'animal était situé à un endroit particulier ou "champ spatial" ("*place field*") codant ainsi sa position dans l'environnement **(Fig. 3**). De plus, l'enregistrement simultané de centaines de ces cellules a montré que, si l'animal court le long d'un chemin particulier, il y a formation d'une séquence particulière d'activation de cellules de lieu. Cette séquence sera rejouée si l'animal refait le même trajet et devient rapidement assez robuste, ce qui montre bien qu'elle est liée à la mémoire de l'environnement spatial (Wilson et McNaughton, 1993). Cette découverte aboutit à l'hypothèse que les neurones de l'hippocampe créent une carte cognitive qui permet de construire une représentation allocentrique de la position de l'animal dans son environnement pendant l'exploration (O'Keefe et Nadel, 1979). Cette carte cognitive leur donnerait leur localisation au sein de l'environnement à chaque instant, information nécessaire pour calculer le chemin optimal ("*path integration*" en anglais) vers un but. Le rôle de l'hippocampe dans la mémoire épisodique serait alors uniquement une conséquence de son rôle majeur dans la mémoire et la navigation spatiale. Des études chez l'homme ont renforcé cette hypothèse en montrant une même implication de l'hippocampe dans la formation de cartes cognitives (Suthana et al., 2009 ; pour revue : Burgess, 2006 ; Burgess et al., 2002). Cependant, cette théorie est actuellement très débattue et de nombreuses études ont montré que les cellules de l'hippocampe ne se contentent pas de coder de l'information spatiale pure (Pour revue : Eichenbaum et al., 1999 ; Leutgeb et al., 2005 ; Poucet et al., 2010). En effet, les séquences d'activation des cellules de lieu peuvent être modulées par l'expérience de l'animal que ce soit en effectuant un apprentissage (ex : Moita et al., 2004 ; Wood et al., 2000) ou en changeant des indices spatiaux (ex : Bostock et al., 1991 ; Scaplen et al., 2014). D'autre part, le CE médian qui reçoit directement les informations visuo-spatiales provenant du cortex post-rhinal et projettent sur l'hippocampe, possèdent lui-aussi une variété de cellules assurant une représentation spatiale. Il s'agit des cellules de grille ou *grid cells* qui s'activent lorsque l'animal passe par certains points de l'environnement répartis de manière régulière, dessinant ainsi une grille qui forme un maillage de l'espace dans lequel le rongeur évolue (Hafting et al.,

2005). Cette grille dépend faiblement des informations externes (lumière/obscurité, odeurs,..) et certaines cellules de grille codent aussi pour d'autres paramètres comme la direction de la tête ou la vitesse de l'animal (Sargolini et al., 2006). Ces observations suggèrent que le CE fournirait un cadre de référence métrique construit sur l'intégration des informations fournies par ses déplacements (Moser et al., 2008) qui modulerait les cartes spatiales construites dans l'hippocampe (Brun et al., 2002). Ainsi, la navigation spatiale requiert le recrutement de plusieurs régions cérébrales (le cortex pariétal postérieur a aussi été impliqué, voir Whitlock et al., 2008), et pas seulement l'hippocampe. De plus, de nombreuses études ont montré que celui-ci permet d'associer des informations spatio-temporelles ce qui renforce l'idée d'une implication de l'hippocampe dans les mémoires épisodiques. Les représentations spatiales encodées par les cellules de lieu représenteraient ainsi une part cruciale mais non exclusive des informations stockées dans l'hippocampe (Eichenbaum et Cohen, 2014). L'hippocampe permettrait l'encodage de différents stimuli traités de manière conjointe en une même représentation associative grâce à des mécanismes cellulaires que nous aborderons plus tard (Rudy et Sutherland, 1995).

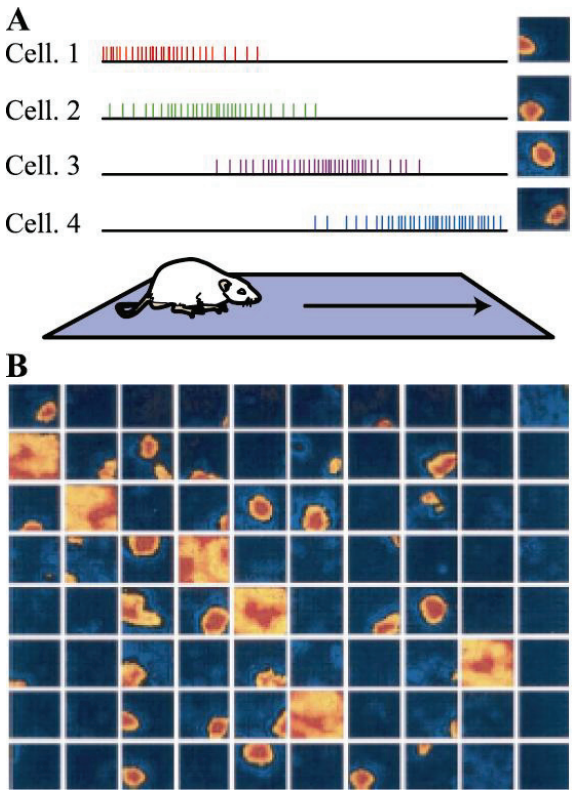


Figure 3. Les cellules de lieu. A. Le taux de décharge de certains neurones de l'hippocampe augmente spécifiquement quand le rat traverse certaines régions d'un environnement, ce sont les cellules de lieu. En attribuant un code couleur au taux de décharge, on peut alors visualiser les régions de l'espace où la cellule est activée (rouge) et celle où elle demeure silencieuse (bleu). **B..** Tableau représentant 80 cartes d'activation de cellules enregistrées dans l'aire CA1 de l'hippocampe pendant l'exploration de l'animal. Dans cet exemple, la plupart des cellules restent silencieuses, 30% codent pour un emplacement précis de l'environnement et les 6 déchargeant sans interruption sont probablement des interneurones. (D'après Wilson et McNaughton, 1993)

1.4. La mémoire émotionnelle

Chez l'homme comme chez l'animal, la mémoire déclarative est modulée par les émotions. En effet, on se souviendra mieux d'un évènement qui nous affecte émotionnellement par rapport à un évènement quotidien considéré comme neutre (Buchanan, 2007 ; Conway et al., 1994). Des sujets sains montrent ainsi une rétention accrue pour un matériel à composante émotionnel par rapport à un matériel neutre qu'il s'agisse de mots (Sharot et Phelps, 2004), d'images (Bradley et al., 1992) ou d'histoires courtes (Cahill and McGaugh, 1995). Autrement dit, la mémorisation d'informations de nature explicite dépendantes de l'hippocampe serait modulée de manière implicite par les émotions et surtout par l'activité physiologique qui y est associé (McGaugh et al., 2002). En réponse à une stimulation émotionnelle ou stressante, les hormones de stress comme l'adrénaline ou les glucocorticoïdes, provoquent la libération de noradrénaline dans une structure du LTM qui projette notamment sur l'hippocampe, l'amygdale (Galvez et al., 1996 ; Williams et al., 1998). Or l'infusion de noradrénaline dans l'amygdale baso-latérale (BLA) de rongeur, un noyau de l'amygdale, juste après un apprentissage spatial réalisé dans un labyrinthe aquatique (*Morris Water Maze*), permet une meilleure rétention de l'information tandis que l'infusion d'un antagoniste des récepteurs à la noradrénaline diminue les performances des animaux (Hatfield et McGaugh, 1999). De nombreuses études chez l'homme et l'animal ont ainsi montré que l'amygdale régulerait l'encodage et la consolidation des traces mnésiques dans l'hippocampe en y attribuant une tonalité émotionnelle (Roozendaal et al., 2009).

1.4.1. Le conditionnement à la peur

L'identification de ce circuit hippocampo-amygdalien comme support neuronal de la mémoire émotionnelle a été en grande partie assurée par l'utilisation du modèle de conditionnement à la peur et ce, particulièrement chez le rongeur (Johansen et al., 2011). Lors de ce conditionnement, on présente aux animaux un stimulus neutre (contexte, son, ...) puis on applique un stimulus aversif (un choc électrique par exemple) qui engendrera une réaction de peur non contrôlée (**Fig. 4**). On parle alors de stimulus inconditionnel (SI) pour ce stimulus aversif. La présentation ultérieure du même stimulus neutre ou conditionnel (SC) seul provoquera alors une réaction de peur dite conditionnée puisque l'animal aura associé à ce stimulus initialement neutre une charge émotionnelle due à la présentation conjointe du SI. Cet apprentissage est extrêmement robuste puisqu'il permet, en une seule session d'entraînement, d'engendrer un souvenir durable du SC. La réaction de peur se manifeste à la

fois de manière physiologique (modification du rythme cardiaque, diamètre pupillaire, réponse électrodermale...) et comportementale. La plupart du temps, pour évaluer les performances du rongeur dans une tâche de conditionnement à la peur, on étudie et quantifie son comportement d'immobilisation (*freezing*). Il est caractérisé par une absence totale de mouvements, à l'exception des mouvements respiratoires (Fanselow, 1980). La forme contextuelle du conditionnement à la peur est à la fois un apprentissage spatial (un contexte consiste ici en une association de différents éléments multisensoriels), hippocampo-dépendant et un apprentissage émotionnel, amygdalo-dépendant (application d'un choc électrique). Le conditionnement contextuel à la peur constitue ainsi un excellent modèle pour étudier le circuit hippocampo-amygdalien sous-tendant la modulation implicite par les émotions de la mémoire déclarative (Maren et al., 2013).

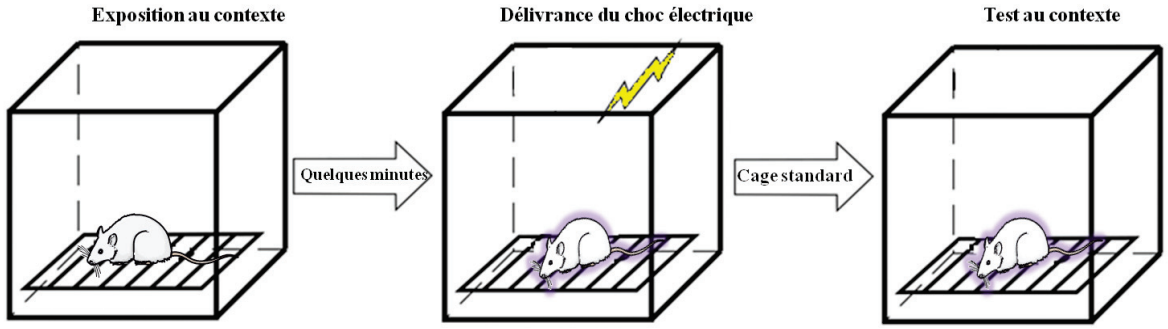


Figure 4. Principe du conditionnement contextuel à la peur. Ce paradigme expérimental utilise la capacité des animaux à anticiper le danger en associant les stimuli environnementaux (contexte) aux événements aversifs qui se produisent conjointement. Dans le conditionnement contextuel à la peur, un stimulus neutre ou conditionnel (SC), le contexte (cage expérimentale, éléments de la pièce visibles par l'animal, etc.), est associé à un stimulus inconditionnel (SI), le choc électrique. Ensuite, l'exposition de l'animal au SC seul suffit alors à entraîner la réponse comportementale de peur, ici la réaction d'immobilisation ou *freezing*.

1.4.2. Le circuit hippocampo-amygdalien

Les nombreuses études de lésions ou d'inactivation pharmacologiques ont démontré l'implication de l'hippocampe dans le conditionnement contextuel à la peur (LeDoux, 2000). Ainsi une lésion de l'hippocampe un jour après l'acquisition, altère grandement les performances au rappel puisqu'aucune réaction d'immobilisation n'est observée quand l'animal est replacé dans le contexte conditionné (Kim et Fanselow, 1992). Des lésions à la résolution plus fine au sein de l'hippocampe ont montré une participation différente des sous-régions hippocampiques (Hunsaker et Kesner, 2008). En plus de sa classique subdivision en CA1 CA2 et CA3, l'hippocampe est aussi scindé en hippocampe dorsal et ventral d'après des critères anatomiques et fonctionnels (Moser et Moser, 1998 ; Strange et al., 2014). Ainsi l'hippocampe présente des profils de connections avec de multiples régions corticales et sous-

corticales différents selon cet axe dorso-ventral. Cette distinction est assez nette concernant les connections à l'amygdale. L'hippocampe dorsal reçoit peu d'afférences en provenance de l'amygdale et n'en émet aucune vers cette région. Cette organisation est différente pour l'hippocampe ventral qui entretient des connections réciproques importantes avec l'amygdale (Pikkarainen et al., 1999). Notons que, si l'inactivation pharmacologique de l'hippocampe dorsal, diminue les performances lors d'un conditionnement contextuel à la peur, elle n'affecte en rien les performances lors d'un conditionnement à la peur indicé (Stiedl et al., 2000). Cette autre forme de conditionnement à la peur utilise un son isolé comme SC et ne requiert donc pas de mémoriser une association de stimuli (contexte). Au contraire, l'inactivation pharmacologique de l'amygdale bloque l'acquisition des deux types de conditionnements ce qui est cohérant avec un rôle de l'amygdale dans l'attribution de la tonalité émotionnelle (Maren et al., 1996) nécessaire aux deux types de conditionnement.

L'amygdale est composée de trois principaux noyaux : l'amygdale latérale (LA), l'amygdale basolatérale (BLA), et l'amygdale centrale (CeA). La LA est considérée comme la voie d'entrée principale de l'amygdale puisqu'elle reçoit de nombreuses afférences des cortex sensoriels primaires et du thalamus. Elle est aussi fortement connectée de manière réciproque aux autres noyaux amygdaliens. La BLA reçoit la majorité des afférences provenant de la formation hippocampique et du cortex préfrontal sur lesquels elle projette à son tour massivement. Ce profil particulier de connexions lui confère un rôle de relai pour l'intégration des informations et la formation des réponses de peur. Enfin le CeA, qui est maintenant séparée en plusieurs noyaux (Ciocchi et al., 2010), est assimilée à la voie de sortie de l'amygdale puisqu'elle envoie ses projections sur de nombreuses structures modulant des fonctions viscérales et endocriniennes permettant l'expression de la réponse de peur.

Du fait de ses connections extensives avec l'hippocampe, la BLA a depuis longtemps été considérée comme sélectivement impliquée dans le conditionnement contextuel à la peur (ex : Helmstetter and Bellgowan, 1994) tandis que la LA gérerait le conditionnement à la peur indicé (ex : Schafe et al., 2005). Toutefois, il semble que ces trois noyaux soient recrutés dans l'acquisition, la rétention et l'expression du conditionnement à la peur, qu'il soit indicé ou contextuel, comme le montrent de nombreuses études chez le rongeurs où les différents noyaux sont lésés ou inhibés soit avant, soit après l'acquisition ou encore avant le rappel (Goosens et Maren, 2001 ; Phelps et LeDoux, 2005). Ceci suggère que le réseau intra-amygdalien participerait dans son ensemble et de manière distribuée, à toutes les étapes du conditionnement contextuel à la peur. Ces résultats ont permis l'établissement d'un modèle

standard du conditionnement contextuel à la peur mettant en jeu le circuit hippocampo-amygdalien (LeDoux, 2000, 2014) (**Fig. 5**). L'hippocampe traiterait l'information contextuelle concernant le SC puis transmettrait cette information à la BLA puis à la LA. La LA reçoit des afférences de la BLA et de nombreux systèmes sensoriels codant les informations propres au SI. La LA, du fait de sa place intégratrice importante dans le réseau intra-amygdalien, permettrait alors l'association entre le SI et le SC. Cette représentation associative serait ensuite traitée par la CeA qui permettrait alors l'expression d'une réaction de peur conditionnée adaptée grâce à ses efférences sur les centres responsables de sa genèse (Paré et al., 2004).

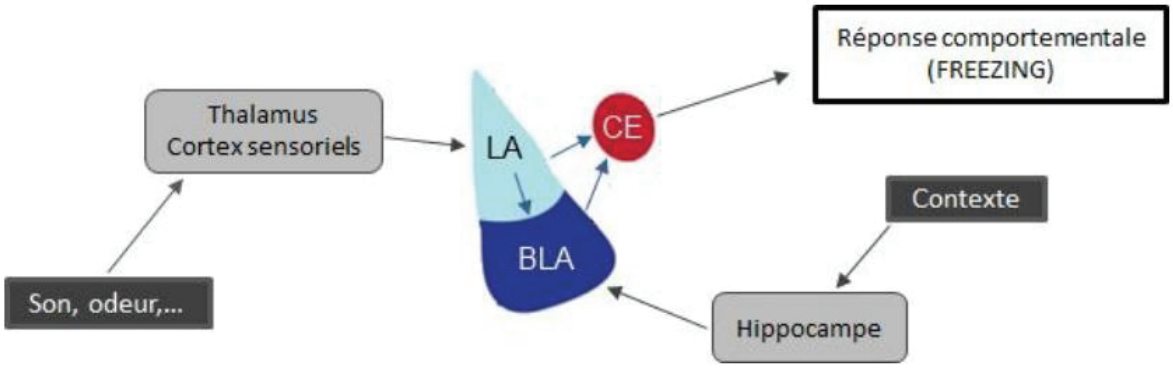


Figure 5. Modèle standard du conditionnement contextuel à la peur et réseau hippocampo-amygdalien. Les noyaux LA et BLA sont les noyaux d'entrée des informations sensorielles et contextuelles respectivement. Ils projettent vers le CeA qui transmet l'information aux structures impliquées dans l'expression du comportement de peur adapté. L'association entre SI et SC se ferait dans la LA (D'après Rodrigues et al., 2009). *LA : amygdale latérale, BLA : amygdale basolatérale, CeA ou CE sur la figure: amygdale centrale.*

L'hippocampe est donc une structure clef dans la mémoire déclarative qu'elle ait ou non une composante émotionnelle. Cependant si la lésion de l'hippocampe un jour après un conditionnement contextuel à la peur perturbe les performances mnésiques au rappel, ce n'est pas le cas si celle-ci a lieu plusieurs jours après l'apprentissage (Kim et Fanselow, 1992). Le réseau hippocampique est-il donc recruté de la même manière au cours du temps par les processus de mémorisation ?

1.5. La composante temporelle de la mémoire

Les psychologues ont très tôt considéré, qu'au cours du temps, la mémoire est modifiée et qu'on peut ainsi identifier plusieurs compartiments mnésiques mettant en jeu des processus différents, la mémoire à court terme et la mémoire à long terme (Drachman et Arbit, 1966 ; James, 1890). D'après leur définition, seule une quantité limitée d'information peut être

maintenue en mémoire à court terme dans le but de réaliser une tâche comportementale mnésique (ex : calcul mental complexe). Ces informations sont alors accessibles de manière automatique uniquement tant que notre attention est concentrée sur la tâche en cours ; la mémoire à court-terme est donc éphémère. A l'inverse, la mémoire à long terme permettrait un stockage durable et illimité des souvenirs. Cependant, pour pouvoir utiliser à nouveau ces informations, il serait nécessaire de les "récupérer", c'est-à-dire de les copier temporairement dans la mémoire à court terme (Jeneson et Squire, 2012). Cette première conception temporelle de la mémoire a depuis beaucoup évoluée notamment avec l'introduction du concept de mémoire de travail chez l'homme dérivé de celui de mémoire à court terme (Atkinson et Shiffrin, 1968 ; Baddeley et Hitch, 1974). Bien que dérivé de celui de mémoire à court-terme (souvent les deux termes sont utilisés comme synonymes), le concept de mémoire de travail fait plus référence à la manipulation des contenus mnésiques qu'à leur maintenance sur une courte durée. Ainsi, les informations existantes en mémoire de travail, peuvent être manipulées et stockées quelques temps après que les informations sensorielles ne soient plus disponibles (secondes/minutes) grâce à des mécanismes de répétitions ou de maintenance active afin de réaliser une tâche cognitive complexe. Ces informations peuvent à la fois provenir de la perception immédiate d'un évènement ou de la récupération d'un souvenir stocké en mémoire à long terme (Baddeley, 2012). Bien que le concept de mémoire de travail ne soit pas figé et continue encore à évoluer, un grand nombre de travaux chez l'homme se réfère au modèle proposé par Baddeley et Hitch en 1974 même si, depuis, d'autres modèles ont été proposés. Pour ces auteurs, la mémoire de travail serait un système cognitif comprenant trois différents compartiments : un centre exécutif et deux sous-systèmes qui diffèrent selon le type d'information retenu, la boucle phonologique (représentations linguistiques) et le calepin visuo-spatial (image mentale). Le centre exécutif contrôlerait les deux autres sous-systèmes en leur allouant les ressources attentionnelles requises à chaque instant (Baddeley and Hitch, 1974). Pour Baddeley et Hitch, on réaliserait ainsi une tâche cognitive en manipulant des informations maintenues grâce à l'autorépétition et la formation d'images mentales.

Ce modèle prête un rôle fondamental au langage dans la mémoire de travail, et ne peut donc être transposé à l'animal. Le concept de mémoire de travail chez l'animal a donc émergé de manière parallèle d'après les travaux de Olton et Honig chez le rongeur dans le labyrinthe radial. Dans ce test, l'animal peut être placé sur une plateforme centrale de laquelle rayonnent huit bras dont l'extrémité abrite une récompense alimentaire. Les auteurs remarquent alors

que, dès que les rongeurs ont compris qu'il y avait des récompenses, ils visitent l'ensemble des bras en évitant d'entrer plusieurs fois dans un bras déjà visité et donc dans lequel il ne reste plus de récompense. Au cours d'une seule session, les rats sont ainsi capables de se souvenir des bras qu'ils ont visités. Cette information n'est néanmoins pas conservée puisqu'elle devient inutile pour la session suivante où tous les bras sont à nouveau appâtés (Olton et Samuelson, 1976). Il s'agit bien ici d'une tâche de mémoire de travail dans le sens où il y a maintien transitoire (secondes/minutes) d'informations et utilisation (manipulation) de ces informations pour réaliser une tâche comportementale. Cette mémoire de travail s'oppose à la mémoire de référence, une mémoire à long terme qui, chez l'animal, est acquise lors d'un entrainement répété (ex : aller dans un bras donné du labyrinthe, toujours le même, pour avoir une récompense) et peut persister sur plusieurs mois (Olton et al., 1979). Certains auteurs définissent aussi une mémoire à court terme chez l'animal qui s'assimilerait à la mémoire de travail mais durerait plus longtemps, jusqu'à quelques heures (Dudchenko, 2004).

Deux questions fondamentales se posent alors : la mémoire de travail se transforme-t-elle en mémoire à long terme ou s'agit-il de deux systèmes distincts pouvant coexister ? Quelles sont alors les bases neuronales de ces deux formes de mémoire ? Impliquent-elles un même réseau de manière différentielle ou, au contraire, deux réseaux indépendants ?

Là encore, c'est l'étude des patients amnésiques qui a, pour la première fois, suggéré que mémoire à court terme et mémoire à long terme n'ont pas les mêmes substrats neuronaux. Le patient HM, malgré son importante amnésie, était en effet, tout à fait capable de mener une conversation courte et avait un empan numérique intact (capacité à répéter une suite de 6/7 chiffres à l'envers) (Squire, 2009). De plus, grâce à une autorépétition continue, il pouvait se souvenir d'une suite simple de chiffres pendant un maximum de 15 minutes. Cependant, dès que son attention était attirée ailleurs, il oubliait tout. Ces résultats suggèrent que la mémoire de travail de HM était intacte. Vue l'importante lésion bilatérale du LTM présente chez HM, ces résultats semblaient suggérer que la mémoire de travail est indépendante de l'hippocampe. Au contraire, comme on l'a vu précédemment, son amnésie antérograde indique qu'il est incapable de former des mémoires déclaratives à long terme. Deux interprétations sont alors possibles : soit le LTM est essentiel pour la formation des mémoires à long terme, soit il est indispensable à leur récupération.

Mais quelles régions participent au réseau de la mémoire de travail ? Les premiers éléments de réponse ont été apportés par des études chez les primates non-humains et chez l'homme.

Elles suggèrent une implication du cortex préfrontal (PFC), une région jouant un rôle important dans les mécanismes attentionnels et qui pourrait être le support neuronal du centre exécutif proposé par Baddeley (Curtis et al., 2004 ; Funahashi et al., 1989, 1993 ; Fuster et Alexander, 1971 ; pour revue : D'Esposito, 2007 ; Euston et al., 2012). Qu'en est-il chez le rongeur, où la mémoire de travail se comprend surtout comme la capacité à maintenir des informations jugées utiles pour la réalisation d'une tâche comportementale en cours ? Des lésions du cortex préfrontal médian (mPFC) altèrent la performance de rats dans des tâches de mémoire de travail subséquentes à la lésion (Dunnett et al., 1999 ; van Haaren et al., 1988 ; Horst et Laubach, 2009). De plus, des enregistrements électrophysiologiques ont montré que l'activité de certains neurones du PFC est modulée lors d'une tâche de mémoire de travail d'alternance différée. Lors de ces tests, les animaux sont entrainés dans un labyrinthe à alterner entre deux bras contenant une récompense. On les laisse entrer dans un premier bras, puis après un certain délai, on les autorise à choisir entre les deux bras ; l'animal devra donc se souvenir duquel il a visité afin de récupérer la seconde récompense dans le deuxième bras. Or, le taux de décharge de certains neurones préfrontaux augmente spécifiquement pendant l'intervalle de rétention entre les deux essais (Jung et al., 1998, 2000). De plus, des enregistrements multi-unitaires ont permis de mettre en évidence des assemblées de neurones dont l'activité permet de prédire le choix de l'animal (Baeg et al., 2003).

Le mPFC semble ainsi requis pour la mémoire de travail chez l'animal mais est-ce la seule structure impliquée ? L'hippocampe ventral projette directement et assez fortement sur le mPFC qui en retour l'innerve de manière indirecte (Cenquizca et Swanson, 2006 ; Vertes et al., 2007). Serait-il possible que l'hippocampe participe à la mémoire de travail du rongeur ? Comme nous l'avons vu précédemment, l'hippocampe joue un rôle majeur dans la mémoire spatiale. Il pourrait donc être impliqué dans les tâches de mémoire de travail spatiales. Afin de déterminer si la communication entre hippocampe et mPFC est requise à la réalisation d'une tâche de mémoire de travail, des auteurs ont lésé l'hippocampe dans un hémisphère et le mPFC dans le second. Ainsi, la communication inter-hémisphérique étant considérée négligeable, les animaux possédaient un mPFC et un hippocampe intègres mais non reliés entre eux. Les performances de ces animaux lésés sont alors grandement altérées dans des tâches spatiales (Churchwell et al., 2010 ; Wang et Cai, 2006, 2008) mais pas dans des tâches non-spatiales (Wang et Cai, 2008). Des études électrophysiologiques ont d'ailleurs montré une synchronie d'activité entre hippocampe et mPFC pendant une tâche de mémoire de travail spatiale, qui augmente lorsque l'animal arrive à l'endroit où il doit faire son choix (i.e.,

l'intersection entre les bras) (Benchenane et al., 2010). De plus, l'inactivation pharmacologique alternée de ces deux régions avant une tâche de mémoire de travail spatiale a montré que les deux contribuaient de manière différente à son acquisition (Yoon et al., 2008). Cela suggère un fonctionnement en réseau entre ces deux structures avec un rôle de l'hippocampe dans le codage du contexte, ce qui est en accord avec le rôle qu'on prête à l'hippocampe dans le traitement des informations contextuelles (voir plus haut).

Enfin, plus les délais de rétention sont augmentés, plus l'implication de l'hippocampe semble importante (Lee et Kesner, 2003). Cela nous renvoie à l'idée que l'hippocampe pourrait être le substrat du transfert de l'information de la mémoire à court terme vers la mémoire à long terme via ce qu'on appelle la consolidation mnésique, c'est-à-dire la stabilisation progressive de la trace mnésique.

1.6. La consolidation mnésique

Cette idée est assez ancienne puisqu'elle puise ses racines dans les travaux de Müller et Pilzecker qui définissent la consolidation comme la période pendant laquelle des interférences (de nouveaux apprentissages par exemple) peuvent perturber le rappel d'une mémoire déclarative (Lechner et al., 1999). Aujourd'hui, la consolidation mnésique fait référence à un ensemble de processus à travers lesquels une trace mnésique nouvellement encodée passe d'un état labile, c'est-à-dire fragile et sensible aux interférences, à un état résistant et permanent (Dudai, 2004 ; Frankland et Bontempi, 2005 ; McGaugh, 2000 ; Wang et Morris, 2010). Cependant, ces mécanismes de consolidation ainsi que leurs substrats neuronaux sont toujours sujet à controverse et changeraient au cours du temps. Il a en effet été postulé qu'il y aurait, durant l'apprentissage et immédiatement après celui-ci, un ensemble de changements moléculaires au niveau synaptique reflétant la formation et la consolidation de la trace mnésique. Cet ensemble de changements est regroupé sous le terme de consolidation cellulaire ou synaptique (Dudai, 2004 ; McGaugh, 2000 ; Morris, 2006 ; Rogerson et al., 2014 ; Wang et Morris, 2010). Cette dernière serait accompagnée d'une réorganisation graduelle sur le long terme des traces mnésiques à travers le réseau de régions cérébrales impliquées dans la mémorisation. On parle alors de consolidation systémique (Dudai, 2004 ; Frankland et Bontempi, 2005 ; Wang et Morris, 2010). Deux théories principales ont été avancées pour expliciter le rôle de ces deux types de consolidations : la théorie standard de la consolidation (Frankland et Bontempi, 2005) et la théorie des traces multiples (Nadel et Moscovitch, 1997).

1.6.1. *Consolidation synaptique et consolidation systémique*

L'injection, chez le rat, d'inhibiteurs de synthèse protéique de 3 à 6 heures après un apprentissage empêche sa rétention, suggérant que des changements précoce à l'échelle moléculaire sont requis pour la stabilisation des traces mnésiques (Squire et Barondes, 1972). On parle alors de consolidation synaptique ou cellulaire. Morris a ensuite postulé que cette consolidation synaptique reflétait l'expression (indépendante de la synthèse protéique) et le maintien (dépendant de la synthèse protéique) de phénomènes moléculaires de plasticité synaptique à long terme, initiés par l'apprentissage (Morris, 2006). La potentialisation à long terme (LTP pour *long-term potentiation*) correspond à une augmentation persistante de la transmission synaptique excitatrice observée expérimentalement suite à l'application d'une stimulation de haute fréquence (Bliss et Lømo, 1973) qui mimerait la stimulation répétée des réseaux neuronaux engendrée lors d'un apprentissage. Cet accroissement de l'efficacité synaptique dans une assemblée de neurones donnée permettrait la constitution de la trace mnésique. De nombreux travaux chez le rongeur ont montré que le blocage de l'induction, l'expression ou du maintien de la LTP dans l'hippocampe, entraîne une altération de la consolidation de tâches de mémoire spatiale (Takeuchi et al., 2014). Notamment, une étude de souris mutantes chez lesquelles la plasticité à long terme est spécifiquement bloquée dans les cellules pyramidales de CA1, a montré un déficit d'apprentissage de ces souris dans une tâche spatiale réalisée dans un labyrinthe aquatique (*Morris Water Maze*) conjugué à une perturbation de la formation et stabilisation des "champs spatiaux" associés aux cellules de lieux (Wilson et Tonegawa, 1997). Cela suggère que la plasticité synaptique à long terme dans l'hippocampe, et particulièrement dans CA1 (nous en détaillerons les mécanismes plus loin), est essentielle à la consolidation synaptique des mémoires épisodiques (Huerta et al., 2000 ; Laroche et al., 2000 ; Takeuchi et al., 2014). Cependant des études de patients amnésiques comme le patient HM, ont montré assez tôt que la consolidation sur le long terme de ces mémoires ne dépendait pas uniquement de l'hippocampe. En effet, chez ce dernier, il existait ce qu'on appelle un gradient d'amnésie rétrograde, autrement dit il ne se souvenait pas d'événements récents survenus peu avant sa lésion, mais gardait encore en mémoire des souvenirs de son enfance (Scoville et Milner, 1957). Cette observation suggère que le LTM, lésé chez ce patient, aurait un rôle limité dans le stockage et la récupération des mémoires déclaratives. Il y aurait donc une redistribution des traces mnésiques au cours du temps au sein d'un réseau de structures cérébrales impliquées dans la mémoire, c'est ce qu'on appelle la consolidation systémique. De très nombreuses études lésionnelles du LTM et particulièrement

de l'hippocampe, chez le rongeur, ont reproduit, ou non, ce gradient d'amnésie rétrograde (Pour revue : Frankland et Bontempi, 2005) et ont mené à l'élaboration de deux modèles de consolidation mnésique intégrant les processus de consolidation synaptique et systémique : la théorie standard de la consolidation et la théorie des traces multiples.

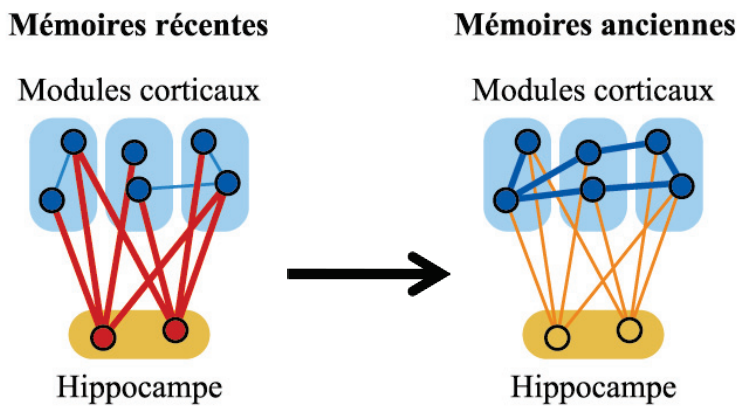


Figure 6. Théorie standard de la consolidation. L'encodage de l'information se produit initialement dans les aires corticales spécialisées et associées. L'information distribuée dans ces différents modules est ensuite intégrée par l'hippocampe pour aboutir rapidement à une trace mnésique cohérente. Les réactivations successives des connexions hippocampo-corticales conduisent au renforcement progressif des connexions cortico-corticales. Ceci permet aux souvenirs récents de devenir indépendants de l'hippocampe en s'intégrant graduellement aux souvenirs préexistants dans le néocortex (D'après Frankland et Bontempi, 2005).

1.6.2. La théorie standard de la consolidation

La théorie standard de la consolidation (Frankland et Bontempi, 2005 ; McClelland et al., 1995 ; Squire et Alvarez, 1995) s'inspire des travaux du théoricien David Marr (Marr, 1970, 1971) et stipule que l'hippocampe assure un stockage temporaire de l'information tout en permettant la transformation de celle-ci en une forme plus robuste qui sera transférée vers le néocortex (**Fig. 6**). Initialement, l'information à consolider serait encodée au niveau des zones corticales engagées dans la perception des différents aspects sensoriels (visuel, auditifs… etc.) liés à cette information. L'hippocampe permettrait ensuite son intégration via la formation rapide d'une trace mnésique cohérente (consolidation synaptique). Il y aurait ainsi formation d'un réseau hippocampo-cortical dont les réactivations successives permettrait le renforcement voire la création de nouvelles connections cortico-corticales correspond à la trace mnésique à stocker à long terme. Au fur à mesure du temps, cette dernière s'intégrerait progressivement dans les réseaux corticaux préexistants pour finalement devenir indépendante de l'hippocampe. Cette théorie a été confirmée chez l'animal grâce des techniques d'imagerie cérébrale fonctionnelles et de suivi de gènes d'expression précoce qui constituent des marqueurs indirects d'activité neuronale (Bontempi et al., 1999 ; Frankland et

al., 2004 ; Maviel et al., 2004). Dans ces études, si l'hippocampe est fortement activé lors du rappel un jour après l'acquisition d'une tâche de mémoire spatiale, il l'est beaucoup moins lors d'un rappel à 30 jours. Parallèlement, un certain nombre de régions corticales dont le mPFC sont recrutées pour un rappel à plus long terme de ces informations. De plus, l'inactivation de l'hippocampe juste avant le rappel n'a d'effet que sur les mémoires récemment acquises tandis que l'inactivation du mPFC altère sélectivement le rappel à long terme. Une étude récente permettant de suivre le devenir de chaque neurone après l'apprentissage d'un conditionnement contextuel à la peur a montré que si les même neurones sont activés pendant l'encodage et pendant le rappel à court terme (2 semaines) dans l'hippocampe et le mPFC, seuls les neurones corticaux sont réactivés lors du rappel à long terme ce qui montre que seule la trace mnésique corticale persévère dans le temps tandis que l'hippocampe se désengage au cours du temps (Tayler et al., 2013).

1.6.3. La théorie des traces multiples

La théorie alternative des traces multiples est basée sur l'observation de patients avec des lésions importantes du LTM associées dans certains cas, à une amnésie rétrograde totale, c'est-à-dire touchant l'intégralité des souvenirs depuis la naissance, et ce, uniquement pour des mémoires épisodiques ou des mémoires spatiales complexe. De plus, des études d'imagerie fonctionnelles chez l'homme montrent que le rappel de mémoires épisodiques détaillées et anciennes engage l'hippocampe suggérant que l'hippocampe continuerait à stocker certains aspects de la mémoire épisodique sur le long terme (Nadel et Moscovitch, 1997). Afin d'intégrer ces observations, Nadel et Moscovitch ont proposé que l'hippocampe permettrait de coder le contexte spatio-temporel d'un évènement à mémoriser. Pour eux, la réactivation du réseau hippocampo-cortical ne mènerait donc pas à un désengagement complet de l'hippocampe mais à la génération de traces multiples reliées entre elles dans l'hippocampe et le néocortex. Ainsi, la récupération de mémoires épisodiques détaillées, qu'elles soient récentes ou anciennes, dépendraient toujours de l'hippocampe. Au contraire, les mémoires sémantiques, indépendantes du contexte, seraient stockées au niveau cortical et leur récupération ne nécessiterait pas l'hippocampe.

2. Rôle du sommeil sur la mémoire

La mémoire est un phénomène complexe. Il existe plusieurs formes de mémoires selon la nature de l'information encodée mais aussi selon la manière dont elles sont traitées et intégrées. De plus, ces mémoires ne cessent d'évoluer à travers le temps et l'expérience,

notamment au travers des processus de consolidation. Or le sommeil constitue un état privilégié pour la consolidation. En effet, cet état qui nous isole du monde extérieur ne permet pas la mise en place de nouveaux apprentissages; la stabilisation et l'intégration des traces labiles acquises avant un épisode de sommeil ne pourront donc pas être perturbées par l'encodage de nouvelles informations. Dans ce chapitre, après une brève présentation des différents états de vigilance et de leur modulation, nous présenterons les preuves expérimentales en faveur d'un rôle du sommeil dans les processus mnésiques et les principales théories avancées pour l'expliciter.

2.1. Le cycle veille-sommeil

2.1.1. Sommeil lent et sommeil paradoxal

Le cycle veille-sommeil se traduit par l'alternance de différents états de vigilance qui peuvent être identifiés phénotypiquement par quatre critères : une posture spécifique, un changement caractéristique de l'électroencéphalogramme (EEG), une augmentation du seuil de réponse aux stimuli environnementaux et une rapide réversibilité (Dement et Kleitman, 1957 ; Jouvet et Michel, 1959 ; Jouvet et al., 1959). Chez les rongeurs, EEG et électromyogramme (EMG) sont suffisants pour différencier l'éveil du sommeil (**Fig. 7**). Durant l'éveil, l'animal est actif, son EMG indique donc une forte activité musculaire avec des bouffées correspondant aux mouvements de l'animal. L'EEG est dit "activé", c'est-à-dire caractérisé par la prépondérance d'oscillations rapides (>30Hz) de faible amplitude. On observe également des ondes thêta d'origine hippocampique lors de périodes d'activité exploratoire (7-8Hz) ou de comportements de prise alimentaire et de toilettage (5-10Hz). On divise le sommeil en deux états, le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal (SP). Lors du SL, l'animal est inactif, le tonus musculaire est faible et sans bouffées. L'EEG présente majoritairement des ondes lentes delta (2-4Hz) de grande amplitude accompagnées de fuseaux (*spindles*) de courte durée (1-3sec) et de fréquence plus élevée (10-14Hz). Dans l'hippocampe apparaissent des évènement transitoires complexes appelés "*sharp wave ripples*" (SW-R). Ces derniers sont constitués de pointes-ondes de 40-120ms générées dans CA3 qui se superposent à des oscillations locales de haute-fréquence (100-300 Hz) originaires de CA1. On considère que la souris, animal nocturne dont le pic d'activité s'observe durant la nuit, passe 60 % de la phase claire et 20 % de la phase sombre en SL (Yasenkov et Deboer, 2012). Le sommeil paradoxal (SP) est un état de sommeil profond succédant au SL. Il est accompagné d'une atonie totale des muscles de la posture. Il ne représente chez la souris que 6% de la phase claire et 1% de la phase sombre

(Yasenkov et Deboer, 2012. Paradoxalement, ce stade de sommeil est caractérisé par un EEG "activé" très proche de celui de l'éveil (d'où son nom), composé d'oscillations toniques de faible amplitude et de fréquence thêta (5-10Hz) auxquelles peuvent s'ajouter des oscillations de type gamma (>30Hz). Cette particularité ferait du SP le siège privilégié de l'activité onirique. Le SP est également associé à de légers spasmes (*twitches*) dans les muscles des extrémités et de la face et à l'apparition d'une activité oculomotrice phasique rapide (d'où sa dénomination anglophone de *Rapid-Eye-Movement sleep* ou *REM sleep*). Ces mouvements oculaires sont associés à la génération de pointes pontiques (ondes P) par l'activation phasique de cellules glutamatergiques du pont (Datta et al., 1998).

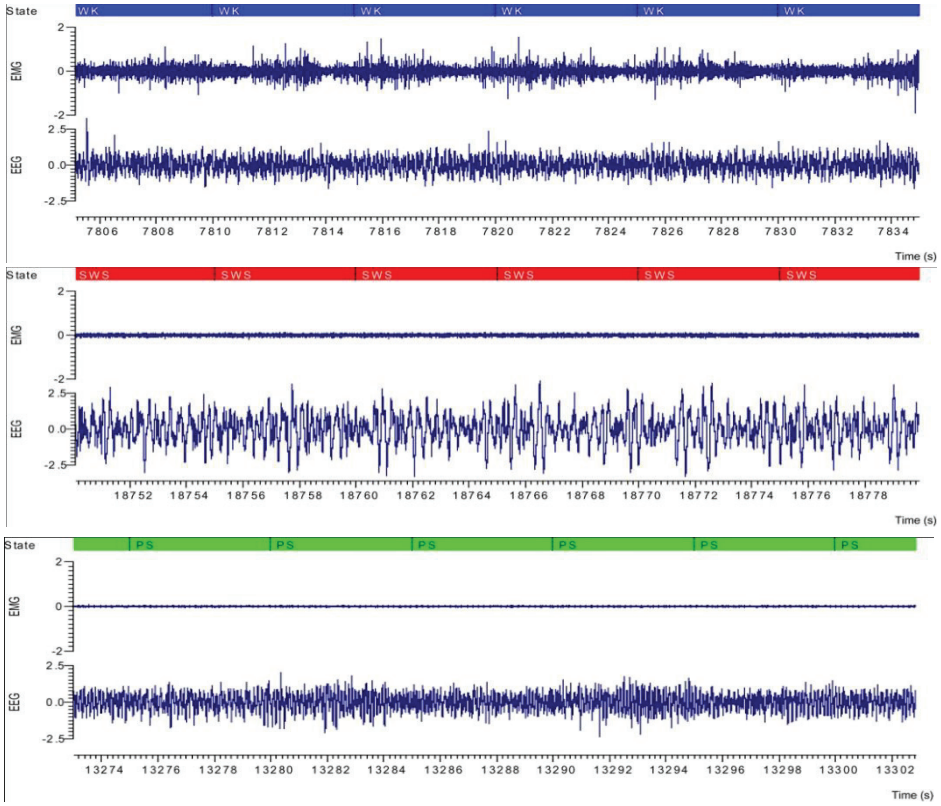


Figure 7. Enregistrements polysomnographiques des différents états de vigilance chez la souris. Tracés électromyographiques (EMG) et électroencéphalographiques (EEG) enregistrés chez la souris durant l'éveil (en bleu), le SL (en rouge) et le SP (en vert). Pendant l'éveil, on observe un tonus musculaire important et variable selon l'activité comportementale de l'animal, et un EEG désynchronisé (actif) et de faible amplitude. Pendant le SL, il ya diminution du tonus musculaire et l'EEG est synchronisé. Il est constitué majoritairement d'ondes lentes de grande amplitude. Pendant le SP, il ya une atonie musculaire accompagnée d'un EEG actif marqué par une prédominance des ondes thêta.

Ce cycle ultradien se répète à plusieurs reprises au cours d'une journée avec des épisodes de durées variables et des transitions plus ou moins fréquentes vers les différents états de vigilance selon le moment de la journée ou de la nuit. Notons qu'à l'issue d'un épisode de SL, il peut y avoir transition vers un état de SP ou d'éveil, et qu'un épisode de SP ne peut succéder qu'à un épisode de SL.

2.1.2. *Neuromodulation des états de vigilance*

L'alternance des différents états de vigilance est essentiellement assurée par la modulation de l'activité de différents systèmes neuromodulateurs diffus. L'éveil est maintenu par l'activation des cellules cholinergiques du tegmentum latéro-dorsal et pédunculopontique (LDT/PPT), des cellules histaminergiques des noyaux tubéromamillaires (TMN), des cellules noradrénergiques du *locus cœruleus* (LC), des cellules sérotoninergiques du raphé dorsal (NRD) et les cellules à hypocrétine/orexine de l'hypothalamus postérieur. Ces différentes populations de neurones constituent les centres d'éveil majeurs. Ces derniers projettent tous sur le néocortex, avec ou sans relais thalamique, contribuant alors à une activité corticale microvoltée et rapide responsable de l'activation observée à l'échelle globale sur l'EEG (Saper et al., 2010 ; Steriade, 2003).

Il a été proposé que l'entrée en SL soit déclenchée par l'inhibition coordonnée de l'ensemble des centres d'éveil principalement via l'activation de neurones GABAergiques de l'aire préoptique ventro-latérale (VLPO) de l'hypothalamus (Gallopin et al., 2000 ; Sherin et al., 1996, 1998 ; Szymusiak et al., 1998). L'activité du VLPO est notamment sous contrôle du noyau suprachiasmatique, une région fondamentale dans le contrôle du cycle circadien. Elle peut donc être régulée en fonction de l'heure de la journée permettant ainsi au SL de ne survenir que durant la période propice à cet état (Saint-Mleux et al., 2007). La libération de substances hypnogènes comme l'adénosine pourrait aussi favoriser la survenue du SL (Porkka-Heiskanen et al., 1997). En effet, l'adénosine inhibe la plupart des centres d'éveil (Liu et Gao, 2007 ; Oishi et al., 2008 ; Rainnie et al., 1994) et elle pourrait même stimuler les neurones du VLPO (Gallopin et al., 2005 ; Scammell et al., 2001). La diminution de l'activité des centres d'éveil entraîne un ralentissement de l'activité corticale au profit d'oscillations synchrones dans les boucles thalamo-corticales. En effet, lorsque l'acétylcholine cesse d'être libérée, les neurones GABAergiques du noyau réticulaire thalamique sont désinhibés et vont alors hyperpolariser les neurones thalamo-corticaux. Cette hyperpolarisation permet le déclenchement des fuseaux qui se propagent alors aux neurones cortico-thalamiques. Ces deux populations de neurones glutamatergiques sont interconnectées et possèdent également des collatérales atteignant les neurones du noyau réticulaire. Cette connectivité permet d'entretenir les oscillations, fuseaux et ondes delta, associées au SL (Saper et al., 2010 ; Steriade, 2003).

Le déclenchement et le maintien du SP passent par deux principaux mécanismes. Comme pour le SL, les neurones monoaminergiques des centres d'éveil sont maintenus inactifs pendant le SP. D'ailleurs, l'infusion dans le LC d'un neurotransmetteur spécifique à l'éveil, l'hypocrétine/orexine active les neurones du LC et diminue les quantités de SP de manière dose-dépendante (Bourgin et al., 2000). Au contraire, le système cholinergique, actif pendant l'éveil et inactif pendant le SL, se trouve être à nouveau actif pendant le SP. Cette particularité contribue, pendant le SP, à l'absence d'ondes lentes et à la modulation du rythme thêta tonique généré pendant le SP dans l'hippocampe, et dans plusieurs autres régions, notamment du para-hippocampe et de l'amygdale (Buzsáki, 2002). D'autre part, le SP apparaîtrait lors de l'activation d'une population de neurones du noyau sub-latéro-dorsal (SLD) (Boissard et al., 2002 ; Saper et al., 2010). Les fibres ascendantes et descendantes des neurones du SLD participeraient à la fois à l'activation corticale et à l'atonie musculaire observées durant ce stade de sommeil (Saper et al., 2010).

Pour résumer, l'activité conjointe des centres d'éveil monoaminergiques (sérotonine, noradrénaline, histamine) et cholinergiques assure l'éveil et permet l'activation corticale. Leur inhibition permet la genèse du SL et la cessation d'activité des centres cholinergiques favorise la mise en place des ondes lentes. Pendant le SP, il y a mise en place d'un thêta tonique dans l'hippocampe modulé par l'acétylcholine dont la libération pendant cette phase de sommeil favorise la disparition des ondes lentes (< 4Hz).

2.2. Rôle du sommeil dans les processus de mémorisation

Le sommeil n'est pas un état homogène. Au vue de la multiplicité et de la complexité des systèmes mnésiques, il est naturel de se demander comment les différents états de sommeil, SL et SP, peuvent contribuer sélectivement à certains de ces processus mnésiques. Si les premières études explorant le rôle du sommeil sur la mémoire considéraient le sommeil comme un seul phénomène, ce n'est plus le cas aujourd'hui et les principales théories mises en avant pour expliciter le rôle du sommeil dans la mémoire en tiennent compte.

2.2.1. Mise en évidence d'un lien entre sommeil et mémoire

Dès 1885, Ebbinghaus, un pionnier de la recherche expérimentale sur la mémoire qui a établit le premier une courbe d'apprentissage chez l'homme, remarque que si le sujet dort dans l'intervalle de rétention suivant la mémorisation d'une liste de mots, il s'en souvient mieux qu'un sujet qui n'a pas dormi durant cette période. Cet effet favorable du sommeil sur la

mémoire est confirmé par Jenkins et Dallenbach (Jenkins et Dallenbach, 1924) qui interprètent leurs résultats en prêtant au sommeil un simple rôle protecteur contre les interférences engendrées par de nouveaux apprentissages qui pourraient avoir lieu durant une période équivalente d'éveil. Ce rôle passif du sommeil fut ensuite remis en cause par la découverte du SP (Jouvet et al., 1959) qui, comme nous l'avons vu, est caractérisé par une activité corticale intense et un riche contenu onirique suggérant plutôt un rôle actif du sommeil dans la consolidation mnésique. Cet aspect a donc été étudié intensivement dans les années qui ont suivies la découverte du SP et nombre de données ont été acquises chez les rongeurs.

Chez le rongeur, on observe une augmentation significative des quantités de SP suivant une variété de tâches d'apprentissages ou une exposition à un environnement enrichi (Rasch et Born, 2013 ; Smith, 1995). L'augmentation des quantités de SP par administration d'agents pharmacologiques ou par rebond après privation spécifique de SP améliore les performances des animaux dans un test de mémoire spatiale (Ravassard et al., sous presse ; Wetzel et al., 2003). Inversement, une privation de SP post-apprentissage entraîne une altération des performances mnésiques dans une tâche de conditionnement contextuel à la peur confirmant un rôle important du SP dans la mémoire (Ravassard et al., sous presse). D'autre part, la densité des fuseaux ainsi que le nombre de SW-R survenant lors du SL augmente après une tâche de discrimination olfactive (Eschenko et al., 2006) et cette modification du SL n'est pas observée chez les animaux qui ont échoué à apprendre la tâche (Eschenko et al., 2008) suggérant un effet cognitif de cette modification de l'architecture du SL sur la mémoire.

Cependant, toutes les formes de mémoire ne semblent pas affectées de la même manière par le sommeil. Ainsi, chez l'animal, les effets de privation de SP comme l'augmentation de SP post-apprentissage sont d'autant plus importants que la tâche est complexe. Au contraire, les performances lors de tâches simples ne sont pas affectées (Hennevin et al., 1995). D'autre part, le SP semble avant tout favoriser chez l'animal, les mémoires dépendantes de l'hippocampe (Prince et Abel, 2013). L'apprentissage spatial dans le labyrinthe aquatique de Morris se déroule en deux étapes, une phase visible qui ne dépend pas de l'hippocampe, où l'animal apprend à monter sur une plateforme indicée et une phase spatiale dépendante de l'hippocampe, où l'animal doit utiliser des repères contextuels et spatiaux pour localiser une plateforme cachée submergée dans l'eau opaque. Il a été montré que seules les performances dans la version spatiale de la tâche sont altérées par une privation de SP post-apprentissage (Smith et Rose, 1996, 1997). De la même manière, la privation de SP provoque une

diminution de la rétention dans une tâche de conditionnement contextuel à la peur, dépendante de l'hippocampe mais pas lors d'une tâche de conditionnement à la peur auditif (ou indicé) qui ne dépend pas de l'hippocampe (McDermott et al., 2003 ; Ruskin et al., 2004). Chez l'homme, des privations partielles de première partie (riche en SL) ou seconde partie de nuit (riche en SP) ont permis de mettre en évidence un rôle propre du SP et du SL dans la consolidation de différentes formes de mémoires. Divers paradigmes mettant en jeu des formes de mémoire déclarative ont révélé que le SL facilite ce type d'apprentissage. Les sujets qui ont bénéficié de SP post-apprentissage (par rapport aux privés de sommeil total et aux privés de SP) réalisent de meilleures performances lors des tests de rappel pour des apprentissages émotionnels et procéduraux (Diekelmann and Born, 2010 ; Hu et al., 2006 ; Karni et al., 1994 ; Plihal and Born, 1997 ; Rasch et al., 2009).

Ainsi, le sommeil contribue de manière active aux processus de consolidation mnésique et ce, de manière différente selon le type de mémoire mis en jeu. Cependant, si ces études comportementales ont montré un lien entre le sommeil et la mémoire, elles ne nous révèlent pas les mécanismes mis en jeu.

2.2.2. Modèles intégrés de la contribution du sommeil dans la mémoire

Deux théories principales ont été avancées pour expliquer le rôle du sommeil sur la mémoire. Selon la théorie de la réactivation des traces mnésique, le sommeil favoriserait la stabilisation de l'information de manière durable et son transfert vers les registres de mémoire à long terme en induisant sa réactivation. Les profils d'activité cérébrale associés à un nouvel apprentissage seraient ainsi "rejoués" au cours du sommeil qui suit cet apprentissage. Cette proposition d'une consolidation très spécifique des traces mnésiques pendant le sommeil est contrebalancée par la théorie de l'homéostasie synaptique (SHY pour *Synaptic Homeostasis hYpothesis*) qui propose cette fois un rôle général et aspécifique du sommeil. Selon cette théorie, les processus de plasticité cérébrale donnent lieu, durant l'éveil, à une potentialisation synaptique dans les réseaux corticaux associés à l'apprentissage. Celle-ci serait suivie d'une dépotentialisation globale au cours du sommeil permettant au réseau d'encoder de nouvelles informations lors du réveil. Le modèle dynamique de la consolidation mnésique pendant le sommeil a tenté d'intégrer la plupart des différents résultats issus des recherches sur le rôle du sommeil sur la mémoire en donnant des rôles distincts aux différents états de sommeil. Mais tout d'abord, voici un bref exposé de ces deux théories.

2.2.2.1. La théorie de l'homéostasie synaptique pendant le sommeil (SHY)

En se basant essentiellement sur des recherches faites sur l'animal, Tononi et Cirelli ont proposé l'hypothèse de l'homéostasie synaptique (SHY pour *Synaptic Homeostatis hYpothesis*, Tononi et Cirelli, 2003, 2006) qui relie la régulation homéostatique du sommeil à la capacité d'apprentissage du cerveau et aux mécanismes de plasticité synaptiques. De façon générale, les activités quotidiennes durant l'éveil (stimulations sensorielles, processus cognitifs,…) qui constituent autant de nouvelles informations produiraient une augmentation (ou potentialisation) de la force synaptique, c'est-à-dire un renforcement voire une augmentation du nombre de connections synaptiques entre les neurones du réseau (*synaptic upscaling*) de la mémoire. Le sommeil permettrait ensuite une dépotentialisation synaptique (*synaptic downscaling*) globale à travers le réseau nécessaire pour contrer la potentialisation synaptique induite par l'activité de l'éveil qui finirait par excéder les ressources disponibles en énergie et en espace (**Fig. 8**). Un réseau ainsi saturé ne serait plus plastique et ne permettrait plus l'encodage de nouvelles informations. L'activité des ondes lentes pendant le SL reflèterait cette régulation des processus synaptiques. En effet, leur amplitude est maximum en début de sommeil ce qui serait le marqueur d'une synchronie importante dans un réseau fortement potentialisé. Cette amplitude des ondes lentes diminue ensuite progressivement au cours du SL. Les ondes lentes serait aussi, en elles-mêmes, un mécanisme de dépotentialisation puisque leur faible fréquence et leur nature répétée pourrait favoriser une diminution de la force synaptique. En effet, il a été montré *in vitro* que des synapses potentialisées par induction de LTP peuvent être dépotentialisées (i.e. retour à leur état basal) par une stimulation de basse fréquence prolongée (Barrionuevo et al., 1980). Le sommeil aurait ainsi une fonction restauratrice au niveau cérébral, permettant aux neurones de se préparer à recevoir et à traiter de nouvelles informations motrices, sensorielles et cognitives. Les effets positifs du sommeil seraient alors dus à une augmentation du ratio signal sur bruit pour les traces mnésiques consolidées. Quelques études chez la drosophile et le rongeur ont amené des arguments expérimentaux en faveur de cette hypothèse (Pour revue, voir Tononi et Cirelli, 2014). Chez le rat, la pente et l'amplitude de réponses à la stimulation des fibres calleuses du cortex frontal, augmente pendant l'éveil et diminue après une période de sommeil et ces changements sont corrélés avec l'activité des ondes lentes (Vyazovskiy et al., 2008, 2009). Cependant des études récentes nuancent ces résultats. Chez le chat notamment, les réponses du cortex somato-sensoriel évoquées par une stimulation des fibres du lemnisque médian augmentent lors de l'éveil suivant le premier épisode de SL et ne sont plus modifiées par les épisodes suivants de SL (Chauvette et al., 2012). Chez le rat, les taux de décharge de neurones

hippocampiques augmentent progressivement pendant les épisodes de SL parallèlement à une augmentation de leur synchronie culminant lors des SW-R (Grosmark et al., 2012). Gan et collaborateurs ont montré qu'il y a une augmentation du nombre de synapses dans le cortex moteur pendant le SL suivant un apprentissage moteur, ce qui n'est pas compatible avec SHY (Yang et al., 2014). Ces résultats suggèrent que, si certains jeux de connexions sont dépotentialisés ce n'est pas le cas pour tous. De plus, actuellement, on ne sait pas si la transmission synaptique inhibitrice est elle aussi modifiée pendant le sommeil. L'hypothèse SHY est intéressante par sa simplicité mais elle ne permet pas d'intégrer de nombreux résultats publiés. Elle ne permet pas notamment d'expliquer des mécanismes locaux de potentialisation et de stabilisation des traces mnésiques qui auraient lieu lors d'évènements particuliers tels les SW-R hippocampiques (Born et Feld, 2012).

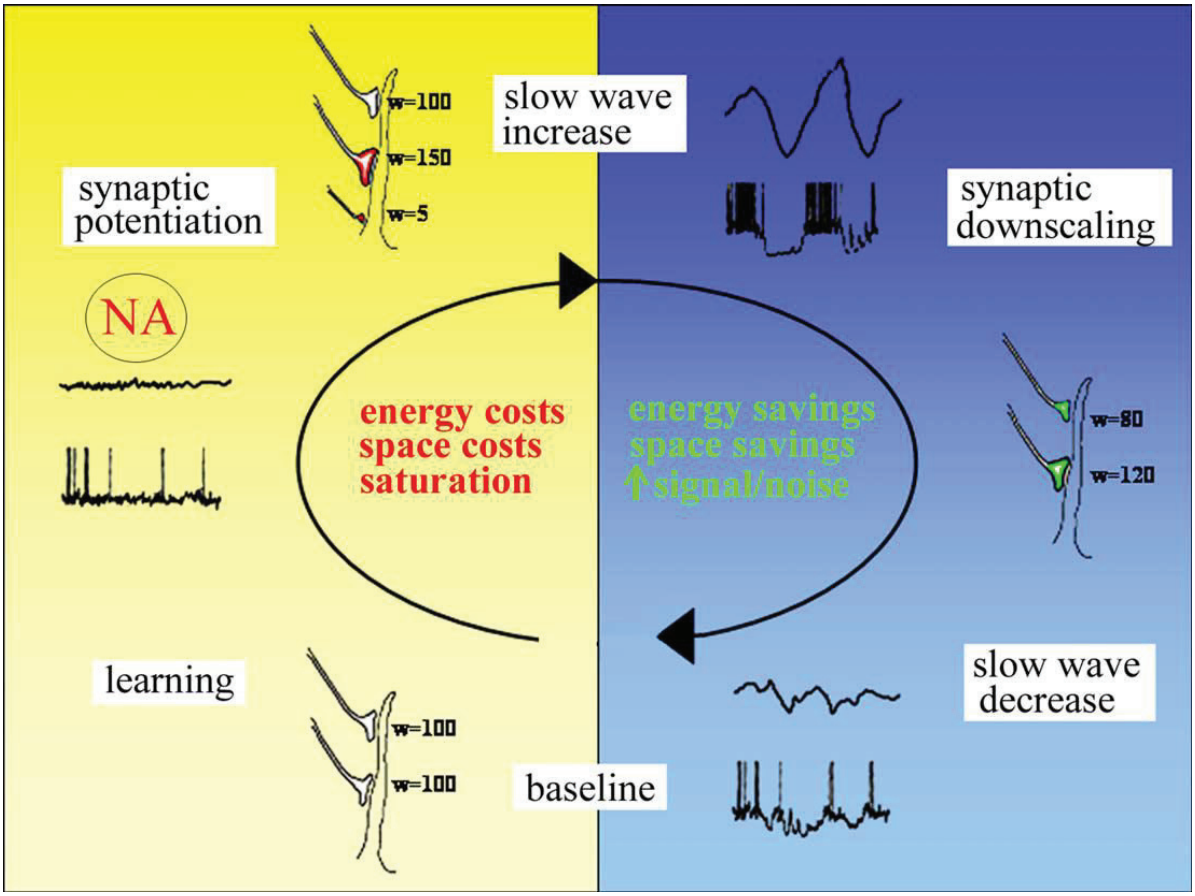


Figure 8. Théorie de l'homéostasie synaptique (SHY). Durant l'éveil, les différents processus d'apprentissage augmenteraient la force synaptique (potentialisation synaptique) conduisant à une saturation des réseaux de la mémoire. D'après SHY, le rôle du sommeil serait alors de recalibrer les synapses afin de conserver les traces mnésiques les plus importantes mais effacer des informations non-essentielles en induisant une dépotentialisation synaptique globale permettant de supprimer les synapses faiblement potentialisés (correspondant aux apprentissages non pertinents) tout en laissant les synapses les plus potentialisées. Ce mécanismes aurait lieu pendant les ondes lentes. Ces dernières, survenant pendant le SL, seraient alors homéostatiquement régulées par le niveau de potentialisation qui a eu lieu durant la période d'éveil précédente. Ainsi plus la potentialisation synaptique serait importante au cours de l'éveil, plus l'activité des ondes lentes serait importante pendant le sommeil suivant. (D'après Tononi et Cirelli, 2006).

2.2.2.2. Réactivations des traces mnésiques pendant le sommeil

La théorie des réactivations des traces mnésiques suggère que la consolidation des traces mnésiques se base sur une réactivation, durant la nuit de sommeil, du réseau neuronal impliqué dans l'apprentissage qui permettrait de transformer les traces mnésique d'un état labile et susceptible aux interférences à un état stable, et de favoriser leur transfert vers le registre de mémoire à long terme décrit dans le modèle standard de consolidation. Ces réactivations apparaissent de manière répétées pendant l'éveil calme et le sommeil ce qui pourrait promouvoir une intégration progressive de ces nouvelles traces mnésiques dans les réseaux préexistant de la mémoire à long terme sans écraser les mémoires plus anciennes. Dans cette partie, nous ne détaillerons que les résultats obtenus chez les rongeurs, modèle de notre étude.

Cette hypothèse provient de différentes études électrophysiologiques menées chez le rongeur où l'activité des cellules de lieu dans l'hippocampe est enregistrée pendant et suivant des tâches de navigation spatiale. Comme nous l'avons vu précédemment, lorsque l'animal court le long d'un chemin particulier, il y a formation d'une séquence particulière d'activation de cellules de lieu permettant la mémorisation de l'environnement spatial. Or il se trouve que l'activité particulière de ces neurones peut être "rejouée" à l'envers pendant l'éveil calme suivant l'exploration (Foster et Wilson, 2006) et à l'endroit (et donc dans la même séquence) au cours des phases de sommeil qui suivent l'exploration (Skaggs et McNaughton, 1996 ; Wilson et McNaughton, 1994). Ceci suggère que l'apprentissage induit, pendant l'éveil, une stabilisation précoce des traces mnésique dont le traitement serait achevé durant les phases consécutives du sommeil. Ces réactivations de séquences pendant le sommeil sont néanmoins reproduites à un rythme accéléré de manière moins précise et ont lieu préférentiellement lors du SL (Nádasdy et al., 1999). De plus, elles sont observées majoritairement en concomitance avec les SW-R, comme celle de l'éveil (Nakashiba et al., 2009). Dans une étude, des réactivations neuronales ont été observées au cours du SP avec le même décours temporel qu'à l'éveil (Louie et Wilson, 2001). De manière intéressante, les cellules de lieu encodant une information familière sont réactivées préférentiellement pendant la phase descendante des oscillations thêta, alors que les cellules encodant de nouvelles informations déchargent pendant la phase ascendante de ces oscillations. Ainsi, le SP pourrait aider, dans l'hippocampe, à effacer des informations devenues familières en dépotentialisant les circuits synaptiques associés mais potentialiserait ceux qui encodent de nouvelles informations (Poe et al., 2000).

Si on bloque l'apparition des SW-R post-apprentissage, il y a une diminution significative des réactivations dans l'hippocampe (Nakashiba et al., 2009) et les performances lors d'un test de conditionnement contextuel à la peur (Nakashiba et al., 2009) ou d'un apprentissage spatial (Ego-Stengel et Wilson, 2010 ; Girardeau et al., 2009) sont réduites lors du rappel suggérant un rôle cognitif de ces réactivations dans la consolidation mnésique. Néanmoins, si les réactivations neuronales favorisent la redistribution des traces mnésiques du registre temporaire (hippocampe) au registre à long terme (néocortex), elles devraient avoir lieu dans d'autres structures que l'hippocampe. En effet, chez le rat, conjointement aux réactivations observées dans les assemblées de cellules hippocampiques, sont observées des réactivations dans les cortex préfrontal, pariétal et visuel ainsi que dans des régions sous-corticales (striatum ventral, thalamus, noyau accumbens) après des tâches d'apprentissages spatiaux (Ahmed et al., 2008 ; Euston et al., 2007 ; Ji et Wilson, 2007 ; Qin et al., 1997 ; Ribeiro et al., 2004). De plus, il a été montré par des études de corrélations croisées (*cross-correlation*) que les réactivations observées au niveau du cortex préfrontal sont précédées de peu par celles qui ont lieu dans l'hippocampe pendant les SW-R (Wierzynski et al., 2009) confortant ainsi l'idée d'un transfert progressif des traces mnésiques de l'hippocampe vers le néocortex.

Ainsi, l'étude des réactivations des traces mnésiques et leur impact sur les performances mnésiques semblent indiquer que des mécanismes de renforcement mnésique surviennent lors des sommeils lent et paradoxal. En revanche, ces réactivations n'interviennent pas de la même façon durant le SL et le SP, suggérant une contribution différente de ces deux phases de sommeil au traitement "hors ligne" des traces mnésiques qui achèveraient leur consolidation.

2.2.2.3. Le modèle de consolidation systémique active

Une des principales hypothèses avancées actuellement pour expliquer les phénomènes de consolidation mnésique pendant le sommeil est celle de la consolidation systémique active qui s'articule autour d'un dialogue en deux étapes entre hippocampe et néocortex et prête un rôle complémentaire au SL et au SP (Buzsáki, 1996, 1998 ; Diekelmann et Born, 2010 ; Rasch et Born, 2013) (**Fig. 9**). L'hypothèse d'un tel dialogue s'intègre dans la conception de la consolidation mnésique selon laquelle l'hippocampe permettrait l'acquisition et le stockage à court terme des traces mnésiques qui seraient ensuite transférées vers le néocortex pour un stockage à long terme. Dans ce modèle, l'acquisition et l'encodage des informations, ainsi que l'initiation de la consolidation mnésique, s'effectueraient pendant l'éveil dans le LTM, essentiellement dans l'hippocampe. Les réactivations répétées des traces mnésiques pendant le

sommeil permettrait ensuite leur stabilisation via des mécanismes cellulaires (consolidation synaptique) et leur intégration dans les réseaux de la mémoire via leur transfert progressif vers le néocortex (consolidation systémique). Les ondes lentes du SL guideraient le déclenchement, lors de leur phase ascendante, des réactivations neuronales pendant les SW-R dans l'hippocampe et pendant les fuseaux de sommeil qui, de part leur nature thalamo-corticale, permettraient la redistribution à l'échelle systémique des traces mnésiques. En effet, le sommeil favorise l'intégration de nouvelles représentations dans le réseau existant lors de tâches lexicales, et cet effet est associée à une augmentation de la densité des fuseaux de sommeil chez l'homme (Tamminen et al., 2010). Chez le rat, on observe aussi une augmentation du nombre de fuseaux après l'apprentissage ou le rappel d'une tâche de discrimination olfactive (Eschenko et al., 2006) (Pour revue : Rasch et Born, 2013). De plus, les SW-R hippocampiques sont associés au "creux" des fuseaux de sommeil (Sirota et al., 2003) ce qui suggère bien une synchronie des réseaux de l'apprentissage propice à la réorganisation des traces mnésiques dans les différents registres de la mémoire. Ce modèle de consolidation systémique active pendant le sommeil permet aussi d'intégrer l'idée d'un sommeil qui permettrait le recalibrage des synapses des réseaux de la mémoire en postulant que les ondes lentes permettraient l'alternance entre des processus homéostatiques globaux (dépotentialisation) favorisés lors de leur phase descendante et des processus de consolidation par intégration des traces mnésiques dans les registres de mémoire à long terme lors de leur phase ascendante permettant ainsi une vraie optimisation dynamique du rapport signal sur bruit (Born et Feld, 2012).

Une hypothèse au centre de la théorie de la consolidation systémique active est que cette dernière est sélective. Il serait en effet absurde de consolider de manière globale toutes les traces mnésiques nouvellement acquises car le système serait rapidement saturé. Le SP participerait ainsi à la consolidation de la mémoire à une échelle plus locale (synaptique) au sein des réseaux (Rasch et Born, 2013 ; Ribeiro et al., 2007 ; Siegel, 2001) en y favorisant l'augmentation de la force synaptique. Il a, en effet, été montré qu'une privation sélective de SP après l'acquisition d'un conditionnement contextuel à la peur altère les performances des animaux au rappel et l'induction de LTP dans l'hippocampe dorsal *in vitro* tandis qu'un rebond de SP, non seulement restaure, mais facilite la consolidation de la tâche et l'induction de LTP (Ravassard et al., sous presse). Cette potentialisation des réseaux se ferait possiblement grâce aux oscillations thêta dans l'hippocampe (Buzsáki, 2002). En effet, les épisodes de SP induisent une augmentation de la synchronie de la décharge des neurones hippocampiques

corrélée au rythme thêta (Grosmark et al., 2012). Les oscillations thêta permettraient alors la stabilisation et le renforcement spécifiquement des synapses réactivées pendant le SL. En accord avec cette idée de consolidation sélective, de nombreuses études montrent que le sommeil ne bénéficie pas de la même manière à toutes les traces mnésiques. Les performances lors d'une tâche lexicale ou d'apprentissage spatial chez l'homme, sont améliorées par un sommeil post-apprentissage uniquement si on informe les sujets qu'il y aura un rappel (van Dongen et al., 2012 ; Wilhelm et al., 2011). Les performances lors de tâches de séquence motrice du type *finger tapping* sont également améliorées si l'on promet une récompense monétaire au sujet (Fischer et Born, 2009). Ceci suggère que seules les mémoires nouvellement formées dont on s'attend à ce qu'elles soient utiles dans le futur ou associées à une récompense, sont consolidées. Notons que, chez l'animal, l'apprentissage de la plupart des tests comportementaux est motivé par une récompense. Enfin, l'attribution d'une tonalité émotionnelle à un apprentissage représenterait aussi un bon moyen de sélectionner l'information à consolider pendant le sommeil.

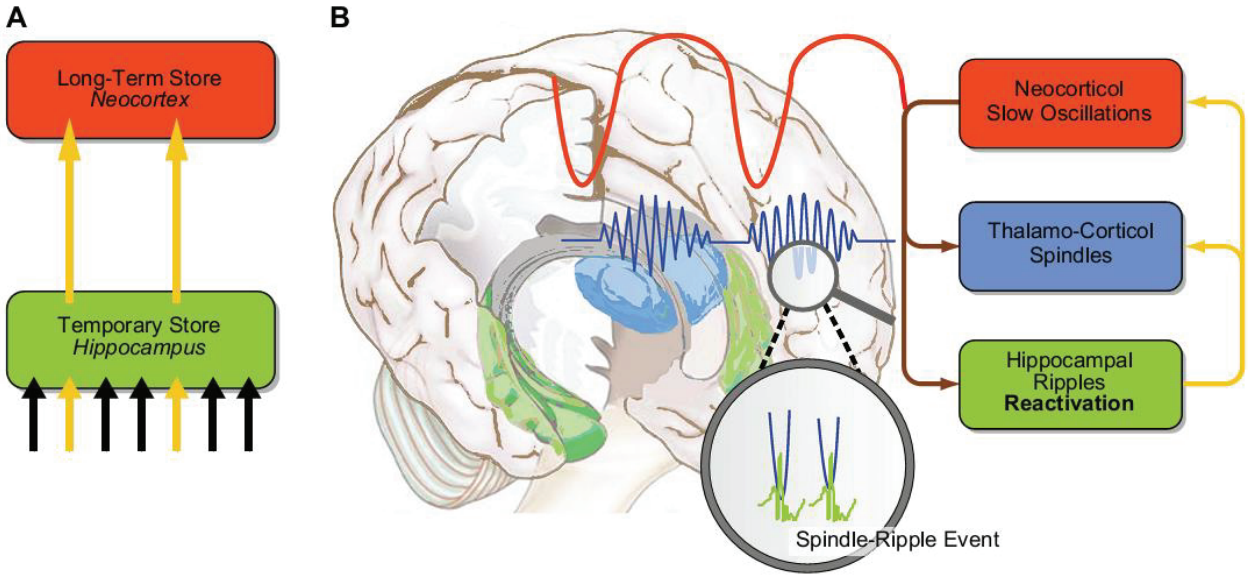


Figure 9. Modèle de consolidation systémique active pendant le sommeil. .A. Les traces mnésiques nouvellement encodées et encore labiles sont stockées temporairement dans l'hippocampe. Pendant le sommeil, elles seraient alors consolidées et leur réactivation répétée permettrait alors leur redistribution vers le néocortex **B.** La consolidation systémique pendant le SL reposerait sur un dialogue entre le néocortex et l'hippocampe guidé par les ondes lentes néocorticales (rouge). Ces dernières engendreraient le déclenchement, lors de leur phase ascendante, des réactivations neuronales pendant les SW-R (vert) dans l'hippocampe et pendant les fuseaux de sommeil (*spindles*, bleu). Ainsi les traces mnésiques réactivées pendant les SW-R pourraient être redistribuées à l'échelle systémique grâce aux fuseaux de sommeil thalamo-corticaux (D'après Rasch et Born, 2013).

2.2.3. Sommeil paradoxal et mémoire émotionnelle

De nombreux travaux ont montré un effet facilitateur du sommeil et particulièrement du SP, sur la mémoire émotionnelle chez l'homme (ex : Hu et al., 2006 ; Payne et al., 2008 ; Wagner et al., 2001). Ainsi la rétention de texte à contenu émotionnel est renforcée suite à une période de sommeil riche en SP par rapport à une période de sommeil riche en SL. Cet effet bénéfique du SP n'est pas observé pour la rétention de texte neutre (Wagner et al., 2001). Chez les rongeurs, des privations de SP avant ou après une tâche de conditionnement contextuel à la peur dépendante de l'hippocampe, altèrent les performance au rappel (Ravassard et al., sous presse ; Ruskin et al., 2004). Cet effet a été répliqué pour des tâches d'évitement passif et actif (Silva et al., 2004) et de labyrinthe aquatique de Morris (Smith and Rose, 1997) qu'on peut considérer comme émotionnelles du fait de leur nature aversive. Le SP semble donc être un état privilégié pour la consolidation de la mémoire émotionnelle. Il a, en effet, été montré chez l'homme que, lors d'une sieste suivant un apprentissage au contenu émotionnel, les quantités de SP et l'activité thêta corticale sont corrélées positivement à un gain de performances (Nishida et al., 2009). Cela suggère que l'activité neuronale pendant le SP pourrait faciliter la consolidation mnésique de nature émotionnelle.

Comme on l'a vu précédemment, la formation et l'expression de la mémoire émotionnelle s'appuie sur un réseau neurobiologique, le circuit hippocampo-amygdalien. Or ce dernier est activé sélectivement pendant le SP comme le montre des études en neuroimagerie chez l'homme (Maquet, 1999) et des études de gènes d'expression précoce chez le rongeur (Ribeiro et al., 1999, 2002). Ces résultats suggèrent aussi qu'il y a une modulation de l'activité cérébrale au niveau cellulaire pendant le SP. Par ailleurs, suite à une tâche de conditionnement à la peur, il y a une augmentation de la cohérence du thêta entre l'amygdale et l'hippocampe pendant le SP corrélée positivement à l'efficacité de la consolidation mnésique (Popa et al., 2010). Ainsi un apprentissage émotionnel permet la réactivation du circuit hippocampo-amygdalien pendant le SP assurant ainsi un dialogue dynamique qui serait un facteur important dans la réorganisation des réseaux de l'amygdale et de l'hippocampe. De plus, ces résultats suggèrent que le circuit hippocampo-amygdalien dans son ensemble participe activement aux processus de consolidation systémique des mémoires émotionnelles.

Cependant si le sommeil aide à la consolidation des information émotionnelles et particulièrement des informations aversives, des observations comportementales simples, telles que l'augmentation de l'irritabilité suite à une privation de sommeil, ont pointé du doigt

un rôle fondamental du sommeil dans la gestion des émotions chez l'homme (Horne, 1985). Le manque de sommeil semble donc amplifier les émotions à valence négative. La présentation d'une série d'images présentant un gradient émotionnel allant de neutre à extrêmement aversif après privation ou non d'une nuit de sommeil conduit à une augmentation de plus de 60% de l'activité dans l'amygdale chez les sujets privés par rapport aux sujets non-privés (Yoo et al., 2007). La connectivité entre l'amygdale et le mPFC, une région supposée exercer un contrôle descendant, inhibiteur, sur l'amygdale, est diminuée chez les sujets privés tandis que la connectivité entre l'amygdale et les régions engagées dans les fonctions viscérales est augmentée. Dormir permettrait donc de corriger, via les connections mPFC-amygdale, l'attribution d'une tonalité négative à un souvenir afin de gérer le stress potentiellement engendré par l'évocation mentale de ce souvenir. Or, il a été observé chez des patients atteints de dépression ou de stress post-traumatique, deux maladies associées à une mauvaise gestion du stress, des perturbations du cycle de sommeil et du SP en particulier (Davidson et al., 2002 ; New et al., 2007). Les patients souffrant de dépression présentent ainsi des insomnies associées à une déstructuration du sommeil. Il y a ainsi augmentation des quantités de SP en début de nuit et une diminution de la latence d'entrée en SP. Leur manque de sommeil conduirait ainsi à un encodage des évènements aversifs et à une réactivité émotionnelle forte. Ces informations à valence négative seraient alors consolidées lors d'épisodes de SP ultérieurs.

Ces observations chez l'homme, ont conduit Walker et Van Der Helm à proposer la théorie "dormir pour oublier, dormir pour se rappeler" (*sleep to forget, sleep to remember*, Walker et van der Helm, 2009) (**Fig. 10**). Elle suppose que le SP, après une expérience émotionnelle aversive, favoriserait le renforcement du contenu (déclaratif) d'une représentation mnésique donnée, le vécu de l'expérience proprement dit, tout en diminuant le tonus émotionnel qui y est associé via la réactivation des structures du circuit hippocampo-amygdalien. Ainsi, le rappel un an plus tard d'un souvenir émotionnel, conduit à une augmentation de l'activité dans l'hippocampe mais pas dans l'amygdale alors que celle-ci était présente lors de l'encodage (Dolcos et al., 2004, 2005). Il y aurait ainsi un découplage progressif entre hippocampe (aspects déclaratif et contextuel du souvenir émotionnel) et amygdale (émotion). Or, pendant la nuit suivant un apprentissage, il y a une diminution de l'activité de l'amygdale pendant le SP. Ce découplage semble donc bien être dépendant du SP (van der Helm et al., 2011). La mémoire de l'évènement émotionnel et de son contexte spatio-temporel serait ainsi conservée au niveau de l'hippocampe tandis que les réactions émotionnelles originellement associées à

l'événement diminueraient avec le désengagement de l'amygdale. De plus, l'encodage d'une mémoire épisodique émotionnelle est influencée par des concentrations élevées de neuromodulateurs propres à la réaction physiologique engendrée par l'expérience (stress par exemple), qui faciliterait sa consolidation en la rendant plus robuste qu'une mémoire à contenu neutre (McGaugh, 2004). En l'absence de ces facteurs synergiques, le rappel ultérieur de l'expérience émotionnelle conduirait à un effacement progressif d'une tonalité affective devenue non pertinente tandis que l'information en elle-même continuerait à être consolidée. Les patients atteints de dépression ou de stress post-traumatique présenteraient ainsi une altération de cette fonction protectrice du SP conduisant à une consolidation biaisée des contenus négatifs.

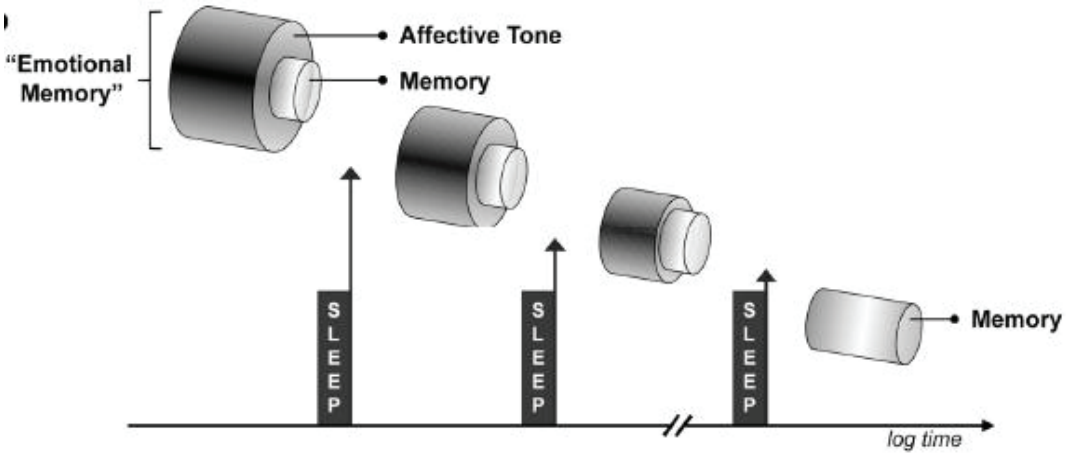


Figure 10. Théorie "dormir pour oublier, dormir pour se rappeler". Au cours des épisodes de SP la nuit suivant (et aussi les nuits successives) un apprentissage émotionnel, il y aurait découplage progressif entre l'hippocampe et l'amygdale dû à leur réactivation en l'absence des facteurs synergiques (hormones de stress par ex) présents lors de l'association entre le stimulus émotionnel et le la mémoire de l'évènement à proprement parlé. Cela conduirait d'abord à une consolidation et donc une rétention de l'information saillante émotionnelle puis à une diminution de la charge affective. Cela limiterait, lors du rappel de l'information émotionnelle, la réactivation des émotions éprouvées lors de l'encodage de cette information, empêchant ainsi l'établissement d'un état d'anxiété chronique.

Le SP jouerait donc un rôle facilitateur dans la consolidation des informations de nature émotionnelle et, de facto, dans la modulation de l'activité du circuit hippocampo-amygdalien et plus particulièrement de hippocampe. Cet état de vigilance est caractérisé par un ensemble de neuromodulateurs et d'hormones dont la libération peut influencer la consolidation mnésique en modifiant la force synaptique au sein du réseau hippocampique. Ce dernier représente donc un modèle idéal pour comprendre les mécanismes synaptiques de la régulation de la mémoire par le SP.

3. Un modèle cellulaire de la mémoire : plasticité synaptique dans l'hippocampe

La consolidation synaptique met en jeu une série de modifications synaptiques et cellulaires au niveau de l'hippocampe sous-tendant la stabilisation des traces mnésiques et leur réactivation, notamment pendant le sommeil. Ces modifications pourraient être le reflet de mécanismes de plasticité synaptique, c'est-à-dire la capacité à moduler la force de connexion entre des neurones donnés (Morris, 2006). Il a, en effet, été postulé que les traces mnésiques pourraient être encodées dans des ensembles de neurones dont les synapses seraient modifiées par l'apprentissage. Ces changements de poids synaptiques persisteraient à travers le temps et assureraient la stabilisation et la récupération de la trace mnésique (Morris, 2006). Cette hypothèse trouve ses racines dans de nombreux travaux proposant la plasticité synaptique, c'est-à-dire l'ensemble des modifications morphologiques et fonctionnelles des connexions entre neurones, comme un corrélat cellulaire de la mémoire. Il existe trois grandes catégories de plasticité synaptique : 1) la plasticité homéostatique, qui prend place au niveau cellulaire et synaptique, permettrait aux circuits neuronaux de maintenir un niveau d'excitabilité et de connectivité optimal malgré les changements de plasticité induits par l'expérience (Burrone et Murthy, 2003). C'est cette forme de plasticité qui serait mise en place pendant le sommeil selon l'hypothèse SHY ; 2) la plasticité à court terme consiste en une modification transitoire de la transmission synaptique, elle assurerait ainsi les modifications dynamiques des propriétés de la synapse nécessaires au traitement de l'information (Abbott et Regehr, 2004) ; et enfin 3) la plasticité à long terme correspond aux changements synaptiques et cellulaires persistants considérés comme à la base des principaux mécanismes d'apprentissage et de mémoire. Ces processus de plasticité synaptique seraient ensuite régulés de manière plus globale par la métaplasticité, c'est-à-dire la plasticité de la plasticité. Cette dernière est définie comme l'ensemble des modulations persistantes et dépendantes de l'activité qui influenceront la direction, la durée et l'amplitude des changements synaptiques futurs. Les apprentissages dépendent en effet de l'expérience passée. La métaplasticité, régulée de manière dynamique par l'activité passée, pourrait ainsi préparer les réseaux neuronaux à encoder de nouvelles informations en vue d'un futur apprentissage (Finnie et Nader, 2012 ; Hulme et al., 2013). Une forme de métaplasticité correspond à ce qui a été regroupé sous le terme de loi de Bienenstock Cooper Munro (BCM). Cette loi décrit de manière relativement précise (sans proposer d'explication) la susceptibilité qu' un réseau cérébral de pouvoir réaliser une LTD ou

LTP en fonction du niveau d'activité passée globale de ce dernier (Bienenstock et al., 1982 ; Cooper et Bear, 2012).

De nombreuses études ont montré la contribution de la plasticité synaptique à long terme hippocampique dans les processus de consolidation dépendants du sommeil (Abel et al., 2013 ; Rasch et Born, 2013 ; Ravassard et al., 2014). Or, la plasticité à court terme participe aux mécanismes de plasticité à long terme. Ces deux formes de plasticité synaptique sont donc d'excellents candidats pour étudier le rôle du sommeil sur la mémoire. Bien que la métaplasticité joue également un rôle important dans la maintenance de la mémoire (Finnie et Nader, 2012 ; Hulme et al., 2013), ses différents processus sont encore mal connus. Nous ne nous focaliserons donc dans nos travaux que sur les deux premières. Nous présenterons ici leurs mécanismes dans l'hippocampe et leurs rôles possibles dans la consolidation mnésique dépendante du sommeil et plus particulièrement du SP.

3.1. La plasticité synaptique comme substrat cellulaire de la mémoire

Les réseaux de neurones communiquent entre eux via les synapses. Fort de cette observation, Ramon y Cajal avait déjà suggéré en 1894 que la perception d'un évènement générait des changements d'activité neuronale capables de modifier les synapses sur le long terme (Bliss et Collingridge, 1993). Cette idée a été reprise et étoffée par le psychologue D.Hebb en 1949 (Hebb, 2002) qui propose que l'apprentissage est sous-tendu par une règle de détection de coïncidence permettant de renforcer la connexion entre deux neurones actifs au même moment. Considérons le cas d'un réseau neuronal simple, à savoir deux neurones reliés par une connexion excitatrice. Selon cette hypothèse, lorsque la libération de neurotransmetteur par le neurone pré-synaptique et l'émission d'un potentiel d'action par le neurone post-synaptique coïncident de façon répétée ou persistante, l'efficacité de la synapse sera augmentée de façon durable. Ainsi, le déclenchement de l'activité post-synaptique par le neurone pré-synaptique s'accompagnerait d'une potentialisation de la réponse synaptique (**Fig.11**). Inversement, bien que non prévu par Hebb au départ, s'il y a libération de neurotransmetteur par le neurone pré-synaptique en absence d'activité post-synaptique, l'efficacité synaptique pourrait être diminuée comme proposé par différents auteurs (Sejnowski, 1977 ; Stent, 1973). Ce mécanisme permettrait d'éviter la saturation des synapses en engendrant une dépression de la réponse synaptique. On parle dans les deux cas de plasticité hebbienne de longue durée. L'existence de ces deux phénomènes a depuis été

démontrée : il s'agit de la potentialisation de longue durée ou LTP (*long-term potentiation*) et de la dépression de longue durée ou LTD (*long-term depression*).

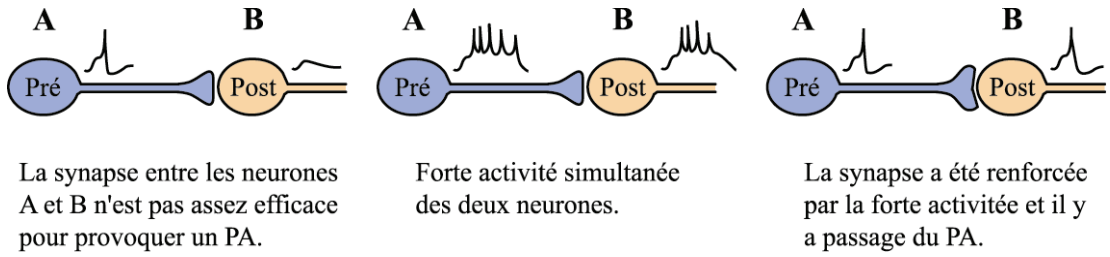


Figure 11. Augmentation de l'efficacité synaptique selon la loi de Hebb.

3.2. Plasticité à long terme dans les réseaux excitateurs de l'hippocampe

La plasticité synaptique de longue durée est étudiée de manière privilégiée grâce aux techniques d'électrophysiologie qui permettent d'enregistrer la transmission synaptique au cours du temps. On peut induire la modification de la transmission par l'application d'agents pharmacologiques ou de protocoles variés de stimulation de l'activité neuronale. On pourra ainsi examiner la potentialisation ou la dépression de la réponse synaptique excitatrice en mesurant le potentiel post-synaptique excitateur ou PPSE et ses changements en réponse à une stimulation pré-synaptique. La plasticité synaptique de longue durée, peut potentiellement s'exprimer au niveau de n'importe quelles synapses excitatrices ; elle a d'ailleurs été caractérisée au niveau de l'amygdale, du néocortex et de l'hippocampe (Citri et Malenka, 2008). Nous avons vu précédemment que l'aire CA1 est particulièrement impliquée dans la consolidation mnésique. Or les cellules pyramidales de CA1 sont innervées par les cellules pyramidales de CA3 via les collatérales de Schaffer de nature glutamatergique (synapses SC-CA1). Le blocage de la transmission excitatrice chez le rongeur par l'injection intra-hippocampique d'antagonistes aux récepteurs du glutamate ou l'utilisation de modèles génétiques ciblant ces mêmes récepteurs, entraîne des déficits dans des tâches comportementales dépendantes de l'hippocampe suggérant que cette transmission glutamatergique est essentielle à la formation des traces mnésiques (ex : Quinn et al., 2005 ; Schmitt et al., 2005). Nous utiliserons donc cette synapse comme modèle dans nos travaux de thèse. Nous présenterons notamment une partie des mécanismes de plasticité à long terme qui y prennent place. Il existe, en effet, plusieurs formes de plasticité à long-terme prenant place au niveau des synapses SC-CA1, et plus encore dans d'autres circuits (Citri et Malenka, 2008). Les formes les mieux connue de plasticité à long terme (LTP et LTD) dépendent de

l'activation des récepteurs post-synaptiques au glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Dudek et Bear, 1992) et c'est celles-ci que nous présenterons et étudierons tout au long de ce manuscrit.

3.2.1. La potentialisation à long terme de la transmission synaptique (LTP)

Bliss et Lomo ont démontré expérimentalement pour la première fois l'hypothèse hebbienne, en découvrant l'existence d'un mécanisme physiologique de plasticité à long terme, la LTP, dans le gyrus denté de lapin (Bliss et Lømo, 1973). Ils montrèrent ainsi que la stimulation à haute fréquence (100Hz, 1s) de la voie perforante induit une potentialisation durable des réponses synaptiques enregistrées au niveau des cellules granulaires. Cette LTP est, de plus, spécifique des fibres d'entrée (McNaughton et al., 1978). La voie perforante est en effet composée de deux ensembles d'axones, la voie perforante médiane (venant du CE median) et latérale (venant du CE latéral), qui projettent sur les même neurones. Leur stimulation alternée permet de mesurer la transmission synaptique basale dans ces deux voies. Or, la LTP n'est induite que dans les synapses activées par le tétanus. On dit qu'elle est homosynaptique. Cette caractéristique est essentielle à l'idée d'une LTP sous-tendant les mécanismes d'apprentissage puisque ceux-ci nécessitent une discrimination des informations. Cette idée a pourtant longtemps été remise en cause par certains auteurs qui considéraient que la LTP pouvait être un artefact expérimental induit par des stimulations de haute fréquence non physiologiques (Barnes, 1995). Ce n'est plus le cas désormais. En effet, la LTP peut être induite *in vivo* au niveau des synapses SC-CA1, par la dépolarisation induite des neurones post-synaptiques pendant les SW-R (King et al., 1999). Ce n'est donc pas seulement la fréquence de stimulation qui régit l'induction de la LTP mais plutôt la coïncidence de l'activité pré et post-synaptique comme le postulait Hebb (ici dépolarisation induite des neurones post-synaptiques au même moment que la dépolarisation des éléments pré-synaptiques par les SW-R). Il s'agit d'un appariement entre les activités pré et post-synaptiques (*synaptic pairing* ou pairage synaptique). En revanche, la plasticité de type *spike-timing dependent plasticity* ou STDP regroupe des formes de LTP et de LTD induites par l'association entre activités pré-synaptiques et potentiels d'action post-synaptique (Dan et Poo, 2006). En général, lorsque l'activité pré-synaptique précède les PA post-synaptiques de 10-20 ms, cela produit une LTP alors que lorsque l'activité post-synaptique précède l'activité pré-synaptique cela produit une LTD. Ainsi une relation temporelle produit la bidirectionnalité de cette forme de plasticité. A ce jour, chez l'animal adulte, il n'a pas été possible de reproduire *in vivo* la bidirectionnalité de la STDP, alors que tous les autres protocoles établis *in vitro*, notamment le pairage

synaptique, produisent LTD ou LTP *in vivo*. D'autre part, de nombreuses études, dont nous avons déjà cité quelques exemples, montrent que l'altération ou l'inhibition des récepteurs au glutamate perturbent à la fois plasticité synaptique et processus de mémorisation (Citri et Malenka, 2008). Ainsi, l'injection d'un antagoniste des récepteurs NMDA entraîne des déficits d'apprentissages spatiaux comparables à ceux observés lors de lésions de l'hippocampe et empêche l'induction de LTP (Morris et al., 1986). L'étude comportementale de souris déficientes en récepteurs NMDA uniquement dans les cellules pyramidales de CA1, couplé avec l'enregistrement des cellules de lieu, a montré que la représentation spatiale est fortement altérée chez ces souris (McHugh et al., 1996). Cependant, si ces expériences ont démontré que la LTP est essentielle à l'apprentissage, elles n'ont pas montré si, effectivement, un apprentissage engendre de la LTP. C'est ce qu'a démontré les équipes de Bear et Gruart dans l'hippocampe grâce à l'utilisation de nombreuses multi-électrodes afin d'enregistrer les réponses des synapses impliquées dans un apprentissage aversif dépendant de l'hippocampe (Whitlock et al., 2006) ou une tâche de reconnaissance d'objet (Clarke et al., 2010). Bear et coll. ont montré que ce type d'apprentissage induisait un phénomène "LTP-like" dans les cellules pyramidales de CA1 de rat. Ce phénomène présente les mêmes caractéristiques électrophysiologiques et moléculaires que la LTP induite par un tétanus. Ainsi, les pattern d'activité neuronale générés lors d'un apprentissage sont suffisants pour déclencher les mécanismes de plasticité synaptique de longue durée (Whitlock et al., 2006). De plus, l'infusion *in vivo* d'un inhibiteur de la maintenance de la LTP dans l'hippocampe, abolit spécifiquement sa maintenance et perturbe la consolidation d'une mémoire spatiale (Pastalkova et al., 2006). L'ensemble de ces travaux font donc de la LTP, un mécanisme internationalement reconnu des processus de mémorisation que nous allons maintenant détailler.

Une découverte clef qui permit une meilleure compréhension de la LTP, tout comme de la transmission excitatrice basale, fut la démonstration de l'existence de deux types majeurs de récepteurs post-synaptique au glutamate : Les récepteurs NMDA (NMDAR) et les récepteurs à l'acide propionique α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol (AMPAR). Ces derniers sont colocalisés au niveau des épines dendritiques des synapses SC-CA1 et interviennent dans différentes phases de la LTP. On distingue, en effet deux étapes principales dans le phénomène de LTP, la phase précoce correspondant à son induction et son expression, et la phase tardive qui met en eu l'expression et la synthèse de nouvelles protéines afin d'assurer sa stabilisation et sa maintenance sur le long terme.

3.2.2. La phase précoce de la LTP

L'acteur clef de cette phase de la LTP est le NMDAR qui agit comme un détecteur de coïncidence d'activité entre les neurones pré et post-synaptiques. Il existe trois familles de sous-unités de NMDAR : GluN1, GluN2, avec quatre membres (GluN2A-D) et GluN3, composée de deux membres (GluN3A-B). L'existence d'un tel nombre de sous-unités de NMDAR permet de nombreuses combinaisons qui sont à l'origine de multiples populations de NMDAR avec des fonctions distinctes. Dans la région CA1 de l'hippocampe de souris adulte, le NMDAR est un hétéro-tétramère composé de sous-unités GluN1, GluN2A et GluN2B (Paoletti et al., 2013). Le NMDAR est un récepteur ionotropique composé d'un canal Na^+/Ca^{2+} qui est bloqué par un ion magnésium en condition basale, i.e. quand le neurone est à son potentiel membranaire de repos. La stimulation haute fréquence de l'élément pré-synaptique engendre alors une forte libération de glutamate qui conduit à une forte dépolarisation de la membrane post-synaptique via l'activation des AMPAR, des récepteurs ionotropiques perméables au K^+ et au Na^+. Si cette dernière est suffisante, l'ion magnésium est éjecté de son site d'ancrage sur le NMDAR (Nowak et al., 1984). L'ouverture du canal Na^+/Ca^{2+} sur ce récepteur conduit alors à une entrée massive d'ions Ca^{2+} dans l'épine post-synaptique qui augmente la concentration intracellulaire de Ca^{2+} sélectivement au niveau de celle-ci. C'est cette compartimentation qui permet la spécificité des fibres d'entrée de la LTP (Nicoll et al., 1988). Notons que les NMDAR ne sont pas les seuls à moduler ce flux calcique dépendant de l'activité ; il existe, en effet, des récepteurs métabotropiques du glutamate, les canaux TRP (*Transient receptor potential*), et des canaux calciques voltage-dépendants exprimés au niveau de l'épine dendritique (Sala et Segal, 2014). Cette élévation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} déclenchera alors les processus biochimiques nécessaires à l'induction de la LTP via notamment l'activation de cascades de transduction du signal (**Fig. 12**).

L'entrée de Ca^{2+} post-synaptique provoque l'activation de nombreuses protéines kinases localisées dans la densité post-synaptique, c'est-à-dire à proximité des NMDAR. Des études d'inactivation/activation spécifique suggère que la *Ca^{2+}-calmoduline-dependant protein kinase II* (CaMKII) est certainement la protéine kinase la plus essentielle à l'établissement de la LTP (Citri et Malenka, 2008). Son autophosphorylation, requise pour l'induction de la LTP (Giese et al., 1998), lui permet d'entretenir son activation bien après que les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} aient diminuées. Tant qu'elle reste activée, elle pourra alors phosphoryler à son tour d'autres protéines (Lisman et al., 2002). C'est cette seconde étape qui

assure l'expression de la LTP. Elle dépend essentiellement des AMPAR et met en jeu deux grands mécanismes : l'augmentation de la conductance des AMPAR et l'insertion de nouveaux AMPAR à la membrane post-synaptique (Citri et Malenka, 2008). Ces deux mécanismes contribuent à l'augmentation des flux sodiques entrants, et donc à entretenir la dépolarisation post-synaptique. Cette hypothèse s'est imposée progressivement grâce aux études de "synapses silencieuses", des synapses qui ne contiennent quasiment que des NMDAR et pas ou peu d'AMPAR et chez lesquelles il est possible d'induire le LTP.

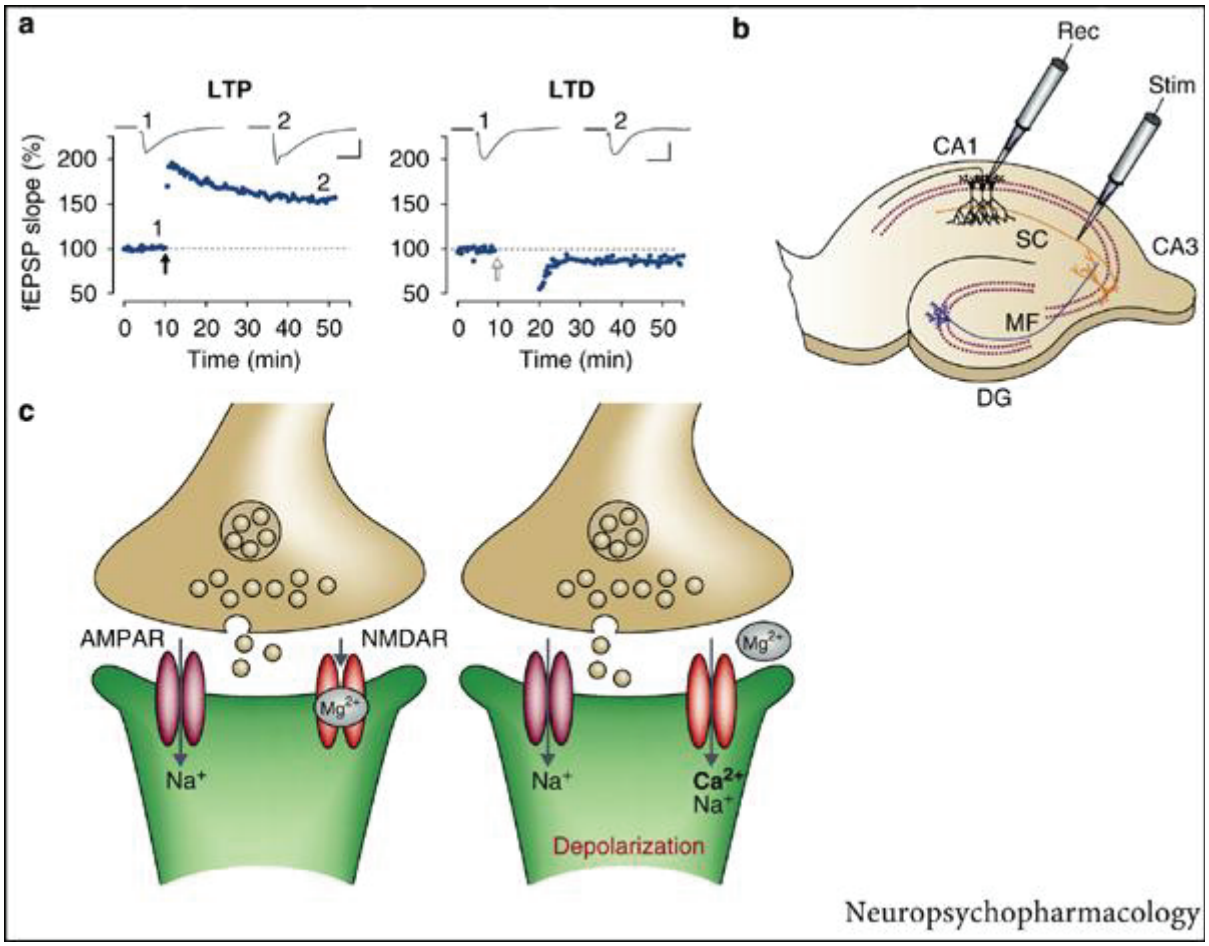


Figure 12. Induction de plasticité synaptique à long terme NMDA dépendante dans les synapses de CA1. A . Expériences typiques illustrant une LTP (à gauche) et une LTD (à droite) induite dans CA1. La force synaptique, définie par la pente initiale du potentiel post-synaptique excitateur (fEPSP, normalisé sur la ligne de base) est représentée en fonction du temps. La LTP est induite par une stimulation de haute fréquence (100 Hz, 1 s, flèche noire). et la LTD est induite par une stimulation basse fréquence (1 Hz, 20 min, flèche blanche) Les traces représentées en encart correspondent aux chiffres sur le graphique. **B.** Placement typique des électrodes de stimulation (Stim) et d'enregistrement (Rec) correspondant à l'étude de la plasticité synaptique entre SC et neurones de CA1 en potentiel de champ. *SC: Collatérales de Schaffer, MF: Fibres moussues, DG: Gyrus denté*. **C.** Lors de la transmission synaptique normale (à gauche), le glutamate (jaune) est libéré du bouton terminal pré-synaptique et agit sur les récepteur au glutamate de type AMPA (AMPAR) et NMDA (NMDAR). En condition basale, les ions Na^+ entrent uniquement au travers des récepteurs AMPA, mais pas au travers des récepteurs NMDA qui sont bloqués par les ions Mg^{2+}. La dépolarisation de l'élément post-synaptique (à droite) provoquée par la stimulation répétée de l'élément pré-synaptique, provoque le déplacement des ions Mg^{2+} du récepteur canal NMDA. Cela aboutit à l'entrée massive de calcium dans l'épine dendritique. Cette augmentation de calcium intracellulaire est essentielle à l'initiation des évènements conduisant à l'expression de la plasticité à long terme (D'après Citri et Malenka, .2008).

L'AMPAR est un tétramère pouvant être composé de quatre sous-unités GluA1 à 4. Dans l'aire CA1 de l'hippocampe, les formes prédominantes sont les hétéromères GluA1/2 et GluA2/3 (Wenthold et al., 1996). Or, la CaMKII phosphoryle la sous-unité GluA1 des AMPAR. Il en résulte un changement de conformation des AMPAR qui augmente la conductance sodique des récepteurs monomériques GluA1 (Derkach et al., 1999) suggérant un rôle clef de CaMKII dans cette étape de l'expression de la LTP. Enfin, une protéine présente dans la densité post-synaptique, la PDS95, jouerait un rôle important dans l'insertion des AMPAR à la membrane. La surexpression de cette protéine augmente tellement la transmission synaptique AMPA-dépendante qu'il y a occlusion de la LTP (Ehrlich et Malinow, 2004). Sa sous-expression, au contraire, conduit à une diminution de la réponse synaptique et un mauvais adressage des AMPAR (Ehrlich et al., 2007). Enfin, la CaMKII phosphoryle aussi la stargazine, une protéine de la famille des TARP (*transmembrane AMPAR regulatory proteins*) qui sont des protéines auxiliaires des AMPAR. Cette phosphorylation entraîne la formation d'un complexe stargazine-AMPAR activé qui favorise la fixation des AMPAR à la PSD95 (Opazo et al., 2012 ; Sumioka et al., 2010) et donc leur insertion à la membrane post-synaptique (**Fig. 13**).

D'autres protéines kinases seraient néanmoins impliquées dans les mécanismes régissant la phase précoce de la LTP. Nous ne citerons ici que quelques exemples. Ainsi, la protéine kinase PKA favoriserait indirectement l'action de la CaMKII via l'activation d'une adenylate cyclase (AC). Cette dernière diminue l'activité compétitrice des phosphatases qui inhibe les kinases pareille à la CAMKII (Makhinson et al., 1999). La CaMKII, la PKA et la PKC permettraient de promouvoir la stabilisation des AMPAR au niveau de la membrane post-synaptique en phosphorylant différents sites de la sous-unité GluA1 (Boehm et al., 2006 ; Esteban et al., 2003 ; Lee et al., 2003). La perturbation de cette phosphorylation altère l'expression de la LTP et la mémoire spatiale (Lee et al., 2003).

3.2.3. *La phase tardive de la LTP*

L'application d'anisomycine, un inhibiteur de la synthèse protéique, bloque *in vitro* le maintien de la LTP dans l'aire CA1 sans perturber son induction (Frey et al., 1988). De la même manière, l'application d'un inhibiteur de transcription sur des tranches d'hippocampe empêche la persistance de la LTP au-delà de 100 min dans l'aire CA1 (Nguyen et al., 1994). Ces travaux et de nombreux autres similaires, ont permis de définir l'existence d'une phase tardive de la LTP sous la dépendance de mécanismes de transcription génique et de synthèse

protéique. Ces mécanismes, prenant place une à deux heures après l'induction de LTP sont les acteurs de la consolidation synaptique (Reymann et Frey, 2007).

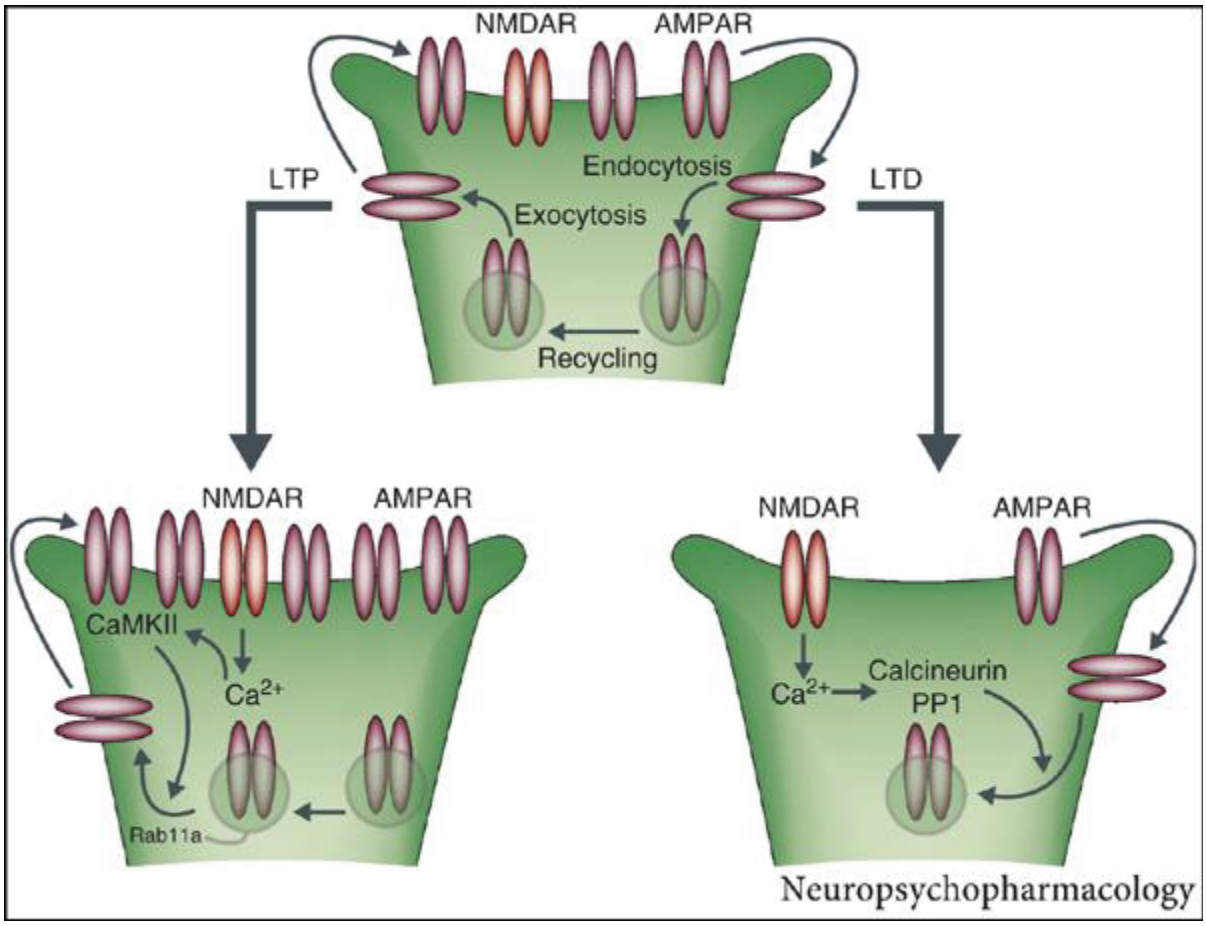


Figure 13. Mécanismes d'expression de la plasticité à long terme. Dans une synapse naïve (*en haut*), le renouvellement des récepteurs AMPA au niveau de la membrane est assuré par un cycle d'endocytose/exocytose de récepteurs stockés dans les endosomes dendritiques. A l'induction de la LTP (à gauche), l'augmentation de calcium intracellulaire active la CaMKII qui va favoriser l'insertion membranaire des récepteurs AMPA par deux mécanismes. La CaMKII active la protéine Rab11a qui conduit à l'exocytose des récepteurs séquestrés dans les endosomes et leur insertion à la membrane. La CaMKII phosphoryle les sous-unités GluA1, ce qui augmente la conductance unitaire des récepteurs AMPA et les stabilise au niveau de la membrane post-synaptique. Il en résulte une augmentation de la conductance sodique et par conséquent de la réponse post-synaptique. A l'induction de la LTD (à droite), l'augmentation modérée de calcium intracellulaire active la calmoduline et la protéine phosphatase 1 (PP1). Ces phosphatases conduisent à la déphosphorylation des sous-unités GluA1, et augmente l'endocytose des récepteurs AMPA. La diminution du nombre de récepteurs AMPA à la surface de la membrane se traduit par la diminution de la réponse post-synaptique (D'après Citri et Malenka, 2008).

Les épines dendritiques possèdent tous les éléments de la machinerie traductionnelle et on y trouve aussi de nombreux ARNm. Cette synthèse locale serait régulée par l'activation de voies de signalisation cellulaire parmi lesquelles, la voie des ERK/MAPK (*Extracellular signal-Regulated Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase*) jouerait un rôle essentiel dans les mécanismes de transcription et de traduction au cours de la LTP (Kelleher et al., 2004). Lors de l'activation de cette cascade, la phosphorylation de la kinase ERK, notamment par la CaMKII, déclenche sa translocation vers le noyau. Dans celui-ci, des facteurs de transcription clés tels que CREB (*cAMP response element-binding protein*) sont activés, notamment par ERK, permettant ainsi l'expression de plusieurs gènes d'expression précoce (IEG pour *immediate-early genes*). Ceux-ci, comme *zif268/Egr-1*, et *c-fos* vont permettre l'expression de nouveaux facteurs de transcription qui réguleront des gènes secondaires cibles et la synthèse de nouvelles protéines (Thomas et Huganir, 2004). L'injection de bloqueurs de l'activation de la voie ERK/MAPK ou l'inactivation de la protéine CREB empêche la consolidation d'une tâche de mémoire dépendante de l'hippocampe (Bozon et al., 2003a ; Kelly et al., 2003). De plus, des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas Zif268 présentent un déficit de maintenance de la LTP associé à un blocage de la consolidation à long-terme (Bozon et al., 2003b ; Jones et al., 2001). Ainsi, l'activation de ces voies de signalisation cellulaire pourrait permettre l'expression de gènes effecteurs assurant le maintien de la LTP grâce à l'adressage des protéines nouvellement synthétisées (telles que des nouvelles sous-unités GluA1) à la synapse (**Fig. 14**). Cet adressage permettrait une meilleure transmission/réception du signal glutamatergique. Leur acheminement à la synapse d'intérêt serait assuré par la création d'une sorte de marquage moléculaire, un "*synaptic tag*" (Frey et Frey, 2008). Des kinases comme la CAMKII, PKMξ (Glanzman, 2013 ; Pastalkova et al., 2006) ou un facteur trophique comme le *brain derived-factor* (BDNF) (Panja et Bramham, 2014) ont été impliqués comme étant de potentiel tags.

3.2.4. La dépression à long terme (LTD)

La LTP permet une augmentation de la force synaptique persistante. Or, si l'activité cérébrale n'était modulée que par ce mécanisme, il y aurait forcément une saturation rapide des réseaux neuronaux, rendant ceux-ci inefficaces pour encoder de nouvelles informations. De plus, la formation d'une trace mnésique ne peut se faire que s'il y a une modulation relative des poids synaptiques à travers les réseaux afin de créer des assemblées de neurones reliées entre elles. Il doit donc y avoir un mécanisme inverse permettant de diminuer la force synaptique. Ce dernier a été démontré expérimentalement par deux approches. D'abord, une stimulation

prolongée de basse fréquence (1-3Hz) peut dépotentialiser des synapses préalablement renforcées par LTP, les ramenant à leur état basal (Barrionuevo et al., 1980). Enfin, ce même type de stimulation peut induire une dépression de longue durée (LTD) dépendante des NMDAR sur des synapses naïves dans l'hippocampe (Dudek et Bear, 1992). Cette LTD existe dans de nombreuses structures présentant une transmission excitatrice (Citri et Malenka, 2008). Cependant, une autre forme de LTD, induite par un protocole légèrement différent, coexiste dans les synapses SC-CA1. Elle est dépendante des récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) (Oliet et al., 1997). Nous ne l'aborderons pas dans ce manuscrit. La LTD dépendante des NMDAR partage de nombreuses caractéristiques avec la LTP. Ainsi, elle est homosynaptique, est inductible par des protocoles de pairage synaptique (considérés plus physiologiques) et se compose aussi de deux phases, précoce et tardive. Ces mécanismes d'induction, d'expression et de maintenance sont donc très similaires à ceux de la LTP.

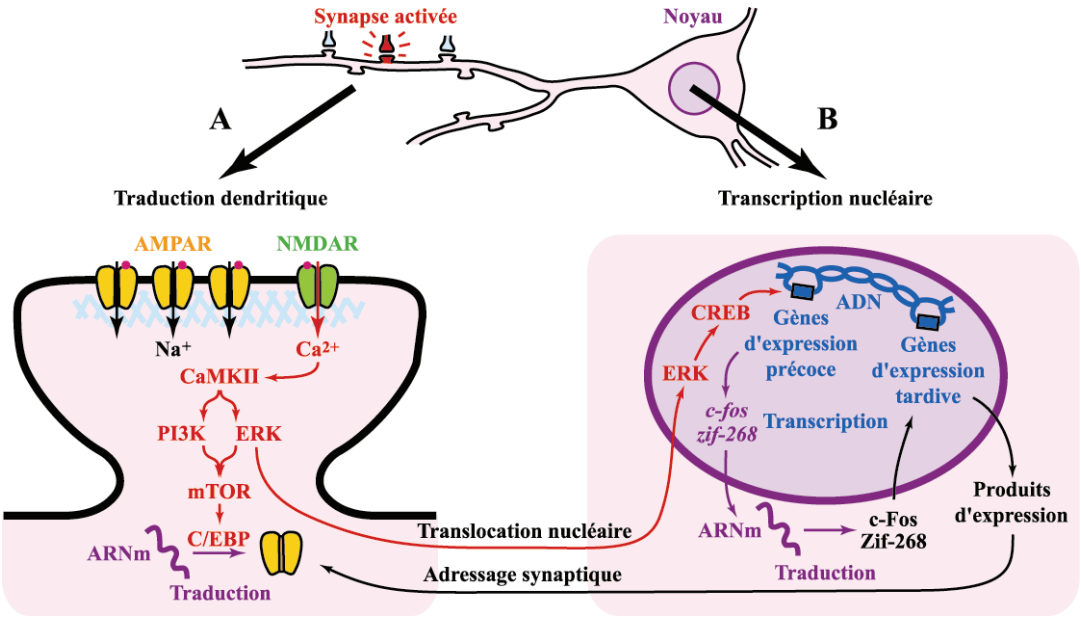


Figure 14. Mécanismes de maintenance de la LTP. L'activation d'une synapse induit des phénomènes locaux et nucléaires afin de pérenniser la potentialisation de la réponse synaptique. **A.** Mécanismes de traduction dendritique. L'induction de la LTP augmente la concentration intracellulaire en Ca2+ ([Ca2+]i) et active la CaMKII. Cette dernière alimente deux cascades de phosphorylation: la voie ERK/MAPK et la voie des PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*). Ces deux voies conduisent à l'activation de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), qui initie des mécanismes de traduction locale via le facteur C/EBP afin de néo-synthétiser les facteurs indispensables au maintien de la LTP. **B.** Mécanismes de transcription nucléaire. L'activation d'ERK donne lieu à sa translocation vers le noyau du neurone, et à l'activation du facteur de transcription CREB. Celui-ci induit la transcription des gènes d'expression précoce *c-fos* et *zif268*. Ces facteurs de transcription régulent à leur tour des gènes d'expression tardive dont le produit est adressé spécifiquement à la synapse activée (D'après Ravassard, 2009).

La stimulation de basse fréquence induit une libération lente mais continue de glutamate qui va engendrer une dépolarisation post-synaptique en dessous du seuil de génération des PA. Celle-ci permettra tout de même l'activation des NMDAR et donc l'entrée lente et continue de Ca^{2+} dans l'épine dendritique (Kemp et Bashir, 2001). Ainsi, l'induction de la LTD, comme celle de la LTP, est dépendante de l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire (**Fig. 12**). Toutefois, l'amplitude de cette augmentation permettrait l'apparition différentielle des deux formes de plasticité à long terme. Ainsi, une concentration faible, de l'ordre du nanomolaire, suffirait à l'induction de la LTD tandis que celle de la LTP nécessiterait une élévation au delà d'un certain seuil, de l'ordre du micromolaire (Citri et Malenka, 2008). La manipulation de cette concentration calcique intracellulaire permet ainsi de provoquer une transition entre la LTP et la LTD (Harney et al., 2006). Ces conditions particulières permettraient alors l'activation, non pas de la CaMKII, comme dans la LTP, mais d'une protéine phosphatase, la calcineurine (PP2B). Son activation entraîne celle de toute une cascade de phosphatases, dont la PP1, qui diminue alors l'activité des kinases que nous avons décrites précédemment (Kirkwood et Bear, 1994a ; Morishita et al., 2001). La déphosphorylation de la CaMKII par cette cascade de phosphatases conduit à celle de la stargazine et donc à la dissociation du complexe stargazine-AMPA de la PSD95 impliqué dans l'adressage des AMPAR à la membrane post-synaptique (Tomita et al., 2005). Ceci pourrait être un des mécanismes à l'origine de l'internalisation des AMPAR (Beattie et al., 2000). Cette diminution du nombre d'AMPAR à la membrane synaptique diminue alors la réponse synaptique (**Fig. 13**). Il est donc important de noter que les mécanismes moléculaires régissant LTP et LTP sont très proches mais complètement opposés. Ainsi, l'inhibition génétique de la calcineurine altère l'induction de la LTD mais augmente l'amplitude de la LTP dans l'hippocampe (Malleret et al., 2001 ; Zeng et al., 2001). Il y a donc une régulation bidirectionnelle de la plasticité synaptique ce qui représente un mécanisme majeur de métaplasticité.

Mais quel est le rôle de la LTD dans les processus de mémorisation dépendant de l'hippocampe ? Pendant longtemps, on lui a prêté un rôle auxiliaire dans les fonctions d'oubli (Tsumoto, 1993) et d'augmentation du ratio signal sur bruit (Dayan et Willshaw, 1991). Ces postulats se basaient sur la conception de la LTD comme une image miroir de la LTP. Ainsi, si la LTP permet l'encodage des souvenirs en augmentant l'efficacité de certaines synapses, alors on a pensé que la LTD devrait favoriser l'oubli de ces souvenirs en permettant de diminuer l'efficacité de ces synapses. De la même manière, la LTD pourrait augmenter le

rapport signal sur bruit en déprimant les synapses non impliquées dans un apprentissage tandis que les connexions entre les neurones de la trace mnésique seraient augmentées par LTP. Ces conceptions ont été fortement remises en cause par des études suggérant que la LTD jouerait un rôle dans l'établissement des traces mnésiques. Ainsi, l'apprentissage d'un nouvel environnement entraîne une facilitation de l'induction *in vivo* de LTD dans l'hippocampe de rat (Manahan-Vaughan et Braunewell, 1999). De plus, la performance des animaux dans une tâche de mémoire de travail spatiale a été corrélée à l'amplitude de la LTD induite *in vitro* (Nakao et al., 2002). Pour rendre compte de ces résultats, deux idées ont été avancées. D'abord, la LTD permettrait le stockage d'informations dans l'hippocampe différentes de celles codées par la LTP (Kemp et Manahan-Vaughan, 2007). Ainsi, la LTD est facilitée dans CA1 lors de l'exploration d'un environnement riche où plusieurs objets sont disposés alors que la LTP est facilitée lors de l'exploration d'un environnement vide (Manahan-Vaughan et Braunewell, 1999). Dans CA1, la LTP rendrait alors compte des informations spatiales tandis que la LTD permettrait l'association entre objet et contexte. Une seconde hypothèse suppose que la LTD fragilise les traces mnésiques anciennes pour les empêcher d'interférer avec l'encodage de nouvelles informations essentielles au comportement (Nicholls et al., 2008). Ainsi, chez des souris déficientes pour la calcineurine, l'altération de la LTD hippocampique est associée à une altération des performances dans une tâche de mémoire de travail (Zeng et al., 2001). Nicholls et coll. ont trouvé le même phénotype chez des souris déficientes pour une autre phosphatase, la PP2A (Nicholls et al., 2008). En plus, d'un déficit en mémoire de travail, ces souris présentaient un déficit de flexibilité comportementale. En effet, lors d'une tâche de transfert en water maze (durant laquelle on demande à l'animal d'apprendre à localiser un nouvel emplacement de plateforme), ces souris persistaient à retourner au premier emplacement appris de la plateforme. Ce déficit d'oubli d'informations préalablement acquises mais non pertinentes fut observé dans une tâche de mémoire de travail. Ces résultats semblent donc indiquer que la LTD fragiliserait bien les traces mnésiques anciennes pour les empêcher d'interférer avec l'encodage de nouvelles informations essentielles au comportement (Nicholls et al., 2008).

3.3. Plasticité synaptique à court terme

Une propriété essentielle des synapses est leur capacité à garder une trace des évènements passés qui ont modifié leur activité. C'est le rôle de la plasticité synaptique. Or, la LTP et la LTD ne sont pas les seuls phénomènes par lesquels l'activité induite par l'expérience est capable de modifier les propriétés des circuits neuronaux. Il existe, en effet, de nombreuses

formes de plasticité différentes agissant à des échelles de temps et d'espace différentes et au sein des mêmes réseaux (Fioravante et Regehr, 2011 ; Zucker et Regehr, 2002). La plasticité à court terme, qui dure uniquement de quelques millisecondes à quelques minutes, est un phénomène limité à la synapse. Elle serait ainsi le support des fonctions de transfert des informations synaptiques à la base du codage neuronal (Abbott et Regehr, 2004). Nous présenterons, dans cette section, les principales formes de plasticité à court terme permettant la potentialisation ou la dépression transitoire de la réponse synaptique au niveau des synapses SC-CA1. Elles sont pré-synaptiques, c'est-à-dire qu'elles résultent de la modulation de la libération de glutamate induite par l'activité de l'élément pré-synaptique.

3.3.1. Mécanismes de potentialisation à court terme de la transmission excitatrice

Un des mécanismes de potentialisation à court terme les plus connu est la facilitation induite par stimulations pairées (PPF pour *paired-pulse facilitation*) (**Fig. 15B**). Expérimentalement, lorsque deux stimulations sont délivrées dans un bref intervalle de temps (classiquement entre 20 et 500 ms), on observe une augmentation de la réponse synaptique induite par le second stimulus par rapport à celle induite par le premier stimulus (Fioravante et Regehr, 2011 ; Katz et Miledi, 1968 ; Zucker et Regehr, 2002). Un des principaux mécanismes avancé pour expliquer ce phénomène repose sur la théorie du calcium résiduel. La libération de neurotransmetteur est un mécanisme probabiliste. A chaque instant, tous les sites de libération ont une chance de libérer ou non le contenu d'une vésicule de neurotransmetteur (Stevens, 1993). Cette probabilité p de libération de neurotransmetteur, faible, est variable en fonction des projections synaptiques et atteint une probabilité de 50% (i.e. 50% d'échec) dans les synapses SC-CA1 (Allen et Stevens, 1994 ; Katz, 1969). L'entrée de calcium dans le bouton synaptique suite à la stimulation des collatérales de Schaffer, permet l'activation de protéines favorisant l'exocytose des vésicules de glutamate (Cesca et al., 2010 ; Jahn et Fasshauer, 2012). Puis le calcium résiduel accumulé dans le bouton synaptique lors du passage du PA est progressivement pompé hors du cytosol. Cependant, si on applique une stimulation suffisamment proche dans le temps, il restera encore du calcium résiduel dans le bouton synaptique qui s'ajoutera alors au flux de calcium entrant. Cette concentration de calcium plus élevée conduit à l'augmentation de la probabilité p de libération de glutamate (i.e. une diminution du taux d'échec) à l'origine de la diminution du taux d'échec et donc de la facilitation la réponse synaptique (Fioravante et Regehr, 2011 ; Zucker et Regehr, 2002).

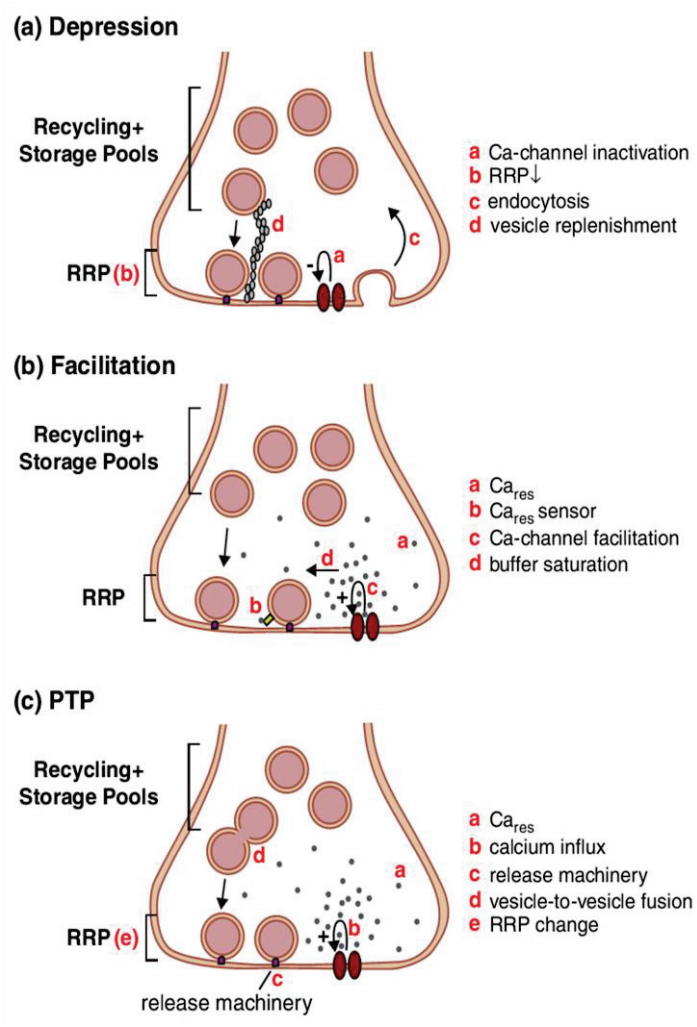


Figure 15. Mécanismes pré-synaptiques de la plasticité synaptique à court terme. Schémas illustrant et résumant les principaux mécanismes proposés pour expliquer **A.** la dépression synaptique, **B.** la facilitation induite par stimulations pairées et **C.** la potentialisation post-tétanique (PTP). *RRP: ready releasable pool ou stock de vésicules prêtes à être libérées* (D'après Fioravante et Regehr, 2011).

La potentialisation post-tétanique (PTP pour *post-tetanic potentiation*) est, elle, observée après une stimulation à haute fréquence (**Fig. 15C**). Elle peut durer de quelques dizaines de secondes à quelques minutes selon le protocole utilisé. Elle correspond à une augmentation de courte durée de l'efficacité synaptique déclenchée par deux mécanismes principaux (Fioravante et Regehr, 2011 ; Magleby et Zengel, 1982 ; Zucker et Regehr, 2002). D'un côté, il y a augmentation de la probabilité *p* de libération de glutamate provoquée soit par le calcium résiduel qui irait activer des protéines intervenant dans l'exocytose des vésicules synaptiques (Brager et al., 2003), soit par l'activation de nouveaux canaux calciques (Mochida et al., 2008). De l'autre côté, il y a une augmentation du stock de vésicules de glutamate prêt à être libéré (RRP pour *ready releasable pool*) qui correspond aux vésicules synaptiques liés à la membrane (Lee et al., 2008). Le passage des vésicules synaptiques du stock de réserve au RRP pourrait être en partie assurée par la phosphorylation de synapsines (Chi et al., 2003 ; Giachello et al., 2010).

3.3.2. Mécanismes de dépression à court terme de la transmission excitatrice.

Une stimulation répétée à basse fréquence peut induire une diminution transitoire de la force synaptique allant de quelques secondes à quelques minutes. C'est la dépression synaptique (Betz, 1970 ; Fioravante et Regehr, 2011 ; Zucker et Regehr, 2002) (**Fig. 15A**). La stimulation répétée conduit à un épuisement du stock RRP responsable en partie de diminution de libération de glutamate (Wang et Manis, 2008). La fusion des vésicules synaptiques au site de libération entraîne son inactivation pendant quelques secondes, le temps de recycler les protéines de membrane vésiculaires subsistantes (Neher et Sakaba, 2008). L'inactivation progressive des sites de libération pendant le protocole d'induction participerait à la dépression synaptique (Hosoi et al., 2009). Enfin, cette dernière met aussi en jeu une diminution de la probabilité *p* de libération de glutamate via l'inhibition de canaux calciques (Xu et Wu, 2005).

3.3.3. Fonctions possibles

Un rôle essentiel de la plasticité synaptique à court terme serait de moduler la fonction de transfert des informations des synapses en agissant comme un filtre physiologique (Abbott et Regehr, 2004). Ainsi, les synapses présentant une faible probabilité initiale *p* de libération de neurotransmetteurs fonctionnent comme des filtres passe-haut, puisqu'elles vont faciliter la transmission de bouffées de potentiels d'action de haute fréquence, alors que les bouffées de basse fréquence seront transmises avec une efficacité moindre. A l'inverse, les synapses présentant une probabilité de libération élevée vont agir comme des filtres passe-bas (**Fig. 16**). Les caractéristiques de filtrage des synapses peuvent ainsi être régulés bidirectionnellement par la modulation de la probabilité de libération *p* de neurotransmetteurs. L'hippocampe étant un "*hub*" qui centralise et traite de multiples informations, de telles capacités de filtrage pourraient faciliter le codage neuronal impliqué dans les processus de mémorisation. Néanmoins, ceci ne reste qu'une hypothèse et il est important de noter ici que le (ou les) rôle de la plasticité synaptique à court terme est beaucoup moins connu que celui attribué à la LTP ou à la LTD. Comme vous le verrez dans les pages qui suivent, nous avons essayé de comprendre ce rôle grâce notamment à l'utilisation de modèles de souris transgéniques.

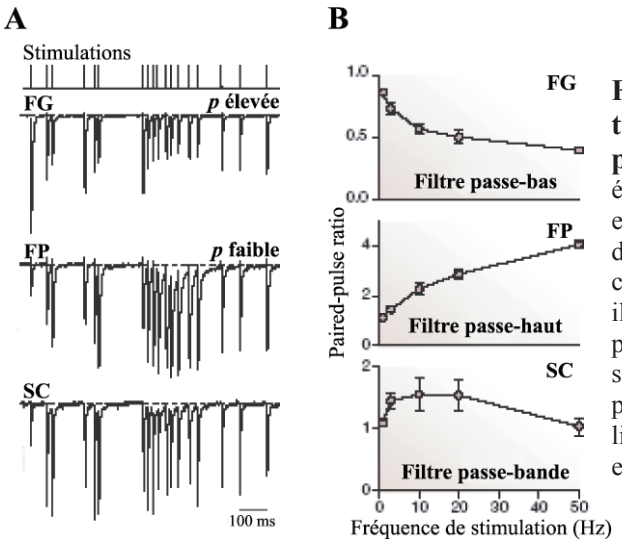


Figure 16. La plasticité synaptique à court terme pourrait agir comme un filtre physiologique. A. Potentiels post-synaptiques évoqués en réponse à des stimulations irrégulières enregistrés au niveau des fibres grimpantes (FG), des fibres parallèles (FP) du cervelet, et des collatérales de Schaffer (SC). **B.** Ces trois exemples illustrent les caractéristiques de filtres physiologiques possibles de la transmission synaptique: passe-bas (FG), passe-haut (FP) et passe-bande (SC), qui dépendent de la probabilité de libération de neurotransmetteurs *p* (D'après Abbott et Regehr, 2004).

3.4. Neuromodulation de la plasticité synaptique hippocampique et consolidation mnésique pendant le SP

L'alternance des états de vigilance est sous le contrôle de plusieurs systèmes neuromodulateurs dont l'activité est, pour la plupart, régulée de manière différentielle au cours des différents états de sommeil. Ainsi la libération d'acétylcholine (ACh) est minimale pendant le SL mais elle atteint lors du SP des niveaux comparables, voire même plus élevés, à ceux observés pendant l'éveil. Au contraire, la libération de noradrénaline (NA) et de sérotonine (5-HT) diminue pendant le SL avant d'atteindre son minimum au cours du SP (Hasselmo, 2006, 1999). Or, il se trouve que la plupart de ces neuromodulateurs ont été impliqués dans les processus de consolidation mnésique et de plasticité synaptique. Ils pourraient donc participer aux mécanismes moléculaires de la facilitation de la mémoire par le sommeil, et plus particulièrement le SP.

3.4.1. La plasticité à long terme est modulée par le SP

Une privation de sommeil totale diminue la rétention d'un conditionnement contextuel à la peur et altère la LTP dans l'hippocampe de souris (Vecsey et al., 2009). Ce déficit est associé à une diminution de l'activation de la voie de signalisation cellulaire dépendant de la PKA, impliquée dans les mécanismes de maintenance de la LTP, et une augmentation de certaines phosphatases. Or, le traitement des souris privées de sommeil avec un inhibiteur de phosphatases, le rolipram, immédiatement et 2h30 après l'acquisition restaure les niveaux de performances des animaux au rappel (Vecsey et al., 2009). Ces travaux suggèrent que le sommeil serait une période privilégiée pour la mise en place des mécanismes de maintien de

la LTP et de consolidation synaptique. De la même manière, il a été montré qu'une privation sélective de SP diminue la LTP et l'activation de la voie ERK/MAPK dans l'hippocampe dorsal *in vitro* (Ravassard et al., 2009). De même, l'induction de LTP dans l'hippocampe, comme l'exposition de rongeurs à un nouvel environnement, induit l'expression au cours des phases de SP qui suivent ces deux protocoles, de *zif268*, un gène d'expression précoce impliqué dans la phase tardive de la LTP, dans l'hippocampe et certaines aires corticales (Ribeiro et al., 1999, 2002). En revanche, cette activation de *zif-268* ne se produit pas chez les animaux qui, durant les mêmes périodes, n'ont effectué que de l'éveil ou du SL, suggérant que des mécanismes de consolidation synaptique auraient lieu dans l'hippocampe spécifiquement pendant le SP en accord avec le modèle de la consolidation systémique active pendant le sommeil. L'ensemble de ces travaux a conduit Ribeiro à postuler qu'il y aurait une sorte de "*replay*" moléculaire pendant le SP des évènements moléculaires recrutés au moment de l'encodage de l'information pendant l'éveil (Ribeiro et Nicolelis, 2004).

3.4.2. Acétylcholine, plasticité synaptique, sommeil et mémoire

L'activité cholinergique pendant le SP est élevée, et ceci est particulièrement vrai pour l'hippocampe (Kametani et Kawamura, 1991 ; Marrosu et al., 1995) où elle module les ondes thêta (Siok et al., 2006). D'autre part, la libération phasique d'ACh dans l'hippocampe par les fibres du septum médian est synchronisée avec le rythme thêta (Zhang et al., 2010). Or, l'application d'une stimulation dans le creux du thêta permet l'induction de LTD et une stimulation délivrée au pic du thêta permet l'induction de LTP (Huerta et Lisman, 1995). L'acétylcholine pourrait donc favoriser l'induction de plasticité synaptique bidirectionnelle dans l'hippocampe via les ondes thêta (Huerta et Lisman, 1995). Le rythme thêta a aussi été impliqué dans les processus de réactivations cellulaires (voir plus haut) pendant le SP qui participeraient aux mécanismes de consolidation mnésique. De plus, la suppression de certaines ondes propres aux SP, les ondes pontiques (ondes P), pendant le sommeil suivant directement l'acquisition d'une tâche de mémoire dépendante de l'hippocampe, empêche l'augmentation induite par l'apprentissage de l'expression de molécules impliquées dans le maintien de la LTP (ex : BDNF, CREB phosphorylée,..) dans l'hippocampe dorsal, et ce, sans altérer la structure du sommeil (Datta et al., 2008). A l'inverse, l'augmentation de ces ondes P par stimulation cholinergique de leur générateur conduit à une augmentation similaire des mêmes molécules (Datta et al., 2008). L'ACh pourrait donc réguler cette consolidation synaptique dépendante du SP en induisant les ondes P. Notons aussi que les ondes-P apparaissent de manière synchrone avec l'augmentation de la puissance du thêta

hippocampique (Karashima et al., 2007). D'autre part, le blocage des récepteurs cholinergiques muscariniques à l'ACh par injection de scopolamine pendant le SP altère la mémoire de rats entraînés dans une tâche de mémoire spatiale (Legault et al., 2004) et l'ACh augmente la synthèse protéique dans CA1(Lana et al., 2013). Ainsi, l'ACh pourrait avoir un rôle indirect sur la plasticité synaptique hippocampique et la mémoire en régulant le rythme thêta et les ondes P pendant le SP.

3.4.3. Adénosine, plasticité synaptique, sommeil et mémoire

Les deux principaux récepteurs à l'adénosine, les récepteur A1 (A1R) et A2A (A2AR) sont métabotropiques et sont tous deux exprimés dans l'hippocampe (Dunwiddie et Masino, 2001). Une source majeure d'adénosine dans le cerveau est constituée par les astrocytes ; l'adénosine est alors obtenue par hydrolysations successives de l'ATP par des ecto-nucléotidases, enzymes présentes dans l'espace extracellulaire (Dias et al., 2013 ; Dunwiddie et Masino, 2001). L'adénosine est le deuxième produit de dégradation de l'ATP et de l'AMPc, son accumulation dans le système nerveux central, reflète donc une forte activité cérébrale. Le blocage génétique de la gliotransmission chez la souris diminue la pression de sommeil due à une privation (temps de sommeil diminué, diminution de la durée des épisodes de SL,...) (Halassa et al., 2009). L'adénosine, et principalement celle libérée par les astrocytes, joue alors le rôle d'un senseur énergétique et d'indicateur de pression de sommeil participant ainsi à l'homéostasie du sommeil. Il pourrait promouvoir ainsi l'entrée en sommeil. On a, en effet, vu précédemment que l'adénosine participe à l'inhibition des centres de l'éveil responsables du déclenchement du sommeil. De plus, l'adénosine, via ses A1R, est responsable d'une large inhibition pré-synaptique de la transmission synaptique excitatrice. Dans l'hippocampe, l'adénosine peut ainsi diminuer la LTP via l'activation des A1R tandis que sa liaison au A2AR conduit à l'augmentation de la LTP dans les fibres moussues de l'hippocampe (Costenla et al., 2010 ; Rebola et al., 2008). Comme les A2AR ont un seuil plus élevé que les A1R, il a été proposé, qu'à l'état basal, l'adénosine extracellulaire libérée par les astrocytes assurerait une inhibition diffuse de la transmission synaptique tandis qu'une stimulation de haute fréquence permettrait le recrutement des A2AR et donc une facilitation de la LTP (Cunha, 2001). Ainsi l'adénosine au delà de son rôle dans la régulation homéostatique du sommeil, permettrait une régulation bidirectionnelle de la plasticité synaptique dans l'hippocampe.

La plasticité synaptique hippocampique est à la base des processus de consolidation synaptiques des mémoires déclarative qui prennent place préférentiellement pendant le

sommeil. SL et SP sont caractérisés par des milieux neurochimiques contrôlés dont les principaux neuromodulateurs interviennent dans la régulation des mécanismes de plasticité. De nombreuses neurohormones impliquées dans de grandes fonctions physiologiques, comme le stress (glucocorticoïdes) ou encore la régulation du rythme circadien (mélatonine), participent à la régulation du cycle veille-sommeil. Or, de plus en plus d'études montrent que ces neurohormones joueraient aussi un rôle important dans la modulation de la plasticité et de la mémoire pendant le sommeil (Rasch et Born, 2013). Dans cette thèse nous essayerons de caractériser le rôle des neurones à MCH ainsi que celui du peptide MCH.

4. L'Hormone de Mélano-Concentration (MCH) : lien moléculaire entre sommeil et mémoire ?

L'hormone de mélano-concentration (MCH) est un neuropeptide aux rôles multiples centraux aussi endocriniens que cognitifs : prise alimentaire, anxiété, alternance des états de vigilance, sommeil, mémoire.... Une molécule aux fonctions aussi ubiquitaires pourrait permettre la régulation des processus cognitifs par des mécanismes végétatifs et vice versa. Pourrait-elle donc agir comme un neuromodulateur du rôle du sommeil sur la mémoire ?

4.1. Présentation du système à MCH

4.1.1. Le neuropeptide MCH

La MCH a été pour la première fois isolée dans la glande pituitaire du saumon (Kawauchi et al., 1983). Chez les poissons, la MCH, un peptide cyclique de 17 acides aminés, est sécrétée en réponse à un stress ou des stimuli environnementaux. Elle permet l'éclaircissement de la peau en stimulant l'agrégation de mélanosomes, des granules de pigmentation, dans certaines cellules des écailles. Bien que cette fonction, très spécialisée, soit propre aux poissons et batraciens, l'identification, chez plusieurs espèces de poissons, d'un rôle neuromodulateur de l'axe hypothalamo-pituitaire par la MCH a suggéré un rôle plus large et complexe de ce peptide (Pissios et al., 2006). On a donc cherché à mettre en évidence la présence de MCH dans d'autres espèces de vertébrés. Elle est alors découverte chez de nombreuses espèces de mammifères tels que les rongeurs et l'homme. Chez les mammifères, la MCH est un peptide cyclique de 19 acides aminés qui présente cependant une homologie assez forte avec la forme identifiée chez les poissons.

Le peptide MCH dérive d'une hormone précurseur, le pre-proMCH (ppMCH). Cette dernière présente différents sites de clivage potentiels permettant la génération de trois différents peptides, la MCH, le NEI (*neuropeptide-glutamic acid-isoleucine*) et le NGE (*neuropeptide-glycine-glutamic acid*) (Croizier et al., 2013). Deux autres peptides sont aussi formés à partir du gène codant pour la MCH : le peptide MGOP (*MCH gene overprinted peptide*) obtenu par épissage alternatif et le peptide AROM (*antisense RNA overlapping MCH gene*) obtenu par transcription antisens. Les fonctions de ces différents peptides sont encore mal connues (Boutin et al., 2002 ; Pissios et al., 2006).

Il existe deux types de récepteurs à la MCH, les récepteurs MCH-R1 et MCH-R2. En revanche, seul le premier est présent chez les rongeurs. La MCH se lie au MCH-R1 avec une très forte affinité. Il s'agit d'un récepteur métabotropique couplé aux protéines G (Chambers et al., 1999 ; Saito et al., 2000). Son activation permet la phosphorylation d'enzymes appartenant à de multiples voies de signalisation intracellulaire telles que les voies des MAP-Kinases, des protéines kinases A (PKA) et C (PKC) (Hawes et al., 2000).

4.1.2. Les neurones à MCH

Chez les rongeurs, les neurones à MCH sont localisés intégralement dans deux régions : l'hypothalamus latéral et la *zona incerta*. La distribution des péricaryons change selon l'axe rostro-caudal avec une majorité des neurones à MCH situé dans la partie médiane de la zona incerta au niveau rostral puis, au-delà du noyau paraventriculaire postérieur de l'hypothalamus, ces derniers deviennent de plus en plus latéraux dans la *zona incerta* et se retrouvent principalement dans l'hypothalamus latéral (Bittencourt, 2011 ; Croizier et al., 2013) (**Fig. 17**).

La population des neurones à MCH n'est pas homogène : il existe plusieurs sous-populations caractérisées notamment pas la présence ou l'absence d'expression du peptide CART (*cocaine and ampethamine regulated transcript*) conjointement avec le récepteur à la neurokinine tachyninergique 3 (NK3) (Croizier et al., 2013). Chez la souris, le modèle utilisé dans nos différentes études, 45% des neurones à MCH expriment CART (Croizier et al., 2010 ; Hanriot et al., 2007). Les neurones à MCH, dans des proportions plus ou moins variables, expriment aussi d'autres neuropeptides que la MCH tels que la nesfatin1 ou la substance P (Croizier et al., 2013 ; Fort et al., 2008). Enfin, il est maintenant admis que la plupart des neurones à MCH sont GABAergiques (Sapin et al., 2010).

Bien que les neurones à MCH soient localisés dans une région restreinte, ils envoient des projections dans toutes les aires cérébrales à l'exception du cervelet. L'étude des fibres immunoréactives aux anticorps dirigés contre un neuromodulateur est un excellent outil pour extrapoler les différentes fonctions d'une substance neuroactive à partir de l'identification des structures efférentes. Notons cependant que les différentes études sur les fibres à MCH ont été principalement menées chez le rat même s'il est assez largement reconnu que la distribution des projections de tels systèmes est similaire chez les rongeurs. Il existe deux grandes catégories de projections qui dépendent de la nature de la sous-population de neurones MCH considérée. Les neurones CART/NK3 envoient leurs axones en majorité dans les aires corticales et hippocampiques tandis que les autres projettent principalement vers la moelle épinière. Les axones MCH/CART se partagent en projections descendantes dirigées vers des structures du tronc cérébral tel le noyau paragigantocellulaire ou le LC et en projections ascendantes dirigées soit vers les zones corticales (cortex préfrontal, amygdale, ...) via le septum médian, soit vers la formation hippocampique (Bittencourt, 2011 ; Croizier et al., 2013). Les fibres MCH sont particulièrement denses dans la formation hippocampique, l'amygdale et l'hypothalamus (hypothalamus latéral, noyaux arqués et corps mamillaires). Il est intéressant de noter que la répartition anatomique du MCH-R1 coïncide étroitement avec la distribution de fibres à MCH suggérant bien un rôle physiologique de ces différentes projections (Bittencourt, 2011).

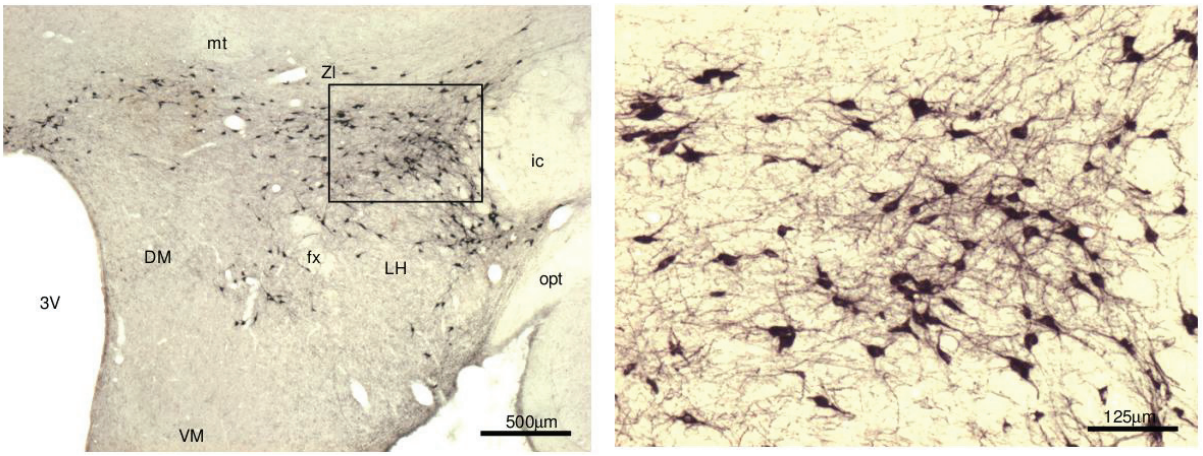


Figure 17. Localisation des neurones à MCH par immunohistochimie du peptide. Les somas des cellules produisant la MCH sont situés dans l'hypothalamus latéral et la Zona Incerta. Résultats obtenus au laboratoire par Lucienne Léger. *LH : aire hypothalamique latérale, opt : tractus optique, ic : capsule interne, DM : noyau hypothalamique dorso-médian, VM: noyau hypothalamique ventro-médian, fx : fornix, 3V : troisième ventricule, mt : faisceau mammillothalamique)*

Les neurones à MCH reçoivent aussi de nombreuses afférences et leur activité est finement modulée. Ils se comportent comme des senseurs de glucose. Une augmentation des concentrations de glucose, de manière physiologique, provoque en effet une excitation des neurones à MCH, i.e. une excitation et une augmentation de la résistance membranaire (Burdakov et al., 2005). Les neurones à MCH sont aussi régulés par plusieurs peptides hypothalamiques, ce qui rend bien compte de la complexité de cette structure. D'abord, les neurones à MCH sont excités par l'hypocrétine/orexine, un peptide produit par les neurones à hypocrétine/orexine, une population de neurones qu'on pense avoir un rôle antagoniste à celui des neurones à MCH. D'autre part, les neurones à MCH possèdent aussi le récepteur MCH-R1 au même titre que les neurones à hypocrétine/orexine et son activation inhibe les deux populations de neurones ce qui suppose une régulation fine et conjointe par rétrocontrôle négatif et positif de ces deux systèmes. Plusieurs populations de neurones situées dans les noyaux arqués, que nous ne détaillerons pas dans ce manuscrit, innervent l'hypothalamus latéral et régulent les neurones à MCH. Ils ont été impliqués principalement dans la régulation de la prise alimentaire. Certaines hormones périphériques, telles la leptine et la ghreline, impliquées aussi dans la régulation de la satiété et de la prise alimentaire ont un effet sur les neurones à MCH. Enfin, la noradrénaline la sérotonine et l'acétylcholine, trois neuromodulateurs impliqués dans la régulation des états de vigilance, sont libérés dans l'hypothalamus latéral via des afférences extra-hypothalamiques provenant notamment du LC, du NRD et des noyaux du LDT/PPT respectivement (Bayer et al., 1999 ; Mochizuki et Scammell, 2003). Les trois semblent inhiber l'activité des neurones à MCH (Guyon et al., 2009). Il est intéressant de noter que l'amygdale et l'hippocampe projettent aussi vers l'hypothalamus latéral même si, à l'heure actuelle, on ne sait pas s'il existe des connexions corticales monosynaptiques avec les neurones à MCH (Cenquizca et Swanson, 2006).

4.2. Rôles physiologiques de la MCH

La distribution anatomique des afférences et efférences des neurones à MCH suggère une action large du neuropeptide MCH à la fois en tant que neuromodulateur et en tant qu'hormone dans le système nerveux central. En effet, la MCH a été impliqué dans de nombreuses fonctions neuroendocriniennes (stress, comportements sexuels, prise alimentaire, homéostasie énergétique), cognitives (mémoire, sommeil, dépression et anxiété, comportements sociaux) et dans la régulation du volume ventriculaire (Blouin et al., 2013 ; Borowsky et al., 2002 ; Conductier et al., 2013 ; Pissios et al., 2006). Dans ce manuscrit nous

ne décrirons que les études concernant le rôle de la MCH dans l'homéostasie énergétique, rôle le plus décrit à ce jour, et dans les deux fonctions qui retiennent notre attention : le sommeil et la mémoire.

4.2.1. La MCH régule l'homéostasie énergétique

Il est clair, en considérant le pattern d'expression de la MCH chez les rongeurs, que la MCH doit jouer un rôle dans la balance énergétique. Une série d'études a montré, qu'en effet, la MCH est un important régulateur de la prise alimentaire (Boutin et al., 2002). L'administration de MCH, qu'elle soit centrale ou intracérébrale provoque une hyperphagie chez le rat comme la souris et ce, que l'injection soit chronique ou aigüe (Della-Zuana et al., 2002 ; Gomori et al., 2003). Cette dernière, lors d'injections chroniques de MCH, est accompagnée d'obésité (Gomori et al., 2003). D'autre part, un jeûne forcé chez la souris conduit à l'augmentation des niveaux d'ARN messager de la ppMCH, niveaux qui reviennent à la normale après nutrition (Qu et al., 1996). Des souris transgéniques sur-exprimant la ppMCH sont obèses et présentent une hyperphagie lorsqu'elles suivent un régime enrichi en graisses (Ludwig et al., 2001). Inversement, l'application d'antagonistes du récepteur MCH-R1 ou la délétion du gène de la ppMCH ou du MCH-R1 provoquent une hypophagie et une diminution du poids (Borowsky et al., 2002 ; Mashiko et al., 2005 ; Shimada et al., 1998). Alon et Friedman ont développé un modèle de souris chez lequel les neurones à MCH sont spécifiquement détruits grâce à une construction génétique qui permet l'expression ciblée d'une toxine pro-apoptotique, l'ataxine 3, dans les neurones à MCH (Alon et Friedman, 2006). Ces souris présentent une perte des neurones à MCH progressive qui commence à quatre semaines et aboutit à la disparition d'environ 65% des neurones à MCH à 15 semaines. A partir de sept semaines, les souris MCH/ataxine3 commencent alors à devenir hypophagiques et maigres. Ce phénotype similaire à celui observé chez les souris déficientes pour le gène de la ppMCH suggère que la MCH elle-même est le principal médiateur des effets sur la prise alimentaire des neurones à MCH (Alon et Friedman, 2006).

D'autre part, on a vu que l'activité des neurones à MCH est régulée par des molécules intervenant dans la prise alimentaire. Ils pourraient ainsi relayer l'effet d'autres hormones ou peptides sur le métabolisme. Nous ne détaillerons pas ces différents cas de manière exhaustive dans ce manuscrit et nous ne détaillerons que le cas de la leptine, une hormone anorexigène (i.e. qui diminue la prise alimentaire) synthétisée par les adipocytes. En effet, chez les souris déficientes pour la leptine (souris ob/ob), la MCH et le MCH-R1 sont surexprimés (Kokkotou

et al., 2001 ; Segal-Lieberman et al., 2003). De plus, l'expression de MCH est diminuée après administration de leptine en conditions basales tandis qu'après un jeûne, la surexpression de MCH et de son récepteur sont bloquées par une même administration de leptine. Enfin, les souris MCH/ataxine3 comme les souris déficientes pour le gène du ppMCH présentent des niveaux de leptine inférieurs à ceux observés chez les souris contrôles (Alon et Friedman, 2006 ; Shimada et al., 1998). La leptine délivrerait donc son signal de satiété au moins en partie via un contrôle négatif sur le système MCH.

Enfin, notons que les souris déficientes pour le MCH-R1 sont aussi hyperactives et présentent un métabolisme altéré (élévation du rythme cardiaque et de la température corporelle) (Borowsky et al., 2002). Ainsi, en plus de son action sur la prise alimentaire, la MCH pourrait favoriser la conservation énergétique en diminuant le catabolisme et l'activité locomotrice. Ceci est cohérant avec l'effet excitateur du glucose sur les neurones à MCH qui pourrait alors promouvoir le repos et la conservation d'énergie lorsque les ressources énergétiques sont élevées comme après la prise alimentaire.

Ainsi, l'activation des neurones à MCH stimule la prise alimentaire et inhibe la dépense énergétique. Ces neurones sont sous le joug de régulations fines et multiples de différents acteurs du réseau de l'homéostasie énergétique ce qui désigne clairement cette population de neurones comme un centre intégrateur de ce réseau.

4.2.2. La MCH est un facteur hypnogène

La distribution anatomique des afférences et des projections des neurones à MCH suggère un lien entre le système MCH et le sommeil. Comme on l'a vu précédemment, les neurones à MCH projettent sur de nombreux noyaux cérébraux du tronc cérébral impliqués dans la régulation de l'alternance des états de vigilances et reçoivent des afférences de régions appartenant au même réseau.

Durant la dernière décennie, de nombreuses études, essentiellement chez le rongeur, ont exploré le rôle de la MCH dans la régulation du cycle veille-sommeil. Chez le rat, les neurones à MCH expriment fortement le marqueur d'activité c-Fos après à une hypersomnie en SP (Verret et al., 2003). De plus, l'application intra-cérébro-ventriculaire de MCH induit une augmentation dose-dépendante des quantités de SP et, dans une moindre mesure, de SL (Verret et al., 2003). Inversement, l'injection sous-cutanée d'un antagoniste du MCH-R1 conduit à une diminution dose-dépendante des quantités de SL profond et de SP au profit de

l'éveil (Ahnaou et al., 2008). La latence d'endormissement est plus grande et les épisodes de SP comme de SL sont plus courts. L'ensemble de ces études ont permis l'élaboration de l'hypothèse hypnogène de la MCH. Notons que les souris déficientes pour le MCH-R1 montrent aussi une altération de leur cycle veille-sommeil bien que les résultats ne soient pas complètement cohérents avec l'ensemble des autres études (Adamantidis et al., 2008). Néanmoins, l'hypersomnie observée chez ces mutants absolus (i.e. absence du MCH-R1 depuis l'embryogenèse) peut provenir de mécanismes de compensation qui ont pu se mettre en place pendant le développement en l'absence d'un système MCH fonctionnel. Les résultats observés ne sont donc peut-être pas spécifiquement liés au déficit en MCH-R1d'autant que la MCH est impliquée dans le développement. En effet, son application favorise la croissance de neurites dans des cultures cellulaires de neuroblastomes (Cotta-Grand et al., 2009).

La diminution des quantité de SP et de SL induite par l'injection d'antagoniste au MCH-R1 est suivie d'une récupération ou rebond de SP mais pas de SL (Ahnaou et al., 2008). De plus, l'enregistrement juxtacellulaire des neurones à MCH permettant un marquage cellulaire a montré que ces neurones sont silencieux pendant l'éveil puis, que leur taux de décharge augmente progressivement pendant le SL pour être maximal lors des épisodes de SP (Hassani et al., 2009) suggérant que la MCH contribuerait à la régulation de l'homéostasie du sommeil principalement en agissant sur le SP. Récemment, différentes études ont disséqué les mécanismes du contrôle de l'alternance des états de vigilance par le système MCH en utilisant la technique d'optogénétique afin d'explorer cette théorie. Cette dernière permet l'activation ou l'inhibition d'un gène d'intérêt via un laser en insérant dans sa séquence, celle d'un gène permettant l'expression d'un canal photosensible. La stimulation optique chronique des neurones à MCH pendant la nuit, période où les souris sont majoritairement éveillées, conduit à l'augmentation des quantités de SP comme de SL. L'amplitude des ondes delta, associée à l'intensité à la profondeur du SL, est elle aussi augmentée (Konadhode et al., 2013). Cela suggère que la MCH joue un rôle aussi bien sur l'induction de SL que du SP. Cependant, les auteurs stimulent les neurones à MCH une minute toutes les cinq minutes pendant un jour complet, cette activité soutenue pourrait donc conduire à une accumulation des neuromodulateurs libérés par les neurones à MCH qui pourrait amplifier l'effet hypnogène. Dans deux autres études, les auteurs ont choisi cette fois de stimuler les neurones spécifiquement lors des épisodes de SL ou de SP. La stimulation optique des neurones à MCH pendant les épisodes de SL conduit à un nombre plus important de transitions du SL vers le SP tandis que les stimulations optiques pendant le SP induisent une augmentation de la durée

des épisodes de SP (Jego et al., 2013 ; Tsunematsu et al., 2014). L'inactivation des neurones à MCH engendre une diminution de la fréquence de l'activité thêta observée pendant le SP. D'autres expériences menées par Jego et coll. suggèrent que l'activation des neurones à MCH favorise le maintien du SP en inhibant les centres d'éveil dont les neurones histaminergiques du noyau tubéro-mamillaire (TMN) via un effet conjoint de la MCH et du GABA libéré par les fibres à MCH (Clément et al., 2012 ; Jego et al., 2013). Ainsi, si la participation de la MCH dans la régulation du cycle veille-sommeil ne fait aucun doute, son rôle sur le SL et dans le contrôle du SP reste à élucider. La MCH est à la fois impliqué dans la régulation des états de vigilance et du métabolisme, elle pourrait donc contribuer à la régulation homéostatique du sommeil en favorisant l'endormissement lorsque les ressources énergétiques (glucose par exemple) sont élevées comme après la prise alimentaire.

4.2.3. MCH et mémoire

Les premières indications de l'implication de MCH dans les processus mnésiques, sont anatomiques. En effet, il existe une grande densité de projections des neurones à MCH associée à une forte expression de transcrits de MCH-R1 dans la formation hippocampique, l'amygdale et le néocortex, trois structures clefs dans l'apprentissage et la mémoire (Bittencourt, 2011 ; Lima et al., 2013) **(Fig. 18).**

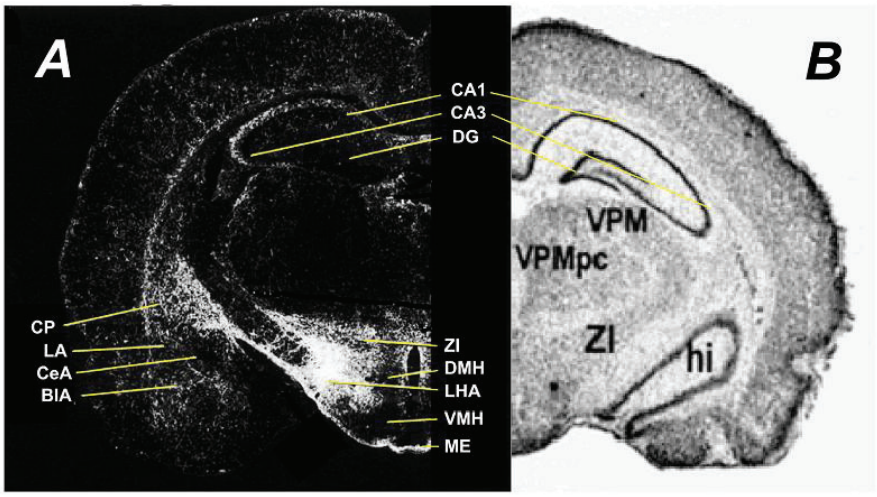


Figure 18. Distribution neuroanatomique (A) des projections des neurones à MCH et des transcrits du récepteur MCH-R1 (B) dans le cerveau de rat. *BlA, amygdale basolatérale; CeA, amygdale centrale;CP, putamen caudé; DG, gyrus denté; DMH, hypothalamus dorso-médian; hi, hippocampe; LA,amygdale latérale; LHA, hypothalamus latéral; ME, éminence médiane; VPM (pc), noyaux ventro-postérieurs médians du thalamus (pars compacta); ZI, zona incerta* (D'après Bittencourt et al., 2012 et Hervieu et al, 2000).

Des injections intra-hippocampiques et intra-amygdalienne de MCH chez le rat augmentent la rétention mnésique lors du test d'évitement passif, une tâche mnésique dépendante de

l'hippocampe et de l'amygdale (Monzon et al., 1999). Pendant la phase d'acquisition de cette tâche, l'animal est placé dans un compartiment grand et éclairé puis, dès qu'il rejoint le compartiment petit et sombre naturellement préféré, on lui envoie un choc électrique. La rétention est évaluée lors d'une phase de test en mesurant le temps de latence d'entrée dans le compartiment naturellement préféré devenu aversif. Ce même test a permis de mettre en évidence, chez des souris déficientes pour le MCH-R1, une forte détérioration de la courbe d'apprentissage et de la mémoire à long terme (Adamantidis et al., 2005). Lorsqu'elles sont testées un jour après la phase d'acquisition, les souris mutantes présentent une diminution significative des temps de latence d'entrée dans le compartiment aversif. Cet effet est encore plus important si les souris sont testées six jours après l'acquisition. Alors que les souris contrôles montrent toujours une rétention significative, les souris mutantes se comportent de manière naïve par rapport au stimulus aversif. Ainsi, la MCH semble faciliter les processus de d'apprentissage et de consolidation mnésique en modulant l'activité dans l'hippocampe et l'amygdale. La MCH pourrait-elle donc moduler la plasticité synaptique hippocampique ?

L'application de MCH dans l'hippocampe in vitro a montré une facilitation de la LTP en diminuant son seuil d'induction. L'injection intra-hippocampique de MCH induit une augmentation de l'expression des ARNm des sous-unités GluN1, GluN2A, GluN2B des récepteurs NMDA dans le gyrus denté (Varas et al., 2003) ce qui suggère un mécanisme NMDA dépendant. Chez les souris MCH-R1-/-, l'expression des transcrits de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA est diminuée dans l'aire CA1 et, dans une moindre mesure, dans l'aire CA3 de l'hippocampe (Adamantidis et al., 2005). Cette expression est associée à une diminution de la transmission AMPA et NMDA-dépendante dans l'aire CA1 de l'hippocampe. Les mécanismes d'induction de la LTP dans cette même aire sont altérés chez les souris déficientes pour le MCH-R1 et la LTD est diminuée (Pachoud et al., 2010). La MCH favoriserait donc la transmission glutamatergique et la plasticité synaptique de longue durée dans l'hippocampe.

La MCH est capable d'influencer les processus de mémoire et d'apprentissage dépendants de l'hippocampe, ainsi que certains acteurs importants de la transmission et la plasticité synaptique dans l'hippocampe. Ainsi, la MCH étant impliquée dans la régulation du métabolisme et notamment dans la prise alimentaire, elle pourrait favoriser la mémorisation de lieux où l'animal a ressenti la faim contribuant ainsi à l'optimisation des stratégies de recherche de nourriture (Moran et Gao, 2006). Comme on l'a vu précédemment, le SP est caractérisé par des quantités élevées d'acétylcholine dans l'hippocampe qui pourrait favoriser

la consolidation mnésique en augmentant les oscillations thêta dans la formation hippocampique (Hasselmo, 2006). Or, de manière intéressante, des injections de MCH dans le septum médian induisent la libération d'acétylcholine dans l'hippocampe de rat (Lu et al., 2013). Les neurones à MCH étant principalement actifs pendant le SP, ceci suggère que la MCH pourrait être un bon médiateur du rôle facilitateur du SP sur la mémoire.

Objectifs

Comme nous l'avons vu dans cette introduction, le SP facilite les formes de mémoires dépendantes de l'hippocampe possiblement via une modulation de la plasticité synaptique hippocampique. Lors de cette thèse, nous avons cherché à caractériser les mécanismes, à l'échelle synaptique et systémique, par lesquels le SP exerce ce rôle facilitateur. Pour cela nous nous sommes posé trois questions principales : D'abord, quels acteurs associés au SP pourraient réguler la formation ou la consolidation de nouveaux apprentissage ? Ensuite, comment ces derniers pourraient moduler l'activité de l'hippocampe et de quelle façon ? Et enfin, si le SP post-apprentissage peut modifier des processus précoces mis en place lors de la consolidation synaptique, quelles en sont les conséquences sur le remodelage des réseaux corticaux de la mémoire qui apparait lors de la consolidation à long terme ? Ces questions ont donné lieu aux trois projets exposés ci-dessous.

Objectif 1 : Déterminer le rôle des neurones à MCH sur la mémoire hippocampo-dépendante et la plasticité synaptique hippocampique

Les neurones à MCH sont actifs principalement pendant le SP et complètement silencieux pendant l'éveil (Hassani et al., 2009). Or, l'injection de MCH a un effet pro-mnésiant dans des apprentissages dépendants de l'hippocampe et des études menées chez des souris déficientes pour le récepteur MCH-R1 (MCH-R1 -/-) ont montré qu'une atteinte du système MCH-MCH-R1 altérait à la fois les performances des animaux dans des tests de mémoire dépendante de l'hippocampe (Adamantidis et al., 2005), et l'induction de plasticité à long terme au niveau des synapses SC-CA1 de l'hippocampe (Pachoud et al., 2010). **Les neurones à MCH peuvent-ils donc moduler la mémoire hippocampo-dépendante dont la consolidation est facilitée par le SP ? Et si c'est le cas, peuvent-ils participer à la régulation des processus de consolidation synaptique qui prennent place dans l'hippocampe ?**

Pour tester cette hypothèse, nous avons donc travaillé avec un modèle de souris transgéniques MCH/ataxine3 (Alon et Friedman, 2006) chez lesquelles les neurones à MCH sont spécifiquement détruits à l'âge adulte. Nous avons étudié le comportement de ces souris dans deux tâches de mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe : une tâche de mémoire de référence dans le labyrinthe aquatique et une tâche de mémoire de travail dans un labyrinthe en T. En parallèle, nous avons examiné la plasticité synaptique, à court et à long terme, au

niveau des synapses SC-CA1 d'hippocampe de souris MCH/ataxine3. Cette étude électrophysiologique a été menée sur tranche de cerveau afin de nous permettre une caractérisation détaillée de ces différentes formes de plasticité. Les résultats de cette étude sur les souris MCH/ataxine3 sont présentés dans le chapitre I de ce manuscrit et ont fait l'objet d'une publication soumise au journal *Hippocampus*.

Objectif 2 : Caractériser les effets neuromodulateurs de la MCH sur les réponses synaptiques hippocampiques

Comme nous l'avons exposé, la MCH pourrait être un médiateur moléculaire du rôle facilitateur du SP sur la mémoire. De plus, l'injection de MCH chez le rat facilite ensuite l'induction de LTP dans l'hippocampe (Varas et al., 2003). Il a été montré que la MCH exerce des effets variés sur la transmission glutamatergique selon les synapses considérées, dans l'hypothalamus latéral et le noyau accumbens (Gao, 2009 ; Rao et al., 2008 ; Sears et al., 2010). Cependant, les mécanismes cellulaires de l'action du neuropeptide directement sur la transmission dans l'hippocampe sont très peu connus. **La MCH peut-elle moduler la transmission excitatrice dans l'hippocampe ? Par quels mécanismes ?** Nous avons donc cherché à caractériser les effets neuromodulateurs de la MCH sur la transmission excitatrice au niveau des synapses SC-CA1. Ces synapses comme on l'a vu, ont été largement étudiées dans le cadre de la mémoire et de la plasticité synaptique. Pour cela, nous avons examiné, dans des tranches d'hippocampe de souris, l'effet de l'application exogène de MCH sur la réponse synaptique glutamatergique dans les cellules pyramidales de CA1 au moyen d'enregistrements extra- et intra-cellulaires (patch-clamp). Ces expériences devaient nous permettre de confirmer le rôle neuromodulateur de la MCH sur la transmission excitatrice dans l'hippocampe et identifier si cette action était pré et/ou post-synaptique. Ensuite, nous avons utilisé de nombreux agents pharmacologiques afin de disséquer les mécanismes d'action de la MCH et identifier des différents acteurs, moléculaires et cellulaires, impliqués. Nos travaux ont révélé, de manière inattendue, que la MCH modulait la transmission excitatrice hippocampique en agissant sur la gliotransmission. Pour compléter nos résultats obtenus en électrophysiologie, nous avons mené une collaboration avec l'équipe de Bernard Lakaye (Université de Liège, Belgique) qui a réalisé une série d'expériences sur des cultures cellulaires d'astrocytes corticaux. L'ensemble de ces expériences devaient nous permettre d'établir un modèle de l'action de la MCH dans les synapses SC-CA1 de l'hippocampe de

souris. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre II et font l'objet d'une publication qui sera soumise prochainement.

Objectif 3 : Déterminer le rôle du SP dans l'activation des réseaux corticaux pendant les processus de consolidation à court et long terme lors d'un conditionnement contextuel à la peur

Dans nos deux précédents projets nous avons cherché à déterminer si la MCH pouvait être un possible vecteur moléculaire du rôle facilitateur du SP sur la mémoire et les processus de consolidation synaptique dans l'hippocampe. Des études ont montré que le SP étaient nécessaire à la consolidation uniquement pendant des fenêtres temporelles restreintes (*REM sleep window*) (Smith, 1995). Une étude de notre laboratoire a montré qu'une privation courte de SP (4h) chez le rat directement après l'apprentissage suffit à altérer les performances de rats dans une tâche de conditionnement contextuel à la peur (hippocampo-dépendante) et à perturber l'induction de LTP dans l'hippocampe dorsal (Ravassard et al., sous presse). De plus, l'induction d'un rebond de SP de 3h post apprentissage permet une restauration de la LTP et une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans le maintien de la LTP comme le facteur de transcription c-Fos, et le BDNF (Ravassard et al., 2014). Cela suggère que le SP post-apprentissage joue un rôle dans les processus de consolidation synaptique qui se mettent en place de manière précoce dans l'hippocampe. **Mais est-ce que la perturbation de ces processus synaptiques précoces pourraient avoir des conséquences sur le stockage à long terme de l'information (plusieurs semaines, voire mois) et dans les processus de consolidation systémique qui l'accompagne ? Le SP post-apprentissage pourrait-il être impliqué dans la formation et le remodelage du réseau cortical qui apparait au cours du temps ?** Chez le rongeur, à notre connaissance, aucune étude n'a été publiée sur le rôle du SP post-apprentissage sur la consolidation à long-terme.

Nous avons donc étudié chez la souris, l'influence d'une privation courte de SP (6h) immédiatement après un conditionnement contextuel à la peur sur la consolidation à court (24h) ou à long (30 jours) terme de ce conditionnement. Pour cela, nous avons utilisé une méthode de privation automatique et non stressante développée au laboratoire (Chauveau et al., 2014). L'étude des performances des animaux privés testés à 24h et 30 jours devait nous permettre d'étudier la contribution SP dans la consolidation à court et long terme d'une tâche de mémoire dépendant de l'hippocampe. En parallèle, nous avons réalisé une étude immunologique de l'expression du marqueur indirect d'activité c-Fos (qui peut être induite par

un rebond de SP et par la plasticité à long terme) dans les principales structures des réseaux corticaux mis en place lors des processus de consolidation à court et long terme. Comme nous l'avons vu, l'apprentissage d'un apprentissage émotionnel et spatial comme le conditionnement contextuel à la peur, met un jeu un réseau hippocampo-amygdalien auquel s'ajoutent progressivement des structures néocorticales pendant la consolidation systémique. Nous avons ainsi évalué l'activité au rappel à 24h et 30 jours de trois structures : l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal. Si le SP post-apprentissage est impliqué dans la consolidation à long terme nous nous attendions à une perturbation de la réorganisation du réseau cortical responsable du stockage à long terme, chez les souris privées de SP au rappel à 30 jours. Cette étude est encore en cours et nous ne présenterons donc que nos résultats préliminaires dans le chapitre III.

CHAPITRE I :

Rôle des neurones à MCH, actifs pendant le SP, sur la mémoire hippocampo-dépendante et la plasticité synaptique hippocampique

1. Contexte

Les neurones à MCH sont actifs principalement pendant le SP et complètement silencieux pendant l'éveil (Hassani et al., 2009) et ont été impliqués dans la régulation des états de sommeil (Jego et al., 2013 ; Konadhode et al., 2013 ; Tsunematsu et al., 2014). De précédents résultats du laboratoire ont montré une diminution sévère à la fois de la LTP et de la LTD au niveau des synapses SC-CA1 de souris déficientes pour MCH-R1 (MCH-R1 -/-) (Pachoud et al., 2010). Ces mêmes souris présentent une altération des performances dans des tests de mémoire dépendante de l'hippocampe (Adamantidis et al., 2005). Ces résultats suggèrent donc que l'activation des MCH-R1 contribue à l'expression de phénomènes de plasticité synaptique de longue durée dans l'hippocampe et à la mémorisation de nouvelles informations. Cependant, les souris MCH-R1 -/- présentent un déficit de l'expression des récepteurs AMPA et NMDA, à l'origine des perturbations de la plasticité à long terme, qui pourrait résulter d'une absence d'activation des MCH-R1 pendant le développement. En effet, la MCH via ses MCH-R1, participerait aux processus développementaux en contribuant notamment à la différenciation neuronale (Cotta-Grand et al., 2009). Ainsi, les déficits observés pourraient ne pas refléter un rôle cognitif des neurones à MCH sur l'hippocampe et la mémoire.

Pour élucider le rôle des neurones à MCH dans la mémoire hippocampo-dépendante facilitée par le SP, nous avons travaillé avec un modèle de souris transgéniques MCH/ataxine3 pour lesquelles les neurones à MCH sont spécifiquement détruits et qui ne devait nous permettre de nous abstraire des contraintes développementales. En effet, l'ataxine, une toxine pro-apoptotique, est inactive pendant le développement et assure donc la destruction spécifique des neurones à MCH à l'âge adulte. Cette souche de souris transgénique a été générée au laboratoire par Lucienne Léger grâce à une collaboration avec Jeffrey M. Friedman (The Rockefeller University, New York, USA) qui nous a fourni la construction MCH/ataxine3 (Alon et Friedman, 2006). Dans un premier temps, nous avons donc examiné, en électrophysiologie *in vitro*, la plasticité synaptique, à court et à long terme, au niveau des

synapses SC-CA1 d'hippocampe de souris MCH/ataxine3. Puis, dans un second temps, nous avons étudié le comportement de ces souris dans deux tâches de mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe : une tâche de mémoire de référence dans le labyrinthe aquatique et une tâche de mémoire de travail dans un labyrinthe en T

Ces résultats ont donné lieu à une publication soumise à la revue *Hippocampus*.

2. Article 1

Publication: "Genetic deletion of Melanin-Concentrating Hormone (MCH) neurons impairs hippocampal short-term synaptic plasticity and hippocampal-dependent forms of short-term memory."

Léa Le Barillier[1, 2, 4], Lucienne Léger[1, 3, 4], Pierre-Hervé Luppi[1, 3, 4], Patrice Fort[1, 3, 4], Gaël Malleret[1, 2, 4†], Paul-Antoine Salin[1, 2, 4†‡]

1 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche 5292; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 1028

2 Forgetting and cortical dynamics, Lyon Neuroscience Research Center, F-69008 Lyon, France

3 Physiopathology of the Sleep Neuronal Networks, Lyon Neuroscience Research Center, F-69008 Lyon, France

4 University Lyon 1, University Lyon 1, F-69000 Lyon, France

† G.M. and P.A.S. contributed equally to the work.

Abstract

The cognitive role of Melanin-Concentrating Hormone (MCH) neurons, a neuronal population located in the mammalian postero-lateral hypothalamus sending projections to all

cortical areas, remains poorly understood. Mainly activated during paradoxical sleep (PS), MCH neurons have been implicated in sleep regulation. The genetic deletion of the only known MCH receptor in rodent leads to an impairment of hippocampal dependent forms of memory and to an alteration of hippocampal long-term synaptic plasticity. By using MCH/ataxin3 mice, a genetic model characterized by a selective deletion of MCH neurons in the adult, we investigated the role of MCH neurons in hippocampal synaptic plasticity and hippocampal-dependent forms of memory. MCH/ataxin3 mice exhibited a deficit in the early part of both long-term potentiation and depression in the CA1 area of the hippocampus. Post-tetanic potentiation (PTP) was diminished while synaptic depression induced by repetitive stimulation was enhanced suggesting an alteration of pre-synaptic forms of short-term plasticity in these mice. Behaviorally, MCH/ataxin3 mice spent more time and showed a higher level of hesitation as compared to their controls in performing a short-term memory T-maze task, displayed retardation in acquiring a reference memory task in a Morris water maze and showed a habituation deficit in an open field task. Deletion of MCH neurons could thus alter spatial short-term memory by impairing short-term plasticity in the hippocampus. Altogether, these findings could provide a cellular mechanism by which PS may facilitate memory encoding. *Via* MCH neuron activation, PS could prepare the day's learning by increasing and modulating short-term synaptic plasticity in the hippocampus.

Introduction

Melanin-concentrating hormone (MCH), a 19 amino acid neuropeptide, has been implicated in many major physiological functions such as energy homeostasis, food intake (Alon and Friedman, 2006; Guyon et al., 2009; Pissios et al., 2006) emotional processes and social behaviors (Blouin et al., 2013; Borowsky et al., 2002) and in the regulation of ventricular volume (Conductier et al., 2013). Several studies have also investigated the role of MCH in the sleep–wake cycle and suggested that MCH could increase slow wave sleep (SWS) and paradoxical (Rapid Eye Movement, REM) sleep (PS) amount, while the antagonists against the only known MCH receptor in rodent (MCH receptor 1, MCH-R1) decrease their quantity (Ahnaou et al., 2008; Verret et al., 2003). Furthermore, recent optogenetic studies suggest that MCH-producing neurons exert a complex action on sleep regulation and mainly contribute to an increase in PS amount (Jego et al., 2013; Konadhode et al., 2013; Tsunematsu et al., 2014).

It has been shown that MCH neurons are active during PS and silent during wakefulness (Hassani et al., 2009). As it is now well demonstrated that sleep facilitates the encoding and consolidation of different hippocampal-dependent forms of memory (Rasch and Born, 2013), we hypothesized that MCH neurons might play a critical role in this sleep-induced facilitation (Pachoud et al., 2010). Supporting this hypothesis, MCH neurons located mainly in the *zona incerta* and the postero-lateral hypothalamus send projections to the hippocampal formation, particularly the CA1 and CA3 regions, known to be involved in the encoding and consolidation of several forms of spatial memory (Bittencourt, 2011; Lima et al., 2013). MCH administration has been shown to improve performance in a hippocampal-dependent memory task, inhibitory passive avoidance, and to enhance hippocampal excitatory synaptic transmission (Varas et al., 2002a; Varas et al., 2002b; Varas et al., 2003). Moreover, we previously reported that the induction of hippocampal long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), two cellular models of learning and memory, are impaired in MCH-R1 knockout (MCH-R1 -/-) mice (Pachoud et al., 2010). In these mice, the consolidation of inhibitory passive avoidance is also altered (Adamantidis et al., 2005).

Thus, following hippocampal replays during slow wave sleep (Rasch and Born, 2013; Wilson and McNaughton, 1994), MCH neuron activation might facilitate synaptic plasticity in the hippocampus during PS, and by this mean, enhance memory consolidation (Pachoud et al., 2010). In order to more fully understand the role of MCH neurons, we carry out experiments in MCH/ataxin3 mice expressing a pro-apoptotic toxin (ataxin3) specifically in MCH neurons. One important advantage of this genetic model is that it bypasses a potential drawback of MCH-R1-/- mice such as developmental induced impairments. The genetic deletion of MCH neurons in MCH/ataxin3 mice thus gradually appears during post-natal development. It has already been shown that these mice are characterized by an altered food intake and energy homeostasis at adulthood (Alon and Friedman, 2006). In the present study, we investigated hippocampal synaptic plasticity in CA1 and hippocampal-dependent memory in MCH/ataxin3 mice and showed that short-term plasticity and short-term memory are impaired.

Materials and methods

Animals. MCH/ataxin3 mice (Alon and Friedman, 2006) and their wild-type (WT) littermates were bred in our facility using a C57BL/6J strain for backcrossing (C57BL/6J mice were

purchased from Charles Rivers, France). Mice were housed in groups of 4 or 5 individuals. They were exposed to a standard 12h light/dark cycle in a temperature-controlled room and had *ad libitum* access to food and water. All experiments were conducted on 3 months old male mice. All procedures were approved by the institutional animal care and use committee of the University of Lyon 1 (protocols BH2006-09 and BH2006-10) and were conducted in compliance with the French and European Community guidelines for the use of research animals.

Electrophysiology. Mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (150mg/kg, i.p.) and their brains were extracted. Coronal brain slices (350 µm) were cut with a vibratome (VT1000S, Leica) in 4°C artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 124 NaCl, 26 NaHCO3, 2.5 KCl, 1.25 NaH2PO4, 2.5 CaCl2, 1.3 MgCl2, 10 glucose. Slices were maintained at room temperature for at least 30 min in a submerged chamber containing aCSF equilibrated with 95% O2 and 5% CO2 and then transferred to a recording chamber continuously superfused with oxygenated aCSF maintained at 33 °C. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded at CA3 Schaffer Collateral (SC)-CA1 synapses with both stimulating (bipolar tungsten electrode, FHC) and recording electrodes (borosilicate glass microelectrodes) located in the *stratum radiatum*. All recordings were performed in presence of gamma-aminobutyric acid (GABA)-A receptor antagonist picrotoxin (100 µM, Sigma). Before recording, CA1 and CA3 regions were separated on each slice by a knife section. Synaptic responses were quantified by using the initial slope of fEPSP and plasticity amplitude was expressed as a percentage of the average synaptic response recorded during the 10 min baseline. Baseline fEPSPs were evoked at 0.1 Hz. The stimulation intensity (square pulse, 200 µs duration) was adjusted to give fEPSP slopes of approximately 40% of the maximum response. Input/output (I/O) curves were assessed by progressively raising the stimulation intensity every 5 data points from 40 to 200 µA. The input is given by the amplitude of the afferent volley (Schaffer collateral presynaptic action potentials) that precedes the postsynaptic response, whereas the output is given by the initial slope of the fEPSP. Paired-pulse facilitation (PPF) was tested by evoking fEPSP with two paired stimulations separated by 10, 50, 100, 500 and 1000 ms intervals. PPF ratio was computed as the ratio between the response of the second pulse by the response of the first pulse.

Long-term plasticity. Long-term potentiation (LTP) was induced by giving a theta burst stimulation (TBS) which consists of 4 bursts (a burst was composed by 4 stimuli at 100 Hz)

delivered at a 5 Hz frequency (Kirkwood and Bear, 1994) and long-term depression (LTD) was induced by low frequency stimulation (LFS) consisted of 900 pulses at 1 Hz (Dudek and Bear, 1992).

Short-term plasticity. All short-term plasticity experiments were conducted in presence of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist D-acid 2-amino-5-phosphonovaleric (DAPV, 100 µM, Tocris). Post Tetanic Potentiation (PTP) was induced by giving either high frequency stimulation (HFS) consisting in 100 pulses at 100 Hz, or more moderate 20 Hz stimulation during 20 s. During baseline and after HFS, fEPSPs were sampled at 1Hz. Synaptic depression was induced by a LFS (900 pulses at 1 Hz). Data acquisition and analysis were carried out using Elphy (G. Sadoc, CNRS, Gif-sur-Yvette, France).

Intra-group comparisons were analyzed with a non-parametric paired sample Wilcoxon signed rank test. Comparisons between MCH/ataxin3 and WT mice were made using Mann-Whitney *U* test. All summary data are expressed as mean ± S.E.M., with *n* representing the number of animals used.

Behavioral studies.

Morris Water Maze Task. The apparatus was a white circular swimming pool (200 cm in diameter, 60 cm high) located in a room with various distal cues. The pool was filled with opaque water (40 cm depth, 20 °C) and the circular platform (10 cm in diameter) was placed 1cm below the water surface in the center of a given quadrant. The water maze task consisted in three training phases as previously described (Malleret et al., 1999). During the visible platform habituation phase (days 1 and 2), the animals learned to swim to a cued platform placed in a different location at each trial. During the acquisition phase (spatial task - days 3 to 12), the animals learned the location of a hidden platform placed in a fixed location. During the reversal phase (days 13 to 16), the hidden platform location was changed to the opposite quadrant. Each day, the animals performed 4 trials of no more than 120 s with a 15 min inter-trial interval. Animals that exceeded the 120 s cut-off time were gently hand-guided to the platform. All the animals were allowed to rest 15 s on the platform at the end of each trial. Probe trials of 60 s, during which the platform was removed from the pool, were performed to assess retention of the previously acquired information at the end of training on days 7, 12 and 17. The mice pathways were recorded with a video tracking system (Viewpoint, France).

Open Field. The apparatus was a square box (60 x 40 x 20 cm). The animals were initially placed at one of the four corners of the box and were allowed to freely explore it during 20min. Mice pathways were recorded using the same video tracking system (Viewpoint, France).

Delayed Non-match to Sample T-Maze Task. One-week prior the beginning of the task, food was restricted so that the animals were at 85% of their *ad-libitum* free weight. The apparatus was a plexiglass transparent maze (long arms 65 x 10 cm, short arms 55 x 10 cm). Mice were habituated to the maze the day before the task with three trials during which they collected food pellets dispersed throughout the maze. Once habituated, mice performed 4 trials per day with 15 min inter-trial intervals and each trial consisted in two runs, a forced run and a choice run. Both arms were baited at the beginning of the trial. In the forced run, only one pseudo-randomly chosen arm was open. The animal was placed at the end of the long arm and was allowed to collect the food reward located at the end of the open arm. The animal was then placed in a holding cage for 5 s while the second short arm was open for the choice run. The animal was then returned to the end of the long arm of the maze and was allowed to visit only one of the two short arms of the maze. Trials were ended as soon as the animal reached the end of one arm. Errors were scored when the animals entered the same arm visited during the forced phase, and correct choices were scored when they entered the previously unvisited arm. Latencies to reach an arm and hesitations (hesitation is defined as a stop of more than 3 s at the crossroad or a momentary entrance in a wrong arm that is quickly corrected) were also quantified. We carried out the analysis on blocks of two consecutive days.

For all behavioral studies, the experimenter was blind to the genotype. Statistical analyses used repeated measures ANalysis Of VAriance (ANOVAs) with Genotype as the between-subject factor and Time, Quadrants and Blocks as within-subject factors. Data are presented as mean ± SEM. *n* indicates the number of mice for each behavioral experiments.

Results

SC-CA1 Basal Synaptic Transmission is Normal in MCH/ataxin3 Mice.

We studied the input/output (I/O) relationships for different stimulus intensities (Fig. 1A) to assess the synaptic efficacy in the two genotypes. No significant differences between the I/O curve slopes from MCH/ataxin3 and littermate controls (wild type (WT) mice) were observed

(Fig. 1A, p = 0.6). These results suggest that excitatory basal synaptic transmission at SC-CA1 synapses was normal in MCH/ataxin3 mice.

Paired-pulse Facilitation is Normal at SC-CA1 Synapses in MCH/ataxin3 Mice.

We next assessed if basal presynaptic function at SC-CA1 synapses could be modulated in MCH/ataxin3 mice by examining paired-pulse facilitation (PPF). PPF is a form of short-term synaptic plasticity which provides an indirect measure of glutamate release probability (Salin et al., 1996; Zucker and Regehr, 2002). To address this question, we first computed PPF ratio at different inter-stimuli intervals and found that it was not affected in MCH/ataxin3 mice (Fig.1B). Secondly, we manipulated the probability of neurotransmitter release by changing the extracellular Ca^{2+}/Mg^{2+} concentration (Fig.1C-E) to determine if calcium sensitivity was changed in mutant mice. Diminishing the Ca^{2+}/Mg^{2+} ratio from 4/4 mM to 1/7 mM produced an increase in the paired-pulse ratio in WT and MCH/ataxin3 mice (Fig.1E, 4/4 mM: 92 ± 3% for WT and 91 ± 5% for MCH/ataxin3 mice; 1/7 mM: 165 ± 14% for WT and 140 ± 14% for MCH/ataxin3 mice). This modulation of Ca^{2+}/Mg^{2+} ratio from 4/4 mM to 1/7 mM gave rise to a decrease in the fEPSP slope of WT and MCH/ataxin3 mice (Fig.1D, 4/4 mM: 120 ± 15% for WT and 161 ± 20% for MCH/ataxin3 mice; 1/7 mM: 21 ± 2% for WT and 27 ± 3% for MCH/ataxin3 mice). However, no difference between MCH/ataxin3 and WT mice was observed for fEPSP slope and paired-pulse ratio at these two Ca^{2+}/Mg^{2+} concentrations (for 4/4 mM, PPF: p = 0.942, fEPSP: p = 0.272; for 1/7 mM, PPF: p = 0.175, fEPSP: p = 0.138).

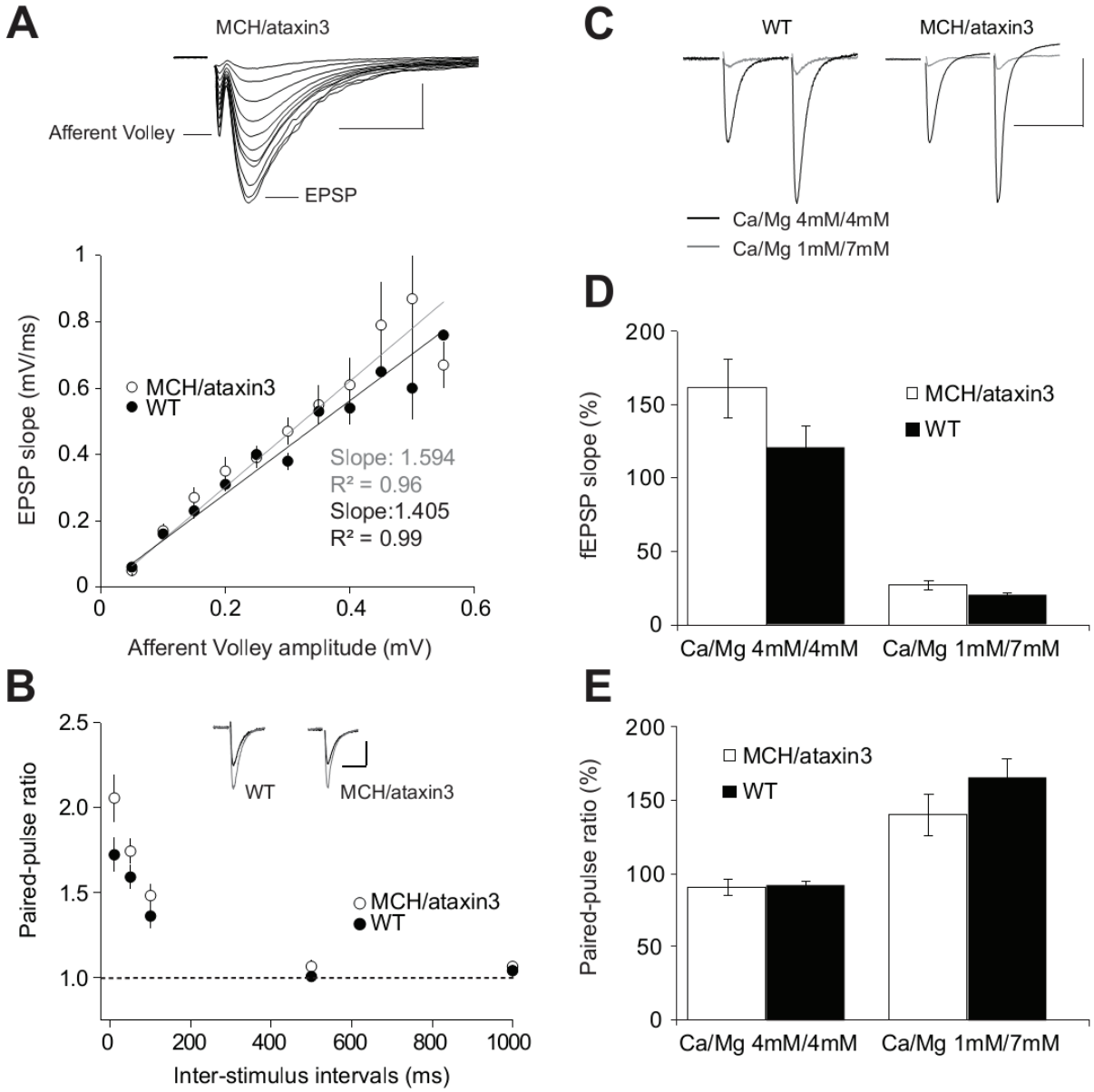


Figure 1. SC-CA1 Basal Synaptic Transmission and Paired-pulse Facilitation are Normal in MCH/ataxin3 mice. A. Mean input/output curves from MCH/ataxin3 (open circles, n = 11) and littermate controls (WT mice, filled circles, n = 10). The sample traces correspond to the superimposed afferent volley and fEPSP evoked by eleven stimuli with increasing intensity. The stimulus artifacts were removed. Scale: 0.5 mV/10 ms. The average curve slope values were not significantly different between the two genotypes. **B.** Summary plot of paired-pulse facilitation experiments for MCH/ataxin3 mice (open circles, n = 9) and WT mice (filled circles, n = 9) at the indicated inter-stimulus intervals. Average traces of 5 successive sweeps. Response evoked by the second stimulation at an interval of 50 ms (grey trace) is superimposed on the one evoked by the first stimulation (dark trace). No difference in the paired-pulse ratio was observed between genotypes. **C-E.** Effect of Ca^{2+} on fEPSP at SC-CA1 synapse. The Ca^{2+}/Mg^{2+} ratio was changed from 4/4 to 1/7 mM. Average traces of 20 successive sweeps. Scale: 0.2 mV/50 ms. No difference is observed in fEPSP slope or in paired-pulse ratio between MCH/ataxin3 and WT mice (Ca^{2+}/Mg^{2+}: 4/4 mM, paired-pulse ratio: p = 0.942, fEPSP slope: p = 0.272; Ca^{2+}/Mg^{2+}: 1/7 mM, paired-pulse ratio: p = 0.175, fEPSP slope: p = 0.138).

The Early Phases of LTP and LTD induced at SC-CA1 synapses is Altered in MCH/ataxin3 Mice.

To determine if MCH neurons deletion affected long-term synaptic plasticity, we first compared LTP induced at SC-CA1 synapses in brain slices of MCH/ataxin3 (n = 7) and WT mice (n = 8) (Fig. 2A and C). Theta burst stimulation (TBS, see Materials and Methods) evoked a similar persistent increase of the fEPSP slope in both MCH/ataxin3 (Fig.2C, 194 ± 24%, p = 0.024) and WT mice (Fig. 2C, 193 ± 17%, p = 0.019) 55-60 min post-stimulus. However, while LTP amplitude was maximum shortly after TBS in WT mice, MCH/ataxin3 mice displayed a progressive increase of the fEPSP slope before reaching a plateau 25 min after stimulation (Fig. 2C, differences between genotypes at 0-25 min: p = 0.045) suggesting that, although TBS led to normal SC-CA1 LTP expression, the early part of this type of plasticity was impaired in MCH/ataxin3 mice. A decrease in cooperativity (Andersen, 1987) cannot explain such deficit as we did not observe any differences between genotypes in average baseline fEPSP slope before LTP induction (0.17 ± 0.06 mV/ms for MCH/ataxin3 and 0.18 ± 0.06 mV/ms for WT mice, p = 1). The envelope of depolarization during TBS stimulation was also not different between genotypes (0.206 ± 0.03 mV for MCH/ataxin3 and 0.207 ± 0.05 mV for WT, p = 0.834, Fig. 2C).

LTP and LTD are thought to be bidirectional phenomena relying on the same effectors and therefore co-regulated at a synaptic level. Therefore, we investigated if LTD –and in particular its early phase- might be enhanced in MCH/ataxin3 mice. LTD induced at SC-CA1 synapses with low frequency stimulation (LFS) was observed in MCH/ataxin3 (73.6 ± 5%, p = 0.015, n = 7) and WT mice (88.8 ± 2%, p = 0.031, n = 8) (Fig.2B and D). No difference was observed between both genotypes at 55-60 min post-LFS (p = 0.054). During LFS (0-15 min) however, the repeated stimulation led to a depression of the synaptic response as fEPSP slope decreased to 90.2 ± 1% in wild type and to 58.5 ± 3% in mutant mice during the last 5min (10-15 min, Fig.2D). This depression was significantly higher in MCH/ataxin3 as compared to WT mice (p = 0.013). Expression of SC-CA1 LTD was thus not altered in MCH/ataxin3 mice but we observed an enhancement of synaptic depression during LFS that mirrored the impairment of the early phase of the LTP seen above.

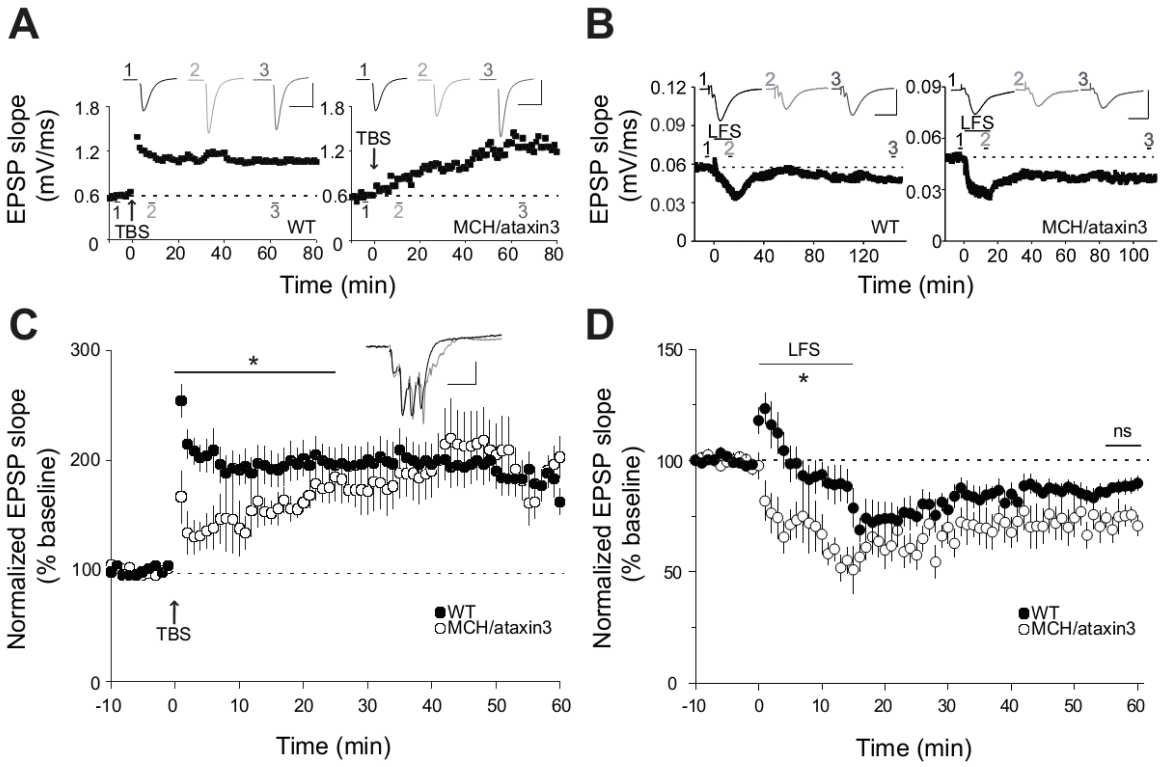


Figure 2. Induction of LTP and LTD is altered in MCH/ataxin3 mice at SC-CA1 synapses. Time course of representative LTP (**A**) and LTD (**B**) experiments from a WT mouse (left) and a MCH/ataxin3 mouse (right). Sample traces are average of 20 successive sweeps taken 5 min before, 5 min after and 60 min after TBS (**A**) and 5 min before (dark line), 5 min during (blue line) and 60 min after LFS (red line) (**B**). Scale: 0.2 mV/20 ms. **C.** Summary plot of LTP experiments for MCH/ataxin3 mice (open circles, n = 7) and WT mice (filled circles, n = 8). No significant differences of LTP amplitude were observed 55 to 60 min after TBS between MCH/ataxin3 mice and their WT controls. However, during the first 25 min after TBS, MCH/ataxin3 mice displayed a lower and slower increase in fEPSP slope as compared to WT mice (p = 0.045) suggesting that the early phase of LTP is altered in transgenic mice. Sample traces are taken during TBS stimulation of two representative experiments for MCH/ataxin3 (grey line) and WT (dark line). Scale: 0.25 mV/25 ms. The envelope of depolarization during TBS was the same in both genotypes (p = 0.834). **D.** Summary plot of LTD experiments for MCH/ataxin3 mice (open circles, n = 7) and wild type mice (filled circles, n = 8). No significant differences of LTD amplitude were observed 55-60 min after LFS between MCH/ataxin3 mice and their WT controls. However, during LFS, MCH/ataxin3 mice displayed a greater decrease in fEPSP slope as compared to WT mice (p = 0.013) suggesting that the early phase of LTD is also altered in transgenic mice.

Short Term Plasticity is Impaired in MCH/ataxin3 Mice at SC-CA1 Synapses.

As expression of long-term plasticity and basal synaptic transmission were normal in MCH/ataxin3 mice, we discarded the hypothesis that alteration of the early phase of either SC-CA1 LTP or LTD was provoked by abnormal synaptic glutamate receptor-dependent transmission. It is well established that forms of short-term plasticity induced by repetitive stimulation, post-tetanic potentiation (PTP) and synaptic depression, participate to the early phase of long term synaptic plasticity (Zucker and Regehr, 2002). We therefore investigated if these forms of short-term plasticity were altered in MCH/ataxin3 mice in presence of the

NMDAR antagonist DAPV to prevent long-term plasticity induction. We elicited PTP with high frequency stimulation at 100 Hz (Fig.3A). A 100 Hz tetanus caused a 20 s increase of fEPSP slope in wild type (Fig.3A, 151 ± 8%, $p < 0.0001$) but a shorter (15 s) increase in MCH/ataxin3 mice (Fig.3A, 124 ± 4%, $p < 0.0001$). The amplitude of PTP was significantly lower for MCH/ataxin3 mice as compared to their wild type controls (Fig.3A, 0-15 s post-stimulus, $p = 0.004$) suggesting that PTP was diminished in MCH/ataxin3 mice. To determine if an enhanced synaptic depression could account for the alteration of the early phase of LTD, we induced synaptic depression upon repetitive stimulation (LFS, Fig.3B). Synaptic response was more depressed during repetitive stimulation in MCH/ataxin3 mice (Fig.3B, 4-11 min, $p = 0.038$) confirming what we observed during LTD experiments. We also observed during the first minutes after LFS a transitory enhancement of synaptic depression amplitude for MCH/ataxin3 mice as compared to their wild type controls (Fig.3B, 0-2 min post-stimulus, $p = 0.038$). These results suggest that a shift toward depression exists in MCH/ataxin3 mice during the induction of short-term plasticity. To assess such shift, we used an intermediate stimulation protocol of 20 Hz during 20 s known to be able to induce both PTP and synaptic depression (Zucker and Regehr, 2002) (Fig.3C). This protocol induced a 4 min lasting potentiation of the synaptic response in wild type mice (Fig.3C, 136 ± 18%, $p = 0.039$) but a 3 min lasting synaptic depression in MCH/ataxin3 mice (Fig.3C, 81 ± 8%, $p = 0.023$). A significant difference between genotypes was observed (Fig.3C, 0-4 min post-stimulus, $p = 0.024$) confirming that a shift toward depression exists in MCH/ataxin3 mice during the induction of short-term plasticity. In consequence, the impairment of early phase of long-term plasticity in MCH/ataxin3 mice could be supported by an alteration of some forms of short-term plasticity.

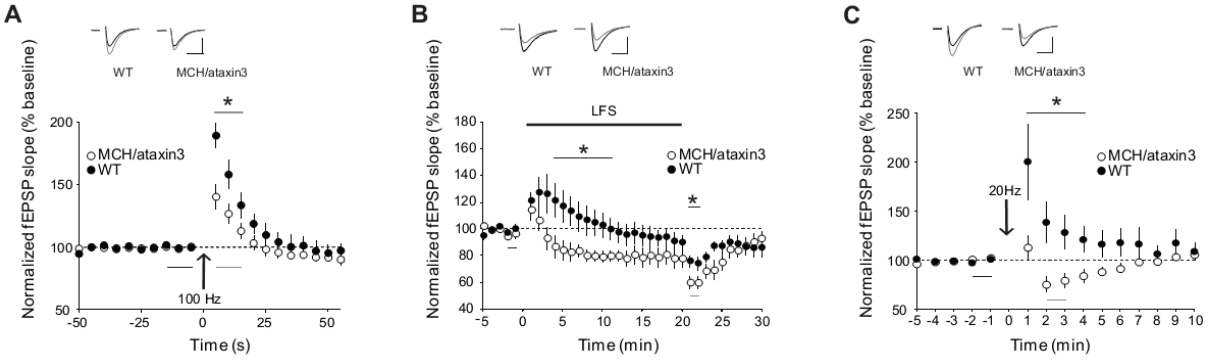


Figure 3. Short term plasticity is impaired in MCH/ataxin3 mice at SC-CA1 synapses. A.-C. Sample traces are average of 12 successive sweeps taken before (dark line) and after (grey line) stimulation. All the experiments were conducted in presence of DAPV (100 µM). **A.** Summary plot of post-tetanic potentiation experiments elicited by HFS for MCH/ataxin3 mice (open circles, n = 11) and WT mice (filled circles, n = 9). MCH/ataxin3 mice displayed a significantly lower increase of fEPSP slope during the first 15 s after HFS as compared to WT mice (p = 0.004). **B.** Summary plot of synaptic depression experiments elicited by a LFS during 20 min for MCH/ataxin3 mice (open circles, n = 7) and wild type mice (filled circles, n = 7). MCH/ataxin3 mice displayed an enhanced decrease of fEPSP slope during LFS (4-11 min, p = 0.038) and during the first two minutes after stimulation (p = 0.038). **C.** Summary plot of short-term plasticity experiments elicited by a 20 Hz stimulation during 20 s for MCH/ataxin3 mice (open circles, n = 7) and WT mice (filled circles, n = 7). The stimulation protocol elicited a potentiation in WT mice while it induced synaptic depression in MCH/ataxin3 mice during the first 4 min after induction (p = 0.018).

MCH/ataxin3 Mice Exhibit Mild Deficits in a Short-term Memory Task.

The deletion of MCH neurons in MCH/ataxin3 mice thus results in an alteration of different forms of short-term plasticity at the SC-CA1 synapses that is accompanied by an impairment in the early phases of LTP and LTD at the same synapses. Therefore, we first tested short-term/working memory in MCH/ataxin3 (n = 12) and wild type control mice (n = 12) using a hippocampal-dependent delayed non-match to place T-maze task (Dudchenko, 2004). This task relies on the short-term storage and flexible use of spatial information. Briefly, this task consists for the animal in remembering the location of a food reward previously retrieved before a short delay of 5 s to retrieve a second food pellet after the delay in a different (non-match) location. Both groups learned this task, reaching a plateau in performance of 6.52 ± 0.36 average correct choices over the last 4 blocks for wild type mice and of 6.35 ± 0.36 average correct choices over the last 4 blocks for MCH/ataxin3 mice and no difference in the acquisition of this task was observed between groups (Fig. 4A upper panel, p = 0.13, repeated measured ANOVA). However, when all mice acquired the task rules and performed the task with maximum accuracy (during the last 4 blocks), MCH/ataxin3 mice increased their latency to reach the end of the arm during the choice run compared to WT mice (Fig.4A medium panel, p < 0.0001, repeated measured ANOVA ; block 4 : p = 0.048, block 5: p = 0.020, block

6 : $p < 0.0001$, block 7 : $p<0.0001$, t-test). On the last block of training, MCH/ataxin3 mice reached the end of the arm after 9.75 ± 0.44 s while wild type mice only required 5.79 ± 0.28 s to achieve the same level of performance. Interestingly, we noticed at the same time that MCH/ataxin3 mice started to "hesitate" more at the crossroad between the two arms to choose. Mutant mice stopped there -sometimes even sat- and went back and forth between the two arms, just putting their head in them. This behavior reflects a form of hesitation [vicarious trial and error (Tolman, 1939)] which corresponds to a "mental" reorganization found to be associated with the achievement of learning (Amsel, 1993). We quantified this behavior as "hesitation" (see Materials and Methods). MCH/ataxin3 mice showed an increased number of hesitations from block 4 to block 7 while wild type mice did not (Fig.4A lower panel, $p < 0.0001$, repeated measured ANOVA ; block 4 : $p = 0.002$, block 5: $p = 0.002$, block 6 : $p < 0.0001$, block 7 : $p < 0.0001$,Fisher t-test). On block 3, both groups showed a similar average number of hesitations (2.67 ± 0.48 for MCH/ataxin3 mice and 2.08 ± 0.43 for WT mice) while on block 7 transgenic mice showed a far greater average number of hesitations (6.08 ± 0.53) than wild type mice (0.92 ± 0.38). MCH/ataxin3 mice thus seemed to take more time to reach the end of the arm because they spend more time to hesitate before making their choice. To test this hypothesis, we checked if the latencies to reach the end of the arm and the number of hesitations were positively correlated in MCH/ataxin3 mice over the 4 last blocks. We found that these two parameters were highly correlated for MCH/ataxin3 mice (Fig.4C, $r = 0.694$, $p < 0.0001$, Spearman correlation test) but not for the WT mice (Fig. 4D, $r = 0.256$, $p = 0.0795$, Spearman correlation test). These results suggest that while MCH/ataxin3 mice understood the rule and perform the task as well as their wild type controls, they took more time to make the correct decision.

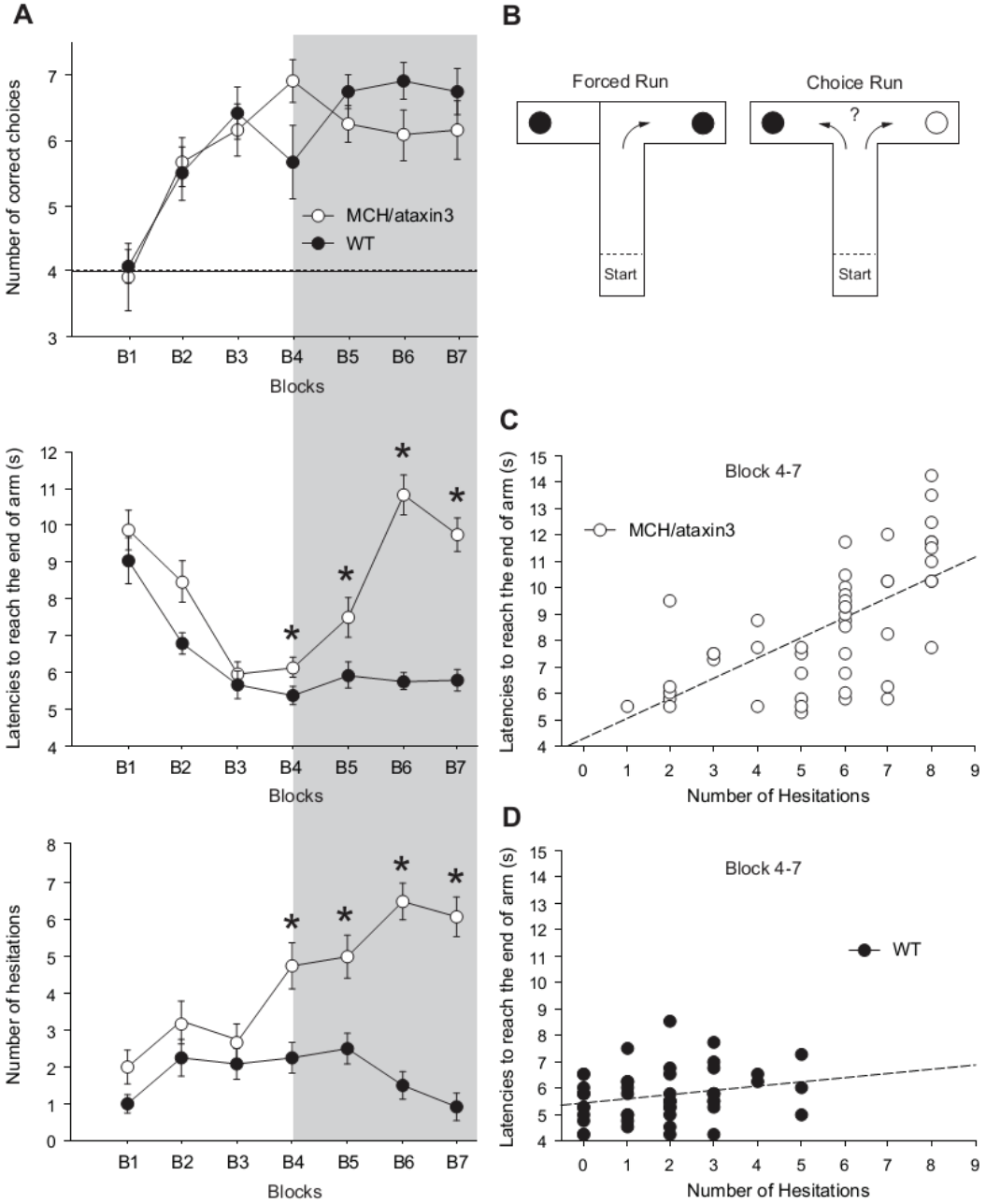


Figure 4. MCH/ataxin3 Mice Exhibits mild Deficits in a short-term memory task. A. Mean performances per block of two consecutive days in a delayed non-match to place T-maze task for MCH/ataxin3 (open circles, $n = 12$) and WT mice (filled circles, $n = 12$). *Upper panel*. MCH/ataxin3 and WT mice completed the task with the same efficiency. No significant effect of Genotype (ANOVA test) was observed. *Medium panel*. At the end of training (from block 4 to block 7 - in gray), when all mice reached a satisfying level of performance, MCH/ataxin3 mice spent more time to reach the end of the arm ($p < 0.0001$, ANOVA; block 4: p = 0.048, block 5: $p = 0.02$, block 6: $p < 0.0001$, block 7: $p < 0.0001$, t-test). *Lower panel*. This deficit was associated with an increased number of hesitations (p < 0.0001, ANOVA; block 4: $p = 0.002$, block 5: $p = 0.002$, block 6: $p < 0.0001$, block 7: $p < 0.0001$, t-test). **B.** Delayed non-match to place T-maze task. **C.** MCH/ataxin3 mice spent more time to reach the end of the arm as they hesitated more at the crossroad between arms. We observed a high positive correlation ($r = 0.688$, $p<0.0001$, Spearman correlation test) between these two factors for block 4 to 7. **D.** In wild type mice, no such correlation was seen between latencies to reach the end of the arm and the number of hesitations ($r = 0.234$, $p = 0.108$, Spearman correlation test) from block 4 to 7.

MCH/ataxin3 Mice show retardation in learning a Spatial Long Term Memory Task.

We next tested the mice in a long-term memory Morris water maze (MWM) task (Morris, 1984) with four trials per day as previously described (Malleret et al., 1999). During the non-hippocampal-dependent visible platform phase, MCH/ataxin3 (n = 15) and WT mice (n = 14) learned to swim to the cued platform equally well with average latencies to reach the platform decreasing from 71 ± 8 s and 83 ± 6 s on the first day to 24 ± 4 s and 20 ± 3 s on the second day for MCH/ataxin3 and WT mice, respectively (Fig.5A, days 1 and 2). Average path lengths and swimming speeds were also similar (data not shown) indicating that elementary motivational and attentional processes were not altered by the mutation. The animals were then trained to swim to the fixed location of a hidden platform on day 3 to 12. This spatial phase of the task relies on the functional integrity of the hippocampus (Davis et al., 1992). MCH/ataxin3 mice and their wild type controls performed the task with the same efficiency as they spent respectively 13 ± 1 s and 15 ± 1 s to reach the platform on the last day of training (Fig.5A, day 12). However, MCH/ataxin3 mice showed a slight retardation in acquiring the task as compared to the WT mice. Repeated measures ANOVA over days 3-12 thus showed a significant effect of Day, $p < 0.0001$ and Genotype, $p = 0.0102$. On the second day of spatial training, MCH/ataxin3 mice spent more time to reach the platform than the WT mice (Fig.5A, day 4, 40 ± 6 s for MCH/ataxin3 and 25 ± 3 s for wild types, $p = 0.0478$, ANOVA). This retardation in acquiring the water maze task is reminiscent of the hesitation observed in the short-term memory T-maze experiment. We therefore tested our transgenic mice in a reversal phase to see if such retardation was still present. During this phase, the hidden platform was moved to the opposite quadrant of the pool (Fig.5A; days 13–17). Both MCH/ataxin3 and wild type mice learned to swim to the new platform location reaching similar latencies by the last day of reversal (Fig.5A, 28 ± 4 s for MCH/ataxin3 and 23 ± 3 s for WT). However, MCH/ataxin3 mice spent again more time to learn the new location than their wild type controls. Repeated measures ANOVA over days 13–16 revealed significant effects of both Day $p < 0.0001$ and Genotype, $p = 0.025$. On the first day of the reversal phase, MCH/ataxin3 mice took significantly more time to swim to the platform than their controls (Fig.5A, day 13, 64 ± 6 s and 48 ± 2 s for MCH/ataxin3 and their controls respectively, $p = 0.016$, t-test) and the same tendency (although non-significant) was observed on the second day (Fig.5A, day 14, 40 ± 7 s and 25 ± 4 s for MCH/ataxin3 and WT mice respectively, $p = 0.07$, t-test). However, this delay in learning the new platform location was not accompanied by an increase in the percent of time the animals spent searching for the

platform in the previously correct quadrant during a probe trial given on day 17 (data not shown). Moreover, no significant differences in time spent floating or swimming at the periphery of the pool (thigmotaxis) was observed between mutant and controls mice indicating that deletion of MCH neurons did not lead to increased emotional (anxious) behavior (data not shown). Altogether, these results thus indicate that MCH/ataxin3 mice displayed a deficit in the rate of acquiring spatial information in this long-term memory task even if they showed a similar level of performance as compared to controls at the end of training.

MCH/ataxin3 Mice do not habituate to a New Environment.

To assess if the delayed non-match to place T-maze task and the water maze task deficits we observed in MCH/ataxin3 mice were not associated with locomotion or exploratory activity deficits, we tested the mice in an open field test. Both groups showed similar average path lengths during the 10 last minutes of free exploration (Fig.5B, paths lengths at 10-15 min and 15-20 min, 4617 ± 158 cm for MCH/ataxin3 mice and 4347 ± 162 cm for WT) and similar thigmotaxis rate (69.1 ± 2.5% for MCH/ataxin3 mice and 68.4 ± 1.6% for WT, data not shown). MCH/ataxin3 mice thus display normal locomotor activity, exploratory activity and anxiety level. However, MCH/ataxin3 mice displayed a habituation deficit in this task. To reveal such deficit, we computed the habituation curve for both groups. Wild type mice showed a classical profile of habituation with a progressive decreased in the average path lengths from 2600 ± 91 cm during the first 5 minutes to 2154 ± 103 cm during the last 5 minutes of the task (Fig.5D, significant effect of Time, $p < 0.0001$, repeated measures ANOVA). In contrast, MCH/ataxin3 mice did not habituate to the new environment as they exhibited similar average path lengths during the test from 2428 ± 142 cm during the first 5 minutes to 2389 ± 84 cm during the last 5 minutes (Fig.5D, non significant effect of Time, $p = 0.211$, repeated measures ANOVA). Repeated measures ANOVA revealed significant effects of Genotype between groups ($p = 0.013$). This deficit in habituation in MCH/ataxin3 mice is reminiscent of their retardation in acquiring the water maze task as well as their increased hesitation observed in the T-maze task, and suggests that alteration in short-term plasticity in MCH/ataxin3 mice lead to minor impairments of short-term memory processing while sparing more elementary memory abilities.

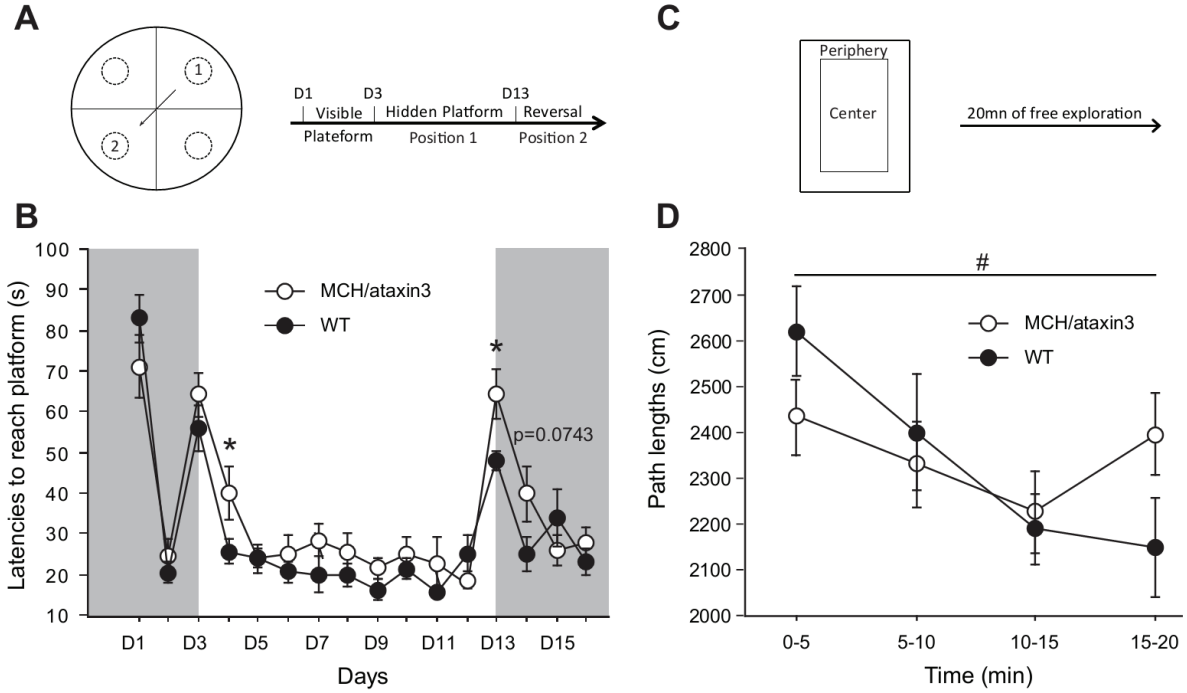


Figure 5. MCH/ataxin3 Mice are Slower to Learn a Long-term Memory Task. A. Morris Water Maze task. **B.** Average latencies to reach the escape platform in the Morris water maze during the visible platform (days 1 and 2), hidden platform (days 3–12), and reversal (days 13–17) phases of the task for MCH/ataxin3 (open circles, $n = 15$) and WT mice (filled circles, $n = 14$). During days 3-12, MCH/ataxin3 mice learned the location of the spatial platform as well as WT mice but were slower to learn it. MCH/ataxin3 mice took more time to reach the platform only on day 4 ($p = 0.048$, t-test) and we observed a significant Genotype effect for day 3 to 12, $p = 0.01$, ANOVA. During the reversal phase, the same deficit was observed as MCH/ataxin3 spent more time to learn the new location as they took more time to reach the platform on day 13 ($p = 0.016$, t-test). We observed a significant Genotype effect for day 13 to 16, $p = 0.025$, ANOVA. **C.** Open Field task. **D.** Average path lengths in the open field of MCH/ataxin3 mice (open circles, $n = 15$) and their WT controls (filled circles, $n = 14$) in a single-session exploration test. MCH/ataxin3 mice did not display habituation to the new environment (no significant effect of Time, $p = 0.211$, ANOVA) whereas the wild type mice did (significant effect of Time, $p < 0.0001$, ANOVA). A significant effect of Genotype was also observed ($p = 0.013$, ANOVA)**.**

Discussion

In this study, we used mice with a selective loss of MCH neurons using a pro-apoptotic toxin ablation strategy to explore the role of MCH on learning and memory processes. We found that a specific loss of MCH neurons leads to an impairment of short-term plasticity at SC-CA1 synapses associated with a deficit of habituation and hippocampal-dependent forms of short-term memory.

Methodological considerations

In MCH/ataxin3 mice, the apoptosis of MCH neurons starts only during the fourth week (young adulthood) after birth (Alon and Friedman, 2006). The phenotype we observed in

MCH/ataxin3 mice is likely to be mild as only a maximum of 65% of the MCH neurons of the lateral hypothalamus are destroyed at about 3 months, the age of mice for our behavioral and electrophysiological experiments (Alon and Friedman, 2006). Given that MCH neurons send dense projections to the CA1 and CA3 areas of the hippocampus, a decrease in the release of peptides and neurotransmitters contained by MCH neuron axonal terminals is likely to be observed in the hippocampus of MCH/ataxin3 mice. MCH neurons release not only MCH but also GABA, the neuropeptides nesfatin-1 as well as cocaine and amphetamine regulated transcript (CART). The contribution of GABA by MCH neurons is minor since the main source of GABA in the brain is intrinsic (local) inhibitory interneurons. Moreover, we conducted all the electrophysiological experiments in presence of an inhibitor of GABA-A receptors, picrotoxin. Therefore, it was very unlikely that the alteration of synaptic plasticity we observed in MCH/ataxin3 mice was due to a lack of GABA. Micro-infusions of nesfatin-1 in CA1 area of the dorsal hippocampus have no effects on performance in Morris Water Maze (Zhu et al., 2013) which suggest that nesfatin-1 does not play an important role on hippocampal dependent learning and memory processes. MCH fibers do not seem a major source of CART since it is expressed widely through the brain including the hippocampus itself in the dentate gyrus (Seress et al., 2004). However, since a study suggests that CART slightly facilitates Morris Water Maze acquisition, the role of this peptide cannot be ruled out (Upadhya et al, 2011). Other peptides are also encoded at the MCH gene locus (NEI, NGE, MGOP and AROM). They are all derived from the same precursor as MCH, the pre-pro-MCH, and their functions are still mostly unknown (Pissios et al., 2006). As a consequence we cannot rule out a role of these others substances released by MCH neurons in the alterations of short-term memory and plasticity we observed even if it seems that MCH is an important mediator of the physiologic actions of MCH neurons on hippocampal-dependent learning and memory processes.

Alteration of hippocampal-dependent forms of short-term memory

MCH/ataxin3 mice present short-term memory deficits. In a reference memory task (MWM), MCH/ataxin3 mice performed as well as the wild type but showed a mild retardation in learning the task and, in a working memory task (T-maze), they showed increased hesitation to choose the correct arm. Finally, MCH/ataxin3 mice showed a habituation deficit in a 15 min open field free exploration.

As MCH is involved in the central mechanisms controlling emotion and anxiety (Blouin et al., 2013), we had to verify that an altered emotional and motivational state in MCH/ataxin3 mice was not responsible for the mild behavioral deficits we observed. In rodents, a systemic injection of a MCH antagonist has antidepressant and anxiolytic effects in several behavioral models of depression and anxiety (Borowsky et al., 2002). However, plasma corticosterone level, a marker of stress, does not differ between MCH/ataxin3 and WT mice (Alon and Friedman, 2006). In addition, in our study, we did not observe any difference in thigmotaxis (an index of anxiety) between MCH/ataxin3 mice or their wild-type controls in both the open field and the MWM experiments. This result suggests that the level of anxiety in both MCH/ataxin3 and wild-type mice were similar during the tasks. Altogether, these results argue against the possibility that the memory deficit we observed has an emotional origin.

During the T-maze task, animals learn the delayed non-match task by associating an arm location with the potential presence of a food reward. It could be possible that the deficit we observed, ie an increase in the number of hesitations when mice begin to understand the task rules, is due to an impaired motivational feeding behavior as MCH has been shown to have a specific role in this behavior. However, in genetic rodent models of impaired MCH transmission, food reward experiments showed that MCH modulates satiety mechanisms after the initiation of food intake, and not during the acquisition of the conditioned incentive behavior itself (Sherwood et al. 2012, Mul et al. 2011). As in our T-maze task, food rewards were only used to facilitate memory encoding, the deletion of MCH neurons has likely not interfered with the motivational aspects of the task. Moreover, such motivational deficits would have been observed during the entire experiment (from the beginning to the end of training) and cannot be responsible for the hesitations we observed at the end of training.

We described the hesitation behavior we observed during this task as a stop at the crossroad or a momentary entrance in the wrong arm that is quickly corrected. This type of behavior in delayed non-match-to-sample T maze task has been also reported as “oops” cases (Yamamoto et al., 2014). Yamamoto and colleagues thus showed in mice that a high frequency gamma synchrony between CA1 and the Medial Entorhinal Cortex (MEC) was associated with the successful execution of a spatial working memory task. Such synchrony was shifted during such “oops” trials, just prior the reversing of their run direction. The increase of hesitations we observed in our MCH/ataxin3 mice may reflect a similar cognitive deficit *ie* a greater difficulty to make a correct choice. As MCH/ataxin3 also displayed some retardation in the acquisition of a reference memory task in the MWM and a deficit of habituation in the open

field, we hypothesize that the specific loss of MCH neurons leads to the impairment of short-term forms of hippocampal-dependent memory processes.

Impairment of SC-CA1 short-term plasticity

This short-term alteration of hippocampal-dependent memory is associated with synaptic plasticity impairments at SC-CA1 synapses. Previous studies on mice deficient for the MCH receptor 1 (MCH-R1-/-) showed an alteration of hippocampal long-term synaptic plasticity associated with an under-expression of NMDA and AMPA receptors in the CA1 area of the hippocampus (Adamantidis et al., 2005; Pachoud et al., 2010). As MCH has been shown to promote neurite outgrowth in cell culture of neuroblastoma (Cotta-Grand et al., 2009), these deficits in AMPA and NMDA receptors could be due to a morphological reorganization or a decrease in protein synthesis caused by a lack of activation of MCH-R1 during development of CA1 and CA3 areas. We found that while expression of either LTP as LTD was not changed in MCH/ataxin3 mice, short-term synaptic plasticity was altered.

PTP and synaptic depression are two forms of pre-synaptic short-term plasticity which participate to the early phase of long-term plasticity as they are expressed during LTP and LTD induction protocols respectively (Zucker and Regehr, 2002). PTP is a transient (seconds to minutes) increase of synaptic efficacy caused by higher release probability and increased supply of readily releasable pool (RRP) of glutamate synaptic vesicles due to a modulation of calcium signals (Fioravante and Regehr, 2011). Repeated stimuli close in time leads to a transient synaptic depression due to a depletion of the RRP, an inactivation of the release sites and a decrease in calcium influx (Fioravante and Regehr, 2011). These two forms of short-term plasticity are altered in MCH/ataxin3 mice. PTP is diminished while synaptic depression is enhanced. The use of an intermediate stimulation protocol (20 Hz) allowing to induce both PTP and synaptic depression showed that there is a shift towards synaptic depression in MCH/ataxin3 mice. This result suggests that pre-synaptic mechanisms allowing the SC-CA1 synapses to undertake tetanic stimulation are partially impaired. Interestingly, another form of short-term plasticity, PPF, is not altered in MCH/ataxin3 mice. This phenotype matches one observed in mice deleted for synapsin II (Rosahl et al., 1995). Synapsins are neuronal phosphoproteins which play an important role in the control of synaptic vesicles trafficking and release (Cesca et al., 2010). High frequency stimulation leads to calcium accumulation in the axon terminal which triggers synapsin II phosphorylation and then the passage of synaptic vesicles from a reserve pool where they are bound together with actin to the RRP (Cesca et

al., 2010). Similar to what we observed in MCH/ataxin3, expression of CA1 LTP is preserved in mice lacking synapsin II (Silva et al., 1996). Moreover, Silva et al showed that this short-term plasticity deficit in synapsin II -/- mice is associated with impaired short-term forms of hippocampal-dependent memory. Altogether, one can hypothesize that MCH neurons could regulate short-term synaptic plasticity by modulating activation of synapsin II in the hippocampus.

What could explain the impairment in the early phases of LTP and LTD?

At SC-CA1 synapses, the NMDA Receptor (NMDAR)-mediated synaptic transmission is required for LTP and LTD induction (Citri and Malenka, 2008). Moreover, NMDAR current is decreased in MCH-R1 -/- mice compared with their WT controls (Pachoud et al., 2010). An altered NMDAR expression could thus account for a post-synaptic origin of the impairment of the early phases of both LTP and LTD. However, as LTP and LTD maximum amplitudes were the same in both MCH/ataxin3 and wild-type mice, our result suggests that the induction threshold was not modified in MCH/ataxin3 mice. We also took care of adjusting the stimulus intensity to elicit the same levels of cooperativity (Andersen, 1987); that is to say the recruitment of a sufficient number of afferent fibers able to cooperate during the high-frequency train to induce LTP in order not to modulate this induction threshold. The envelope of depolarization during TBS stimulation (Fig. 2C) is known to be dependent of NMDAR activation (Davies et al., 1991). As there is no difference between MCH/ataxin3 and WT control mice, it is unlikely that a modulation of NMDAR synaptic expression could cause these early phase deficits. As we also found a normal AMPAR-mediated synaptic transmission in MCH/ataxin3 mice, we hypothesized that the early phase deficits of LTP and LTD had a pre-synaptic origin which means that they are caused by the short-term plasticity deficits we observed. Interestingly, the early part of LTP was also altered in MCH-R1-/- mice compared to WT mice (Pachoud et al, 2010).

Role of short-term plasticity in working memory and MCH neuron implication

Our work reveals a potential role of hippocampal-dependent short-term plasticity in short-term/working memory. Several theories have proposed that short-term plasticity could be responsible for buffering information during working memory as this form of memory depends on a neuron very recent history of activation (Abbott and Regehr, 2004; Mongillo et al., 2008). Short-term plasticity could allow neurons to act as transient high-pass or low-pass filters by modulating transmitter release at short-term intervals (Abbott and Regehr, 2004;

Citri and Malenka, 2008). During learning, this process could help the animals to improve their immediate performance by easily encoding new information and quickly erasing it as soon as it is irrelevant. The contribution of the hippocampal formation to spatial working memory has long been established (Nadel and Hardt, 2011). Hippocampal short-term plasticity could thus support the time component of spatial working memory (Abbott and Regehr, 2004; Buonomano and Merzenich, 1995; Mongillo et al, 2008) as it is short-lasting.

Thus MCH neurons could play a role in spatial short-term memory by modulating short-term plasticity in the hippocampus. Since MCH neurons seems to be mainly activated during PS (Hassani et al., 2009; Verret et al., 2003), it could point out a role of PS on short-term memory. MCH could enhance short-term facilitation mechanisms during that sleep stage, thus facilitating consolidation of memory traces that is believed to happen during PS (Ravassard et al., 2009). Sleep prior learning has also been involved in the facilitation of new information encoding either in humans (Yoo et al., 2007) and in mice (Hagewoud et al., 2010). Interestingly, in this mice study, acquisition of a hippocampal dependent short-term memory was impaired after sleep deprivation associated with an impairment of synaptic mechanisms implied in short-term plasticity. Thus another role of PS via MCH neuron activation could be to prepare the day's learning by increasing and modulating short-term synaptic plasticity in the hippocampus.

References

Abbott LF, Regehr WG. 2004. Synaptic computation. Nature 431(7010):796-803.

Adamantidis A, Thomas E, Foidart A, Tyhon A, Coumans B, Minet A, Tirelli E, Seutin V, Grisar T, Lakaye B. 2005. Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function. Eur J Neurosci 21(10):2837-44.

Ahnaou A, Drinkenburg WH, Bouwknecht JA, Alcazar J, Steckler T, Dautzenberg FM. 2008. Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. Eur J Pharmacol 579(1-3):177-88.

Alon T, Friedman JM. 2006. Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. J Neurosci 26(2):389-97.

Amsel A. 1993. Hippocampal function in the rat: cognitive mapping or vicarious trial and error? Hippocampus 3(3):251-6.

Andersen P. 1987. Long-term Potentiation – Outstanding problems. In: Changeux JP, Konishi, M., editor. The neural and molecular bases of learning. Chichester: John Wiley & Sons. p 239-262.

Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, Maidment NT, Karlsson KAE, Lapierre JL, Siegel JM. 2013. Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. Nat Commun 4:1547.

Borowsky B, Durkin MM, Ogozalek K, Marzabadi MR, DeLeon J, Lagu B, Heurich R, Lichtblau H, Shaposhnik Z, Daniewska I and others. 2002. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. Nat Med 8(8):825-30.

Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. 2010. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. Prog Neurobiol 91(4):313-48.

Citri A, Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. Neuropsychopharmacology 33(1):18-41.

Cotta-Grand N, Rovere C, Guyon A, Cervantes A, Brau F, Nahon JL. 2009. Melanin-concentrating hormone induces neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells through p53 and MAPKinase signaling pathways. Peptides 30(11):2014-24.

Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL. 1991. GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. Nature 349(6310):609-11.

Davis S, Butcher SP, Morris RG. 1992. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. J Neurosci 12(1):21-34.

Dudek SM, Bear MF. 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. Proc Natl Acad Sci U S A 89(10):4363-7.

Fioravante D, Regehr WG. 2011. Short-term forms of presynaptic plasticity. Curr Opin Neurobiol 21(2):269-74.

Guyon A, Conductier G, Rovere C, Enfissi A, Nahon JL. 2009. Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. Peptides 30(11):2031-9.

Hagewoud R, Havekes R, Tiba PA, Novati A, Hogenelst K, Weinreder P, Van der Zee EA, Meerlo P. 2010. Coping with sleep deprivation: shifts in regional brain activity and learning strategy. Sleep 33(11):1465-73.

Hassani OK, Lee MG, Jones BE. 2009. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. Proc Natl Acad Sci U S A 106(7):2418-22.

Kirkwood A, Bear MF. 1994. Hebbian synapses in visual cortex. J Neurosci 14(3 Pt 2):1634-45.

Malleret G, Hen R, Guillou JL, Segu L, Buhot MC. 1999. 5-HT1B receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. J Neurosci 19(14):6157-68.

Mongillo G, Barak O, Tsodyks M. 2008. Synaptic theory of working memory. Science 319(5869):1543-6.

Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods 11(1):47-60.

Pachoud B, Adamantidis A, Ravassard P, Luppi PH, Grisar T, Lakaye B, Salin PA. 2010. Major impairments of glutamatergic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus of mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. J Neurophysiol 104(3):1417-25.

Pissios P, Bradley RL, Maratos-Flier E. 2006. Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. Endocr Rev 27(6):606-20.

Rasch B, Born J. 2013. About sleep's role in memory. Physiol Rev 93(2):681-766.

Rosahl TW, Spillane D, Missler M, Herz J, Selig DK, Wolff JR, Hammer RE, Malenka RC, Sudhof TC. 1995. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. Nature 375(6531):488-93.

Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA. 1996. Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 93(23):13304-9.

Silva AJ, Rosahl TW, Chapman PF, Marowitz Z, Friedman E, Frankland PW, Cestari V, Cioffi D, Sudhof TC, Bourtchuladze R. 1996. Impaired learning in mice with abnormal short-lived plasticity. Curr Biol 6(11):1509-18.

Varas M, Perez M, Monzon ME, de Barioglio SR. 2002a. Melanin-concentrating hormone, hippocampal nitric oxide levels and memory retention. Peptides 23(12):2213-21.

Varas M, Perez M, Ramirez O, de Barioglio SR. 2002b. Melanin concentrating hormone increase hippocampal synaptic transmission in the rat. Peptides 23(1):151-5.

Varas MM, Perez MF, Ramirez OA, de Barioglio SR. 2003. Increased susceptibility to LTP generation and changes in NMDA-NR1 and -NR2B subunits mRNA expression in rat hippocampus after MCH administration. Peptides 24(9):1403-11.

Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH. 2003. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. BMC Neurosci 4:19.

Wilson MA, McNaughton BL. 1994. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. Science 265(5172):676-9.

Yamamoto J, Suh J, Takeuchi D, Tonegawa S. 2014. Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. Cell 157(4):845-57.

Yoo SS, Hu PT, Gujar N, Jolesz FA, Walker MP. 2007. A deficit in the ability to form new human memories without sleep. Nat Neurosci 10(3):385-92.

Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-term synaptic plasticity. Annu Rev Physiol 64:355-405.

CHAPITRE II :

Etude des effets neuromodulateurs du peptide MCH sur les réponses synaptiques hippocampiques.

1. Contexte

Notre premier projet nous a permis de déterminer que les neurones à MCH régulent la mémoire hippocampo-dépendante notamment en agissant sur la plasticité synaptique hippocampique. La MCH pourrait donc bien être un vecteur moléculaire du rôle facilitateur du SP sur la consolidation. De plus, l'injection intra-hippocampique de MCH juste après, comme 4h après l'acquisition d'une tâche d'évitement passif augmente les performances au rappel, suggérant que la MCH module les processus de consolidation synaptique dans l'hippocampe (Monzon et al., 1999). En accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'injection de MCH intra-cérébro-ventriculaire chez le rat facilite ensuite l'induction de LTP dans les tranches hippocampe (Varas et al., 2003). Ces travaux suggèrent que la MCH pourrait donc moduler la plasticité synaptique dans l'hippocampe en agissant sur ses récepteurs MCH-R1 hippocampiques. Il a été montré que la MCH exerce des effets variés sur la transmission glutamatergique selon les synapses considérées, dans l'hypothalamus latéral et le noyau accumbens (Gao, 2009 ; Rao et al., 2008 ; Sears et al., 2010). Les effets de la MCH sur la plasticité synaptique hippocampique pourraient ils donc être assurés par une modification de la transmission glutamatergique dans l'hippocampe ?

Pour tester cette hypothèse, nous avons donc étudié en électrophysiologie *in vitro* la neuromodulation exercée par la MCH sur la transmission glutamatergique dans les synapses SC-CA1 puis, nous avons disséqué ses mécanismes d'action. Ces résultats issus de notre collaboration avec l'équipe de Bernard Lakaye de l'université de Liège en Belgique ont fait l'objet d'une publication qui sera bientôt soumise. Nous avons réalisé l'ensemble de l'étude de la modulation de la transmission excitatrice hippocampique à l'aide d'enregistrements extra et intra-cellulaires de la réponse synaptique des cellules pyramidales de CA1 et de l'application de multiples agents pharmacologiques, tandis que l'intégralité des résultats issus de l'étude des cultures d'astrocytes corticaux a été obtenu par l'équipe de Bernard Lakaye.

2. Article 2

Publication: "Melanin-Concentrating Hormone (MCH) modulates glutamate receptor mediated transmission in the hippocampus by acting on astrocytes."

Léa Le Barillier[1, £], Sophie Harray[1,*], Bastien Pachoud[£], Marius Rosier[£], André-Guilhem Calas[§], Laurence de Nijs[*], Thierry Grisar[*], Olivier Pascual[+], Gael Malleret[£], Emmanuel Hermans[§], Paul-Antoine Salin[2,£], Bernard Lakaye[2,*]

£ CRNL Center for Research in Neuroscience, Forgetting team, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Lyon 1 University, Lyon, France

* GIGA-Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium

§ Group of Neuropharmacology, Institute of Neuroscience, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

+ CRNL Center for Research in Neuroscience, Oncoflam team, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Lyon 1 University, Lyon, France

1,2: these authors contributed equally to this work

Abstract

The hypothalamic peptide Melanin Concentrating Hormone (MCH) plays important roles in food intake, energy metabolism, sleep homeostasis and memory consolidation. The cellular and molecular mechanisms underlying these MCH actions remain to be determined. Several studies showed that MCH modulates glutamate transmission. We thus investigated the cellular mechanisms by which MCH could modulate glutamatergic transmission at Schaffer collateral-CA1 synapses (SC-CA1) of the hippocampus. We found that MCH induces a presynaptic depression at the SC-CA1 synapses that is blocked in mice lacking the MCH-Receptor 1 gene (MCH-R1-/-). This MCH-induced depression is suppressed by both adenosine receptor A1 antagonist and inhibitors of ectonucleotidases that naturally hydrolyze

ATP in adenosine. As astrocytes are a major source of ATP in the hippocampus, we hypothesized that these cells may play a key role in MCH-induced depression. Antagonists of purinergic receptor P2Y1R and metabotropic glutamate receptor mGluR5, which are activated during astrocyte-dependent ATP release, block MCH-induced synaptic depression. Fluoroacetate, which inactivates astrocytic metabolism, also blocks the MCH effect. MCH increases intracellular calcium concentration in cultured astrocytes and this increase is blocked in astrocytes of MCH-R1-/- mice. In cortical astrocytes culture, MCH also induces ATP release and a decrease in glutamate uptake. These astrocyte-dependent effects were inhibited by protein kinase C (PKC) inhibitors. Altogether these results suggest that MCH is one of the few neuropeptides contributing to gliotransmission. MCH neurons are mainly activated during rapid eye movement (REM) sleep (paradoxical PS) and their activation increases PS amount. MCH-dependent gliotransmission may thus play a key role in regulating sleep and sleep-dependent forms of memory.

Introduction

Melanin-concentrating hormone (MCH) is a cyclic peptide of 19AA, highly conserved in the animal kingdom. In the mammalian central nervous system (CNS), MCH producing neurons are mainly located in the lateral hypothalamus (LH) and *zona incerta* (ZI) and project fibres throughout the whole brain except the cerebellum (Bittencourt et al., 1992). MCH binds specifically to two G protein-coupled receptors (GPCR), MCH-R1, also previously known as SLC-1 (Lakaye et al., 1998), and MCH-R2; although the latter is absent in rat and mouse (Tan et al., 2002). The distribution of MCH-R1 matches the one of MCH-containing fibres as it is expressed in several brain regions but is particularly enriched in limbic structures (Saito et al., 2001). Dense MCH projections and MCH-R1 expression in the hippocampus and the nucleus accumbens (AcSh) suggest a role in cognitive processes. In rodents, MCH modulates consolidation of hippocampal-dependent forms of memory and several goal-oriented behaviours (Adamantidis and de Lecea, 2009). Intra-hippocampal infusion of MCH thus increases the response latency in a hippocampal-dependent passive avoidance memory task. MCH also plays important roles in food intake, metabolism regulation and the control of anxiety and has been involved in sleep regulation and activation of MCH neurons increase sleep, and in particular rapid eye movement, REM sleep (paradoxical sleep, PS). Surprisingly, despite its physiological importance, little is known of the cellular mechanisms underlying MCH-dependent functions.

At a cellular level, several studies suggest that MCH exerts a complex modulation of glutamatergic transmission. In the LH, it inhibits synaptic activity of both glutamatergic and GABAergic neurons possibly by decreasing the amplitude of voltage-dependent calcium currents (Gao, 2009). On orexin-containing neurons, MCH diminishes orexin-induced increase in the frequency of miniature AMPA Receptor (AMPAR) mediated currents (Rao et al., 2008). These studies thus suggest that MCH modulates glutamate release. In contrast, it has been shown that the amplitude of AMPAR mediated current is decreased by MCH in the AcSh, possibly by diminishing GluA1 phosphorylation at serine 845 and suggesting a postsynaptic modulation of glutamatergic transmission (Sears et al 2010). In addition, MCH may also facilitate the induction of long-term potentiation (LTP) (Varas et al., 2003) while MCH-R1-/- mice showed impaired LTP induction in the hippocampus (Pachoud et al., 2010). This action on LTP could be due to an effect of MCH on NMDAR. In agreement with this hypothesis, hippocampal NMDAR expression is down regulated in MCH-R1-/- mice and up-regulated by MCH application (Varas et al., 2003; Adamantidis et al., 2005; Pachoud et al., 2010). Thus, MCH exerts various effects on glutamatergic transmission, but questions remain regarding the cellular and molecular targets that may explain MCH synaptic action.

In the present paper, we examined the synaptic effects of MCH in the CA1 area of the hippocampus, an experimental model with identified monosynaptic connections. By using cortical astrocytes cultures and brain slices, we provide the first evidence that astrocytes express functional MCH-R1 and that MCH triggers several signal transduction cascades in astrocytes leading to a blockade of glutamate uptake and an increase in ATP release. This MCH-activated gliotransmission exerts a fast inhibition of synaptic transmission in the hippocampus.

Materials and methods

Animals Mice and rats we used for these experiments conducted in two different laboratories (GIGA-Neurosciences, University of Liège, Belgium; CRNL, University of Lyon, France). Wistar rat pups were obtained at the animal house facility of the University of Liège. Mice lacking a functional MCH-R1 have been described previously (Adamantidis et al., 2005). A colony, maintained at the animal house facility of the University of Liège, was used to generate WT and MCH-R1-/- pups. Electrophysiological experiments on brain slices were conducted on C56/BL7J mice, MCH-R1-/- and wild-type littermate mice and Sprague-Dawley rats provided by Charles Rivers laboratories (Le Genest St. Isle, France). All

procedures were approved by the institutional animal care and use committee of the University of Lyon1 (protocols BH2006-09 and BH2006-10) and were conducted in accordance to the guidelines of the Belgian and French Ministry of Agriculture in agreement with European Community Laboratory Animal Care and Use regulations.

Chemicals. Pertussis toxin (PTX), poly-L-ornithine, L-aspartic acid, MCH, U-126, U-73122 L-serine-O-sulfate potassium salt (L-SOS), picrotoxin, adenosine 5'-(α,β-methylene)diphosphate (AMP-CP), 8-Cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (CPT) and sodium fluoroacetate (FAC) were purchased from Sigma-Aldrich. MCH was also purchased from Bachem. The MCH-R1 antagonist PMC-3881-PI was from Peptides International. Ro 32-0432, dihydrokainic acid (DHK), L-(-)-threo-3-hydroxyaspartic acid (LTHA), chelerythrine chloride, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid tetrasodium salt (PPADS), 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium (CNQX) and 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[*f*]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX), MRS2179, 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP), D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5) were provided by Tocris Bioscience. Perkin-Elmer NEN supplied D-[^{3}H]-aspartate (specific activity of 12.2 Ci/mmol). Rabbit monoclonal anti-p44/42 MAP kinase antibody, mouse monoclonal anti-phospho-p44/42 MAP kinase antibody, mouse monoclonal anti-GFAP antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody and secondary Cy5-coupled donkey anti-mouse IgG antibody were from Sigma-Aldrich. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody was purchased from Cell Signalling Technology. The BCA and SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kits were supplied by Pierce. The Fura-2AM was obtained from Molecular Probes. The anti-Gβγ peptide (MPS-Phosducin-like protein C terminus), Instapure and PCR primers were from Eurogentec and the different buffers, enzymes and nucleotides used for RT-PCR were obtained from Promega. Culture media, G5 supplement and consumables were purchased from Invitrogen. The "ATP bioluminescent somatic cell assay kit" was purchased from Sigma.

Culture of cortical astrocytes Primary cultures of astrocytes were prepared from postnatal (0-2 day old) wistar rats or mice as described previously (Vermeiren et al., 2005a). Cells were collected after trypsinization and distributed either at 20,000 cells/well into 24-well dishes coated with poly-L-ornithine for glutamate uptake, at 5,000 cells/well into 6-well dishes for ERK experiments or at 120,000 cells/well into 6-well dishes for ATP quantification. After 24 h, cell maturation was initiated by decreasing FBS concentration to 3% during 7 days. When indicated, the culture medium was also supplemented with the defined culture additive G5

diluted 1/100. For ATP and ERK analysis, cells were subjected to a serum starvation of 24 h before the start of the experiments.

Identification of MCH-R1 mRNA by RT-(q)PCR Total RNA was extracted from cultured 5.10^6 astrocytes, either treated or not for 7 days with the G5 supplement, using the Instapure reagent according the manufacturer's protocol. Total RNA was then reverse transcribed using MMLV and random hexamer primers. RT-PCR reactions were performed as described previously (Verlaet et al., 2002).

Measurement of Na^+- dependent glutamate transport activity When indicated, cells were pre-treated at 37°C with either the MCHR1 antagonist PMC-3881-PI (1.5 µM during 14 min), the selective inhibitor of phospholipase C (PLC, U-73122; 10µM for 24 min), the selective inhibitor of protein kinase C (PKC, Ro 32-0432; 1.5 µM for 24 min), pertussis toxin (PTX , 100 ng/ml during 8 h) or the anti-Gβγ peptide (25 µM for 24 min). Then MCH was added at the specified concentration and the incubation was continued for 6 min at 37°C. After this time, plates were immediately placed at the surface of a 37°C water bath and washed three times with 300 µL of preheated Krebs buffer. When required, inhibitors of glutamate transporters were added 6 min before addition of D-[^{3}H]-aspartate (50 nM) to final concentrations of 100 µM for DHK or LTHA and 200 µM for L-SOS in accordance with previous investigations (Goursaud et al., 2008). The uptake was stopped after 6 min by three rinses with 1mL of ice-cold sodium free Krebs buffer in which NaCl was replaced by choline chloride at the same osmolarity (120 mM). The cells were lysed with 500 µL of 1 N NaOH and the radioactivity of 200 µL of the lysate was evaluated by liquid scintillation counting. A fraction of the lysate was also used for protein determination. The specific activity of the glutamate transporters was estimated after subtraction of the value obtained using the non-selective glutamate transporter inhibitor LTHA.

Calcium imaging in cultured astrocytes Cells were loaded with 2 µM fura-2-AM diluted in Krebs buffer at room temperature for 1 h in the dark. Cells were then incubated for 30 min in dye-free Krebs buffer and coverslips containing dye-loaded cells were mounted on a recording chamber continuously perfused with Krebs buffer. All drugs were dissolved and delivered in the perfusate. Fura-2 loaded astrocytes were visualized using a charged coupled device sensor (CDD) camera coupled to an inverted Olympus IX70 microscope (TILL Photonics, Martinsried, Germany). Before starting recordings, cell bodies were defined as regions of interest in the visual field of the camera. Fura-2 was excited alternately at 340 and

380 nm using a monochromator and fluorescence emissions were recorded with the CDD camera IMAGO (TILL Photonics, Martinsried, Germany).

ATP quantification Prior to measurement of extracellular ATP concentration, culture medium was removed and replaced by fresh medium. Cells were then incubated 10 min at 37°C in the presence of MCH at the specified concentrations and, when required, simultaneously with Ro 32-0432 (1.5µM). ATP release was measured by the luciferin-luciferase assay following the manufacturer's instructions. Luminescence was quantified using Glomax luminometer (Promega).

Western blot analysis of MAPK activity Cortical astrocytes either pre-treated or not with PTX (100 ng/ml during 16 h), were incubated 10 min in the presence of 10 nM MCH at 37°C. At the end of the incubation, cells were rinsed with ice-cold PBS and lysed in 50 mM Tris-HCl pH7.4 containing NaCl 150 mM; NaF 10 mM; NaPPi 5 mM; Na_3VO_4 1 mM; EDTA 10 mM; 10% SDS and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Lysates were sonicated 15 s (40 W), and the protein content was quantified. Samples were diluted in loading buffer and heated at 95°C for 5 min. Protein (15 µg/lane) were separated by SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to PVDF membranes (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked with 5% non-fat milk and 0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline (TBS-T; 50 mM, pH 7.4) and incubated overnight at 4°C with rabbit monoclonal anti-p44/42 MAP kinase antibody (1:5000) or mouse monoclonal anti-phospho-p44/42 MAP kinase antibody (1:3000). Blots were washed in TBS-T (3 x 10 min) at room temperature and further incubated with the secondary antibody (1:3000) for 1 h at room temperature. The membranes were washed in TBS-T (3 x 10 min) and proteins were visualized on a film with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit. Optical density of bands was measured with an image analysis program ImageMaster 1D Prime (Amersham Pharmacia biotech) and ratio of phosphorylated ERK ½ to total ERK ½ was calculated in each sample.

Hippocampal electrophysiological recordings Coronal brain slices (350 µm) were cut from 3-8 weeks-old mice and rats with a vibratome (VT1000S, Leica) and were incubated at 33 °C during the first 30 min and then let at least 30 min at room temperature in a holding chamber. Slices were then transferred to a recording chamber maintained at 33 °C and c8ontinuously superfused with oxygenated (95% O2 and 5% CO2) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 124 NaCl, 10 glucose, 1.25 NaH2PO4, 2.5 KCl, 26 NaHCO3, 1.3

MgCl2, and 2.5 CaCl2. All recordings were performed in presence of the gamma-aminobutyric acid (GABA)-A receptor antagonist picrotoxin (100 µM, Sigma). We investigated the synapses between Schaffer collaterals and CA1 pyramidal cells (SC-CA1 synapses). Field Excitatory PostSynaptic Potentials (fEPSPs) were measured using borosilicate glass microelectrodes (~1-3 MΩ) filled with NaCl (1 M) or aCSF and a differential amplifier (WPI). Electrical stimulation was realized with a bipolar tungsten electrode and pulses were delivered through a stimulus isolator unit (WPI). fEPSPs were collected at 0.2 Hz and we used fEPSPs initial slope to quantify synaptic responses. Whole-cell voltage-clamp recordings of CA1 pyramidal cells were carried out with the Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) under visual control with an infrared differential interference contrast microscope (BX50WI, Olympus). The patch pipettes were made of borosilicate glass (~5 MΩ) filled with the following internal solution (in mM): 120 Cesium-gluconate, 10 Na-phosphocreatine, 0.1 CaCl2, 2 MgCl2, 10 HEPES, 1 EGTA and 2 Na-ATP (300 mOsm, pH = 7.2). α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPAR) mediated Excitatory PostSynaptic Currents (EPSCs) were recorded at a holding potential of Vh = -70 mV. In order to assess N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) mediated responses, we recorded EPSCs at Vh = + 40 mV in presence of AMPAR antagonist CNQX (20 µM) or NBQX (10 µM). Paired-pulse facilitation (PPF) at SC-CA1 synapses was tested by evoking fEPSP or EPSCs with two paired stimulations separated by 50 or 100 ms intervals. PPF was computed as the ratio between the response of the second pulse by the response of the first pulse.

Data acquisition and analysis were carried out using Elphy (G. Sadoc, UNIC-CNRS, Gif-sur-Yvette, France).

Statistical analysis Data were expressed as means ± SEM. Significance of difference between control and samples treated with various drugs was determined by one-way ANOVA for correlated-samples followed by the Tukey HSD test. For electrophysiological experiments, we used the non-parametric Mann-Whitney test. Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Results

MCH induces a decrease in glutamate release at SC-CA1 synapses.

We first examined the effect of MCH on glutamate receptor mediated synaptic transmission at

the synapses between Schaffer collaterals and CA1 pyramidal cells (SC-CA1 synapses) in mouse and rat brain slices. In mouse brain slices, MCH (300 nM) induced a significant decrease in field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) slopes of 30% (Figure 1A&B). This MCH-induced decrease in fEPSP was totally abolished in mice deleted for MCH-R1 gene (Figure 1D) indicating that MCH-R1 is required for this synaptic depression. By increasing progressively MCH concentration (from 1 nM to 3 µM), a dose-response curve was carried out. MCH decreased fEPSP at SC-CA1 synapses in a dose-concentration manner and an EC50 of 12.2 nM was determined using a logistic function (Figure 1C). This decrease in SC-CA1 fEPSP was maintained as long as MCH was applied but was rapidly reversed on MCH washout. This suggests that MCH-induced depression in the hippocampus does not desensitize in contrast with the synaptic effect of MCH observed in lateral hypothalamus (Gao, 2009).

We next determined whether this decrease in fEPSP was due to a pre or a postsynaptic mechanism by using several complementary electrophysiological methods in mouse brain slices. If the depression in SC-CA1 fEPSP is due to a presynaptic mechanism such as a decrease in probability of glutamate release, it should be associated with an increase in paired-pulse facilitation (PPF) (Salin et al., 1996; Dobrunz and Stevens, 1997; Zucker and Regehr, 2002). As shown in Figure 1A&B, PPF was increased during the application of MCH suggesting that the decrease in fEPSP during MCH application was due to a presynaptic mechanism. An inhibition mediated by postsynaptic GABA-A receptor (GABA-AR) cannot explain the MCH induced-depression because we used the GABA-AR antagonist picrotoxin in all experiments. Moreover, a MCH-induced depression caused by a decrease in Schaffer collateral excitability was also ruled out as the Schaffer collateral afferent volley was unchanged during MCH application (Figure 1D). To confirm a presynaptic mechanism for the MCH-induced depression, we assessed the glutamate receptor mediated synaptic currents by using whole-cell patch clamp recordings in CA1 pyramidal cells. We found that MCH induced a depression of AMPAR mediated currents at SC-CA1 synapses which was associated with an increase in PPF (Figure 1E&F). We also examined NMDAR mediated current as we believed that a presynaptic effect should affect NMDAR mediated current by the same amount as AMPAR mediated current. Indeed, NMDAR mediated current was decreased by MCH and the amount of depression was not different between AMPAR and NMDAR mediated current (Figure 1E&F). In summary, we demonstrated by a series of

experiments that MCH-induced depression at SC-CA1 synapses is caused by a decrease in probability of glutamate release.

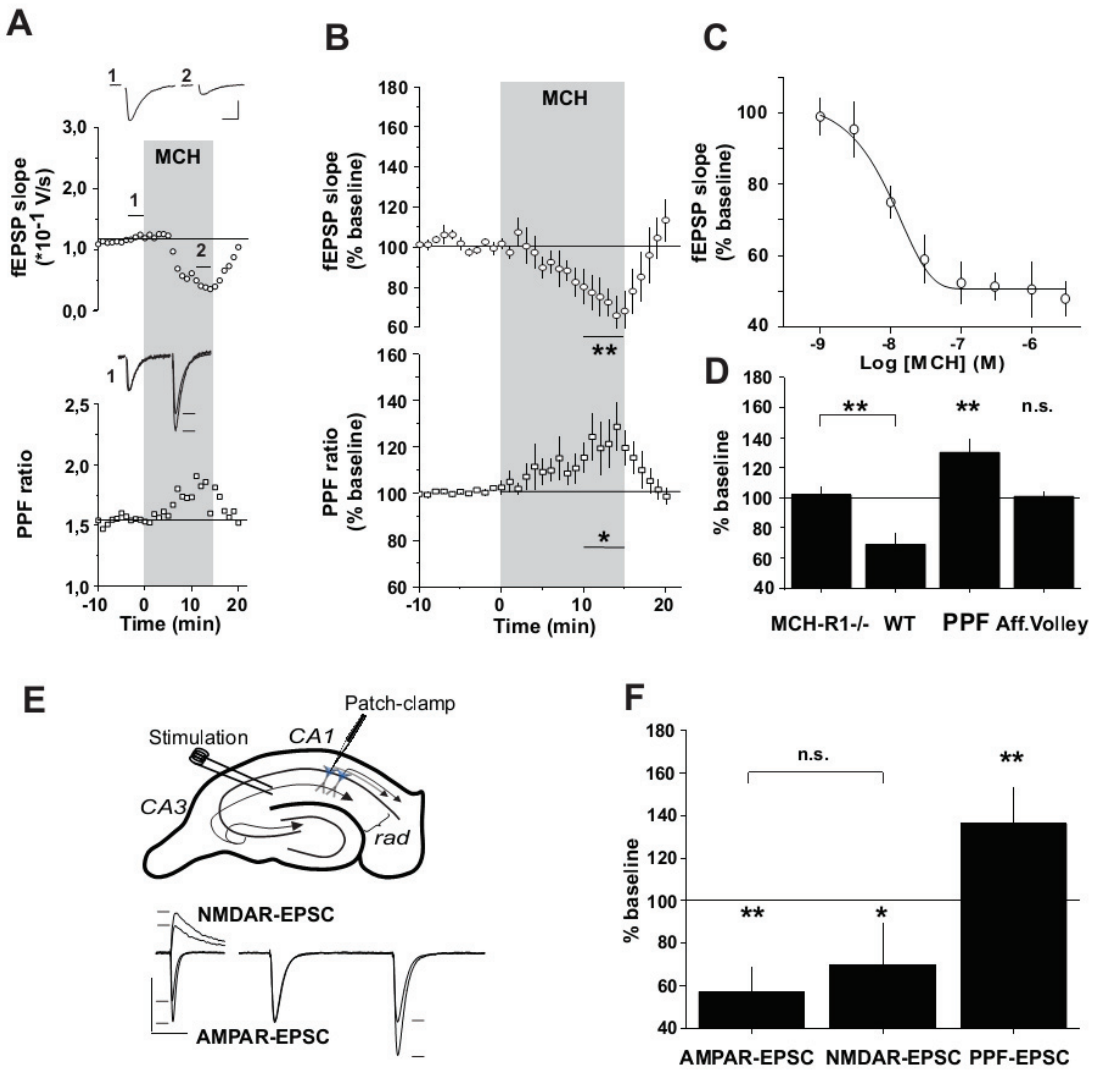


Figure 1. MCH modulates glutamate synaptic transmission in SC-CA1 synapses by acting on glutamate release. A. Time course of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) slope (upper) and paired-pulse facilitation (PPF, lower) in a representative experiment. Sample traces are average of 20 successive sweeps taken during baseline, during MCH application and during washing. Scale: 0.1mV /10ms. To show changes in PPF ratio, averaged fEPSP traces are scaled on the first peak. **B.** Summary plot of field potentials experiments (open circles and square; n=7; mean ± SEM). MCH (300 nM) induced a 27% depression (p=0.009). Changes of the PPF ratio showed the opposite pattern (20% increase, p=0.014) suggesting that MCH modulates glutamate synaptic transmission by acting on neurotransmitter release. **C.** Dose-Response curve from 6 to 11 experiments. The fitting curve was obtained by a logistic function which gives rise to an EC50 of 12.2 nM. **D.** Bar graphs showing the effect of an application of 1 µM MCH on MCH-R1-/- and wild type (WT) littermate mice (n = 8 in each group). MCH induced a depression at SC-CA1 synapses in WT but not in MCH-R1-/- mice. In the WT mice the PPF was significantly increased. In contrast, no effect was observed in afferent fiber volley (Aff Volley) during the application of MCH in WT mice. **E.** Sample traces are average of 20 successive sweeps of AMPAR-EPSC and NMDAR-EPSC taken during baseline and during MCH application. Scale : 50 pA / 100 ms. To show changes in PPF ratio, AMPAR-EPSC averaged traces were scaled on the first peak. **F.** Summary histogram of 9 CA1 pyramidal cells showing that MCH induced a depression of the AMPAR-mediated and NMDAR-mediated excitatory postsynaptic currents (EPSC). No difference was observed between the depression of AMPAR-EPSC and the depression NMDA-EPSC during MCH application. During MCH application PPF ratio increased showing that MCH elicits a decrease in probability of glutamate release.

MCH induces a release of ATP from astrocytes and an activation of A1 receptor at SC-CA1 synapses.

We next examined the cellular mechanisms that might explain the MCH-induced depression in glutamate release. Having established a presynaptic origin for the MCH-induced glutamate depression, we considered the implication of Schaffer collateral terminal autoreceptors. Among them, activation of adenosine receptors powerfully inhibits glutamate transmission at SC-CA1 synapses (Manzoni et al., 1994). As shown in Figure 2A, the adenosine receptor A1 (A1R) antagonist CPT (1 µM) completely blocked the depression of fEPSP induced by MCH (300 nM) and the change in PPF. In contrast, the adenosine receptor A2A (A2AR) antagonist SCH 58261 (100 nM) had a light but not significant effect on the MCH-mediated glutamate depression (Figure 2D). This result suggests that adenosine is required for the MCH-induced depression of glutamate synaptic transmission at SC-CA1 synapses. In the hippocampus, adenosine may come from different cellular populations (Manzoni et al., 1994) but the hydrolysis of ATP released by astrocytes constitutes a major source (Zhang et al., 2003; Pascual et al., 2005). We next determined whether inhibitors of ATP hydrolysis were able to block the MCH-induced glutamate depression. As shown in Figure 2B&D, inhibitors of the ectonucleotidases ARL67156 (100 µM) and AMP-CP (100 µM) totally blocked the MCH-induced glutamate depression suggesting that ATP is required for MCH action on glutamate transmission.

To confirm that ATP is released by astrocytes under the action of MCH, we performed several complementary experiments. Several works have identified that purinergic P2Y1 receptor and metabotropic glutamate receptors mGluR5, which are located on astrocyte membrane, are required for gliotransmission (Pascual et al., 2012). Thus, we examined whether the blockade of P2Y1 receptors was able to inhibit MCH-induced depression. By using selective P2Y1 receptor antagonist (MRS 2179, 30 µM) and unselective P2 receptor antagonist (PPADS, 50 µM), MCH-induced depression was totally inhibited (Figure 2C&D). Instead, during application of MCH, in slices with MRS 2179 pretreatment, we observed a potentiation of fEPSP (Figure 2C). This potentiation was not observed with PPADS (Figure 2D). Next, we tested whether blockade of mGluR5 might affect MCH-induced depression. As expected, application of a mGluR5 antagonist (MPEP, 30 µM) in 3 week old mice blocked the MCH-induced depression (Figure 2D). However, it has been shown (Manzoni et al., 1994) that adenosine could also be released by inhibitory interneurons in the hippocampus. Adenosine release by interneurons requires activation of NMDA receptors. We then tested

whether a NMDAR antagonist was able to block MCH-induced depression. The NMDAR antagonist DAPV had no effect on MCH mediated glutamate depression suggesting that the adenosine released by interneurons was not responsible for MCH-induced depression (data not shown). Altogether, these findings strongly suggest that MCH-induced depression is caused by an astrocyte-dependent ATP release.

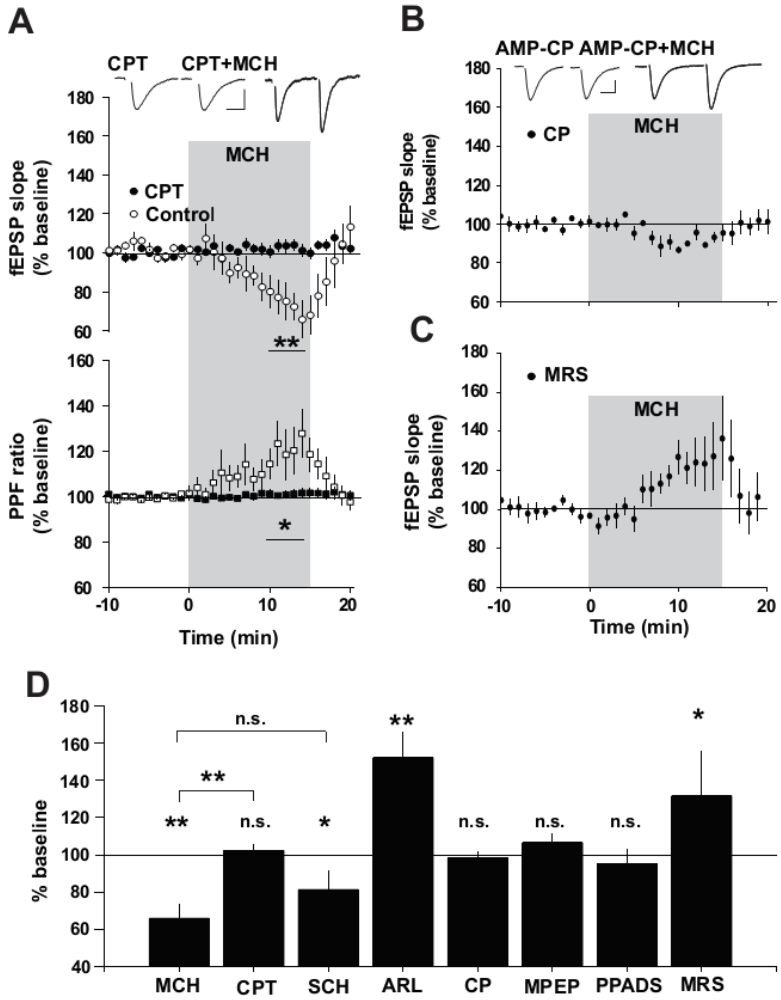


Figure 2. The inhibitory effects of MCH on glutamatergic synaptic transmission are mediated by adenosine. **A**. Summary plot of field potentials experiments in presence of the A1 receptor antagonist CPT (1µM, filled circles and square ; n=7; mean ± SEM) or not (open circles and square ; n=7 ; mean ± SEM) during the application of MCH (300 nM, grey bar). In presence of CPT, neither changes of synaptic response (p=0.306) nor changes of PPF ratio (p=0.4329) were induced by MCH. Sample traces were average of 20 successive sweeps taken during baseline and during MCH application. Scale: 0.1mV /10ms. To show changes in PPF ratio, averaged traces were scaled on the first peak. **B.** Summary plot of field potentials experiments in presence of AMP-CP (100 µM, filled circles; n=5; mean ± SEM). In presence of AMP-CP, neither changes of synaptic response (p=0.531) nor changes of PPF ratio (p=0.242) are induced by MCH (300nM). It suggests that liberation of ATP by astrocytes is necessary to neuromodulating effects of MCH. Sample traces are average of 20 successive sweeps taken during baseline and during MCH application. Scale : 0.1mV /10ms. To show changes in PPF ratio, averaged traces are scaled on the first peak. **C.** Summary graph showing the time course of fEPSP slope during MCH (300 nM) application in presence of the selective purinergic receptor P2Y1 antagonist MRS 2179 (30 µM, n = 9). Sample traces are average of 20 successive sweeps taken during baseline and during MCH application. Scale : 0.1mV /10ms. To show changes in PPF ratio, averaged traces are scaled on the first peak. **D.** Bar graphs showing a summary of experiments with MCH, CPT, the A2AR antagonist SCH, ARL, AMP-CP (CP), the mGluR5 antagonist MPEP, the P2R antagonist PPADS and MRS 2179 (MRS).

Astrocyte inactivation inhibits MCH-induced depression at SC-CA1 synapses

To definitively ascertain that astrocytes are required for MCH-induced depression in brain slices, we used a pharmacological inhibitor of glial tricarboxylic acid (TCA) cycle which inactivates astrocytes but not neurons. We thus carried out experiments at SC-CA1 synapses using the established metabolic inhibitor fluroacetate (FAC) (Papouin et al., 2012). Once a stable baseline was recorded at SC-CA1 synapses under a FAC pre-treatment, MCH (300 nM) was applied. FAC had only a weak effect on SC-CA1 synaptic transmission but totally abolished the MCH-induced depression mediated by MCH (Figure 3). Instead, fEPSPs were significantly increased during MCH application and was associated with a decrease in PPF ratio (Figure 3). Altogether these results showed that the ATP released by astrocytes is required for the MCH-induced depression at SC-CA1 synapses.

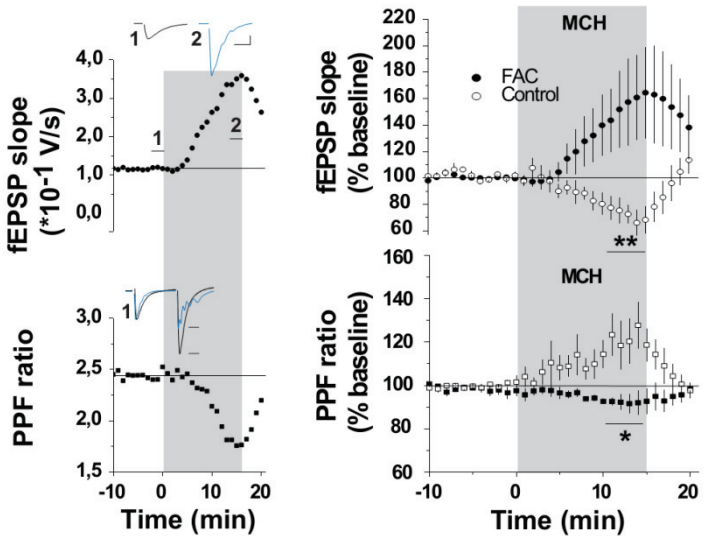
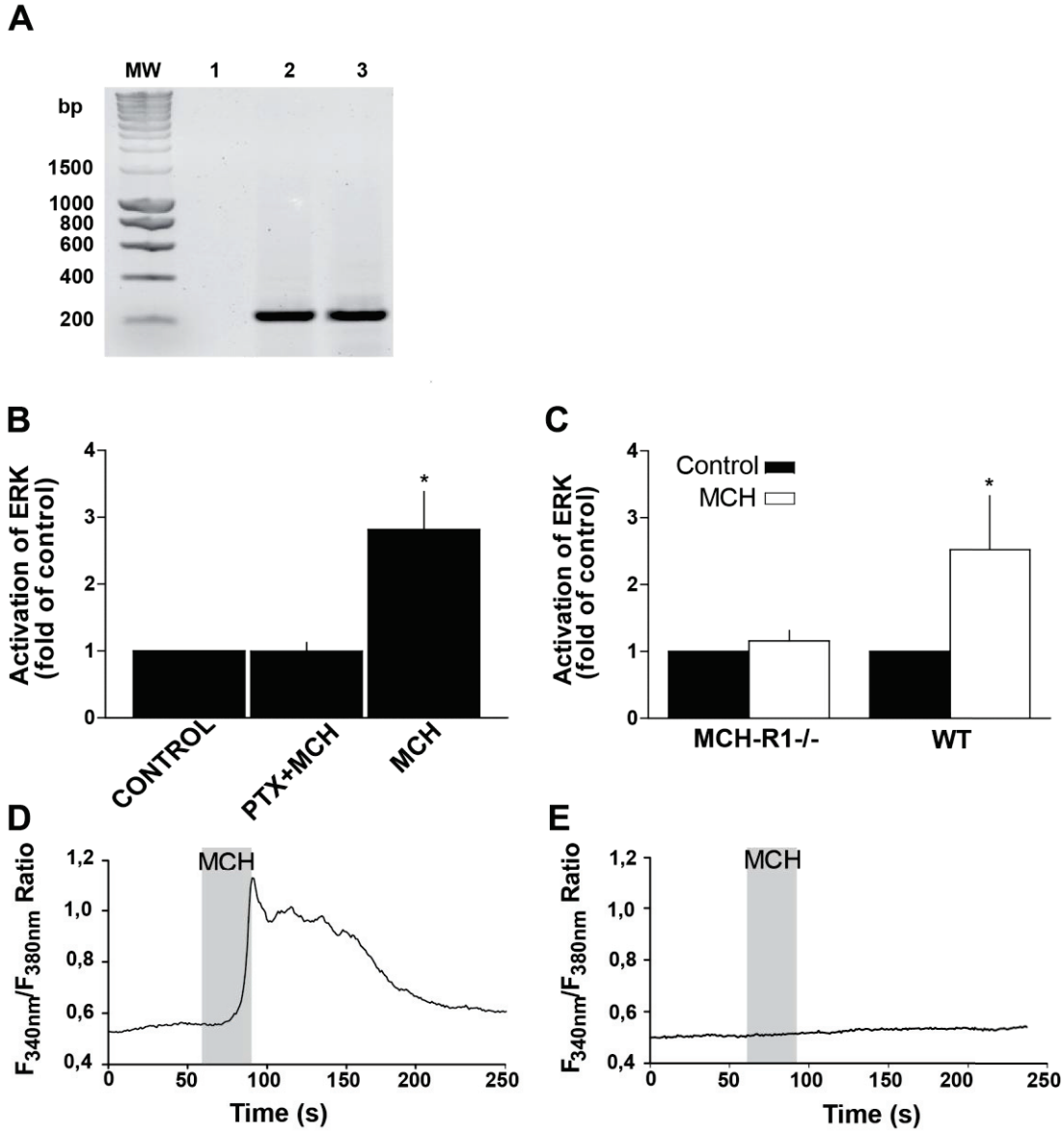


Figure 3. Inhibiting astrocyte metabolism suppresses MCH-induced depression of excitatory synaptic transmission. Time course of fEPSP slope (upper) and PPF ratio (lower) in presence of the metabolic inhibitor, fluoroacetate (FAC, 1 mM) in a representative experiment. Sample traces are average of 20 successive sweeps taken during baseline and during MCH application. Scale: 0.1mV /10ms. To show changes in PPF ratio, averaged traces are scaled on the first peak. (right) Summary plot of field potentials experiments in presence of FAC (filled circles and square ; n=5; mean ± SEM) or not (open circles and square ; n=7 ; mean ± SEM). In presence of FAC, MCH induces a 51% potentiation (p=0.00749) of synaptic response associated with a 8% decrease (p=0.01193) of PPF ratio. It suggests that astrocytes are required to elicit the MCH mediated effect depression of SC-CA1 synaptic transmission.

Astrocytes express functional MCH-R1 receptor

We next investigated whether astrocytes in culture, exposed or not to the G5 additive, do express MCHR1 mRNA. This supplement promotes the growth, differentiation and maturation of astrocytes (Vermeiren et al., 2005a) as demonstrated by the increased proportion of GFAP positive cells in the culture (from 90% to 98-99%; data not shown). Using a PCR primer pair encompassing the 1.2 kb intron, a specific fragment of about 200 bp was amplified in both conditions, confirming the presence of MCH-R1 mRNA (Fig. 4A).

Figure 4. MCH-R1 is expressed by astrocytes and MCH activate astrocytes intracellular



signalling pathways. A. RT-PCR analysis of RNA isolated from cultured rat astrocytes exposed or not to G5 supplement. Lane 1: negative control without RT, lane 2: normal astrocytes, lane 3: G5 treated astrocytes MW: DNA ladder. **C.** Activation of the Mitogen-activated protein kinases (MAPK) signalling pathway in rat astrocytes exposed to MCH with or without PTX treatment. Data are means ± SEM of 8 different experiments (*$p < 0.05$). **D.** Activation of the MAPK signalling pathway in WT and MCH-R1-/- mouse astrocytes exposed to MCH. Data are means ± SEM of 5 different experiments (*$p < 0.05$). **E.** Intracellular [Ca2+] variation in WT mouse astrocytes treated with MCH. **F.** Same experiment as in D but on MCH-R1-/- mouse astrocytes.

Then, we examined the intracellular signalling cascades activated by MCH. Up until now, in the few cell lines that endogenously express MCH-R1, MCH has been strictly coupled to G_i/G_o proteins and was shown to activate ERK phosphorylation (Cotta-Grand et al., 2009). As shown on figure 4B, phosphorylation of p42/44 ERK was significantly increased in rat astrocytes culture after a short MCH treatment and this effect was completely blocked by PTX. To demonstrate its specificity, the same experiment was performed on astrocytes

isolated from WT and MCH-R1-/- mouse pups. In the presence of MCH, a clear and significant phosphorylation of p42/44 ERK was observed in WT astrocytes but was absent in MCH-R1-/- astrocytes, (Figure 4C). Next, we tested the influence of MCH on the intracellular $[Ca^{2+}]_i$ levels. Short time incubation with 2 µM MCH induced a $[Ca^{2+}]_i$ increase in 25% of the WT astrocytes (28/110 cells), whereas no variation was recorded in any cells from MCH-R1-/- (0/110 cells) (Fig. 4D and 4E). Altogether, these results indicate that astrocytes express a functional MCH-R1.

MCH modulates astrocyte-dependent glutamate uptake

We also investigated the influence of MCH on glutamate uptake, one of the main functions of astrocytes. Astrocytic cultures were treated for a short time with increasing peptide concentrations before measuring the specific D-[^{3}H]-aspartate uptake. Under these conditions, MCH significantly decreases the substrate uptake in a concentration dependent manner with an EC_{50} of 0.2 nM (Fig. 5A). To demonstrate the specificity of this effect, we pre-treated astrocytes with a 150 fold excess of PMC-3881, a selective MCH-R1 antagonist. While this drug is without significant effect on its own, it totally abolished the decrease in uptake produced by 10 nM MCH (Fig. 5B). Then we tested the influence of MCH on astrocyte isolated from WT and MCH-R1-/- mouse pups. A significant decrease in aspartate uptake is observed in WT but not in MCH-R1-/- astrocytes (data not shown). Thus both experiments confirm the specificity of the effect.

To indentify which glutamate transporter might be affected, we measured D-[^{3}H]-aspartate uptake in the presence of several inhibitors. Under our culture conditions, the uptake is mainly dependent on GLutamate Aspartate Transporter (GLAST) as indicated by the 30% and 85% inhibition observed in the presence of DHK and L-SOS, respectively (Fig. 5C). In the presence of 1 µM MCH, only the DHK-sensitive uptake was significantly affected, suggesting that MCH modulates GLT-1. In order to determine whether MCH modulates glutamate uptake in the cerebral cortex we carried out experiments in brain slices. It has been well demonstrated that, at SC-CA1 synapses, the glutamate spill-over is extremely well-controlled. NMDAR mediated currents at these synapses may serve as an index of glutamate spill-over as the decay of NMDAR currents depends on the glutamate concentration in the extra-cellular space. Repetitive and brief pulses of high frequency stimulation increased the decay of NMDA mediated currents compared to one pulse. This effect is due to a transient increase in glutamate spill-over caused by high frequency stimulation (Scanziani et al., 1997). According

to our hypothesis, the decay of NMDAR-EPSC during high frequency stimulation was further increased by MCH (300 nM). This MCH-related increase in NMDAR-EPSC decay suggests that MCH induces an increase in glutamate spill-over (Figure 5D). Indeed, when the astrocyte transporter inhibitor DHK was applied, this MCH-dependent increase in NMDAR-EPSC decay was inhibited, confirming that MCH increases glutamate concentration in the extra-cellular space through an action on GLT-1.

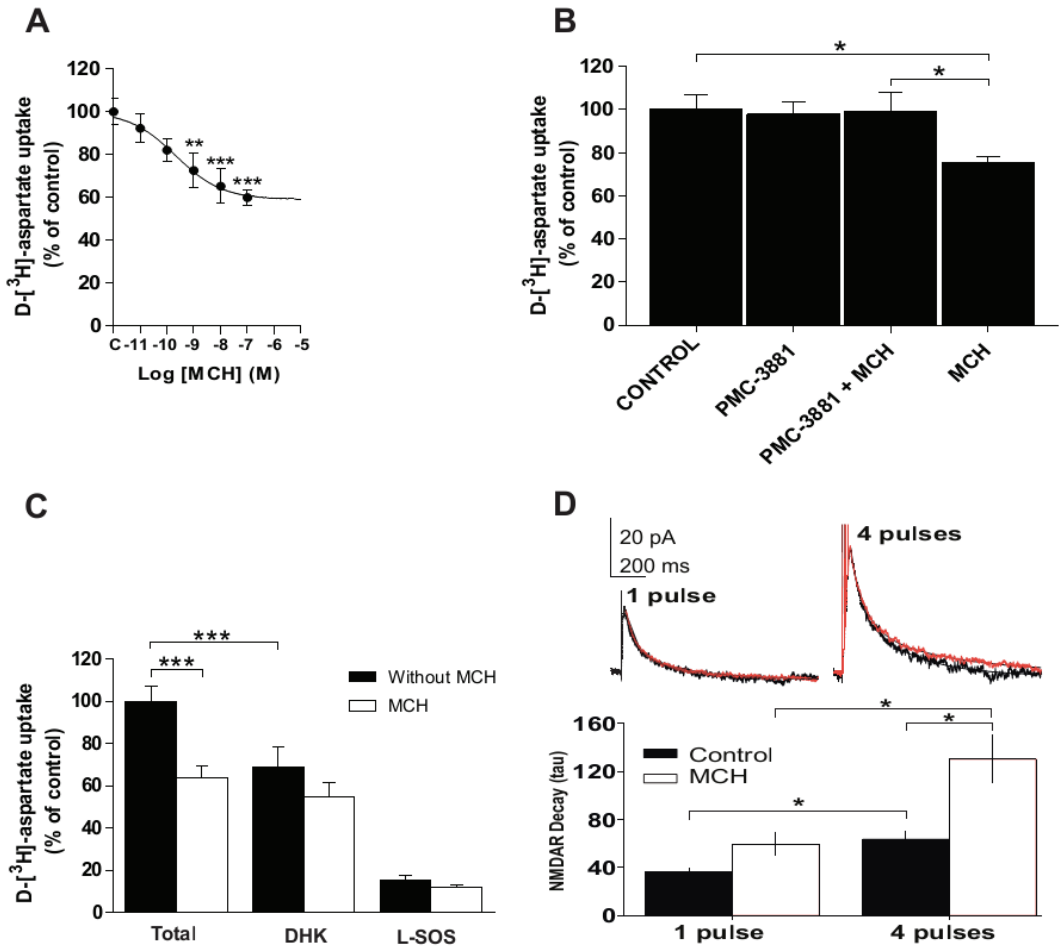


Figure 5. Influence of MCH on glutamate uptake and identification of the glutamate transporter affected. **A.** Concentration dependence of the effect of MCH in cultured rat astrocytes. Data are means ± SEM of 5 different experiments (*p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001). **B.** Inhibition of the effect of MCH by pre-treatment with MCH-R1 antagonist PMC-3881 in cultured rat astrocytes. Data are means ± SEM of 7 different experiments performed in triplicate (*p < 0.05). **C.** Influence of a pre-treatment with the glutamate transporter inhibitors DHK or L-SOS in cultured rat astrocytes. Data are means ± SEM of 5 different experiments performed in triplicate (***p < 0.001). **D.** MCH increased NMDAR-EPSC decay. Stimulation of SC-CA1 synapse by four pulses at high frequency but not one pulse increases the NMDAR EPSC decay by increasing glutamate spillover. In presence of MCH (300 nM) the decay of NMDAR-EPSC induced by four pulse stimulation increased significantly compared to control, suggesting that MCH significantly increase glutamate spillover.

Astrocytic MCH-R1 activates protein kinase C (PKC) cascade.

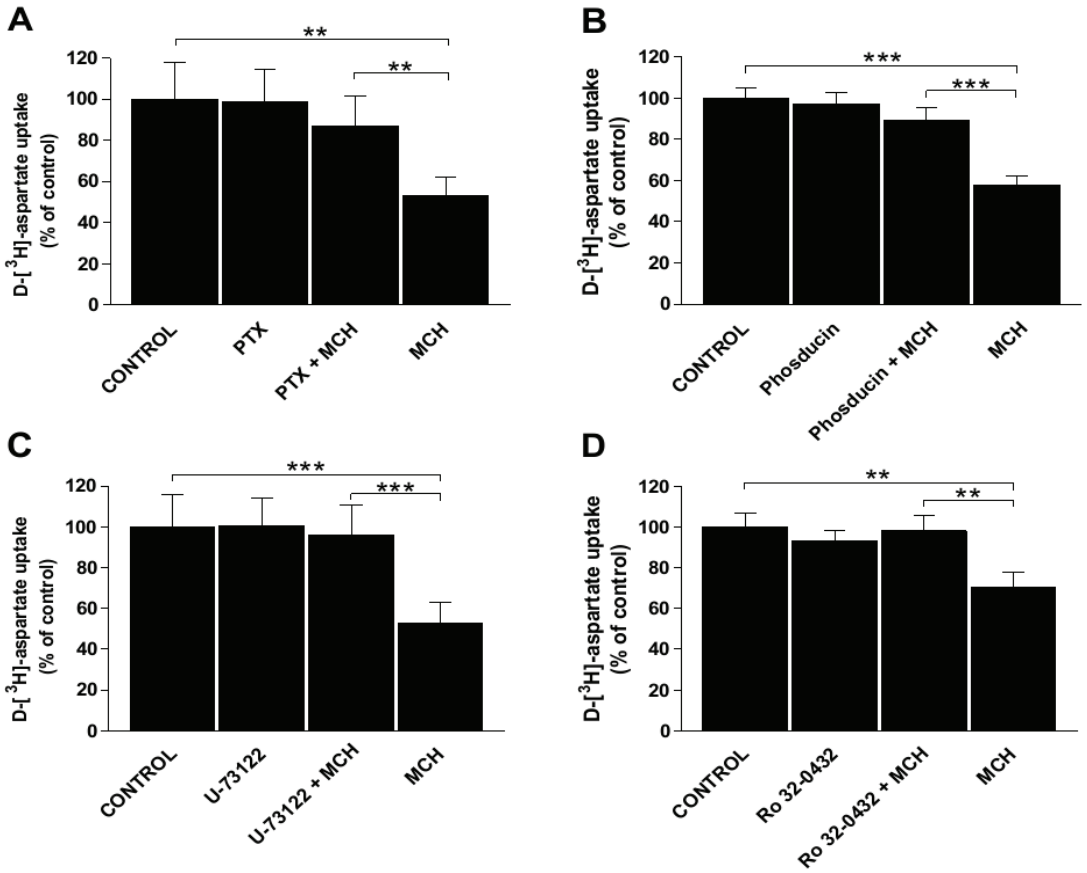


Figure 6. Identification of the signalling cascade regulating D-[^{3}H]-aspartate uptake. A. Effect of PTX pre-treatment. Data are means ± SEM of 3 different experiments performed in triplicate (**$p < 0.01$). **B.** Effect of anti-$G_{\beta\gamma}$ peptide pre-incubation of astrocytes. Data are means ± SEM of 4 separate experiments performed in triplicate (***$p < 0.001$). **C.** Effect of a pre-treatment with the PLC inhibitor U-73122. Data are means ± SEM of 4 separate experiments performed in triplicate (***$p < 0.001$). **D.** Effect of a pre-incubation with the PKC inhibitor Ro-32-0432. Data are means ± SEM of 4 separate experiments performed in triplicate (**$p < 0.01$).

We then investigated the intracellular signalling pathway that mediates this effect on GLT-1. First, by pre-treating the cells with *pertussis toxin* (PTX), which prevents the G protein heterotrimers from interacting with metabotropic receptors, we confirm the involvement of G_i/G_o proteins in the signal transduction cascade (Fig. 6A). Then we tested the influence of a specific inhibitor of the ERK pathway, but did not observe any effect (data not shown). In cells endogenously expressing a GPCR known to couple to G_i/G_o, the G_α subunits typically inhibit adenylate cyclase whereas the $G_{\beta\gamma}$ subunits modulate several other activities. So we used a membrane-permeable peptide conjugated to a 28-amino acid peptide (MPS-phosducin-like protein C terminus) to blocks the $G_{\beta\gamma}$ signalling (Chang et al., 2000). Incubation of astrocytes with this compound inhibited the decrease induced by MCH, indicating that the $G_{\beta\gamma}$ subunits released after G protein activation mediate the inhibition of GLT-1 (Fig. 6B). Because the heterodimeric complex $G_{\beta\gamma}$ modulates phospholipase C (PLC) (Fenton et al.,

2010), we tested the influence of the potent PLC inhibitor U-73122 and showed it abolished the uptake decrease (Fig. 6C). Considering the signalling cascades activated, we investigated the role of protein kinase C (PKC) by using the selective inhibitor Ro 32-0432. The inhibition of PKC was found to block the influence of MCH (Fig. 6D). These data show that the effect of MCH on D-[^{3}H]-aspartate uptake is dependent of PKC.

MCH-dependent ATP release requires PKC cascade.

Finally, we tested whether MCH was able to release ATP in cultured astrocytes. A short exposure to increasing concentration of MCH produced a stepwise increase in extracellular ATP level, demonstrating that MCH were able to stimulate ATP release without the presence of neurons (Fig. 7A). We next tested several inhibitors of intracellular pathways and observed that, as reported for glutamate uptake, ATP release is under the control of PKC (Fig. 7B). Furthermore, as the ATP release in cultured astrocytes was blocked by the PKC inhibitors, we applied PKC inhibitors Ro 32-0432 and chelerythrine in hippocampal slices. Using a pre-treatment with these inhibitors, the MCH-induced depression was blocked confirming the involvement of PKC cascade in ATP release (data not shown).

Altogether these results suggest that astrocytes are directly activated by MCH and that this activation leads to a release of ATP and an increase in extracellular glutamate concentration. MCH-dependent activation of astrocytes, which requires astrocytic MCH-R1 and is dependent on PKC cascade, exerts a fast modulation of glutamatergic transmission at SC-CA1 synapses.

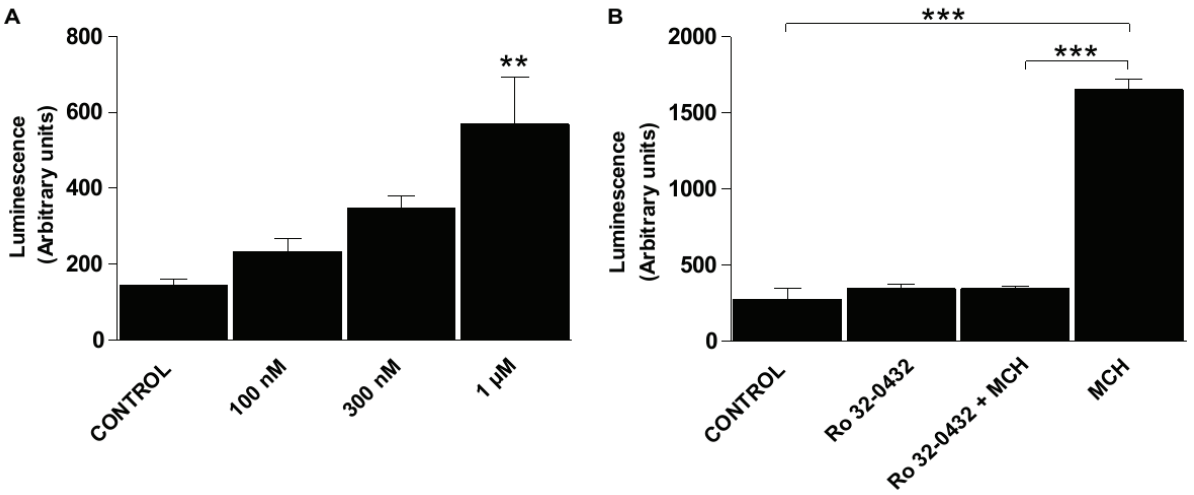


Figure 7. MCH significantly increases ATP release from cultured astrocytes through a PKC dependent pathway. A Concentration dependence of the effect. Data are means ± SEM of 5 different experiments performed in triplicate (**p < 0.01). **B.** Effect of a pre-incubation with the PKC inhibitor Ro 32-0432. Data are means ± SEM of 6 different experiments performed in triplicate (***p < 0.001).

Discussion

In the present paper, we combined several pharmacological, biochemical, electrophysiological and cellular imaging techniques in brain slices and cultured astrocytes to provide the first evidence that MCH modulates glutamate mediated synaptic transmission by activating astrocytes. In this discussion, we will first examine the molecular targets of this MCH action and we will then speculate on the potential significance of this result since recent data suggest that astrocytes are required in cognitive and sleep-related functions.

Identification of the astrocytic molecular pathways involved in MCH-induced gliotransmission

One major finding of the present study is that astrocytes do express mRNA encoding MCH-R1, the only MCH receptor present in rat and mice. We also demonstrated that this receptor is expressed at the cell surface and is functional as it activates intracellular signalling pathways. All the effects of MCH described herein are specific as they were all blocked by well-characterized MCH-R1 antagonists (Sears et al., 2010) and were absent in cultured astrocytes isolated from MCH-R1-/- mice.

As most neuropeptides, MCH acts by binding a seven-transmembrane domain G protein-coupled receptor (GPCR). It is important to note that the intracellular signalling pathway that mediates both effect of MCH in astrocytes uses PKC, and most probably a $G_{\beta\gamma}$ / PLC / PKC cascade. Interestingly, Isoldi and colleagues have shown that MCH activates *in vitro* a PLC / PKC and Ca^{2+}/calmodulin-dependent PKC pathway, very similar to what we observed, although these authors did not check whether $G_{\beta\gamma}$ is implicated (Isoldi et al., 2004). These data suggest that this signalling cascade is probably of prime importance when considering the effects of MCH in various cell types. This is in line with most recent knowledge about GPCR signalling as $G_{\beta\gamma}$ subunits are now considered central mediators especially when they belong to G_i/G_0 coupled receptors (Smrcka, 2008).

Our results also provide important insights on the molecular mechanisms responsible for MCH-R1 activation in astrocytes. MCH-R1 is a GPCR associated to G_i/G_0 when expressed endogenously in cell lines (Eberle et al., 2010). In the present paper, we showed that MCH-R1 mainly binds the G_i/G_0 proteins as, when tested, all MCH effects were blocked by PTX. Application of MCH on astrocytes also induced an increase in the intracellular Ca^{2+} levels. Such modulation of Ca^{2+} levels has also been observed *in vitro* following activation of other

G_i/G_0 protein coupled receptors such as $GABA_B$ (Nilsson et al., 1993), delta-opioid (Thorlin et al., 1998) and dopamine D2 (Khan et al., 2001) receptors. Next we tested the influence of MCH on glutamate uptake, as regulation of glutamate homeostasis is one of the main functions of astrocytes and is also known to be modulated by several GPCR. Indeed, a short-term stimulation of G_i/G_0-coupled receptors decreases glutamate uptake in astrocytes as demonstrated with cannabinoids CB1 (Shivachar, 2007) or endothelin-1 (Leonova et al., 2001) receptors, whereas it increases when G_s-coupled receptors such as mGluR5 (Vermeiren et al., 2005b) or VPAC2 (Goursaud et al., 2008) are stimulated. We also observed a decrease in glutamate uptake after a short exposure to MCH. By using specific inhibitors, we concluded that GLT-1 is mainly affected. Subsequent analysis of the intracellular signalling pathway that links MCH-R1 to GLT-1 revealed that $G_{\beta\gamma}$ subunits are implicated and recruit PLC. Once stimulated, PLC activates PKC that most probably phosphorylates GLT-1 and in consequence decreases glutamate uptake. This assumption is based on the previous observation that an activation of PKC decreases, within minutes, GLT-1-mediated glutamate uptake by stimulating its endocytosis and degradation (Gonzalez-Gonzalez et al., 2008).

Finally, we have also demonstrated that MCH affects ATP release through a mechanism dependent on PKC activation. In various cell types such as neurons and endocrine cells, the activation of PKC stimulates exocytosis (Zhu et al., 2002). Indeed, in these cells, the release of ATP by diacylglycerol is independent of PKC activation (Mungenast, 2011) and the one mediated by both PAR-1 and M3 GPCR uses a Rho-GTPases dependent mechanism (Blum et al., 2008). However, there are several possibilities for PKC to influence exocytosis such as activation of RhoA-GTPase by phosphorylation of RhoGDI (Dovas et al., 2010) or through a modulation of any receptor able to influence the intracellular Ca^{2+} concentration (Verkhratsky et al., 2012).

Impact of MCH-induced gliotransmission in synaptic plasticity

We showed that MCH exerts a fast decrease in glutamate release at SC-CA1 synapses of mouse and rat brain slices. This effect was entirely due to an activation of MCH-R1 since the MCH-induced depression at SC-CA1 synapses was abolished in MCH-R1-/- mice. This MCH-induced gliotransmission involves activation of astrocytic purinergic receptors P2Y1 and metabotropic glutamate receptor mGluR5 as seen in other studies in the hippocampus (Pascual et al., 2012). Thus ATP release by astrocytes acts on astrocytic purinergic receptors (Fam et al., 2003; Gallagher and Salter, 2003). Indeed, although it has been shown that

neuropeptide G-protein coupled receptors are located on astrocytic membranes, such as bradykinin (Parpura et al., 1994), evidence for a functional role for these astrocytic peptide receptors remains sparse. Therefore, our findings demonstrating that MCH may have an impact on gliotransmission suggest a physiological role for astrocytic neuropeptide receptor. The findings of the present paper share similarities with neuron-astrocyte communication through CB1 receptors. Astrocytes do express CB1 receptors and are activated by endocannabinoids (Navarrete and Araque, 2008). Interestingly, cannabinoids selectively modulate both spatial memory and hippocampal LTD through activation of astrocytic CB1 receptors (Han et al., 2012).

In the hippocampus as well as in other brain areas adenosine and glutamate exert an inhibitory feedback mechanism on synaptic transmission, in particular when presynaptic neurons are activated by high frequency stimulation (Manzoni et al., 1994; Scanziani et al., 1997). Synaptic transmission stimulated at high frequency is strongly regulated by extra-cellular diffusion of adenosine and glutamate spillover. Both neurotransmitters act as frequency filters which may enhance the signal to noise ratio. By diffusing to A1R and mGluR2 located on adjacent fibers, glutamate and adenosine may help to focus the information transfer of activated synapses while both transmitters inactivate neighbouring fibers by acting on presynaptic receptors. A1R activation at SC-CA1 synapses inhibits LTP induction (Colgin et al., 2004; Rex et al., 2005) Fujii et al, 1999) whereas it facilitates presynaptic LTP at hippocampal mossy fiber (Moore et al, 2003). Thus adenosine and glutamate spillover may contribute to increase the synapse specificity of hebbian forms of long-term synaptic plasticity such as LTP and long-term depression (LTD).

Potential role of MCH induced gliotransmission in sleep

Our finding that MCH activates astrocytes and increases extracellular adenosine should be related to sleep process. First, astrocytes contribute to EEG slow wave activity (SWA) and these cells play an important role in non REM (NREM) sleep homeostasis. Activity of cortical astrocytes are synchronized with SWA during NREM sleep (Amzica and Massimini, 2002). Second, adenosine is a major sleep homeostatic factor (Porkka-Heiskanen, 2013). Several studies have shown that increase in extracellular adenosine levels, prolongs sleep and increases SWA. Pharmacological studies demonstrated that adenosine and its receptor agonists promoted, but antagonists such as caffeine, inhibited both NREM and REM sleep. Finally, inhibiting adenosine release by gliotransmission reduces NREM sleep homeostasis

(Halassa et al., 2009). Generally, these studies lead to the implication of astrocytes only for NREM sleep homeostasis. However, adenosine modulates not only NREM sleep but also REM sleep amount (Porkka-Heiskanen et al., 1997), and, via an activation of A1R, contributes also to REM sleep homeostasis (Halassa et al, 2009).

Thus, these results together with our finding suggest by which MCH contributes to sleep regulation. MCH application increases sleep amount, REM sleep in particular, while MCH-R1 antagonists decreases sleep quantity and more selectively REM sleep. MPEP, mGluR5 antagonist which blocks MCH-induced depression and gliotransmission (Figure 2, D'Ascenzo et al., 2007), has been shown to decrease REM sleep amount in rats (Cavas et al., 2013). This inhibitory action on REM sleep possibly reflects an effect of MCH-dependent gliotransmission and potentially suggests that MCH-induced astrocytic activation contributes to sleep physiological processes. We can hypothesize that MCH by acting on gliotransmission is a neuronal signal which contribute to sleep regulation.

During REM sleep, extracellular concentration in acetylcholine (Ach) increase in different brain areas such as in the hippocampus (Marrosu et al., 1995). It has been suggested in rodent and human studies that Ach during REM sleep inhibits functional connectivity between areas in the hippocampus and between the hippocampus and the neocortex (Gais and Born, 2004; Hasselmo, 2006). Thus, MCH-induced gliotransmission together with Ach may deeply inhibit information transfer during REM sleep between the hippocampus and the neocortex (Wierzynski et al., 2009). A recent paper suggests that MCH increase Ach release in the hippocampus by an action in the septum (Lu et al., 2013). Thus it is likely that these two transmitters cooperate in order to regulate sleep-related reorganization of functional connectivity between cortical areas. It has been also shown that extracellular glutamate levels in various brain structures increase during REM sleep as compared to NREM sleep (Dash et al., 2009; Cavas et al., 2013). As MCH neurons are particularly active during REM sleep, they could contribute to the increase in extracellular glutamate observed during that sleep state. Finally, the increase in extracellular glutamate concentration we observed may activate metabotrobic glutamate receptor mGluR2 which further inhibits glutamatergic synaptic transmission. Since it has been shown that reducing functional connectivity during REM sleep is important for consolidation of hippocampal-dependent forms of memory (Gais and Born, 2004), our finding suggests a new mechanism for sleep induced facilitation of memory.

In summary we found that MCH activates astrocytes in the hippocampus and in the neocortex. It has been suggested that NREM sleep activates astrocyte networks. Given that MCH neurons are activated during REM sleep (Hassani et al., 2009), it is likely that astrocytes are also activated during REM sleep. This suggests that in both sleep states neurons are tightly coupled with astrocytes.

References

Adamantidis A, Thomas E, Foidart A, Tyhon A, Coumans B, Minet A, Tirelli E, Seutin V, Grisar T, Lakaye B (2005) Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function. Eur J Neurosci 21:2837-2844.

Amzica F, Massimini M (2002) Glial and neuronal interactions during slow wave and paroxysmal activities in the neocortex. Cereb Cortex 12:1101-1113.

Bechtholt-Gompf AJ, Walther HV, Adams MA, Carlezon WA, Jr., Ongur D, Cohen BM (2010) Blockade of astrocytic glutamate uptake in rats induces signs of anhedonia and impaired spatial memory. Neuropsychopharmacology 35:2049-2059.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. J Comp Neurol 319:218-245.

Blouin AM, Fried I, Wilson CL, Staba RJ, Behnke EJ, Lam HA, Maidment NT, Karlsson KAE, Lapierre JL, Siegel JM (2013) Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. Nat Commun 4:1547.

Blum AE, Joseph SM, Przybylski RJ, Dubyak GR (2008) Rho-family GTPases modulate Ca(2+) -dependent ATP release from astrocytes. Am J Physiol Cell Physiol 295:C231-241.

Cavas M, Scesa G, Navarro JF (2013) Effects of MPEP, a selective metabotropic glutamate mGlu5 ligand, on sleep and wakefulness in the rat. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 40:18-25.

Chang M, Zhang L, Tam JP, Sanders-Bush E (2000) Dissecting G protein-coupled receptor signaling pathways with membrane-permeable blocking peptides. Endogenous 5-HT(2C) receptors in choroid plexus epithelial cells. J Biol Chem 275:7021-7029.

Colgin LL, Kubota D, Jia Y, Rex CS, Lynch G (2004) Long-term potentiation is impaired in rat hippocampal slices that produce spontaneous sharp waves. J Physiol 558:953-961.

Cotta-Grand N, Rovere C, Guyon A, Cervantes A, Brau F, Nahon JL (2009) Melanin-concentrating hormone induces neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells through p53 and MAPKinase signaling pathways. Peptides 30:2014-2024.

Dash MB, Douglas CL, Vyazovskiy VV, Cirelli C, Tononi G (2009) Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. J Neurosci 29:620-629.

Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. Neuron 18:995-1008.

Dovas A, Choi Y, Yoneda A, Multhaupt HA, Kwon SH, Kang D, Oh ES, Couchman JR (2010) Serine 34 phosphorylation of rho guanine dissociation inhibitor (RhoGDIalpha) links signaling from conventional protein kinase C to RhoGTPase in cell adhesion. J Biol Chem 285:23296-23308.

Eberle AN, Mild G, Zumsteg U (2010) Cellular models for the study of the pharmacology and signaling of melanin-concentrating hormone receptors. J Recept Signal Transduct Res 30:385-402.

Fam SR, Gallagher CJ, Kalia LV, Salter MW (2003) Differential frequency dependence of P2Y1- and P2Y2- mediated Ca 2+ signaling in astrocytes. J Neurosci 23:4437-4444.

Fenton RA, Shea LG, Doddi C, Dobson JG, Jr. (2010) Myocardial adenosine A(1)-receptor-mediated adenoprotection involves phospholipase C, PKC-epsilon, and p38 MAPK, but not HSP27. Am J Physiol Heart Circ Physiol 298:H1671-1678.

Gais S, Born J (2004) Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. Proc Natl Acad Sci U S A 101:2140-2144.

Gallagher CJ, Salter MW (2003) Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. J Neurosci 23:6728-6739.

Gao XB (2009) Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus. Peptides 30:2025-2030.

Gonzalez-Gonzalez IM, Garcia-Tardon N, Gimenez C, Zafra F (2008) PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster. Glia 56:963-974.

Goursaud S, Maloteaux JM, Hermans E (2008) Activation of VIP/PACAP type 2 receptor by the peptide histidine isoleucine in astrocytes influences GLAST-mediated glutamate uptake. J Neurochem 105:1165-1175.

Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, Haydon PG, Frank MG (2009) Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. Neuron 61:213-219.

Han J, Kesner P, Metna-Laurent M, Duan T, Xu L, Georges F, Koehl M, Abrous DN, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Liu Q, Bai G, Wang W, Xiong L, Ren W, Marsicano G, Zhang X (2012) Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. Cell 148:1039-1050.

Hassani OK, Lee MG, Jones BE (2009) Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. Proc Natl Acad Sci U S A 106:2418-2422.

Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. Curr Opin Neurobiol 16:710-715.

Higuchi S, Irie K, Mishima S, Araki M, Ohji M, Shirakawa A, Akitake Y, Matsuyama K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M (2010) The cannabinoid 1-receptor silent antagonist O-2050 attenuates preference for high-fat diet and activated astrocytes in mice. J Pharmacol Sci 112:369-372.

Hsuchou H, He Y, Kastin AJ, Tu H, Markadakis EN, Rogers RC, Fossier PB, Pan W (2009) Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. Brain 132:889-902.

Isoldi MC, de Pina Benabou MH, Schumacher RI, Gois CC, Scarparo AC, Reboucas NA, Visconti MA (2004) Mechanisms of action of melanin-concentrating hormone in the teleost fish erythrophoroma cell line (GEM-81). Gen Comp Endocrinol 136:270-275.

Jego S, Glasgow SD, Herrera CG, Ekstrand M, Reed SJ, Boyce R, Friedman J, Burdakov D, Adamantidis AR (2013) Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. Nat Neurosci 16:1637-1643.

Khan ZU, Koulen P, Rubinstein M, Grandy DK, Goldman-Rakic PS (2001) An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 98:1964-1969.

Lakaye B, Minet A, Zorzi W, Grisar T (1998) Cloning of the rat brain cDNA encoding for the SLC-1 G protein-coupled receptor reveals the presence of an intron in the gene. Biochim Biophys Acta 1401:216-220.

Leonova J, Thorlin T, Aberg ND, Eriksson PS, Ronnback L, Hansson E (2001) Endothelin-1 decreases glutamate uptake in primary cultured rat astrocytes. Am J Physiol Cell Physiol 281:C1495-1503.

Lu ZH, Fukuda S, Minakawa Y, Yasuda A, Sakamoto H, Sawamura S, Takahashi H, Ishii N (2013) Melanin concentrating hormone induces hippocampal acetylcholine release via the medial septum in rats. Peptides 44:32-39.

Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll RA (1994) Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. Science 265:2098-2101.

Marrosu F, Portas C, Mascia MS, Casu MA, Fa M, Giagheddu M, Imperato A, Gessa GL (1995) Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. Brain Res 671:329-332.

Mungenast AE (2011) Diacylglycerol signaling underlies astrocytic ATP release. Neural Plast 2011:537659.

Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. Neuron 57:883-893.

Nilsson M, Eriksson PS, Ronnback L, Hansson E (1993) GABA induces Ca2+ transients in astrocytes. Neuroscience 54:605-614.

Pachoud B, Adamantidis A, Ravassard P, Luppi PH, Grisar T, Lakaye B, Salin PA (2010) Major impairments of glutamatergic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus of mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. J Neurophysiol 104:1417-1425.

Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. Cell 150:633-646.

Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. Nature 369:744-747.

Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. Proc Natl Acad Sci U S A 109:E197-205.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. Science 310:113-116.

Porkka-Heiskanen T (2013) Sleep homeostasis. Curr Opin Neurobiol 23:799-805.

Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. Science 276:1265-1268.

Rao Y, Lu M, Ge F, Marsh DJ, Qian S, Wang AH, Picciotto MR, Gao XB (2008) Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. J Neurosci 28:9101-9110.

Rex CS, Kramar EA, Colgin LL, Lin B, Gall CM, Lynch G (2005) Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. J Neurosci 25:5956-5966.

Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O (2001) Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. J Comp Neurol 435:26-40.

Salin PA, Scanziani M, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Distinct short-term plasticity at two excitatory synapses in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 93:13304-13309.

Scanziani M, Salin PA, Vogt KE, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. Nature 385:630-634.

Sears RM, Liu RJ, Narayanan NS, Sharf R, Yeckel MF, Laubach M, Aghajanian GK, DiLeone RJ (2010) Regulation of nucleus accumbens activity by the hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone. J Neurosci 30:8263-8273.

Shivachar AC (2007) Cannabinoids inhibit sodium-dependent, high-affinity excitatory amino acid transport in cultured rat cortical astrocytes. Biochem Pharmacol 73:2004-2011.

Smrcka AV (2008) G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. Cell Mol Life Sci 65:2191-2214.

Tan CP, Sano H, Iwaasa H, Pan J, Sailer AW, Hreniuk DL, Feighner SD, Palyha OC, Pong SS, Figueroa DJ, Austin CP, Jiang MM, Yu H, Ito J, Ito M, Guan XM, MacNeil DJ, Kanatani A, Van der Ploeg LH, Howard AD (2002) Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. Genomics 79:785-792.

Thorlin T, Eriksson PS, Persson PA, Aberg ND, Hansson E, Ronnback L (1998) Delta-opioid receptors on astroglial cells in primary culture: mobilization of intracellular free calcium via a pertussis sensitive G protein. Neuropharmacology 37:299-311.

Varas MM, Perez MF, Ramirez OA, de Barioglio SR (2003) Increased susceptibility to LTP generation and changes in NMDA-NR1 and -NR2B subunits mRNA expression in rat hippocampus after MCH administration. Peptides 24:1403-1411.

Verkhratsky A, Rodriguez JJ, Parpura V (2012) Calcium signalling in astroglia. Mol Cell Endocrinol 353:45-56.

Verlaet M, Adamantidis A, Coumans B, Chanas G, Zorzi W, Heinen E, Grisar T, Lakaye B (2002) Human immune cells express ppMCH mRNA and functional MCHR1 receptor. FEBS Lett 527:205-210.

Vermeiren C, Najimi M, Maloteaux JM, Hermans E (2005a) Molecular and functional characterisation of glutamate transporters in rat cortical astrocytes exposed to a defined combination of growth factors during in vitro differentiation. Neurochem Int 46:137-147.

Vermeiren C, Najimi M, Vanhoutte N, Tilleux S, de Hemptinne I, Maloteaux JM, Hermans E (2005b) Acute up-regulation of glutamate uptake mediated by mGluR5a in reactive astrocytes. J Neurochem 94:405-416.

Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Leger L, Boissard R, Salin P, Peyron C, Luppi PH (2003) A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. BMC Neurosci 4:19.

Wierzynski CM, Lubenov EV, Gu M, Siapas AG (2009) State-dependent spike-timing relationships between hippocampal and prefrontal circuits during sleep. Neuron 61:587-596.

Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. Neuron 40:971-982.

Zhu H, Hille B, Xu T (2002) Sensitization of regulated exocytosis by protein kinase C. Proc Natl Acad Sci U S A 99:17055-17059.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. Annu Rev Physiol 64:355-405.

CHAPITRE III :

Rôle du SP dans l'activation des réseaux corticaux pendant les processus de consolidation à court et long terme lors d'un conditionnement contextuel à la peur

1. Introduction

La consolidation à long terme de la mémoire met en jeu la fois des processus synaptiques qui se mettent en place au bout de quelques minutes ou heures, mais aussi la formation progressive d'un réseau cortical sous-tendant cette mémoire qui lui se stabilise au bout de plusieurs semaines, voire années (Frankland et Bontempi, 2005 ; Wang et Morris, 2010). Chez le rongeur, le conditionnement contextuel à la peur, dépendant de l'hippocampe, produit une réponse robuste et durable de peur au contexte de conditionnement qui peut rester stable au cours de très longues périodes voire même pendant tout le durée de vie de l'animal et ce, même si ce conditionnement s'est fait après une seule session d'acquisition (Gale et al., 2004 ; LeDoux, 2014). Il représente donc un excellent moyen d'étudier les différents processus qui se mettent en place pendant la consolidation à long terme des mémoires dépendantes de l'hippocampe. Nous avons vu dans notre introduction que l'acquisition, la consolidation et le rappel de cette tâche met en jeu un réseau hippocampo-amygdalien auquel s'ajoutent progressivement des régions néocorticales au cours du temps. Le stockage à long terme des informations pertinentes relatives au contexte de conditionnement s'effectuerait alors dans le néocortex. Des études de l'expression de marqueurs indirects d'activité neuronaux comme le gène d'expression précoce *c-fos* ont ainsi montré qu'il y avait au rappel à long terme (un mois) d'une tâche de conditionnement contextuel à la peur, un remodelage du réseau de la mémoire. Ce rappel à long terme nécessiterait le recrutement d'une structure du mPFC, le cortex cingulaire antérieur (CCA), qui n'était pas initialement recrutée lors du conditionnement (Frankland et al., 2004 ; Goshen et al., 2011). Chez des souris déficientes pour la CAMKII, une kinase impliquée dans l'expression et le maintien de la plasticité synaptique à long terme, le recrutement de cette structure est empêché et les performances de ces souris au rappel à long terme sont altérées (Frankland et al., 2004). Par ailleurs, Bourtchouladze et coll ont montré qu'il existait une période de consolidation critique de 4h immédiatement après

l'acquisition d'un conditionnement contextuel à la peur (avec un protocole modéré) pendant lesquels interférer avec les processus de consolidation synaptique empêche la rétention (Bourtchouladze et al., 1998). Ainsi, perturber des mécanismes précoces de consolidation synaptique pourrait empêcher le remodelage du réseau cortical de la mémoire de peur conditionnée contextuelle nécessaire au rappel à long terme.

Dans nos deux précédentes études, nous avons montré que le SP pouvait moduler certains processus de consolidation synaptique notamment via la libération d'hormones comme la MCH. Or, les privations de SP perturbent la consolidation de tâches de mémoire dépendantes de l'hippocampe uniquement pendant une fenêtre temporelle restreinte (*REM sleep window*) de 4h après l'apprentissage (Smith, 1995). Une étude de notre laboratoire a montré qu'une privation courte de SP (4h) chez le rat directement après l'apprentissage suffit à altérer les performances de rats dans une tâche de conditionnement contextuel à la peur et à perturber l'induction de LTP dans l'hippocampe dorsal (Ravassard et al., sous presse). De plus, l'induction d'un rebond de SP (hypersomnie) de 3h permet au contraire une facilitation de l'induction de la LTP et une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans le maintien de la LTP comme les facteurs de transcription c-Fos et Zif268 ou comme le BDNF (Ravassard et al., 2014). Cela suggère que le SP post-apprentissage joue un rôle dans les processus de consolidation synaptique qui se mettent en place de manière précoce dans l'hippocampe. En agissant sur ces processus précoces de consolidation synaptique, le SP post-apprentissage pourrait il donc influencer la réorganisation du réseau cortical de la mémoire qui apparait au cours du temps ? Chez le rongeur, à notre connaissance, aucune étude n'a été publiée sur le rôle du SP post-apprentissage sur la consolidation à long-terme.

Nous avons donc étudié chez la souris, l'influence d'une privation courte de SP (6h) sur la consolidation à court (24h) et long (30 jours) terme d'un conditionnement contextuel à la peur. Ensuite nous avons étudié l'expression du marqueur indirect d'activité *c-fos* dans l'hippocampe, l'amygdale et le mPFC, à l'issue du test de rappel de ce conditionnement afin d'identifier les structures dont l'activation est requise au rappel à court ou long terme et l'influence du SP post-apprentissage sur leur recrutement (**Fig.1**). Nous avons ensuite réalisé une étude de la connectivité fonctionnelle entre ces structures pour déterminer les conséquences de la privation de SP post-apprentissage sur la réorganisation fonctionnelle des réseaux impliqués dans la mémoire émotionnelle dépendante de l'hippocampe. Les résultats que nous présentons ici sont préliminaires. Nous n'avons pas encore fini l'analyse du marquage c-Fos et Zif268 de la totalité de nos groupes.

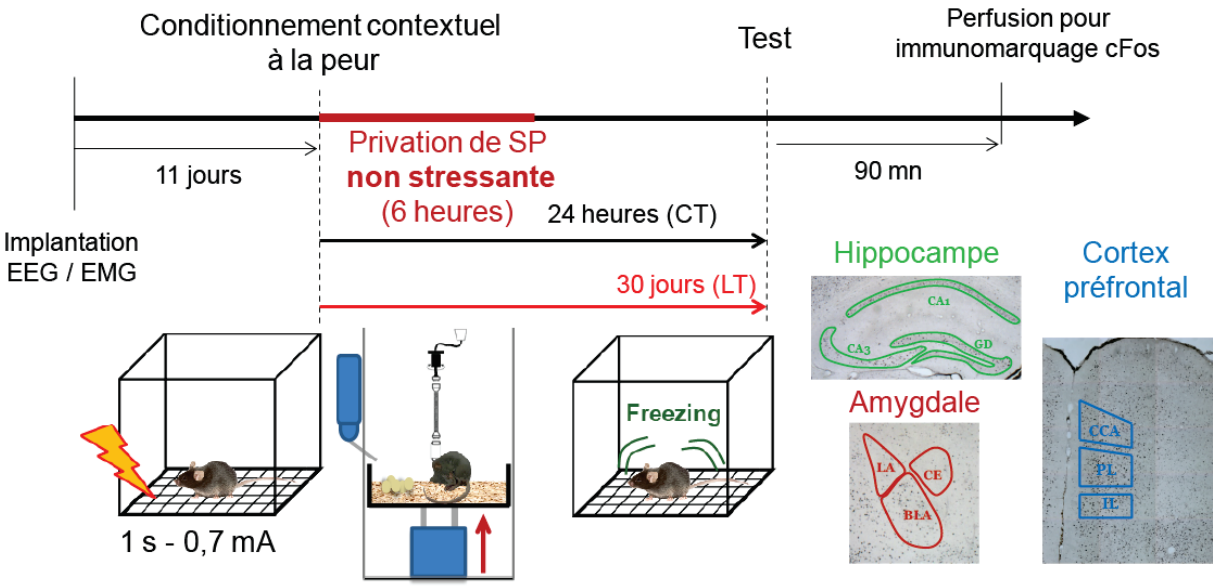


Figure. 1. Déroulement du protocole expérimental. Après implantation des électrodes d'EEG/EMG, on laisse aux animaux une semaine de récupération avant de les placer dans les caissons d'enregistrements. On les y laisse 4 jours afin de leur permettre de s'habituer à leur nouvel environnement et d'enregistrer leur activité EEG/EMG basale. Ils sont ensuite conditionnés, puis remis en caisson d'enregistrement pendant 24h. Les animaux PSP sont alors privés de SP pendant 6h après l'apprentissage. On teste ensuite les animaux, soit 24h après l'acquisition (groupe CT), soit 30 jours après (groupe LT). 90mn après le rappel, on perfuse les animaux pour réaliser l'immunomarquage du marqueur indirect d'activité c-Fos dans l'hippocampe, l'amygdale et le cortex préfrontal.

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux et procédures chirurgicales

Afin d'enregistrer en continu les états de vigilance (enregistrements polysomnographiques), nous avons implanté des électrodes d'EEG et d'EMG sur n = 80 souris mâles C57BL/6J (Charles River) âgées d'environ 11 semaines. Les animaux, dès leur réception, sont hébergés en conditions standard : température maintenue à 22°C, cycle jour/nuit constant de 12h/12h et accès *ad libitum* à la nourriture et l'eau. Une période de stabulation de 4 à 5 jours permet aux souris de s'habituer à leur nouvel environnement. On réalise ensuite la chirurgie d'implantation des électrodes sur une table de chirurgie désinfectée et à l'aide de matériel stérilisé. Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale (i.p.) d'une association d'anesthésiques : 1 mL/kg de kétamine (Virbac Santé Animal, France) et 0,5 mL/kg de xylazine (Bayer, Allemagne). On rase ensuite sa tête de à l'aide d'une tondeuse avant de le placer dans un appareil de contention stéréotaxique (David Kopf Instruments) dans lequel il a la tête maintenue immobile par une paire de barres d'oreille et une barre de gueule. On réalise alors des trépanations avec une fraise de 0,3 mm de diamètre pour y insérer les électrodes. Les électrodes d'EEG sont des vis en acier inoxydables et les électrodes d'EMG sont constituées de fils terminés par une sphère d'étain recouverte de cyanure d'or afin d'améliorer la

conductivité. On implante une électrode d'EEG pariétale (depuis le Bregma en mm : AP – 2 ; L + 1,5), une électrode d'EEG frontale (depuis le Bregma en mm : AP + 2 ; L – 1), une électrode de référence médiane au niveau du cervelet (depuis le Bregma en mm : AP – 6 ; L = 0), et deux électrodes d'EMG dans les muscles de la nuque. Les électrodes sont ensuite solidarisées au crâne par de la résine dentaire (Super-Bond c&B, Sun Medical) puis elles sont reliées à un connecteur. L'ensemble de la construction est recouverte par une prothèse lisse de ciment dentaire (Paladur, Heraeus Kuzler). A l'issue de la chirurgie, les animaux sont placés dans une cage individuelle et reçoivent un complément alimentaire enrichi. On surveille leur récupération post-opératoire en pesant les animaux tous les jours et en surveillant la cicatrisation autour de l'implant. Pendant cette période d'une semaine, on habitue aussi les animaux au contact de l'expérimentateur, en les manipulant chaque jour pendant 10 à 15mn.

Nous avons ensuite séparé les animaux en 8 groupes différents. 4 groupes contrôles et 4 groupes test. Nos groupes test sont divisés en deux principaux groupes : le groupe court-terme (CT, n = 24) testé 24h après encodage et le groupe long terme (LT, n = 24) testé 30 jours après. Eux-mêmes sont divisés en deux sous-groupes chacun, les animaux privés de SP (PSP, n = 12) et les animaux non privés de SP (CTRL, n = 12). En ce qui concerne les groupes contrôles (différents des CTRL, n = 32), les animaux sont placés dans la boîte où on réalise le conditionnement contextuel à la peur mais sans recevoir de choc électrique afin de déterminer l'influence d'une simple exposition au contexte sur l'expression de *c-fos* et déterminer l'expression basale de *c-fos* qui nous permettra d'évaluer ensuite par comparaison les modifications de l'expression de *c-fos* induite par le rappel à court et long terme. Ces groupes sont divisés de la même manière que les groupes tests (pour les lesquels les souris ont reçu un choc électrique) (**Fig. 1**).Nous ne présentons ici que les résultats des groupes tests obtenus avec CT-PSD : n = 8, CT-CTRL : n = 7, LT-PSD : n = 8 et LT-CTRL : n = 7.

2.2. Enregistrements polysomnographiques

Au bout de la période de récupération, les animaux sont habitués aux conditions d'enregistrement. Pour cela, les animaux placés dans un baril en plexiglas, sont branchés dans un caisson d'enregistrement ventilé, insonorisé et isolé électriquement. On enregistre leurs états de vigilance pendant 4 jours avant de réaliser le conditionnement contextuel à la peur Les enregistrements du dernier jour sont utilisés comme condition basale d'enregistrement pour les analyses de sommeil ultérieures. Aussitôt après l'acquisition de la tâche de conditionnement, les animaux sont remis en caisson d'enregistrement pour 24h.

Dans le caisson d'enregistrement, le connecteur implanté sur la tête de la souris est relié au dispositif d'enregistrement par un câble électrique suspendu qui lui permet de se mouvoir librement dans le baril. Les signaux EEG et EMG sont amplifiés 500 fois (MCP Plus, Alpha-Omega Engineering, Israël), numérisés (fréquence d'acquisition de 512Hz) par un convertisseur CED 1401 (Cambridge Electronic Design) et enregistrés avec le logiciel Spike2 (Cambridge Electronic Design) grâce à des scripts développés au sein du laboratoire. Les enregistrements EEG et EMG filtrés et centrés (filtre passe-bas <100Hz, composante continue supprimée), sont ensuite analysés sous Spike2 par une lecture séquentielle du tracé, en attribuant à chaque période d'analyse de 5 secondes, un des trois états de vigilance (éveil, SL ou SP). L'analyse spectrale des signaux EEG frontal et pariétal ainsi que l'examen du tonus musculaire mesuré par les EMG nous ont permis d'identifier des critères physiologiques définis précédemment pour discriminer ces différents états de vigilance :

Eveil : EEG de faible amplitude et activé ou "désynchronisé". Des activités de hautes fréquences (40Hz) et des ondes thêta (5-9Hz) sont présentes. L'EMG varie suivant l'activité motrice de la souris. Pendant l'éveil actif, l'activité musculaire est ample et tonique avec de nombreux événements phasiques pendant les pics d'activité. Pendant l'éveil calme, le tonus musculaire est plus faible avec de rares secousses.

SL : EEG de forte amplitude et présentant des oscillations très lentes (ondes delta: 0,5-4Hz et fuseaux: 10-14Hz). Il est "synchronisé". L'activité musculaire est faible et sans bouffée phasique.

SP : EEG "désynchronisé", rapide et de faible amplitude, similaire à celui de l'éveil. L'activité de rythme thêta est très marquée. L'EMG monte une atonie musculaire ponctuée parfois de brèves bouffées phasiques (*twitches*).

A l'issue de cette analyse, on obtient un hypnogramme représentant l'enchaînement des différents états de vigilance en fonction du temps. Son étude permet d'extraire la durée passée dans chacun des états de vigilance, leurs proportions relatives ainsi que le nombre et la durée des épisodes. Néanmoins, certaines périodes demeurent difficiles à discriminer notamment en raison de la présence d'artefacts et de bruit électrique. La fiabilité de l'analyse dépend donc beaucoup de la qualité des signaux.

2.3. Méthode de privation de SP

La plupart des techniques de privation de SP utilisées chez le rongeur, à l'image de la technique du "pot de fleur inversé", sont stressantes. Pour cette méthode, on place l'animal sur une ou plusieurs plateformes disposées dans un baril rempli d'eau. Celles-ci sont juste suffisamment étroites, pour que l'animal doive en permanence maintenir un certain tonus musculaire pour y rester. Lors de l'atonie musculaire du SP, les animaux chutent donc de la plateforme et tombent dans l'eau. Des travaux du laboratoire ont montré une très forte augmentation des taux de corticostérones plasmatiques après une privation de SP par cette méthode (S. Arthaud, résultats non publiés). Or, le stress est un important modulateur de la consolidation mnésique ce qui a conduit certains auteurs à contester les résultats obtenus avec de telles méthodes de privation et donc de contester le rôle facilitateur du SP (Siegel, 2001).

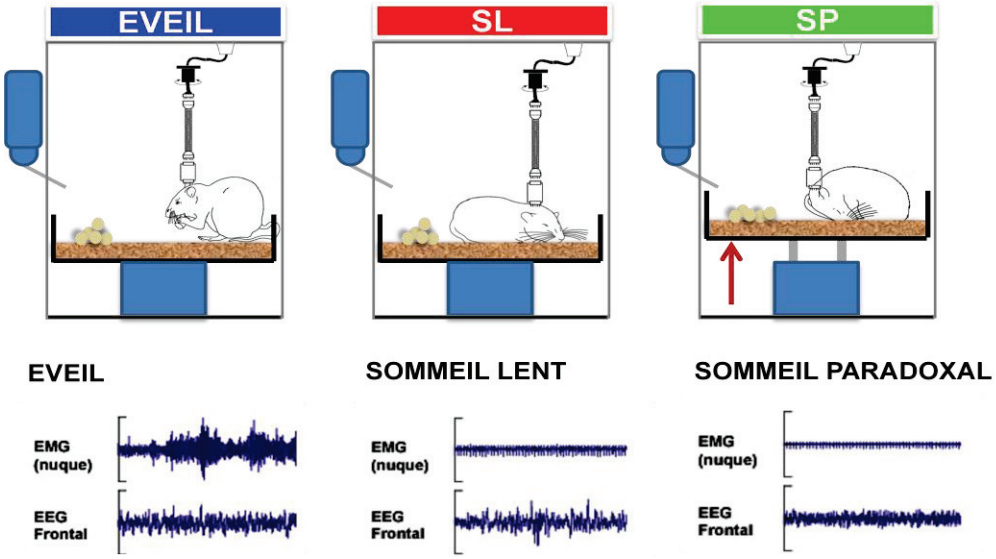


Figure 2. Principe de la méthode automatique et non stressante de SP utilisée dans le cadre de l'étude. Quand un épisode de SP est détecté par le logiciel, un signal TTL est envoyé au stimulateur sui active un électroaimant responsable d'une secousse du plancher du baril de privation.

Nous avons donc réalisé notre privation de SP grâce à une technique de privation automatique développée au laboratoire (Chauveau et al., 2014). Elle repose sur une analyse en direct des signaux EEG et EMG. Pour faire cela, cinq paramètres discriminants calculés à partir des EEG pariétal et frontal et de l'EMG sont comparés en temps réel à des valeurs caractéristiques de ces paramètres. Ces dernières sont calculées à partir de l'attribution manuelle des états de vigilance sur un enregistrement du même animal en condition basale. Le logiciel d'analyse (Spike2) peut alors déterminer à chaque instant une probabilité d'appartenance à chaque état de vigilance et lui attribuer l'état de vigilance pour lequel la probabilité est la plus haute. Lorsqu'un épisode de SP est détecté, un signal TTL (*Transistor-Transistor Logic*) est envoyé à un stimulateur qui, via un électroaimant, entraîne une secousse du sol du baril de la souris

afin de la réveiller (**Fig. 2**). Cette technique est beaucoup moins aversive que la technique classique du "pot de fleur inversé car l'animal reste dans un environnement connu et non aversif pendant la privation. De plus, par rapport à d'autres méthodes de privation "douce" de SP, elle ne nécessite pas la présence de l'expérimentateur. Ces deux facteurs diminuent grandement le stress engendré par la privation. D'ailleurs, les taux de corticostérones présents dans le sang des souris ainsi privées ne diffèrent pas de ceux des souris contrôles (données non publiées de S. Arthaud).

2.4. Conditionnement contextuel à la peur

Le conditionnement et le test sont effectués dans une même cage de conditionnement standard (Saxe et al., 2006). Tout en plexiglas, elle est carrée (25 x 25 x35 cm) et son plancher est constitué d'une grille en acier inoxydable. Des indices distaux et proximaux sont disposés tout autour de la cage afin de créer un contexte particulier identifiable par la souris. L'éclairage est assuré grâce à une lampe halogène. Avant et après le passage de chaque animal, les parois et la grille sont nettoyées à l'éthanol 70% afin de saturer le contexte en indices olfactifs. Une caméra vidéo (PointGrey Firefly MV) placée sur le côté de la cage, permet l'analyse comportementale en direct ou en différé des différentes phases du conditionnement. Les vidéos ainsi acquises (résolution 640 x 480 pixels, 15 images/seconde) sont transmises au logiciel FearFactor développé au laboratoire par Paul-Antoine Libourel. Ce logiciel détermine la quantité de mouvements dans l'image en calculant la différence entre deux images successives. La somme des pixels ayant changé de valeur entre deux images, constitue une mesure de l'actimétrie. L'actimétrie permet d'évaluer la quantité d'immobilité effectuée par l'animal et donc d'étudier le comportement d'immobilisation (*freezing*). Ce paramètre est la réponse comportementale de peur la plus utilisée chez le rongeur pour quantifier le degré de conditionnement à la peur, et donc la performance dans la tâche d'apprentissage. Pour mesurer le temps d'immobilité, nous avons fixé au préalable un seuil de mouvement (60 pixels) en dessous duquel tout comportement sera considéré comme de l'immobilité. Tous les résultats sont calculés automatiquement par le logiciel et sortis au format Excel.

Peu avant 8h, le jour de l'acquisition, les animaux sont sortis de leur caisson d'enregistrement et mis pendant environ 5 minutes dans une cage de transfert opaque. Puis ils sont placés dans la cage de conditionnement. Après 4 minutes d'exploration, ils reçoivent un seul choc électrique (0,7 mA, 1 s) délivré dans la grille par une unité isolée de stimulation (WPI). Les animaux sont ensuite laissés 2 minutes supplémentaires dans la cage, puis remis en caisson

d'enregistrement pendant 24 heures. Chaque jour, un animal du groupe privé de SP (PSP) et un animal du groupe non privé (CTRL) sont conditionnés. L'ordre de passage des animaux est pseudo-randomisé afin d'éviter un éventuel biais. Le jour du rappel, les animaux suivent la même procédure, mais ne reçoivent pas de choc pendant 6 minutes. L'ordre de passage des animaux reste le même entre la session d'acquisition et celle du test. Les animaux sont testés à 24h (groupe Court terme (CT)) ou à 30 jours (groupe Long Terme (LT)) après encodage.

2.5. Neuroanatomie fonctionnelle

Pour ce projet, nous avons choisi d'étudier l'expression du gène d'expression précoce *c-fos*. Comme nous l'avons vu, l'induction de plasticité à long terme induit l'activation de voies de signalisation intracellulaires aboutissant à l'expression de facteurs de transcription, dont le gène *c-fos* qui permettent la transcription de nombreux autres gènes codant pour diverses protéines (AMPAR, protéines du cytosquelette, enzymes de synthèse des neurotransmetteurs, etc.) qui permettent le maintien de cette plasticité. Le gène *c-fos* est donc utilisé comme marqueur d'activité neuronal. En effet, la stimulation d'un neurone entraine la surexpression de l'ARNm de *c-fos* dont le pic est observé environ 30 min après le stimulus alors que le pic d'expression de la protéine est observé entre 90 et 120 min après le stimulus (Kovács, 2008). De nombreuses études chez le rongeur ont montré qu'un apprentissage (acquisition et rappel) notamment un conditionnement contextuel à la peur, est suffisant pour induire l'expression de *c-fos* (Frankland et al., 2004 ; Milanovic et al., 1998 ; Radulovic et al., 1998 ; Vann et al., 2000a, 2000b). De plus, des études en électrophysiologie *in vivo* ont montré que l'activation des neurones par un apprentissage suffit à l'expression de *c-fos* et correspond à une augmentation de leur taux de décharge (Clem et Barth, 2006 ; Yassin et al., 2010) Sa détection aisée grâce à l'immunohistochimie, permet l'analyse exhaustive et comparative de l'ensemble de l'encéphale et donc d'identifier les structures impliquées dans le rappel à court et long terme d'un conditionnement contextuel à la peur.

2.5.1. Perfusion et coupe des cerveaux

90 minutes après la fin du rappel de la tâche de conditionnement contextuel à la peur (correspondant au pic d'expression de la protéine c-Fos – voir ci-dessus), les animaux sont anesthésiés par une injection létale de pentobarbital sodique (CEVA Santé animale). Après ouverture du thorax pour dégager le cœur, une aiguille de perfusion est introduite dans le ventricule gauche tandis que l'oreillette droite est incisée pour laisser s'écouler le sang. La souris est alors perfusée successivement avec 100 mL de Ringer-lactate hépariné (1 mL/L)

frais, puis avec 150 mL d'une solution de fixation froide préparée extemporanément et composée de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans 0,1M de tampon phosphate (PB) à pH 7,4. Le cerveau est alors prélevé et conservé 24 heures dans la solution de perfusion (PFA 4%) avant d'être transféré dans une solution cryoprotectrice de sucrose dilué à 30% dans du PB 0,1M qui sera conservée à 4°C jusqu'à sa congélation. Immédiatement avant la congélation, une légère entaille est effectuée au scalpel sur la partie ventrale de l'hémisphère gauche, afin de localiser ultérieurement les hémisphères droit et gauche sur les coupes histologiques. Le cerveau est ensuite congelé en étant plongé dans du 2-méthylbutane à -50°C. On réalise les coupes histologiques en débitant le cerveau en sections coronales de 30 µm d'épaisseur à -20°C à l'aide d'un cryostat (Leica). Les coupes sont recueillies dans une solution de tampon phosphate 0,1M composée de NaCl 9‰ et de triton X-100 3‰ (PBST) et contenant 0,3% d' H_2O_2 puis agitées pendant 1 heure. Cette étape permet de détruire les peroxydases endogènes contenues dans les hématies résiduelles qui pourraient être à l'origine d'un marquage aspécifique. Les coupes sont ensuite stockées à 4°C dans du PBST-AZIDE. L'azide est un antifongique et bactéricide qui permet la conservation des coupes à long terme.

2.5.2. Protocole d'immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique qui permet de localiser *in situ* un antigène d'intérêt. Pour cela, on incube le tissu cible en présence d'un anticorps, qui va se fixer spécifiquement sur l'antigène d'intérêt (ici, la protéine c-Fos). La présence de l'anticorps est ensuite révélée par une réaction chimique. Ici nous avons utilisé une réaction enzymatique d'oxydo-réduction qui conduit à la formation d'un précipité coloré repérable en microscopie optique. L'immunohistochimie est dite "directe" si le marqueur est directement fixé sur l'anticorps primaire. Nous avons, quant à nous, utilisé une méthode "indirecte" mettant en jeu un anticorps secondaire biotinylé et une réaction d'affinité entre deux composés protéiques, l'avidine (A) et la biotine (B). Cette technique permet d'amplifier l'intensité du signal immunologique puisque plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer sur les anticorps primaires contre lesquels ils sont dirigés, et que la réaction d'affinité aboutie à la formation d'un complexe enzymatique (ABC) qui s'agglomère autour de l'échafaudage d'anticorps. C'est ce dernier qui est révélé en réalisant une réaction d'oxydo-réduction entre la peroxydase de raifort (HRP, "Horse Radish Peroxydase") contenue dans le complexe ABC et son substrat, l'H_2O_2, ajouté au moment de la réaction en présence de 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB). La DAB est alors réduite en un composé insoluble et coloré qui précipite autour de l'échafaudage immunoprotéique. Ce marquage, très stable dans le temps,

est idéal pour l'étude de nombreuses structures et/ou de nombreux animaux comme c'est notre cas. (**Fig. 3**)

Les coupes de la totalité des animaux des 4 groupes sont révélées le même jour en une seule réaction immunohistochimique afin d'éviter tout biais introduits par des variations des temps de réactions/rinçage ou de températures dans la pièce.

Les coupes histologiques sont soumises à un traitement séquentiel consistant en une série de bains d'incubation successifs sous agitation contenant les réactifs précédemment décrits :

- Rinçage des coupes sont 2 fois 10 mn dans du PBST.
- Incubation 3 jours à 4°C et sous agitation constante en présence de l'anticorps primaire (anticorps monoclonal de lapin anti-cFos; cs-52, Santa Cruz Biotechnology) dilué au 1 : 2000 dans du PBST AZIDE contenant 2% de sérum albumine bovine (BSA). La BSA permet de saturer les sites de liaison aspécifique de l'anticorps, et de limiter ainsi le marquage aspécifique.
- Rinçage de 3 fois 10 mn dans du PBST pour éliminer les anticorps non fixés.
- Incubation de 2 heures à 4°C sous agitation en présence de l'anticorps secondaire (anticorps polyclonal biotinylé de chèvre anti-lapin) dilué au 1 : 1000 dans du PBST contenant 2% de BSA.
- Rinçage de 3 fois 10min dans du PBST pour éliminer les anticorps non fixés
- Incubation 2 heures à 4°C sous agitation dans une solution de complexe ABC-HRP (Elite kit, Vector Laboratories) diluée au 1 : 2000 dans du PBST et préparée 30 mn à l'avance. Préparer la solution d'ABC 30 minutes à l'avance permet la formation de suffisamment de complexes avidine-biotine, tout en laissant des sites de biotine libres pour permettre la fixation à l'anticorps secondaire.
- Rinçage de 3 fois 10 mn dans du PBST pour éliminer l'ABC en excès.
- Incubation dans le réactif de révélation composé de Tris-HCl 0.05M, pH 7.6 contenant 10mg/mL de DAB, 5 mg/mL de nickel et 0,003% de H_2O_2. La montée de la réaction est contrôlée sous microscope et stoppée lorsque le rapport signal/bruit est optimal (10 à 15 mn). L'ajout de nickel permet d'augmenter la coloration du précipité assurant ainsi une meilleure analyse du marquage par la suite

- Pour mettre fin à la réaction, quand le marquage est optimal, les coupes sont rincées 3 fois 10 mn dans du PBST-AZIDE
- Conservation à 4°C avant montage sur lames dans du Depex.

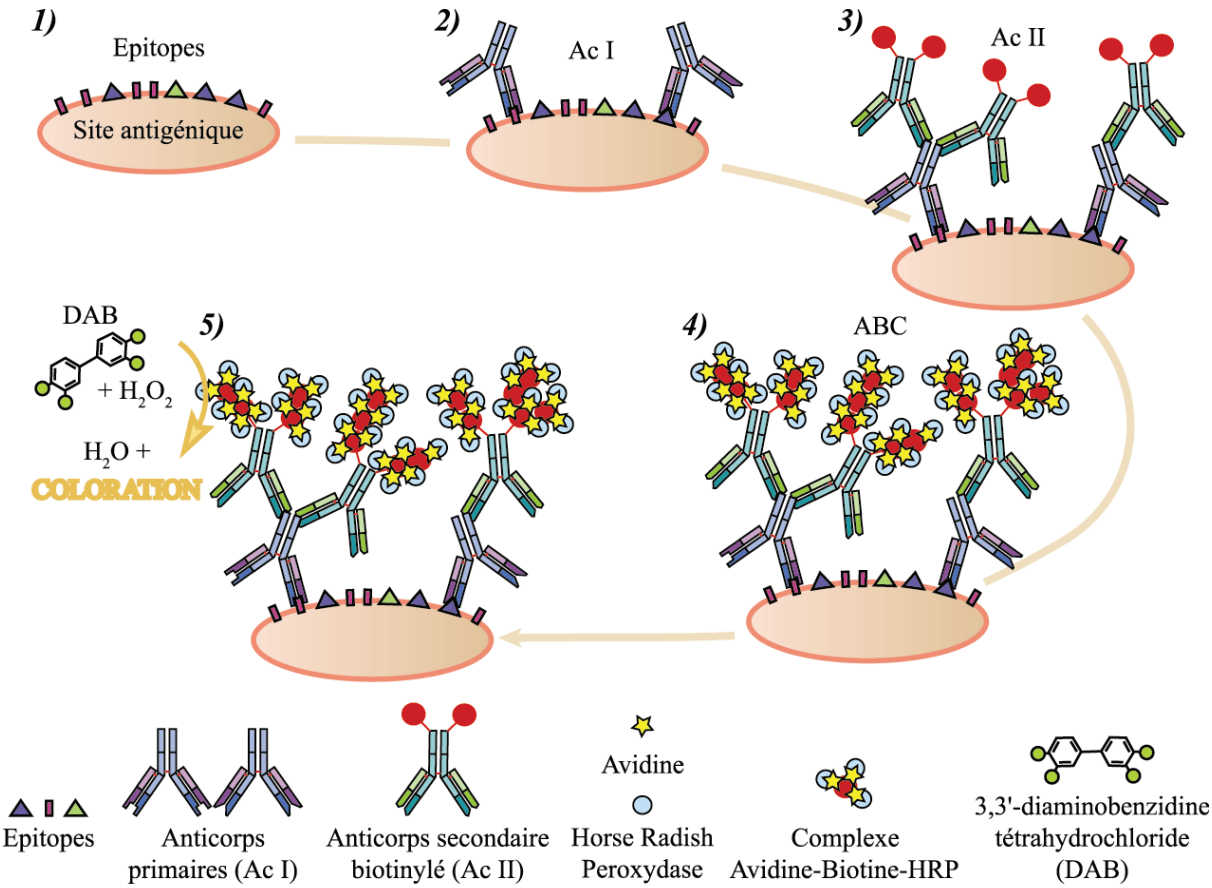


Figure 3. Principe du marquage immunohistochimique avec DAB. Certains des épitopes présents à la surface de l'antigène d'intérêt **(1)** sont reconnus spécifiquement par l'anticorps primaire **(2)** L'anticorps secondaire biotinylé et dirigé contre l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit, se fixe sur ce dernier. **(3)** Le couplage entre biotine, avidine et HRP forme un complexe enzymatique ABC.qui s'agglomère autour des anticorps **(4)** La présence de ce complexe est révélée par la réaction d'oxydo-réduction entre HRP et peroxyde d'hydrogène qui permet l'oxydation de la DAB en un précipité coloré **(5).** (D'après Ravassard, 2009)

2.5.3. Quantification du marquage immunohistochimique

L'analyse quantitative de la densité de cellules c-Fos positives par structure a été réalisée à l'aide d'un système d'analyse Mercator ® (Explora Nova, France), couplé à un microscope Zeiss dont la platine est motorisée en X et en Y. Les contours des structures sont tracés au grossissement x10 et la quantification est effectuée par un comptage automatique des neurones marqués c-Fos en utilisant un objectif de grossissement x20. Le seuil de détection est fixée de manière à prendre en compte uniquement les neurones exprimant fortement c-Fos (noyaux noirs intenses), on élimine ainsi les neurones faiblement marqués (« fantômes ») et les particules noires non spécifiques (de taille inférieure ou supérieure aux noyaux). Les

neurones détectés par cette analyse sont dits Fos+. Le nombre de neurones Fos+ est ensuite divisé par la surface des structures dessinées afin d'obtenir une valeur de densité en nombre de cellules/µm². Quatre coupes par animal sont analysées pour chaque structure et on étudie toujours les structures dans le même hémisphère. Les résultats présentés ici correspondent à un comptage qui n'a été réalisé que sur une partie des groupes tests.

2.6. Analyse des données

Les données comportementales ont été analysées via des tests non paramétriques : test de Wilcoxon pour l'analyse de l'évolution de la quantité d'immobilité au sein d'un groupe, et test de Mann-Whitney pour l'analyse de la différence de quantité d'immobilité entre les groupes. Le test de Mann-Whitney a aussi été utilisé pour évaluer les différences de densités de marquage c-Fos entre les groupes. Ces tests ont été réalisés à l'aide du logiciel OriginPro8 (OriginLab). Ces données sont exprimées sous forme de moyenne ± SEM. Les analyses de corrélations ainsi que les figures ont été réalisées à l'aide du logiciel OriginPro8. La corrélation de Spearman a été utilisée pour l'analyse des corrélations entre densité de marquage, quantité de sommeil et quantité d'immobilité. Les corrélations et les différences sont considérées significatives lorsque $p < 0,05$.

Nous avons évalué l'interaction entre les différentes structures, que nous considérons comme un indicateur indirect de leur connectivité fonctionnelle, en calculant les corrélations entre les densités des neurones marqués c-Fos dans ces structures (Poirier et al., 2008 ; Wheeler et al., 2013). Ces mesures de corrélation sont proches de techniques statistiques utilisées pour étudier la covariance d'activité entre structures notamment en IRM fonctionnelle (*Structural equation modeling)* La corrélation positive ou négative de l'activité de deux structures cérébrales suggère un lien de dépendance entre celles-ci au cours d'une tâche comportementale. A l'issue de ces analyses, nous avons obtenu des matrices de corrélation permettant de caractériser un réseau de structures impliquées au rappel dans nos différents groupes.

3. Résultats

La privation de SP est spécifique et efficace.

Le groupe de souris Court Terme (CT) (n = 15), testées 24h après le conditionnement contextuel à la peur comme le groupe de souris Long Terme (LT) (n = 15), testées 30 jours

après conditionnement sont divisés en deux sous-groupes. On prive les souris PSP de SP avec une méthode automatique pendant 6 heures à la suite l'apprentissage tandis qu'on ne perturbe pas le sommeil des souris contrôles ou CTRL. L'enregistrement des signaux EEG et EMG a permis de quantifier les états de vigilance pendant ces 6h de privation. La privation automatique et non stressante assure une privation efficace de SP puisqu'on observe une diminution significative des quantités de SP chez les animaux PSP du groupe CT ($p < 0.001$) comme du groupe LT ($p < 0.001$) par rapport aux animaux CTRL. Les animaux CT-PSP ($n = 8$) et LT-PSP ($n = 8$) font 0,4 ± 0.1 % et 0,3 ± 0.1 % de SP respectivement alors que les animaux CT-PSP ($n = 7$) et LT-PSP ($n = 7$) passent respectivement 6,2 ± 0,7 % et 5,1 ± 0,7 % du temps en SP (**Fig. 4**).

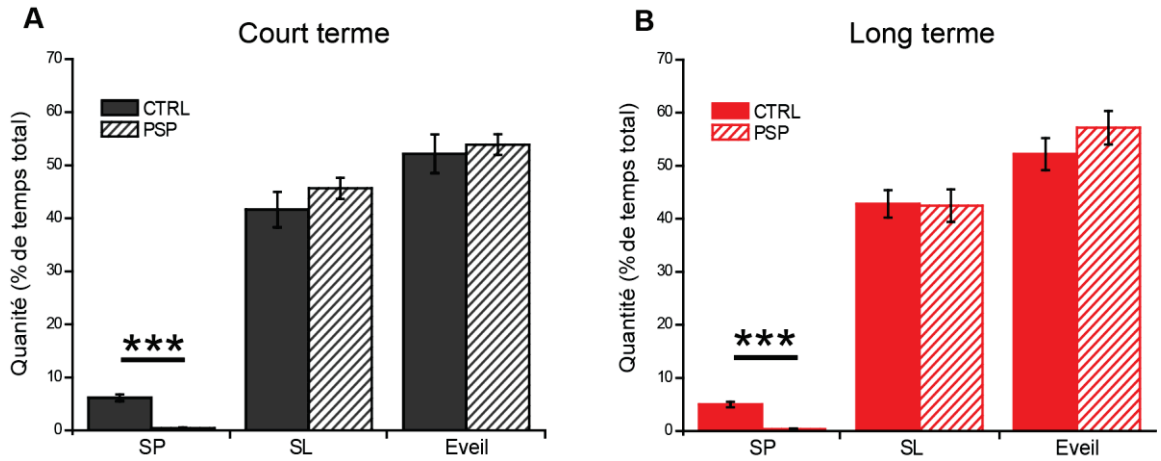


Figure 4. La privation de SP est efficace et sélective. Pourcentage de temps passé dans chaque état de vigilance au cours des 6 heures de privation (8h30 à 14h30) chez les animaux testés à court terme **(A)** et à long terme **(B).** Il y a une forte diminution des quantités de SP dans les groupes privés (PSP) par rapport aux groupes contrôles (CTRL) qui n'engendre pas de modification significative des quantités de SL ou d'éveil. *** *$p < 0,001$*

De plus, cette privation de SP est sélective. En effet, il n'y a pas de différence entre les quantités d'éveil et de SL dans les groupes privés de SP (CT-PSP et LT-PSP) par rapport aux groupes contrôles (CT-CTRL et LT-CTRL). La privation de SP ne modifie donc pas les quantités de SL (**Fig. 4**).

La privation de SP diminue uniquement les performances lors du rappel à long terme

Après le conditionnement à la peur, suivi ou non de privation de SP, on effectue un rappel à court terme (groupe CT, 24h) ou à long terme (groupe LT, 30 jours) dans le même contexte. Les performances des animaux sont quantifiées en évaluant leur taux d'immobilité au cours des différentes sessions de comportement.

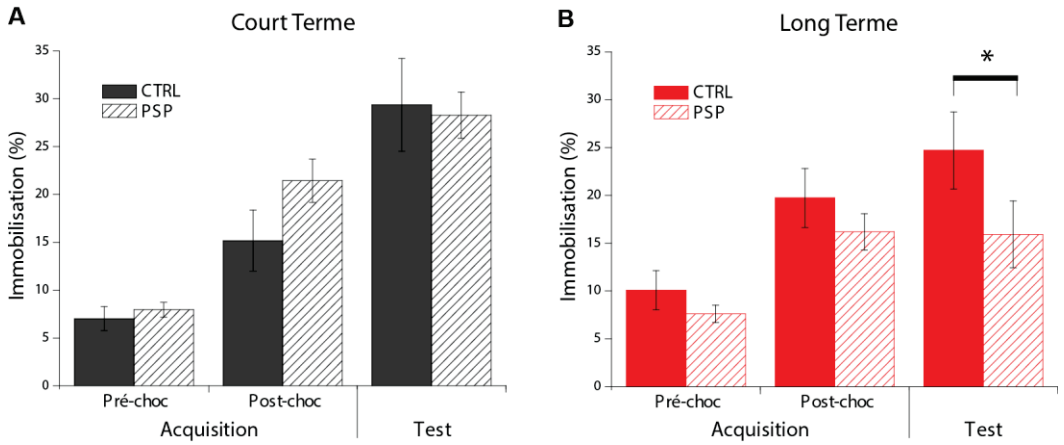


Figure 4. La privation de SP altère sélectivement la consolidation à long terme d'un conditionnement contextuel à la peur. Quantités d'immobilisation observée lors de l'acquisition, avant (pré-choc) et après le choc (post-choc) pour les animaux CT **(A)** et les animaux LT **(B).**On observe une diminution significative du taux d'immobilité lors du test chez les animaux LT-PSD par rapport aux contrôles. * *p < 0,05*

Tout d'abord, notons que les souris des quatre groupes acquièrent correctement la tâche de conditionnement contextuel à la peur. En effet, elles montrent toutes une augmentation significative des quantités d'immobilité après avoir reçu le choc (Post-choc) par rapport à le période pré-choc (**Fig. 4**). Dans le groupe CT, on observe une augmentation similaire des quantités d'immobilité lors du rappel chez les animaux privés et contrôles par rapport au post-choc (CT-CTRL, + 15 ± 5 %, p = 0,031 ; CT-PSD, + 7 ± 3 %, p = 0.,031, pas de différences statistiques entre les groupes) (**Fig. 4A**). La privation de 6h de SP post-apprentissage n'altère donc pas les performances des animaux lors d'un rappel à 24h.

Au contraire, dans le groupe LT, les animaux PSP font moins d'immobilisation que les animaux CTRL lors du rappel à 30 jours (**Fig. 4B**, LT-CTRL : 24 ± 4 % ; LT-PSP : 14 ± 2 %, p = 0,031). De plus, leur taux d'immobilisation au rappel n'est pas différent de celui mesuré au post-choc (**Fig. 4B**, p=0,945) alors que les animaux LT-CTRL montrent bien une augmentation des quantités d'immobilisation entre le rappel et le post-choc (+ 7 ± 2 %, p = 0.016). La privation de 6h de SP semble donc affecter sélectivement les performances des souris lors d'un rappel à long terme.

Enfin, il n'y a pas de différence significative entre les quantités d'immobilité présentées par les animaux CT et LT au sein du groupe CTRL.

La densité de neurones Fos+ est augmentée dans le réseau hippocampo-cortico-amygdalien au cours de la consolidation.

Le réseau hippocampo-amygalien est engagé lors de l'acquisition et la consolidation du conditionnement contextuel à la peur. Nous avons donc cherché à caractériser la modulation de son activité au cours du temps et si le SP pourrait la modifier. Pour cela nous avons réalisé un marquage c-Fos dans les régions GD, CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal, BLA, LA et CeA de l'amygdale et CCA, PL et IL du mPFC.

Dans l'hippocampe, nous n'observons aucune différence significative de densité de neurones Fos+ dans CA3 et le GD entre les animaux CT et LT, qu'ils soient privés ou non (**Fig. 5**). Toutefois, il y a une augmentation de la densité de neurones pyramidaux Fos+ dans CA1 chez les animaux LT-PSP par rapport aux animaux CT-PSP ($p = 0,018$) qui est absente (non significative) chez les animaux CTRL ($p = 0,307$). Ces résultats suggèrent ainsi que la privation de SP post-apprentissage entraînerait une augmentation de l'activité de l'aire CA1 de l'hippocampe dorsal au rappel à long terme.

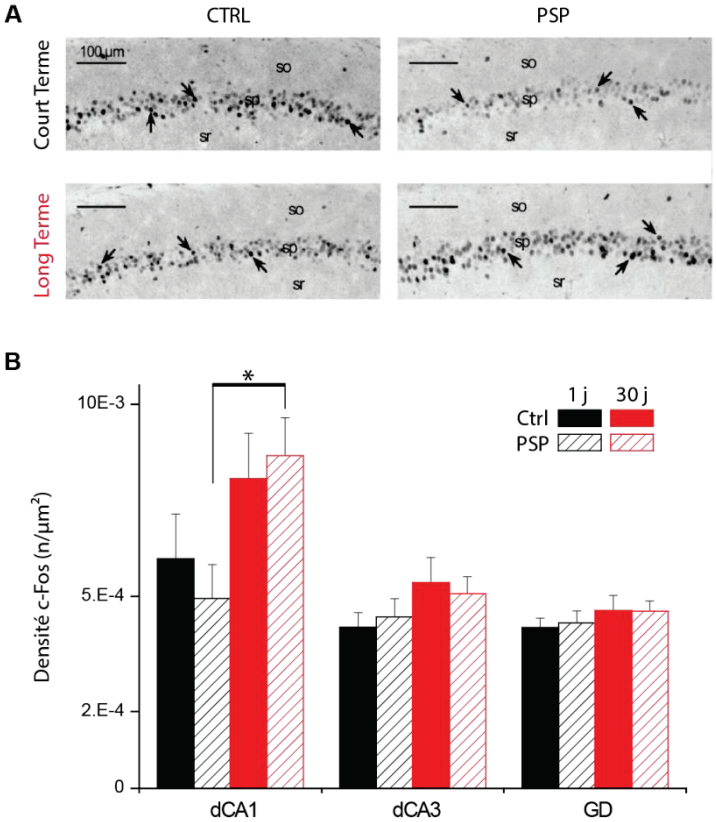


Figure 5. Augmentation de l'activité de l'aire CA1 de l'hippocampe dorsal au cours du temps chez les animaux privés.de SP. (A) Microphotographies représentatives de la région CA1 de l'hippocampe après révélation de la protéine c-Fos pour chaque groupe. Les flèches indiquent des neurones marqués et comptés comme Fos+. *so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum.* **(B)** Histogramme représentant la densité de neurones Fos+ par µm² dans les régions CA1, CA3 et GD de l'hippocampe dorsal. Il y a une augmentation significative de la densité de marquage dans la région CA1 chez les animaux LT-PSP par rapport aux animaux CT-PSP. **: $p < 0,05$*

Dans l'amygdale, nous observons une augmentation de la densité de neurones Fos+ chez les animaux LT-PSP et LT-CTRL par rapport aux animaux CT-PSP et CT-CTRL respectivement dans la BLA (**Fig. 6** ; LT-PSP et CT-PSP, $p < 0,001$ et LT-CTRL et CT-CTRL, $p = 0,021$) et la CeA (LT-PSP et CT-PSP, $p = 0,018$ et LT-CTRL et CT-CTRL, $p = 0,03$). En revanche, aucune différence significative n'est observée dans la LA entre les groupes CT et LT.

Ces résultats suggèrent une augmentation de l'activité amygdalienne (BLA et CeA) au rappel à long terme indépendamment du SP post-apprentissage.

Au cours de la consolidation à long terme, les souvenirs deviendraient progressivement indépendants du réseau hippocampo-amygdalien et seraient graduellement transférés dans des circuits néocorticaux pour y être stockés. Cette réorganisation régionale impliqueraient notamment le recrutement du cortex préfrontal médian (mPFC). Chez le rongeur, on considère que le mPFC est composé de trois régions principales l'infralimbique (IF), le prélimbique (PF) et le cortex cingulaire antérieur (CCA) impliquées dans des fonctions

cognitives (Vertes, 2006). Nous avons donc étudié l'éventuelle modulation de l'activité de ces trois régions au cours du temps et par la privation de SP.

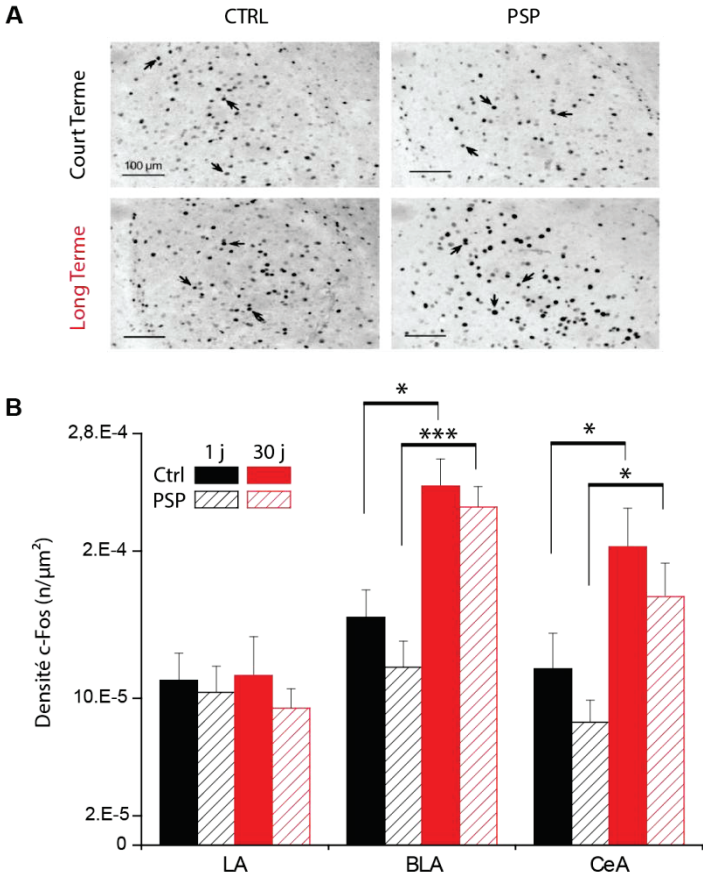


Figure 6. Augmentation de l'activité amygdalienne au cours du temps indépendamment du SP post-apprentissage. (A) Micrographies représentatives du noyau BLA de l'amygdale après révélation de la protéine c-Fos pour chaque groupe. Les flèches indiquent des neurones marqués et comptés comme Fos+. **(B)** Histogramme représentant la densité de neurones Fos+ par µm² dans les noyaux LA, BLA et CeA de l'amygdale. On observe une augmentation significative de la densité de marquage dans les noyaux BLA et CeA chez les animaux LT-CTRL et LT-PSP par rapport aux animaux CT-CTRL et CT-PSP respectivement. **: $p < 0,05$ ***: $p < 0.001$*

Nous observons une augmentation de la densité de neurones Fos+ chez les animaux LT-PSP et LT-CTRL par rapport aux animaux CT-PSP et CT-CTRL respectivement pour le PL (**Fig. 7**, LT-PSP et CT-PSP, p = 0,024 et LT-CTRL et CT-CTRL, p = 0,002) et l'IL (**Fig. 7,** LT-PSP et CT-PSP, p = 0,01 et LT-CTRL et CT-CTRL, p = 0,007). En revanche, aucune différence significative n'est observée dans le CCA entre les groupes CT et LT.

Ces résultats suggèrent une augmentation de l'activité du mPFC (PL et IL) au rappel à long terme indépendamment du SP post-apprentissage.

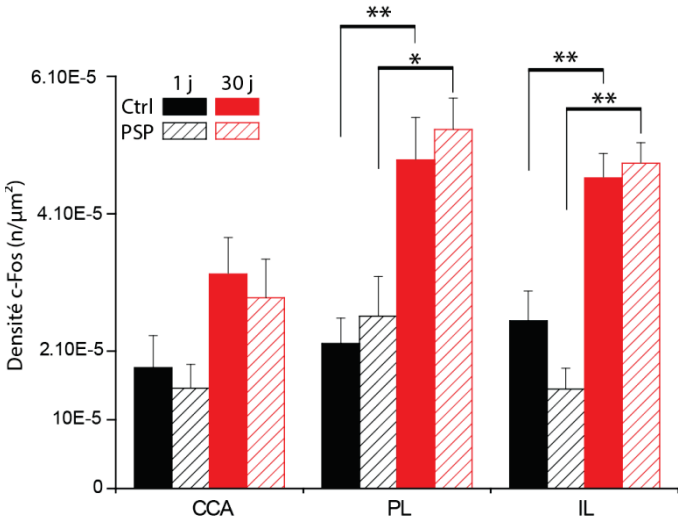


Figure 7. Augmentation de l'activité du mPFC au cours du temps indépendamment du SP. Histogramme représentant la densité de neurones Fos+ par µm² dans les régions CCA, PL et IL du mPFC. On observe une augmentation significative de la densité de marquage dans le PL et l'IL chez les animaux LT-CTRL et LT-PSP par rapport aux animaux CT-CTRL et CT-PSP respectivement. **: $p < 0,05$ **: $p < 0.001$*

Le sommeil paradoxal post-apprentissage module les interactions entre l'hippocampe, l'amygdale et le mPFC qui s'établissent au cours de la consolidation.

Nous nous sommes ensuite demandé si ces changements d'activité dans l'hippocampe, l'amygdale et le mPFC au cours de la consolidation pouvaient refléter une réorganisation fonctionnelle du réseau de la mémoire mis en place pendant le conditionnement contextuel à la peur et si cette dernière pourrait être modulée par le SP post-apprentissage.

Pour cela, nous avons établi des matrices de corrélation des densités de neurones Fos+ entre structures. Ces corrélations sont obtenues après régression linéaire de la densité de neurones Fos+ entre les régions de l'HPC, de l'amygdale et du mPFC. Elles donnent une indication de la connectivité fonctionnelle entre les différentes structures. Les corrélations de densité de neurones Fos+ entre structures sont représentées sous forme de matrice de connectivité (**Fig. 8**). Les corrélations significatives indiquées sur les 4 matrices de connectivité sont toutes des corrélations positives. L'ensemble des coefficients de corrélations et leur significativité sont exposés dans la **Table 1.**

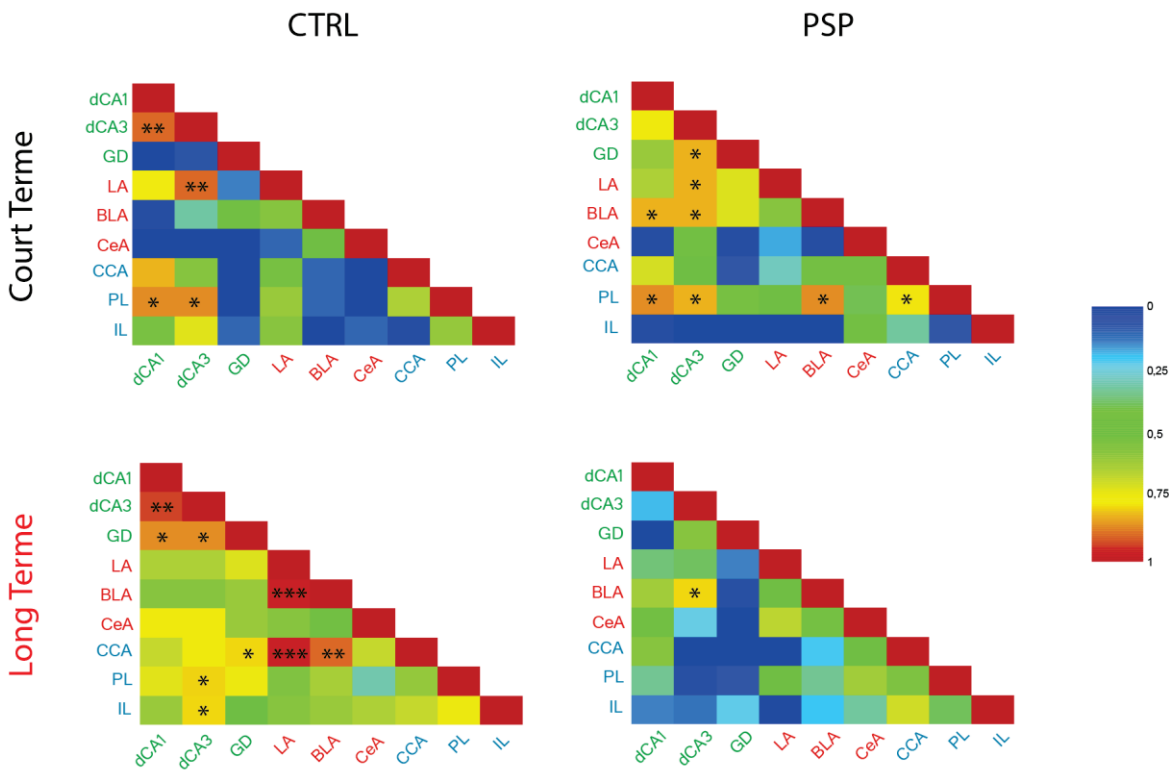


Figure 8. La privation de SP post-apprentissage empêche la formation du réseau cortical de la mémoire mis en place pendant la consolidation à long terme. Matrices représentant les corrélations de densité de neurones Fos+entre structures. Le gradient de couleur symbolise la valeur du coefficient de corrélation de Spearman (r). Les étoiles marquent la significativité des corrélations (test de Spearman). Les régions notées en vert appartiennent à l'hippocampe, les rouges à l'amygdale et les bleues au mPFC. On observe à court terme une corrélation positive entre l'amygdale et l'hippocampe, le PL et l'hippocampe ainsi qu'entre CA1 et CA3, chez les animaux CTRL et PSP. A long terme, on observe une corrélation positive entre les régions de l'hippocampe, entre les noyaux de l'amygdale et entre le CCA et les noyaux de l'amygdale chez les animaux CTRL. Il y a une disparition des corrélations entre hippocampe et amygdale et PL et amygdale dans ce groupe. En revanche, seule une corrélation entre BLA et CA3 est observée chez les animaux PSP.

Chez les animaux testés à court terme, nous observons une corrélation significative de densité de neurones Fos+ entre des régions de l'amygdale et de l'hippocampe dorsal dans les groupes CTRL et PSP : la LA avec CA3 chez les animaux CTRL ($p < 0,01$) et PSD ($p < 0,05$) et la BLA avec CA1 et CA3 chez les animaux PSP uniquement ($p < 0,05$) On observe également chez les CTRL et les PSD, une interaction significative entre le PL et les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe dorsal ($p<0,05$). Chez les CTRL, on observe aussi une forte corrélation de l'activité entre CA3 et CA1 ($p < 0,01$). Chez les PSP, on observe une interaction significative entre le PL et la BLA d'une part ($p < 0,05$) et le CCA d'autre part ($p < 0,05$) bien que cette dernière soit assez faible, ainsi qu'une interaction significative entre le GD et CA3 ($p < 0,05$).

Chez les animaux testés à long terme, nous observons une corrélation significative de densité de neurones Fos+ entre toutes les structures hippocampiques (CA1 vs CA3 vs GD), ainsi

qu’entre le LA et BLA ($p < 0,001$). Nous observons aussi une forte corrélation entre le CCA et les noyaux BLA ($p < 0,01$) et LA ($p < 0,001$) ainsi qu'une corrélation entre CCA et le GD ($p < 0,05$) même si nous ne retrouvons plus les interactions entre les régions hippocampiques et amygdaliennes d'une part, et les régions hippocampiques et le PL d'autre part, que nous avions observées chez les animaux CTRL testés à court terme. En revanche, chez les animaux PSP testés à long terme, seule une corrélation entre BLA et CA3 est observée ($p < 0,01$).

Ce dernier résultat suggère donc un rôle majeur du SP post-apprentissage dans la réorganisation des interactions entre régions hippocampiques, amygdaliennes et préfrontales au cours de la consolidation à long terme.

CTRL

Court Terme

		dCA1	dCA3	GD	BLA	LA	CeA	CCA	PL	IL
dCA1	Corrélations de Spearman	1								
	Significativité	--								
dCA3	Corrélations de Spearman	0,893	1							
	Significativité	0,007	--							
GD	Corrélations de Spearman	0,429	0,714	1						
	Significativité	0,337	0,071	--						
BLA	Corrélations de Spearman	0,750	0,893	0,679	1					
	Significativité	0,052	0,007	0,094	--					
LA	Corrélations de Spearman	0,036	0,321	0,464	0,571	1				
	Significativité	0,939	0,482	0,294	0,180	--				
CeA	Corrélations de Spearman	-0,321	-0,107	-0,250	0,107	0,464	1			
	Significativité	0,482	0,819	0,589	0,819	0,294	--			
CCA	Corrélations de Spearman	0,821	0,571	0,000	0,536	0,107	-0,214	1		
	Significativité	0,023	0,180	1,000	0,215	0,819	0,645	--		
PL	Corrélations de Spearman	0,857	0,857	0,393	0,607	0,107	-0,071	0,643	1	
	Significativité	0,014	0,014	0,383	0,148	0,819	0,879	0,119	--	
IL	Corrélations de Spearman	0,541	0,721	0,523	0,577	-0,072	0,108	0,036	0,595	1
	Significativité	0,210	0,068	0,229	0,175	0,878	0,818	0,939	0,159	--

Long Terme

		dCA1	dCA3	GD	BLA	LA	CeA	CCA	PL	IL
dCA1	Corrélations de Spearman	1								
	Significativité	--								
dCA3	Corrélations de Spearman	0,929	1							
	Significativité	0,003	--							
GD	Corrélations de Spearman	0,857	0,857	1						
	Significativité	0,014	0,014	--						
BLA	Corrélations de Spearman	0,571	0,571	0,607	1					
	Significativité	0,180	0,180	0,148	--					
LA	Corrélations de Spearman	0,643	0,643	0,714	0,964	1				
	Significativité	0,119	0,119	0,071	0,000	--				
CeA	Corrélations de Spearman	0,750	0,750	0,607	0,429	0,571	1			
	Significativité	0,052	0,052	0,148	0,337	0,180	--			
CCA	Corrélations de Spearman	0,679	0,750	0,786	0,893	0,964	0,679	1		
	Significativité	0,094	0,052	0,036	0,007	0,000	0,094	--		
PL	Corrélations de Spearman	0,721	0,793	0,739	0,631	0,559	0,306	0,595	1	
	Significativité	0,068	0,033	0,058	0,129	0,192	0,504	0,159	--	
IL	Corrélations de Spearman	0,607	0,786	0,500	0,607	0,571	0,643	0,679	0,739	1
	Significativité	0,148	0,036	0,253	0,148	0,180	0,119	0,094	0,058	--

PSP

Court Terme

		dCA1	dCA3	GD	BLA	LA	CeA	CCA	PL	IL
dCA1	Corrélations de Spearman	1								
	Significativité	--								
dCA3	Corrélations de Spearman	0,750	1							
	Significativité	0,052	--							
GD	Corrélations de Spearman	0,429	0,714	1						
	Significativité	0,337	0,071	--						
BLA	Corrélations de Spearman	0,643	0,821	0,714	1					
	Significativité	0,119	0,023	0,071	--					
LA	Corrélations de Spearman	0,821	0,821	0,429	0,571	1				
	Significativité	0,023	0,023	0,337	0,180	--				
CeA	Corrélations de Spearman	0,036	0,429	0,143	0,179	0,036	1			
	Significativité	0,939	0,337	0,760	0,702	0,939	--			
CCA	Corrélations de Spearman	0,703	0,487	-0,018	0,288	0,414	0,414	1		
	Significativité	0,078	0,268	0,969	0,531	0,355	0,355	--		
PL	Corrélations de Spearman	0,857	0,821	0,321	0,464	0,857	0,393	0,775	1	
	Significativité	0,014	0,023	0,482	0,294	0,014	0,383	0,041	--	
IL	Corrélations de Spearman	0,036	-0,236	-0,382	-0,291	-0,273	0,418	0,321	0,073	1
	Significativité	0,938	0,610	0,398	0,527	0,554	0,350	0,483	0,877	--

Long Terme

		dCA1	dCA3	GD	BLA	LA	CeA	CCA	PL	IL
dCA1	Corrélations de Spearman	1								
	Significativité	--								
dCA3	Corrélations de Spearman	0,190	1							
	Significativité	0,651	--							
GD	Corrélations de Spearman	-0,310	0,571	1						
	Significativité	0,456	0,139	--						
BLA	Corrélations de Spearman	0,619	0,786	0,048	1					
	Significativité	0,102	0,021	0,911	--					
LA	Corrélations de Spearman	0,357	0,381	0,143	0,476	1				
	Significativité	0,385	0,352	0,736	0,233	--				
CeA	Corrélations de Spearman	0,429	0,238	0,000	0,405	0,667	1			
	Significativité	0,289	0,570	1,000	0,320	0,071	--			
CCA	Corrélations de Spearman	0,571	-0,048	-0,024	0,214	-0,071	0,476	1		
	Significativité	0,139	0,911	0,955	0,610	0,867	0,233	--		
PL	Corrélations de Spearman	0,333	0,048	0,071	0,333	0,476	0,619	0,548	1	
	Significativité	0,420	0,911	0,867	0,420	0,233	0,102	0,160	--	
IL	Corrélations de Spearman	0,144	0,132	0,228	0,204	0,024	0,323	0,695	0,383	1
	Significativité	0,734	0,756	0,588	0,629	0,955	0,435	0,056	0,349	--

Table 1. Valeurs des coefficients de corrélation de Spearman et leur significativité. Les régions notées en vert appartiennent à l'hippocampe, les rouges à l'amygdale et les bleues au mPFC.

Le SP post-apprentissage influence l'activité hippocampique au rappel à court et long terme

Nous avons ensuite étudié les liens possibles entre les quantités de sommeil post-apprentissage et l'activité des régions hippocampiques, amygdaliennes et préfrontales lors du rappel à court et long terme. Nous avons donc analysé les corrélations entre densité de neurones Fos+ dans ces régions et quantités de SP et de SL. Nous ne montrons ici que les résultats que nous avons obtenus pour l'hippocampe dorsal (**Fig. 9**).

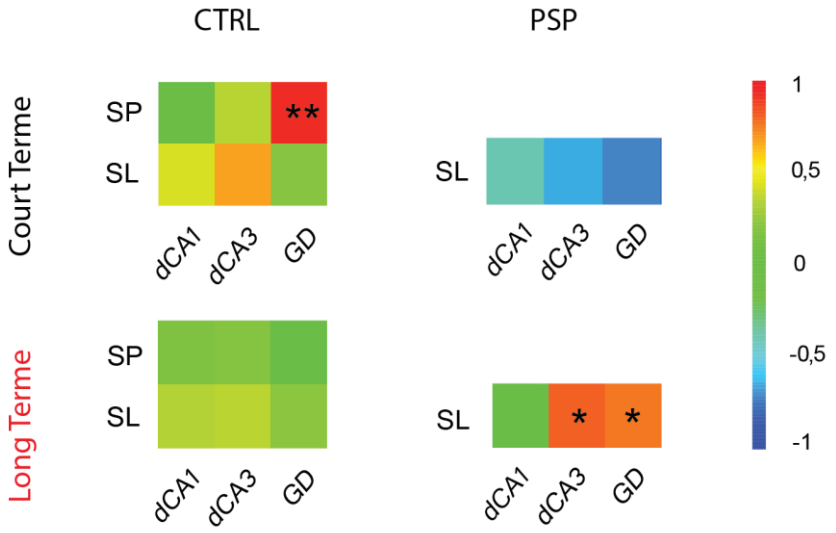


Figure 9. Corrélations entre quantités de sommeil post-apprentissage et activité hippocampique. Matrice représentant les corrélations entre quantité de SP et SL post-apprentissage et densité de neurones Fos+ dans les regiosn CA1, CA3 et GD de l'hippocampe dorsal. Le gradient de couleur symbolise le coefficient de corrélation de Spearman (r). Les étoiles marquent la significativité d'une corrélation (test de Spearman). On observe une forte corrélation entre la quantité de SP post-apprentissage et la densité de neurones Fos+ dans le GD chez les animaux CTRL testés à court terme uniquement. Chez les animaux PSP testés à long terme, il y a corrélation entre les quantités de SL et l'activité dans CA3 et le DG

Il y a une forte corrélation entre les quantités de SP post-apprentissage et la densité de neurones granulaires Fos+dans le GD chez les animaux CTRL testés à court terme ($r = 0,94$, $p < 0,001$) absente chez les animaux CTRL testés à long terme.

Par ailleurs, une corrélation significative entre quantité de SL post-apprentissage et densité de neurones Fos+ dans les régions CA3 ($r = 0,81$, $p = 0,015$) et GD de l'hippocampe ($r = 0,76$, $p = 0,028$) est observée après le rappel à long terme uniquement chez les animaux PSP.

Ces résultats suggèrent que le SP post-apprentissage pourrait, via l'activation du GD, initier la redistribution du réseau cortical de la mémoire du conditionnement contextuel à la peur qui a lieu au cours du temps.

4. Discussion

Notre étude comportementale suggère que le SP post-apprentissage joue un rôle dans la consolidation à long terme de la mémoire contextuelle de la peur. En effet, suite à une privation courte (6h) et non stressante de SP directement après un conditionnement contextuel à la peur, les souris présentent une altération de leurs performances lors du rappel à long terme (30 jours) et non lors du rappel à court terme (24h). L'étude de la corrélation de l'expression de *c-fos* entre les différentes structures impliquées dans la mise en place du réseau cortical de cette mémoire a montré que le SP post-apprentissage pourrait induire la réorganisation de l'activité au sein notamment de l'hippocampe, l'amygdale et du mPFC qui a lieu au cours de la consolidation. Cette modulation initiée par le SP impliquerait le recrutement précoce du GD et conduirait d'abord à un couplage entre hippocampe, amygdale et préfrontal, observé au rappel à court terme et qui serait progressivement annulé, au rappel à long-terme au profit d'interactions intra-hippocampiques et intra-amygdaliennes et entre le CCA et l'amygdale. Cette étude est la première à tester l'effet d'une privation courte et non stressante de SP sur la mémoire à long terme.

Considérations méthodologiques

Les résultats que nous présentons sont préliminaires. Il manque notamment à notre étude immunohistochimique l'analyse des groupes contrôles, exposés au contexte du conditionnement mais n'ayant pas reçu de choc électrique, indispensables pour évaluer la contribution de l'exploration seule du contexte aux modifications d'activité *c-fos* que nous avons observées entre le rappel à long terme et à court terme. Sans ces groupes contrôles, nous ne pouvons interpréter nos résultats d'immunohistochimie de manière fiable.

Un autre aspect que nous devons discuter est l'utilisation du gène d'expression précoce *c-fos* comme marqueur d'activité neuronale. Ce dernier est un marqueur indirect d'activité neuronal reconnu (Kovács, 2008). Cependant, cette approche ne met pas à l'abri de faux négatifs : des neurones faiblement activés lors de la tâche de rappel à LT pourraient ne pas exprimer *c-fos*. Il faudrait croiser nos résultats en utilisant d'autres gènes d'activité précoce comme *zif268* qui n'ont pas les mêmes dynamiques d'expression. Nous avons d'ailleurs réalisé un immunomarquage de Zif268 qui est en cours d'analyse. Enfin, nous avons utilisé l'expression de *c-fos* pour dresser nos matrices de connectivité. Or le marquage Fos ne donne aucune indication sur la connectivité des neurones activés. Nous ne pouvons donc conclure si la corrélation que nous observons entre deux structures est due à une interaction directe via des

afférences communes ou indirecte en faisant intervenir une structure relais qui projettent sur elles deux. De plus, ces matrices de connectivité ne nous révèlent que des interactions possibles entre structures et non une synchronie d'activité neuronale que seules des études d'électrophysiologie pourraient nous permettre d'établir.

La privation courte et non stressante de SP post-apprentissage atteint sélectivement la mémoire à long terme (30 jours).

Nos résultats comportementaux montrent pour la première fois chez le rongeur qu'une privation de SP post-apprentissage altère les performances lors du rappel à long terme (30 jours) d'un conditionnement contextuel à la peur. De plus, nous n'observons pas d'effet sur le rappel à court terme contrairement à ce qu'une étude de notre laboratoire a montré chez le jeune rat. Une privation courte et non stressante de 4h de SP engendre une diminution des performances au rappel à un jour (Ravassard et al., sous presse). Une autre étude a montré que les performances au rappel à 24h d'un conditionnement à la peur étaient corrélées à la cohérence du thêta entre l'amygdale, l'hippocampe et mPFC pendant le SP (Popa et al., 2010). On peut se demander s'il n'existerait pas une grande variabilité chez les souris empêchant certaines d'entre elles de consolider l'apprentissage; en effet, certaines de nos souris montraient des taux d'immobilité inférieurs à ceux mesurés lors de l'acquisition. Il est donc possible que cette grande variabilité dans notre groupe contrôle testé à court terme soit à l'origine de l'absence d'effet de la privation de SP sur les performances lors du rappel à 24h. Néanmoins, l'effet spécifique que nous observons à long terme chez les souris fait de notre modèle d'étude un outil intéressant pour l'étude du rôle du sommeil, et en particulier du SP, dans la consolidation à long terme des informations contextuelles ; étude qui n'a jamais été faite auparavant.

Le SP post-apprentissage pourrait promouvoir le désengagement de CA1 à long terme en favorisant son activation précoce.

Nous observons dans nos groupes privés ou non de SP après apprentissage une augmentation de l'activité Fos dans la BLA et le CE de l'amygdale et du PL et de l'IL du mPFC lors du rappel à long terme par rapport au rappel à court terme. Cette augmentation ne semble pas liée au SP, puisqu'elle est identique chez les animaux CTRL et PSP. Il a déjà été montré que l'amygdale et surtout la BLA est requise pour le rappel à long terme d'un conditionnement à la peur (Goshen et al., 2011 ; Poulos et al., 2009). Le mPFC est aussi une structure essentielle au rappel à long terme de l'information (Bontempi et al., 1999 ; Frankland et al., 2004 ; Takehara

et al., 2003). Il ne nous a donc pas paru étonnant d'observer à long terme une augmentation d'activité *c-fos* dans le PL et l'IL. Cependant, de manière très étonnante, nous n'avons pas trouvé d'augmentation significative de l'activité dans le CCA, une région pourtant identifiée comme critique, contrairement au PL et à l'IL, au rappel à long terme d'informations (Frankland et al., 2004 ; Goshen et al., 2011). Il est probable que cela ne soit dû qu'au faible nombre d'animaux (n=8 pour les PSP et n = 7 pour les CTRL) analysé jusqu'à présent puisqu'une tendance à une augmentation d'activité *c-fos* est néanmoins visible dans la CCA.

En revanche, les résultats observés dans la région CA1 de l'HPC suggèrent une modulation de l'implication de la région CA1 entre le rappel à court terme et à long terme par le SP post-apprentissage. En effet, on observe une augmentation de la densité de neurones Fos+ dans CA1 entre ces deux conditions et ce, uniquement chez les animaux PSP. Cela suggère que la privation de SP renforce l'implication de la région CA1 dans le rappel à long terme. Or, des travaux suggèrent que l'hippocampe et notamment CA1, se désengage progressivement entre le rappel à court terme et long terme d'un conditionnement contextuel à la peur (Frankland et al., 2004) Ainsi le SP pourrait contribuer au désengagement de CA1 lors du rappel à long terme, possiblement en favorisant des processus précoces de consolidation synaptique dans CA1. En effet, une augmentation de l'expression du gène d'expression précoce *zif268*, un marqueur de plasticité synaptique, a été observée dans l'hippocampe au cours du SP après un apprentissage (Ribeiro et al., 1999) et il y a augmentation de l'expression de *zif268* dans les régions parahippocampiques au cours du SP, après induction à l'éveil de LTP dans l'hippocampe (Ribeiro et al., 2002). Une étude de notre équipe a aussi montré qu'un rebond de SP entraîne l'augmentation dans CA1 et CA3 de l'expression des facteurs de transcription c-Fos, Zif268 et Arc et du facteur trophique BDNF impliqués dans le maintien de la plasticité à long terme (Ravassard et al., 2014). Le SP pourrait donc, en favorisant une consolidation rapide des traces mnésiques dans CA1, promouvoir ensuite leur redistribution dans d'autres structures.

La privation de SP post-apprentissage pourrait engendrer, au rappel à court terme, la mise en place de circuits de compensation dans le préfrontal.

Chez les animaux contrôles testés à court terme, l'étude de la corrélation de densité de neurones Fos+ a montré que le rappel à court terme favorisait le couplage de l'hippocampe et l'amygdale d'une part et de l'hippocampe et du prélimbique (PL) d'autre part. La privation de SP post-apprentissage ne semble pas modifier grandement les interactions entre ces régions

puisque ces mêmes couplages inter-structuraux sont observés. Cela est cohérant avec le fait qu'on n'observe pas d'atteinte des performances pour les souris privées de SP au rappel à court terme. Cependant, on observe dans ce groupe de souris, l'apparition d'une interaction entre le PL et l'amygdale (BLA). Or, une étude a montré que des animaux avec l'hippocampe dorsal lésé sont capables de réaliser un conditionnement contextuel à la peur avec des performances similaires à des animaux non lésés si la lésion a lieu bien avant l'acquisition de la tâche mais pas si celle-ci est réalisée juste après le conditionnement (Zelikowsky et al., 2013). Chez ces animaux lésés, le maintien des performances lors la tâche de reconnaissance contextuelle est dû à la mise en place de circuits de compensation impliquant le PL et l'IL. Le nouveau couplage observé entre PL et BLA pourrait donc révéler la mise en place d'un circuit préfrontal de compensation qui pourrait palier à des effets délétères liés à la privation de SP.

Le SP post-apprentissage pourrait initier la réorganisation du réseau cortical de la mémoire qui a lieu pendant la consolidation à long terme.

Notre analyse des corrélations de densité de neurones Fos+ a montré, chez les animaux testés à court terme qu'ils soient privés ou non, un couplage entre l'amygdale et l'hippocampe et un couplage entre le prélimbique et l'hippocampe qui disparaissent lors du rappel à long terme au profit d'interactions intra-amygdaliennes (BLA-LA) et intra-hippocampiques dans le groupe CTRL. En revanche, ce découplage entre amygdale et hippocampe observé au rappel à long terme est absent dans le groupe privé suggérant une implication du SP post-apprentissage dans ce découplage. C'est d'ailleurs la seule interaction constatée dans ce groupe de souris Enfin, il y a chez les animaux CTRL testé à long terme, l'apparition d'un couplage entre le CCA et l'hippocampe (GD) d'une part et le CCA et l'amygdale d'autre part (BLA et LA) absent chez les souris privées. Il y aurait donc au cours du temps, découplage entre hippocampe et amygdale d'un côté et recrutement du CCA couplé à la fois à l'hippocampe et l'amygdale de l'autre.

L'hypothèse d'un découplage entre amygdale et hippocampe influencé par le SP au cours de la consolidation a déjà été évoquée chez l'homme dans la théorie "dormir pour oublier, dormir pour se rappeler" (*sleep to forget-sleep to remember hypothesis*) proposé par Walker et Van der Helm (Walker et van der Helm, 2009). Chez l'homme, le rappel à long terme (un an) d'un souvenir émotionnel, conduit à une augmentation de l'activité dans l'hippocampe mais pas dans l'amygdale alors que cette dernière était activée lors de l'encodage de ce souvenir émotionnel (Dolcos et al., 2004, 2005). De plus l'activité de l'amygdale diminue pendant le SP

la nuit suivant un apprentissage émotionnelle (van der Helm et al., 2011) suggérant que ce découplage est dépendant du SP. Le SP post-apprentissage pourrait ainsi moduler de manière différentielle l'activité des réseaux neuronaux codant le contexte (hippocampe) et ceux codant les émotions (amygdale). Le SP pourrait ainsi initier un "désengagement émotionnel" (oubli) permettant alors de conserver la mémoire de l'évènement émotionnel et de son contexte tout en diminuant l'impact du tonus émotionnel et donc le ressenti émotionnel originellement associé à l'évènement (Walker et van der Helm, 2009). Ce découplage pourrait avoir un rôle protecteur contre les phénomènes de généralisation observés au cours du stress post-traumatique (PTSD). La généralisation est l'association de plusieurs stimuli explicites à une même émotion, alors qu'ils n'ont en réalité jamais été associés dans la vie de l'individu. Dans le cadre d'un conditionnement contextuel à la peur, une généralisation est observée si l'animal exprime un comportement de peur dans un contexte dans lequel il n'a jamais été conditionné. Le phénomène de généralisation est associé à une augmentation de l'activité amygdalienne au rappel d'un conditionnement contextuel à la peur (Kaouane et al., 2012). Nos résultats sont en accord avec cette théorie : il y aurait donc d'abord lors de l'encodage, formation d'un couplage entre hippocampe et amygdale qui serait ensuite progressivement diminué pendant les épisodes de SP suivant le conditionnement contextuel à la peur. Des études d'électrophysiologie viennent renforcer notre hypothèse. Il a en effet été montré que la cohérence de l'activité thêta entre l'hippocampe et l'amygdale pendant le SP post-apprentissage est corrélée aux performances lors d'un test 24 heures après un conditionnement à la peur (Popa et al., 2010) suggérant qu'un dialogue entre l'hippocampe et l'amygdale essentiel à l'apprentissage s'établit lors du SP post-apprentissage. De plus, il a été montré qu'il existait une synchronie des ondes thêta de l'hippocampe et l'amygdale lors du rappel à court terme (24h) après un conditionnement à la peur mais pas lors du rappel à long terme (30 jours) (Narayanan et al., 2007) renforçant l'idée d'un découplage fonctionnel entre hippocampe et amygdale qui se met progressivement en place La privation de SP, en empêchant ce découplage empêcherait la consolidation correcte du contexte (**Fig. 10**).

Le CCA est considéré comme une région critique dans le rappel à long terme d'informations contextuelles. Son activation permettrait la récupération de la trace mnésique stockée et son transfert temporaire dans l'hippocampe (Frankland et al., 2004 ; Goshen et al., 2011). Chez les souris privées testées à long terme, l'activité de cette région n'est corrélée à aucune autre. D'ailleurs les matrices de corrélation ne nous révèlent quasiment aucune interactions au rappel à long terme chez ces souris. Ces observations, conjuguées au déficit de performances de ce

groupe lors du rappel à long terme, semblent suggérer que la privation de SP post-apprentissage a empêché la formation du réseau cortical de la mémoire de peur conditionné qui se met en place au cours de la consolidation à long terme. Celui-ci serait caractérisé par un découplage entre amygdale et hippocampe et par le recrutement du CCA qui servirait alors d'interface entre ces deux structures et le néocortex.

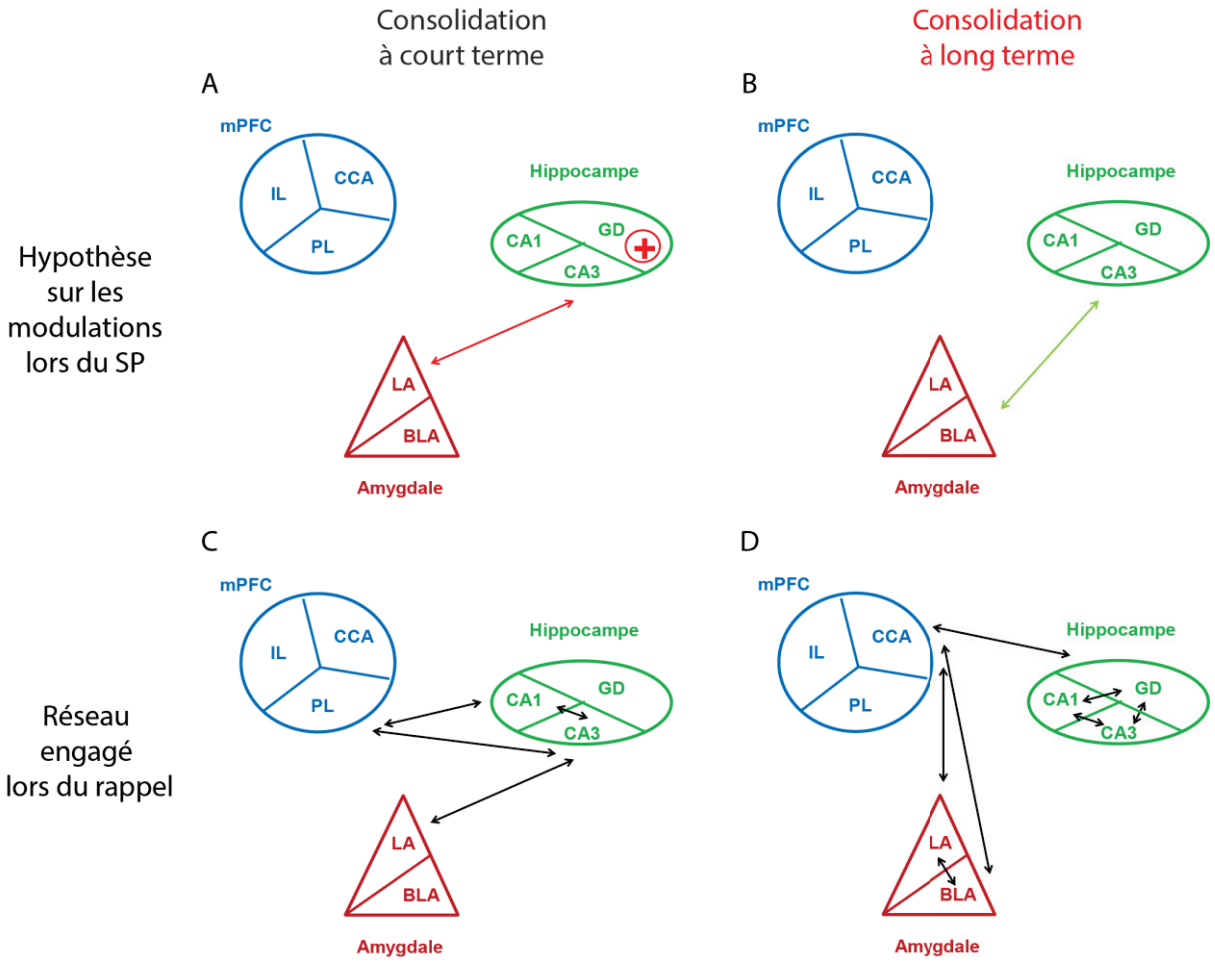


Figure 10. Résumé de nos hypothèses sur les modulations du réseau de la mémoire de peur pendant le SP et leurs conséquences sur le réseau engagé lors du rappel à court et long terme. Les modulations du réseau de la consolidation à court terme (A) et à long terme (B) lors du SP sont présentées sur la ligne du haut. Les conséquences de ces modulations sur l'activité des structures lors du test à court terme (24 h ; C) et à long terme (30 jours ; D) sont présentées sur la ligne du bas. Les double-flèches colorées symbolisent les interactions stimulées (rouge) ou inhibées (vert) par le SP. Les flèches noires représentent les interactions significatives lors du test. Le "+"correspond à l'activité d'une région corrélée aux quantités de SP. Nous proposons une double fonction du SP post-apprentissage. Pendant la consolidation à court terme (24 h), le SP favoriserait les interactions (le couplage) entre hippocampe et amygdale puis, pendant la consolidation à long terme (30 jours), il favoriserait alors le découplage de l'hippocampe et de l'amygdale en diminuant les interactions entre ces deux structures. Ce découplage ainsi que l'activation précoce du GD pourrait initier le recrutement du CCA nécessaire au rappel à long terme.

Le SP post-apprentissage pourrait favoriser l'intégration de nouveaux neurones du gyrus denté dans le réseau de la mémoire à long terme

Nous avons observé une forte corrélation entre la quantité de SP et l'activation du GD lors du rappel à court terme. En revanche, la densité de neurones Fos+ dans le GD n'est pas corrélée à la performance lors du rappel. Cette interaction forte entre activité du GD et quantités de SP lors du rappel à court terme suggère une influence du SP sur un mécanisme prenant place précocement dans le GD, et dont les effets comportementaux ne seraient observables qu'à long terme. L'activation précoce des cellules granulaires du GD dépendante du SP post-apprentissage pourrait donc avoir un rôle dans la consolidation à long terme. L'activation de l'amygdale lors de l'encodage pourrait faciliter l'induction de mécanismes de plasticité synaptique dans le GD. En effet, on sait que la stimulation de l'amygdale facilite l'induction de la LTP du GD (Ikegaya et al., 1995). De plus, ce sont les nouveaux neurones du GD qui sont préférentiellement impliqués dans la LTP puisqu'ils possèdent un seuil d'induction de la LTP particulièrement bas à partir de leur deuxième semaine d'existence et jusqu'à un mois, un mois et demi (Ge et al., 2007). Une fois recrutés, ils sont ensuite intégrés dans le réseau synaptique existant. Or, il a été montré que les nouveaux neurones sont préférentiellement recrutés dans les réseaux neuronaux impliqués dans le rappel à long terme d'une situation précise (Trouche et al., 2009). Enfin, bloquer la neurogenèse dans le GD perturbe la plasticité synaptique dans le GD et diminue les performances des animaux dans un conditionnement contextuel à la peur (Saxe et al., 2006). En modulant les processus d'intégration des nouveaux neurones granulaires du GD au sein du réseau de la mémoire, le SP pourrait favoriser la réorganisation fonctionnelle qui accompagne la consolidation à long terme (**Fig. 10**).

Discussion générale

1. Résumé des principaux résultats obtenus

Dans cette thèse, nous avons cherché à éclaircir le rôle facilitateur du SP dans la mémoire, aussi bien sur l'apprentissage que sur la consolidation mnésique tant au niveau synaptique que systémique. Pour cela nous avons mené trois études dont nous allons maintenant rappeler les principaux résultats.

Déterminer le rôle des neurones à MCH sur la mémoire hippocampo-dépendante et la plasticité synaptique hippocampique

Pour évaluer de manière indirecte le rôle du SP sur la mémoire, nous avons étudié la plasticité synaptique hippocampique à court et à long terme au niveau des synapses SC-CA1 ainsi que plusieurs formes de mémoires hippocampo-dépendantes à court et long terme chez des souris MCH/ataxine3, chez lesquelles les neurones à MCH, un neuropeptide libéré principalement pendant le SP, sont détruits à l'âge adulte.

Nous avons trouvé une atteinte de la phase précoce de la LTP et de la LTD due à un déficit de certaines formes de plasticité pré-synaptique à court terme. Ainsi, bien que la PPF ne soit pas perturbée, nous avons observée une altération de la PTP et une facilitation de la dépression synaptique chez les souris MCH/ataxine3.

Ces déficits sont associés à un retard d'apprentissage d'une tâche spatiale dans un labyrinthe aquatique de Morris. Les souris MCH/ataxine3 montrent aussi un déficit d'habituation à un nouvel environnement et une augmentation des hésitations lors d'une tâche de mémoire de travail d'alternance dans un labyrinthe en T. La mémoire à court terme -et non la mémoire à long terme- serait donc altérée chez ces souris.

Caractériser les effets neuromodulateurs de la MCH sur les réponses synaptiques hippocampiques

Nous avons étudié les effets de l'application de MCH sur des tranches d'hippocampe sur la transmission glutamatergique au niveau des synapses SC-CA1.

L'application de MCH induit une dépression d'origine pré-synaptique des réponses synaptiques dépendante des récepteurs A1 à l'adénosine. Celle-ci est bloquée par des

inhibiteurs des ecto-nucléotidases suggérant que la MCH induit la libération d'ATP qui s'accumule ensuite sous forme d'adénosine dans l'espace extra-cellulaire. L'inactivation du métabolisme astrocytaire et le blocage de récepteurs impliqués dans la gliotransmission suggèrent que la MCH agit sur les astrocytes qui libère alors l'ATP. Des travaux de nos collaborateurs de Liège sur des cultures d'astrocytes corticaux ont montré que le récepteur MCH-R1 à la MCH est exprimé sur la membrane astrocytaire et que son activation engendre la libération d'adénosine et diminue la recapture de glutamate. Nos résultats semblent donc montrer que la MCH modulerait la transmission glutamatergique via la gliotransmission.

Déterminer le rôle du SP dans l'activation des réseaux corticaux pendant le processus de consolidation à long terme d'informations contextuelles de type émotionnel

Pour évaluer le rôle plus direct du SP sur la mémoire, nous avons étudié lors d'une troisième étude les effets d'une privation post-apprentissage courte (6h) et non stressante de SP sur le rappel à court (24 h) et long terme (30 jours) d'un conditionnement contextuel à la peur. Nous avons pu observé que la privation de SP altérait sélectivement le rappel à long terme, et non à court terme, des informations contextuelles.

Nous avons ensuite établi des matrices de corrélation d'activité grâce à l'étude de l'expression d'un marqueur indirect d'activité, le gène *c-fos*. Nous avons montré qu'il y a peu de différences entre le réseau de structures engagé lors du rappel à court terme chez les souris privées et contrôles. On observe principalement des interactions entre l'amygdale et l'hippocampe. En revanche, lors du rappel à long terme, chez les souris non privées de SP (CTRL), on observe la mise en place d'un réseau spécifique et organisé mettant notamment en jeu le CCA du mPFC ainsi que de fortes interactions intra-hippocampiques et intra-amygdaliennes. Toutefois, chez les souris privées de SP, nous n'avons pu observer qu'une seule corrélation d'activité entre l'amygdale et l'hippocampe. Ces résultats suggèrent donc que le SP aurait un rôle précoce (puisque la privation a lieu immédiatement après l'apprentissage) dans des phénomènes de consolidation qui se mettraient en place au cours du temps et qui impliquerait une réorganisation du réseau nécessaire au stockage à long terme des informations contextuelles de type émotionnel.

2. Interprétations fonctionnelles

L'ensemble des résultats que nous avons pu obtenir durant cette thèse s'articulent autour de deux grands axes. Le premier s'attache à déterminer le rôle du SP dans la mémoire en étudiant

l'action de la MCH et de sa modulation dans l'hippocampe sur les mécanismes de plasticité synaptique au cœur des processus de consolidation synaptique et d'apprentissage. Le second, via une approche plus directe de privation de SP, vise à mieux comprendre le rôle du SP dans la consolidation à long terme via la modulation de phénomènes cellulaire précoces influençant la consolidation systémique. Nous aborderons ces deux points de manière successive.

2.1. Le SP contribue, via la régulation de mécanismes synaptiques dans l'hippocampe par la MCH, à l'effet facilitateur du sommeil sur la mémoire.

Nos résultats ont montré que, dans l'hippocampe, la MCH induit par une action sur la gliotransmission, une accumulation d'adénosine dans l'espace extracellulaire. Or, l'adénosine constitue un facteur promoteur du sommeil participant à sa régulation homéostatique (voir Introduction : 2.1.2 et 3.4.3). Elle jouerait le rôle de senseur énergétique, participant ainsi à l'instauration d'une pression de sommeil à la fin de la journée. En effet, durant l'éveil, la forte activité neuronale conduit à la libération d'ATP par les neurones pré-synaptiques. L'ATP, via sa dégradation en adénosine et son action sur la gliotransmission, permettrait un rétrocontrôle négatif de la transmission glutamatergique et ce notamment dans les centres de l'éveil. Leur inhibition participerait alors à l'entrée en SL en favorisant notamment l'instauration des ondes lentes qui se propageraient ensuite dans tout le cerveau. Nous avons donc émis l'hypothèse, en discutant nos résultats dans le chapitre II, que la MCH participerait ainsi à l'homéostasie du sommeil. Cependant, la MCH est libérée principalement pendant le SP, l'activité des neurones à MCH étant très faible pendant le SL et nulle pendant l'éveil. La MCH pourrait donc participer à l'alternance des états de sommeil en régulant l'adénosine extracellulaire pendant le SP et ainsi faciliter la transition vers le SL. En effet, des travaux chez la souris ont montré que, tant l'injection intracérébrale de CPT, un inhibiteur des récepteurs A1 à l'adénosine, que le blocage de la gliotransmission grâce à un modèle de souris transgénique, conduit à une réorganisation de l'architecture du sommeil ciblant essentiellement le SL(Halassa et al., 2009). De la même manière, il se trouve que, chez les souris MCH/ataxine3, les transitions entre états de sommeil sont altérées (résultats non publiés).

La MCH libérée pendant le SP pourrait donc n'avoir qu'un rôle indirect sur la consolidation mnésique en favorisant l'homéostasie du sommeil et en contrôlant son architecture. Néanmoins, il est légitime de se demander si elle pourrait aussi jouer un rôle plus direct dans cette consolidation mnésique. En effet, la diminution de transmission glutamatergique induite

par la MCH dans l'hippocampe, une structure clef de la mémoire, pourrait participer à des mécanismes de consolidation synaptique pendant le SP. Nous avons mis en évidence chez les souris MCH/ataxine3 que l'absence de neurones à MCH entrainait une atteinte de la plasticité synaptique hippocampique couplée à des déficits dans des tâches de mémoire hippocampo-dépendante. La plasticité synaptique étant considérée largement comme un modèle cellulaire de la mémoire, ces résultats semblent suggérer que la MCH pourrait jouer un rôle dans la consolidation synaptique. Mais par quels moyens ? Nous avancerons ici trois hypothèses basées sur la confrontation des résultats obtenus dans nos deux premières études avec la littérature.

2.1.1. La MCH pourrait, en synergie avec l'acétylcholine, contribuer à l'élaboration, pendant le SP, d'un état privilégié pour la consolidation synaptique dans l'hippocampe

Nos résultats ont montré que la MCH induit une dépression de la transmission glutamatergique entre les aires CA3 et CA1 de l'hippocampe en diminuant la libération du neurotransmetteur par les collatérales de Schaffer. Or, des résultats de notre laboratoire ont montré qu'un rebond de 3h de SP facilite, au contraire, l'induction de LTP au niveau des synapses SC-CA1 (Ravassard et al., sous presse). Ces deux résultats peuvent sembler contradictoires de prime abord puisqu'une diminution de la transmission synaptique diminue la connectivité entre CA1 et CA3. Comment alors l'induction de LTP pourrait-elle être facilitée après le SP ? D'autres études ont montré que lors du SP qui suit un apprentissage, il y a augmentation du niveau d'expression de facteurs de transcription (c-Fos, Zif268,...) et du facteur neurotrophique BDNF, impliqués dans le maintien de la LTP (Ravassard et al., 2014 ; Ribeiro et al., 1999). Le SP pourrait alors favoriser les processus de consolidation synaptique prenant place dans l'hippocampe en y facilitant la phase tardive de la LTP. Ces mécanismes de stabilisation de la plasticité synaptique à long terme correspondraient alors à des réactivations (*replay)* moléculaires (Ribeiro et Nicolelis, 2004). Mais pour que ces derniers puissent avoir lieu, il faut en contre partie diminuer les interférences provenant d'un transfert d'informations lié à l'induction d'une nouvelle LTP qui aurait lieu durant le SP. Ainsi la MCH, en diminuant la transmission glutamatergique hippocampique pendant le SP, contribuerait à la diminution de la connectivité entre les différentes structures du réseau de la mémoire, permettant alors l'expression de mécanismes de consolidation synaptique au sein de l'hippocampe. Un même rôle a été suggéré pour l'acétylcholine (ACh), un autre neuromodulateur fortement libéré durant le SP.

En effet, lors du cycle veille-sommeil, il existe une régulation fine des systèmes neuromodulateurs. Il a été proposé que les variations de libération d'ACh au cours des différents états de vigilance pouvait participer à la contribution de celle-ci de manière différentielle à la consolidation mnésique (Hasselmo, 2006, 1999).L'ACh, via ses récepteurs nicotiniques, augmente la transmission synaptique afférente à l'hippocampe, favorisant donc ainsi "le flux entrant". Au contraire, l'activation des récepteurs muscariniques diminuerait la transmission synaptique intra-hippocampique et hippocampo-corticale.

Pendant l'éveil actif, le taux élevé d'ACh favoriserait donc l'encodage de nouvelles informations par induction de LTP dans les circuits hippocampiques, et notamment dans CA3, la voie d'entrée de l'hippocampe, tout en diminuant la connectivité entre les régions de l'hippocampe et entre l'hippocampe et le néocortex. Cette diminution de connectivité permettrait de bloquer des informations déjà mémorisées (pouvant jouer le rôle d'interférences) et donc de limiter leur impact sur l'acquisition de nouvelles informations. Au contraire, pendant le SL, le faible tonus cholinergique lèverait l'inhibition exercée sur les circuits récurrents de CA3 et les connections entre CA3 et CA1 permettant la génération et la propagation des SW-R. Il pourrait alors y avoir réactivations neuronales et transfert vers le néocortex d'informations à stocker sans risque d'interférences du fait de l'absence de nouveaux apprentissages pendant cet état de sommeil. Lors du SP, le rétablissement d'un tonus cholinergique élevé permettrait un retraitement *off-line* des traces mnésiques dans l'hippocampe et la mise en place de processus de consolidation synaptique(Ravassard et al., 2014).

Pendant le SP, la MCH aux côtés de l'ACh pourrait donc contribuer à l'inhibition de la connectivité entre le néocortex et l'hippocampe qui est généralement observée pendant cet état de sommeil(Wierzynski et al., 2009), en diminuant la transmission synaptique dans l'hippocampe. De plus, une étude récente suggère que la MCH favoriserait la libération d'ACh par le septum médian dans l'hippocampe (Lu et al., 2013) renforçant l'idée d'une action synergique de ces deux neuromodulateurs. La MCH, via son action sur le septum médian pendant le SP, pourrait donc coordonner les effets de la MCH et de l'ACh dans l'hippocampe. Leur présence simultanée créerait alors un milieu favorable à la consolidation synaptique, en empêchant la survenue d'interférences pouvant la perturber.

2.1.2. La MCH, en participant à une homéostasie locale du sommeil dans l'hippocampe, pourrait favoriser la consolidation des traces mnésiques.

Comme on l'a vu plus haut, la MCH pourrait participer à l'homéostasie du sommeil en induisant l'augmentation de la concentration d'adénosine extracellulaire notamment dans les centres d'éveil. Cela faciliterait la survenue du SL et donc l'alternance des états de vigilance. Cependant, nous avons mis en évidence la modulation de la gliotransmission induite par la MCH dans l'hippocampe. L'accumulation d'adénosine dans l'hippocampe pourrait-elle avoir un rôle dans la régulation de l'alternance des états de vigilance ? Et quels pourraient en être ses effets sur la consolidation mnésique ?

Traditionnellement, le sommeil est considéré comme un phénomène global à l'échelle de l'organisme tout entier. Nous sommes soit éveillés, soit endormis. Et comme il serait global, le sommeil serait aussi homéostatique. En effet, une période d'éveil prolongée induit un rebond de sommeil via l'inhibition de centres d'éveil par des substances hypnogènes. Cependant, depuis quelques années, cette théorie est remise en question. Des travaux suggèrent en effet que le sommeil serait un phénomène local et dépendant de l'activité neuronale dans chaque région (Krueger et Tononi, 2011 ; Krueger et al., 2008). Chez l'homme, l'existence notamment du somnambulisme suggère que le sommeil peut être un phénomène qui ne concerne pas l'organisme entier. D'autre part, les dauphins ne montrent des ondes delta que dans un hémisphère à la fois suggérant que seule une partie de leur cerveau est endormie tandis que l'autre reste réveillée.

Or, l'un des mécanismes avancé pour expliquer l'apparition de ces sommeils locaux (mise au repos de certaines parties du cerveau de manière isolée) met en jeu l'accumulation d'adénosine extracellulaire et la gliotransmission (Krueger et Tononi, 2011 ; Krueger et al., 2008). La MCH pourrait donc participer à la génération d'un sommeil local dans l'hippocampe puisqu'elle agit elle-aussi sur la gliotransmission et l'adénosine. D'après cette hypothèse, l'induction de LTP à l'éveil serait accompagnée, non seulement d'une augmentation de AMPAR sur la membrane de l'épine dendritique mais aussi par l'augmentation d'ATP extracellulaire. Celle-ci via une action sur les astrocytes engendrerait la libération de facteurs promoteurs du sommeil qui conduirait notamment à l'expression de récepteurs A1 post-synaptique, rendant alors les cellules plus sensibles à l'action de l'adénosine issue de la dégradation de l'ATP extracellulaire. L'activation des A1R permet l'hyperpolarisation du neurone post-synaptique, diminuant ainsi son excitabilité. Une forte activité neuronale

permettrait donc à la fois la possibilité d'un rétrocontrôle positif (AMPAR) et d'un rétrocontrôle négatif (A1R) au sein d'une même synapse conduisant alors à l'apparition d'oscillations (cycle d'inhibition-activation) correspondant à un sommeil local. L'émergence plus ou moins synchrones de ces sommeils locaux dans des assemblées de neurones et leurs interactions par l'intermédiaires de connexions ou d'influences humorales permettrait leur généralisation et l'apparition d'un sommeil global, et donc du sommeil proprement dit. Cependant, l'application de ce modèle semble limitée au SL. En effet le SP, dont la genèse est principalement assurée par des structures localisées dans le pont et l'hypothalamus, semble être un processus moins distribué que les autres états de vigilance et être moins sous la dépendance de ces facteurs régulateurs décrits dans le SL (Krueger et al., 2008).

Ainsi, la MCH, en favorisant pendant le SP, l'accumulation, dans l'hippocampe, d'adénosine qui activerait alors les A1R post-synaptiques, pourrait permettre l'apparition de telles oscillations dans les réseaux de neurones ayant subi une LTP. Or, SP et SL ont des rôles différents dans la consolidation mnésique. Le SP permettrait la stabilisation des traces mnésiques en favorisant le maintien de la plasticité de longue durée, notamment dans l'hippocampe, tandis que le SL permettrait la réactivation de ces traces mnésiques et leur transfert progressif vers le néocortex (hypothèse de consolidation systémique active, voir Introduction : 2.2.2.3). En favorisant l'entrée en SL d'assemblées de neurones hippocampiques, la MCH permettrait, après leur consolidation pendant le SP, la réactivation et le transfert des traces mnésiques pertinentes pendant le SL.

La libération de MCH pendant le SP pourrait alors contribuer de manière indirecte à la consolidation mnésique en assurant la succession rapide dans l'hippocampe 1) de phénomènes de consolidation synaptique locaux durant le SP et 2) de phénomènes de consolidation systémique pendant le SL.

2.1.3. Le SP pourrait il préparer aux apprentissage du lendemain via la MCH ?

Nous avons montré que, chez les souris MCH/ataxine3, la délétion des neurones à MCH engendre un déficit de formes pré-synaptiques de plasticité à court terme dans l'hippocampe, la PTP et la dépression synaptique. Or, il a été montré récemment que la gliotransmission est impliquée dans la plasticité pré-synaptique à court terme, et en particulier dans la dépression synaptique et la PTP (Sibille et al., 2014). La MCH pourrait donc, toujours via son action sur la gliotransmission et l'accumulation d'adénosine extracellulaire, avoir un rôle plus direct sur la plasticité synaptique hippocampique pendant le SP. Cette modulation de la plasticité

synaptique hippocampique pourrait-elle jouer un rôle dans les processus de mémorisation ? L'observation chez les souris MCH/ataxine3 de perturbations de mémoire de travail hippocampo-dépendante semble le suggérer. Mais quels mécanismes pourraient être mis en jeu ?

Le rôle de la plasticité à court terme sur la mémoire de travail a été peu étudié et est sujet à controverse. Cependant la théorie principalement admise est que la plasticité synaptique à court terme contribuerait au maintien temporaire de l'information (mémoire de travail–mémoire à court terme) puisqu'elle est de courte durée et dépend de l'activité passée récente de la synapse. Une hypothèse majeure suggère que la plasticité à court terme pourrait moduler transitoirement la fonction de transfert des informations en changeant leur probabilité de libération de neurotransmetteur (Abbott et Regehr, 2004, voir Introduction : 3.3.3). En favorisant ou non la transmission de bouffées de potentiels d'action de hautes fréquences lors d'un apprentissage, la plasticité synaptique à court terme permettrait alors d'augmenter la réactivité de l'animal pendant un apprentissage. Celui-ci pourrait alors encoder transitoirement de nouvelles informations avant de les effacer aussitôt qu'elles deviennent inutiles. Mais, par définition, ce rôle de la plasticité à court terme sur la mémoire de travail est limité à l'éveil. En effet, la mémoire de travail correspond au maintien et à la manipulation d'informations sur une courte durée pour réaliser une tâche donnée. Il ne s'agit donc pas d'informations à consolider. Comment une régulation de phénomènes de plasticité synaptique à court terme dans l'hippocampe pendant le SP pourrait alors avoir des conséquences sur une mémoire de travail ?

Comme nous venons de le rappeler, la délétion génétique des neurones à MCH a entraîné chez nos souris MCH/ataxine3 un déficit de PTP et de dépression synaptique associé à un déficit de mémoire à court terme. Or, ce même phénotype a été observé chez des souris déficientes pour la synapsine II (Rosahl et al., 1995). Cette observation, que nous avons discutée dans le chapitre I, nous a conduit à envisager une action de la MCH sur la synapsine II. Les synapsines sont des phosphoprotéines neuronales qui jouent un rôle important dans les mécanismes moléculaires régissant le trafic et l'exocytose des vésicules synaptiques (Cesca et al., 2010). L'activation de la CaMKII par l'entrée de calcium qui accompagne l'arrivée d'un PA dans le bouton synaptique permet la phosphorylation des synapsines. Ainsi activée, la synapsine permet le passage des vésicules synaptiques d'un stock de réserve, où elles sont maintenues ensemble par une association aux filaments d'actine du cytosquelette, au stock prêt à être libéré (RRP). Une fois libérée, les vésicules synaptiques migrent vers les sites de

libération des neurotransmetteurs. Certaines synapsines restent accrochées à la membrane des vésicules synaptiques et leur phosphorylation contribue à différentes étapes d'adressage à la membrane, d'ancrage et de fusion qui prennent place lors de l'exocytose (Cesca et al., 2010).La MCH pourrait ainsi contrôler la phosphorylation des synapsines II pendant le SP, modulant ainsi la probabilité de libération de glutamate des synapses hippocampiques.

Chez les souris MCH/ataxine3, on observe une facilitation de la dépression synaptique et une perturbation de la PTP suggérant un shift de la transmission synaptique vers des mécanismes de dépression. Cela suggère que, lors du SP, la MCH pourrait faciliter la plasticité à court terme, notamment en augmentant la taille du RRP via l'activation de la synapsine II. Ces changements pourraient-il alors perdurer jusqu'au lendemain, permettant alors d'assurer à l'animal de meilleures performances en mémoire de travail lors d'un apprentissage le jour suivant ? Autrement dit, le SP pourrait-il avoir une action cette fois, non pas sur la consolidation mnésique mais sur l'encodage *a posteriori* d'une trace mnésique ? Une étude a montré chez le rongeur que l'acquisition d'une tâche de mémoire de travail hippocampo-dépendante était perturbée par une privation de sommeil avant la tâche (Hagewoud et al., 2010). Ce déficit était accompagné par une perturbation de mécanismes synaptiques nécessaires à l'expression d'une plasticité à court terme normale comme une diminution de la phosphorylation des AMPAR (Hagewoud et al., 2010). L'effet de la MCH sur la mémoire de travail, via l'augmentation de la taille du RPP, serait essentiellement due aux derniers épisodes de SP avant le réveil de l'animal puisqu'on conçoit bien que l'activité pendant le sommeil et notamment les réactivations pourraient elles-aussi être facilitées par cette augmentation du RRP dépendante du SP.

Ceci peut sembler, de prime abord, contradictoire avec les résultats de notre étude sur la transmission glutamatergique qui montre que l'application MCH diminue la probabilité de libération de neurotransmetteur au niveau des synapses SC-CA1. Toutefois, une observation nous amène à relativiser cette apparente contradiction. En effet, le lavage de MCH après son application sur des tranches d'hippocampe, induit une potentialisation de longue durée de la réponse des cellules pyramidales de CA1 (résultats non publiés du laboratoire). De plus, cette potentialisation est en partie dépendante de l'activation de récepteurs pré-synaptiques A2A à l'adénosine qui conduit à l'augmentation de la probabilité de libération de glutamate. Enfin, le blocage de la dépression induite par l'application de MCH par un antagoniste des A1R empêche cette potentialisation suggérant que ces deux mécanismes sont interdépendants. L'amorçage des mécanismes de potentialisation et de dépression de la réponse synaptique des

cellules pyramidales de CA1 semble donc simultané. En revanche, l'expression des premiers serait inhibée en présence de MCH. Il pourrait donc y avoir, en présence de MCH pendant les épisodes de SP, inhibition de la transmission glutamatergique dans l'hippocampe puis la diminution des concentrations de MCH lors des épisodes de SL notamment, pourrait alors conduire à l'augmentation de la libération de glutamate possiblement via l'augmentation de la taille du RPP. Cet effet biphasique de la MCH pourrait alors être le reflet des différents rôles du SP sur la consolidation et l'encodage *a posteriori* des traces mnésiques.

Nous proposons donc, d'après nos résultats de nos deux premières études, un rôle de la MCH libérée pendant le SP, à la fois dans la consolidation et dans l'encodage des traces mnésiques via sa modulation de la gliotransmission. Cependant, la délétion des neurones à MCH chez les souris MCH/ataxine3, conduit uniquement à des déficits sur la mémoire et la plasticité à court terme. Si la MCH jouait aussi sur la consolidation, nous devrions observer des déficits de plasticité et de mémoire à long terme plus importants que ceux dus aux atteintes des processus de courte durée. On observe en effet, chez les souris MCH/ataxine3, une diminution de la vitesse d'apprentissage d'une tâche de mémoire spatiale à long terme ainsi qu'une altération de la phase précoce de la LTP et de la LTD. Notons qu'une étude du sommeil chez les souris MCH/ataxine3, a montré que les quantités de sommeil ne sont pas altérées chez ses souris, mais que seules les transitions entre les états de vigilance l'étaient (résultats non publiés). On peut donc imaginer que la libération d'autres substances pendant le SP ou d'autres mécanismes qui ont lieu pendant cet état de sommeil ne soient pas perturbés chez les souris MCH/ataxine3 et assurent alors la consolidation mnésique correcte des traces mnésiques. Les rôles que nous proposons pour la MCH dans les processus de consolidation ne doivent donc pas être fondamentaux. On peut considérer que la MCH exerce un rôle facilitateur en synergie avec d'autres acteurs comme l'ACh que nous avons évoquée plus haut, sur ces processus de consolidation pendant le SP mais que son recrutement n'est pas essentiel à leur bon déroulement. En revanche, la modulation exercée par la MCH sur les apprentissages du lendemain semble être essentielle à l'expression de ce rôle du SP sur l'encodage.

2.2. Le SP post-apprentissage exerce un rôle critique dans la consolidation à long terme

L'étude de la MCH nous a seulement permis d'étudier de manière indirecte l'effet du SP sur la mémoire. Il semble, en effet, que le rôle facilitateur du SP sur la consolidation nécessite l'action synergique de nombreux acteurs et l'étude d'un seul d'entre eux ne peut nous permettre d'appréhender ce rôle du SP dans son ensemble. Pour ce faire, nous avons donc privilégié dans notre dernière étude, une approche plus directe de privation de SP après apprentissage. Nous avons pu ainsi étudier l'impact de la perte du processus entier de SP sur la consolidation. Cependant, une privation trop longue de SP pourrait introduire une pression de sommeil trop importante qui interférait alors avec un rappel à court terme en induisant fatigue et ralentissement cognitif. De nombreuses études ont montré qu'il existait une fenêtre temporelle restreinte après un apprentissage (environ 4h, voir Chapitre III, Introduction) pendant laquelle la privation de SP, comme la perturbation des mécanismes de maintien de la LTP, perturbe la consolidation à court terme de tâches de mémoire dépendante de l'hippocampe. Cela suggère que des processus de consolidation synaptique précoces déterminent l'effet positif du SP sur la consolidation mnésique. Nous avons donc réalisé une privation courte de SP (6h) après l'acquisition d'un conditionnement contextuel à la peur permettant à la fois, aux animaux de récupérer de leur privation avant un rappel à 24h et d'étudier l'impact du SP sur la consolidation d'informations à court ou long terme. En effet, à notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à comprendre le rôle du SP dans la consolidation à long terme. Après avoir exploré dans nos deux premières études le rôle du SP dans l'apprentissage et la consolidation à court terme, nous avons donc, pour notre dernière étude, voulu caractériser l'impact du SP sur le stockage à long terme. C'est pour cela que nous avons choisi d'étudier dans notre troisième étude une mémoire émotionnelle dépendante de l'hippocampe, la mémoire de peur conditionnée à un contexte. Celle-ci est, en effet, une mémoire robuste qui peut perdurer sur une très longue période.

2.2.1. Le recrutement du gyrus denté pendant le SP post-apprentissage pourrait être requis pour la mise en place de "marquages synaptiques" essentiels à la consolidation systémique à long terme

Nous avons montré que lors du rappel à long terme (30 jours) d'un conditionnement contextuel à la peur par rapport au rappel à court terme (24h), il y a mise en place d'un réseau très organisé dont la privation de SP post-apprentissage empêche la survenue. De plus, nous

observons chez les animaux testés à court terme, une forte corrélation entre les quantités de SP et l'activité Fos dans le GD. Ce résultat suggère que le recrutement précoce du GD serait essentiel à la réorganisation fonctionnelle présidant à la mise en place du réseau de la mémoire à long terme. Il a été montré que l'ablation de la neurogenèse altère la LTP et les performances de souris lors d'un conditionnement contextuel à la peur (Saxe et al., 2006). De plus, inhiber la neurogenèse pendant et après l'apprentissage. entraîne des déficits sélectivement au rappel à long terme (pas d'altérations au rappel à court terme) d'un test d'évitement passif dépendant de l'hippocampe (Pan et al., 2012). Les résultats comportementaux de cette étude sont donc similaires à ceux que nous avons obtenu avec la privation de SP. Nous avons donc émis l'hypothèse en discutant nos résultats dans le chapitre III que des nouveaux neurones seraient recrutés dans le GD pendant l'acquisition de la tâche et que leur intégration dans le réseau de la mémoire serait consolidée pendant le SP post-apprentissage. En effet, une augmentation de la survie des nouveaux neurones dans le GD a été observée suite à une activation cholinergique tonique (Bruel-Jungerman et al., 2011). On peut donc concevoir que le tonus cholinergique élevé observé pendant le SP puisse influencer l'intégration des nouveaux neurones dans le GD. Mais comment l'intégration facilitée pendant le SP, de nouveaux neurones du GD dans le réseau de la mémoire pourrait favoriser le stockage à long terme de l'information ?

Le recrutement des nouveaux neurones du GD semble participer au rappel à long terme d'informations spatiales (Trouche et al., 2009).En effet, Trouche et coll. ont montré que ces neurones étaient impliqués dans le rappel à long terme d'un apprentissage spatial dans un labyrinthe aquatique mais que leur réactivation était spécifique d'un apprentissage donné. Le nombre de neurones marqués BrdU+ (intercalant de l'ADN marquant les nouveaux neurones) est ainsi plus important si les animaux sont testés 30 jours après la fin de l'entraînement avec la plateforme présente que si la plateforme est absente. Or, il existe des cellules de lieu dans le GD (Jung et al., 1994) et l'induction de LTP est facilité chez les nouveaux neurones du GD par rapport aux autres (Schmidt-Hieber et al., 2004). Ces propriétés électrophysiologiques particulières en font de bons candidats pour participer à l'élaboration de nouveaux champs de lieu essentiels à la consolidation d'informations spatiales. Ils pourraient ainsi constituer des cellules de lieu spécifiquement activées lorsqu'on replace les animaux dans la même situation. Or, des travaux du groupe de Tonegawa ont montré que si les nouveaux neurones du GD seraient impliqués dans la séparation de pattern *(pattern separation*), les neurones plus anciens seraient plutôt impliqués dans le complètement de pattern *(pattern completion*). La

séparation de pattern est le processus par lequel des représentations similaires sont stockées de manière distincte les unes des autres dans l'hippocampe. Il s'agit d'une sorte de désambiguïsation de traces mnésiques similaires afin d'éviter des phénomènes d'interférence. Le complètement de pattern correspond, quant à lui, à la capacité de récupérer une trace mnésique dans son intégralité à partir d'un indice partiel ou dégradé. Ces deux phénomènes sont complémentaires (Rolls, 2013). Ces nouveaux neurones pourraient alors permettre, lors d'un rappel à long terme, de coordonner la récupération de la trace mnésique encodée lors de l'acquisition pour l'utiliser et la mettre à jour (Nakashiba et al., 2012). On peut donc penser que leur intégration au réseau pendant l'encodage des informations contextuelles liées à notre apprentissage de conditionnement de peur pourrait se trouver facilitée pendant le SP. Chez les animaux testés à long terme et privés de SP post-apprentissage, il n'y a pas d'activation d'un réseau distribué et bien organisé comme on a pu l'observer chez les animaux contrôles. Il est donc possible qu'il y ait, pendant le SP, mise en place de "marquages synaptiques" (*synaptic tagging*) dans les nouveaux neurones recrutés pendant l'encodage de la tâche, permettant à ces neurones d'agir comme un index propre à renforcer les traces synaptiques d'intérêt et guidant leur réorganisation au niveau systémique (Frey et Frey, 2008 ; Frey et Morris, 1997).

D'après cette hypothèse, lors de la phase tardive de la plasticité à long terme, l'activation de certaines kinases telles que PKMξ permettrait l'établissement d'un marquage moléculaire synaptique (*synaptic tagging*) permettant l'adressage aux seules synapses activées, des molécules synthétisées dans le noyau suite à l'activation des cascades de signaux intracellulaires lors de la LTP/LTD. Ce mécanisme assurerait ainsi la spécificité des mécanismes de plasticité à long terme, mais pourrait aussi guider les réactivations des neurones impliqués dans une trace mnésique lors de la consolidation mnésique (Barco et al., 2008). Une étude récente a montré que ce *tagging* précoce à la fois des neurones hippocampiques et néocorticaux est indispensable à la formation d'une mémoire associative stable sur le long terme (30 jours) (Lesburguères et al., 2011).Or, le SP constituerait un état privilégié pour la mise en place de processus de maintien de la plasticité à long terme (phase tardive) (Ravassard et al., 2014 ; Ribeiro et al., 2002). Le SP pourrait donc faciliter la mise en place des marquages synaptiques dans les nouveaux neurones du GD. Leur intégration au réseau de la mémoire pourrait guider ensuite toute la consolidation systémique à l'origine de la formation du réseau de la mémoire à long terme.

2.2.2. Quid de la MCH ?

La MCH pourrait-elle participer à l'activation déterminante du GD pendant le SP ? Précédemment, nous avons émis l'hypothèse que la MCH pourrait favoriser la consolidation synaptique en protégeant les traces mnésiques des interférences. La MCH semble en effet diminuer la connectivité entre CA1 et CA3 et la très grande innervation de l'aire CA3 par les fibres à MCH suggère que la connectivité entre le GD et CA3 soit également diminuée par la MCH via une action de la MCH dans CA3 sur les fibres moussues. Toutefois, il ne semble pas y avoir de fibres à MCH dans le GD bien que les transcrits du MCH-R1 soient présents dans les cellules granulaires du GD(Bittencourt et al., 1992).D'autre part, nous n'avons examiné l'effet de la MCH que sur les synapses SC-CA1 et la grande variété d'effets qu'exerce la MCH sur la transmission glutamatergique dans différentes structures nous amène à être prudent quant à l'effet qu'elle pourrait exercer sur la transmission entre le GD et CA3. Il est donc difficile de se prononcer sur une éventuelle action de la MCH sur le GD.

Enfin, nos résultats chez les souris MCH/ataxine3 semblent suggérer que, même si la MCH participerait à la consolidation synaptique dans l'hippocampe, son rôle ne serait pas essentiel aux effets facilitateurs du SP sur la consolidation.

Conclusion et perspectives

Les travaux de cette thèse ont permis de mieux appréhender les mécanismes par lesquels le SP exerce un effet facilitateur sur la mémoire en privilégiant d'abord une approche indirecte, en se focalisant sur l'effet d'un neuropeptide libéré pendant le SP puis, une approche plus directe basée sur une privation sélective de SP. Par l'étude de la MCH, nous avons montré que les effets du SP sur la consolidation mnésique sont complexes et requièrent la participation de nombreux acteurs. Si la MCH pourrait contribuer à la consolidation mnésique en favorisant la mise en place des processus de consolidation synaptique et systémique des traces mnésiques dans l'hippocampe, son action ne semble pas nécessaire à leur instauration. En revanche, nous avons montré que les épisodes de SP suivant un apprentissage, en favorisant des mécanismes de consolidation synaptique précoces dans le GD pourraient jouer un rôle essentiel dans l'établissement des réseaux corticaux responsables du stockage à long terme de l'information. Enfin, nous avons émis l'hypothèse d'un rôle nouveau des épisodes de SP de fin de nuit, qui pourraient cette fois, non pas agir sur la consolidation, mais l'encodage de nouveaux apprentissages le lendemain en augmentant transitoirement les performances des animaux en mémoire de travail. Nos travaux de thèse ont donc permis d'étudier le rôle du SP sur toutes les étapes de la mémorisation : l'acquisition (mémoire de travail), la consolidation à court terme et le stockage à long terme des informations.

Nos résultats ont également soulevé certaines questions, et certaines hypothèses faites au cours de cette discussion nécessiteront d'être testées dans le futur. Ce sont certaines de ces perspectives que nous nous proposons de développer ici.

La MCH module-elle la transmission glutamatergique uniquement via la gliotransmission ?

La MCH possède dans l'hippocampe des récepteurs sur les astrocytes comme nous l'avons montré dans chapitre II mais il existe aussi des récepteurs MCH-R1 sur les neurones hippocampiques (Bittencourt, 2011 ; Croizier et al., 2013, résultats non publiés de JM Petit). Ceux-ci pourraient donc aussi avoir un rôle sur la transmission glutamatergique. Afin d'établir de manière directe, la contribution de la modulation de la gliotransmission aux effets de la MCH sur la transmission glutamatergique, nous pourrions utiliser des souris génétiquement modifiées chez lesquelles la gliotransmission est inhibée, les souris dn-SNARE (Pascual et

al., 2005). Les SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor)* sont des protéines transmembranaires qui permettent les réactions de fusion membranaire au cours du transport vésiculaire et d'exocytose (Jahn et Fasshauer, 2012). Chez les souris dn-SNARE, l'expression des SNARE non fonctionnelles (*dominant negative* (dn)-SNARE) spécifiquement dans les astrocytes est sous contrôle d'un promoteur activée par la présence de doxycycline. En caractérisant la transmission glutamatergique sur des tranches d'hippocampe de souris dn-SNARE, nous pourrions évaluer directement la contribution de la gliotransmission dans l'effet dépressif induit par la MCH. Enfin, des résultats suggèrent que la gliotransmission est impliquée dans la plasticité à court terme (Sibille et al., 2014). Nous pourrions donc étudier la plasticité et la mémoire à court terme chez les souris dn-SNARE afin de déterminer si le phénotype de ces souris correspond à celui des souris MCH/ataxine3. Cela suggérait que l'effet du SP sur les apprentissages du lendemain est relayé par un effet de la MCH sur la gliotransmission dans l'hippocampe.

Quel est le rôle de la MCH dans les processus de consolidation précoces qui semblent prendre place au cours du SP post-apprentissage ?

Notre projet développé dans le chapitre III suggère que des mécanismes de consolidation synaptique précoces ont lieu pendant le SP post-apprentissage. Afin de déterminer si la modulation de la transmission et de la plasticité synaptique due à la libération de MCH contribue à ces processus précoces, nous pourrions dupliquer les expériences comportementales et immunohistochimiques de notre troisième étude chez les souris MCH/ataxine3. Le sommeil de ces souris étant peu altéré, nous pourrions donc étudier l'effet de l'absence de neurones à MCH pendant le SP post-apprentissage chez ces souris. De même, on peut imaginer utiliser des souris dn-SNARE, dont on inactiverait la gliotransmission pendant notre période de privation de SP. Une alternative à l'utilisation de souris MCH/ataxine3 ou dn-SNARE pourrait être le développement d'un modèle de souris transgénique permettant l'inhibition, contrôlée par optogénétique, des neurones à MCH et ce spécifiquement pendant le SP post-apprentissage.

L'intégration des nouveaux neurones du GD après l'apprentissage est-elle dépendante du SP post-apprentissage et quelle est sa contribution dans la formation des réseaux corticaux de la mémoire à long terme ?

La forte corrélation que nous observons entre l'activité du GD et les quantités de SP lors du rappel à court terme pourrait être le reflet de l'intégration de nouveaux neurones du GD. Nous

pourrions ainsi effectuer une injection d'un rétrovirus marqué avec un colorant fluorescent qui n'est exprimé que dans les nouveaux neurones (Laplagne et al., 2006) deux semaines (période où les nouveaux neurones présentent des propriétés électrophysiologiques propices à leur intégration au réseau) avant l'apprentissage afin de déterminer si ce sont bien ces nouveaux neurones qui ont leur activité corrélée aux quantités de SP. D'autre part, afin de déterminer quels mécanismes de consolidation synaptique pourrait être modulés pendant le SP post-apprentissage dans le GD, nous pourrions sacrifier nos souris à l'issue du test à long ou court terme du conditionnement contextuel à la peur afin de réaliser des enregistrements électrophysiologiques sur des tranches d'hippocampe. Pour déterminer si les synapses ont subi une LTP ou LTD, nous pourrions calculer le rapport de la réponse synaptique des récepteurs AMPA (AMPAR) par rapport à celle des récepteurs NMDA (NMDAR), ces récepteurs étant essentiels à ces deux phénomènes. Le rapport AMPAR/NMDAR augmente par rapport au niveau basal (sans apprentissage) lorsqu'il y a LTP et correspond à l'augmentation de l'insertion de AMPAR dans la membrane post-synaptique. A l'inverse, la LTD est caractérisée par un rapport AMPAR/NMDAR qui diminue par rapport au niveau basal, ce qui correspond cette fois à la diminution de AMPAR au niveau de la synapse due à leur endocytose (Clem et Huganir, 2010). Le calcul des rapports AMPAR/NMDAR au niveau des nouveaux neurones chez les souris privées et contrôles permettrait de savoir la contribution de la neurogenèse du GD et du SP post-apprentissage dans les mécanismes de consolidation synaptique et dans la mise en place des réseaux corticaux de la mémoire à long terme.

Bibliographie

Abbott, L.F., and Regehr, W.G. (2004). Synaptic computation. Nature *431*, 796–803.

Abel, T., Havekes, R., Saletin, J.M., and Walker, M.P. (2013). Sleep, plasticity and memory from molecules to whole-brain networks. Curr. Biol. CB *23*, R774–R788.

Adamantidis, A., and de Lecea, L. (2009). A role for Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. Peptides *30*, 2066–2070.

Adamantidis, A., Thomas, E., Foidart, A., Tyhon, A., Coumans, B., Minet, A., Tirelli, E., Seutin, V., Grisar, T., and Lakaye, B. (2005). Disrupting the melanin-concentrating hormone receptor 1 in mice leads to cognitive deficits and alterations of NMDA receptor function. Eur. J. Neurosci. *21*, 2837–2844.

Adamantidis, A., Salvert, D., Goutagny, R., Lakaye, B., Gervasoni, D., Grisar, T., Luppi, P.-H., and Fort, P. (2008). Sleep architecture of the melanin-concentrating hormone receptor 1-knockout mice. Eur. J. Neurosci. *27*, 1793–1800.

Ahmed, O.J., McFarland, J., and Kumar, A. (2008). Reactivation in ventral striatum during hippocampal ripples: Evidence for the binding of reward and spatial memories? J. Neurosci. *28*, 9895–9897.

Ahnaou, A., Drinkenburg, W.H.I.M., Bouwknecht, J.A., Alcazar, J., Steckler, T., and Dautzenberg, F.M. (2008). Blocking melanin-concentrating hormone MCH1 receptor affects rat sleep-wake architecture. Eur. J. Pharmacol. *579*, 177–188.

Allen, C., and Stevens, C.F. (1994). An evaluation of causes for unreliability of synaptic transmission. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 10380–10383.

Alon, T., and Friedman, J.M. (2006). Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 389–397.

Amaral, D.G., and Lavenex, P. (2006). Hippocampal neuroanatomy. In The Hippocampus Book, (Oxford University Press), pp. 37–114.

Andersen, P. (1987). Long-term potentiation: outstanding problems. In The Neural and Molecular Bases of Learning, (UK: Wiley), pp. 239–262.

Andersen, P., Bliss, T.V., and Skrede, K.K. (1971). Lamellar organization of hippocampal pathways. Exp. Brain Res. *13*, 222–238.

Atkinson, R.C., and Shiffrin, R.M. (1968). Human Memory: A Proposed System and its Control Processes. In Psychology of Learning and Motivation, Kenneth W. Spence and Janet Taylor Spence, ed. (Academic Press), pp. 89–195.

Baddeley, A. (2001). The concept of episodic memory. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B *356*, 1345–1350.

Baddeley, A. (2012). Working Memory: Theories, Models, and Controversies. In Annual Review of Psychology, Vol 63, S.T. Fiske, D.L. Schacter, and S.E. Taylor, eds. (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 1–29.

Baddeley, A.D., and Hitch, G. (1974). Working Memory. In Psychology of Learning and Motivation, Gordon H. Bower, ed. (Academic Press), pp. 47–89.

Baeg, E.H., Kim, Y.B., Huh, K., Mook-Jung, I., Kim, H.T., and Jung, M.W. (2003). Dynamics of Population Code for Working Memory in the Prefrontal Cortex. Neuron *40*, 177–188.

Barco, A., Lopez de Armentia, M., and Alarcon, J.M. (2008). Synapse-specific stabilization of plasticity processes: the synaptic tagging and capture hypothesis revisited 10 years later. Neurosci. Biobehav. Rev. *32*, 831–851.

Barnes, C.A. (1995). Involvement of LTP in memory: are we "searching under the street light"? Neuron *15*, 751–754.

Barrionuevo, G., Schottler, F., and Lynch, G. (1980). The effects of repetitive low frequency stimulation on control and "potentiated" synaptic responses in the hippocampus. Life Sci. *27*, 2385–2391.

Bayer, L., Risold, P.Y., Griffond, B., and Fellmann, D. (1999). Rat diencephalic neurons producing melanin-concentrating hormone are influenced by ascending cholinergic projections. Neuroscience *91*, 1087–1101.

Beattie, E.C., Carroll, R.C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., and Malenka, R.C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. Nat. Neurosci. *3*, 1291–1300.

Benchenane, K., Peyrache, A., Khamassi, M., Tierney, P.L., Gioanni, Y., Battaglia, F.P., and Wiener, S.I. (2010). Coherent Theta Oscillations and Reorganization of Spike Timing in the Hippocampal- Prefrontal Network upon Learning. Neuron *66*, 921–936.

Betz, W.J. (1970). Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. J. Physiol. *206*, 629–644.

Bienenstock, E.L., Cooper, L.N., and Munro, P.W. (1982). Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *2*, 32–48.

Bittencourt, J.C. (2011). Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. Gen. Comp. Endocrinol. *172*, 185–197.

Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W., and Sawchenko, P.E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. J. Comp. Neurol. *319*, 218–245.

Bliss, T.V.P., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature *361*, 31–39.

Bliss, T.V.P., and Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. *232*, 331–356.

Blouin, A.M., Fried, I., Wilson, C.L., Staba, R.J., Behnke, E.J., Lam, H.A., Maidment, N.T., Karlsson, K.Æ., Lapierre, J.L., and Siegel, J.M. (2013). Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. Nat. Commun. *4*, 1547.

Boehm, J., Kang, M.-G., Johnson, R.C., Esteban, J., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2006). Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. Neuron *51*, 213–225.

Boissard, R., Gervasoni, D., Schmidt, M.H., Barbagli, B., Fort, P., and Luppi, P.-H. (2002). The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. Eur. J. Neurosci. *16*, 1959–1973.

Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., and Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. Nature *400*, 671–675.

Born, J., and Feld, G.B. (2012). Sleep to upscale, sleep to downscale: balancing homeostasis and plasticity. Neuron *75*, 933–935.

Borowsky, B., Durkin, M.M., Ogozalek, K., Marzabadi, M.R., DeLeon, J., Lagu, B., Heurich, R., Lichtblau, H., Shaposhnik, Z., Daniewska, I., et al. (2002). Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. Nat. Med. *8*, 825–830.

Bostock, E., Muller, R.U., and Kubie, J.L. (1991). Experience-dependent modifications of hippocampal place cell firing. Hippocampus *1*, 193–205.

Bourgin, P., Huitrón-Résendiz, S., Spier, A.D., Fabre, V., Morte, B., Criado, J.R., Sutcliffe, J.G., Henriksen, S.J., and de Lecea, L. (2000). Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 7760–7765.

Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., and Kandel, E.R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *5*, 365–374.

Boutin, J.A., Suply, T., Audinot, V., Rodriguez, M., Beauverger, P., Nicolas, J.-P., Galizzi, J.-P., and Fauchère, J.-L. (2002). Melanin-concentrating hormone and its receptors: state of the art. Can. J. Physiol. Pharmacol. *80*, 388–395.

Bozon, B., Kelly, A., Josselyn, S.A., Silva, A.J., Davis, S., and Laroche, S. (2003a). MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *358*, 805–814.

Bozon, B., Davis, S., and Laroche, S. (2003b). A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. Neuron *40*, 695–701.

Bradley, M.M., Greenwald, M.K., Petry, M.C., and Lang, P.J. (1992). Remembering pictures: pleasure and arousal in memory. J. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn. *18*, 379–390.

Brager, D.H., Cai, X., and Thompson, S.M. (2003). Activity-dependent activation of presynaptic protein kinase C mediates post-tetanic potentiation. Nat. Neurosci. *6*, 551–552.

Bruel-Jungerman, E., Lucassen, P.J., and Francis, F. (2011). Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. Behav. Brain Res. *221*, 379–388.

Brun, V.H., Otnæss, M.K., Molden, S., Steffenach, H.-A., Witter, M.P., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2002). Place Cells and Place Recognition Maintained by Direct Entorhinal-Hippocampal Circuitry. Science *296*, 2243–2246.

Buchanan, T.W. (2007). Retrieval of emotional memories. Psychol. Bull. *133*, 761–779.

Buonomano, D.V., and Merzenich, M.M. (1995). Temporal information transformed into a spatial code by a neural network with realistic properties. Science *267*, 1028–1030.

Burdakov, D., Gerasimenko, O., and Verkhratsky, A. (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. J. Neurosci. *25*, 2429–2433.

Burgess, N. (2006). Spatial memory: how egocentric and allocentric combine. Trends Cogn. Sci. *10*, 551–557.

Burgess, N., Maguire, E.A., and O'Keefe, J. (2002). The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. Neuron *35*, 625–641.

Burrone, J., and Murthy, V.N. (2003). Synaptic gain control and homeostasis. Curr. Opin. Neurobiol. *13*, 560–567.

Buzsáki, G. (1996). The hippocampo-neocortical dialogue. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *6*, 81–92.

Buzsáki, G. (1998). Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. J. Sleep Res. *7 Suppl 1*, 17–23.

Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. Neuron *33*, 325–340.

Cahill, L., and McGaugh, J.L. (1995). A Novel Demonstration of Enhanced Memory Associated with Emotional Arousal. Conscious. Cogn. *4*, 410–421.

Cenquizca, L.A., and Swanson, L.W. (2006). Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. J. Comp. Neurol. *497*, 101–114.

Cesca, F., Baldelli, P., Valtorta, F., and Benfenati, F. (2010). The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. Prog. Neurobiol. *91*, 313–348.

Chambers, J., Ames, R.S., Bergsma, D., Muir, A., Fitzgerald, L.R., Hervieu, G., Dytko, G.M., Foley, J.J., Martin, J., Liu, W.S., et al. (1999). Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. Nature *400*, 261–265.

Chauveau, F., Laudereau, K., Libourel, P.A., Gervasoni, D., Thomasson, J., Poly, B., Pierard, C., and Beracochea, D. (2014). Ciproxifan improves working memory through increased prefrontal cortex neural activity in sleep-restricted mice. Neuropharmacology *85*, 349–356.

Chauvette, S., Seigneur, J., and Timofeev, I. (2012). Sleep oscillations in the thalamocortical system induce long-term neuronal plasticity. Neuron *75*, 1105–1113.

Chi, P., Greengard, P., and Ryan, T.A. (2003). Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. Neuron *38*, 69–78.

Churchwell, J.C., Morris, A.M., Musso, N.D., and Kesner, R.P. (2010). Prefrontal and hippocampal contributions to encoding and retrieval of spatial memory. Neurobiol. Learn. Mem. *93*, 415–421.

Ciocchi, S., Herry, C., Grenier, F., Wolff, S.B.E., Letzkus, J.J., Vlachos, I., Ehrlich, I., Sprengel, R., Deisseroth, K., Stadler, M.B., et al. (2010). Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. Nature *468*, 277–282.

Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *33*, 18–41.

Clarke, J.R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., and Delgado-García, J.M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 2652–2657.

Clayton, N.S., Griffiths, D.P., Emery, N.J., and Dickinson, A. (2001). Elements of episodic–like memory in animals. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *356*, 1483–1491.

Clem, R.L., and Barth, A. (2006). Pathway-specific trafficking of native AMPARs by in vivo experience. Neuron *49*, 663–670.

Clem, R.L., and Huganir, R.L. (2010). Calcium-permeable AMPA receptor dynamics mediate fear memory erasure. Science *330*, 1108–1112.

Clément, O., Sapin, E., Libourel, P.-A., Arthaud, S., Brischoux, F., Fort, P., and Luppi, P.-H. (2012). The lateral hypothalamic area controls paradoxical (REM) sleep by means of descending projections to brainstem GABAergic neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *32*, 16763–16774.

Cohen, N.J., and Squire, L.R. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. Science *210*, 207–210.

Conductier, G., Brau, F., Viola, A., Langlet, F., Ramkumar, N., Dehouck, B., Lemaire, T., Chapot, R., Lucas, L., Rovère, C., et al. (2013). Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume. Nat. Neurosci. *16*, 845–847.

Conway, M.A., Anderson, S.J., Larsen, S.F., Donnelly, C.M., McDaniel, M.A., McClelland, A.G., Rawles, R.E., and Logie, R.H. (1994). The formation of flashbulb memories. Mem. Cognit. *22*, 326–343.

Cooper, L.N., and Bear, M.F. (2012). The BCM theory of synapse modification at 30: interaction of theory with experiment. Nat. Rev. Neurosci. *13*, 798–810.

Costenla, A.R., Cunha, R.A., and de Mendonça, A. (2010). Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. J. Alzheimers Dis. JAD *20 Suppl 1*, S25–S34.

Cotta-Grand, N., Rovère, C., Guyon, A., Cervantes, A., Brau, F., and Nahon, J.-L. (2009). Melanin-concentrating hormone induces neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells through p53 and MAPKinase signaling pathways. Peptides *30*, 2014–2024.

Croizier, S., Franchi-Bernard, G., Colard, C., Poncet, F., La Roche, A., and Risold, P.-Y. (2010). A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin-concentrating hormone systems. PloS One *5*, e15471.

Croizier, S., Cardot, J., Brischoux, F., Fellmann, D., Griffond, B., and Risold, P.Y. (2013). The vertebrate diencephalic MCH system: a versatile neuronal population in an evolving brain. Front. Neuroendocrinol. *34*, 65–87.

Cunha, R.A. (2001). Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. Neurochem. Res. *26*, 979–991.

Curtis, C.E., Rao, V.Y., and D'Esposito, M. (2004). Maintenance of Spatial and Motor Codes during Oculomotor Delayed Response Tasks. J. Neurosci. *24*, 3944–3952.

Dan, Y., and Poo, M.-M. (2006). Spike timing-dependent plasticity: from synapse to perception. Physiol. Rev. *86*, 1033–1048.

Datta, S., Siwek, D.F., Patterson, E.H., and Cipolloni, P.B. (1998). Localization of pontine PGO wave generation sites and their anatomical projections in the rat. Synap. N. Y. N *30*, 409–423.

Datta, S., Li, G., and Auerbach, S. (2008). Activation of phasic pontine-wave generator in the rat: a mechanism for expression of plasticity-related genes and proteins in the dorsal hippocampus and amygdala. Eur. J. Neurosci. *27*, 1876–1892.

Davidson, R.J., Pizzagalli, D., Nitschke, J.B., and Putnam, K. (2002). Depression: perspectives from affective neuroscience. Annu. Rev. Psychol. *53*, 545–574.

Dayan, P., and Willshaw, D.J. (1991). Optimising synaptic learning rules in linear associative memories. Biol. Cybern. *65*, 253–265.

Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J.L., and Levens, N. (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes. *26*, 1289–1295.

Dement, W., and Kleitman, N. (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. *9*, 673–690.

Derkach, V., Barria, A., and Soderling, T.R. (1999). Ca2+/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 3269–3274.

D'Esposito, M. (2007). From cognitive to neural models of working memory. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. *362*, 761–772.

Dias, R.B., Rombo, D.M., Ribeiro, J.A., Henley, J.M., and Sebastião, A.M. (2013). Adenosine: setting the stage for plasticity. Trends Neurosci. *36*, 248–257.

Diekelmann, S., and Born, J. (2010). The memory function of sleep. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 114–126.

Dolcos, F., LaBar, K.S., and Cabeza, R. (2004). Interaction between the amygdala and the medial temporal lobe memory system predicts better memory for emotional events. Neuron *42*, 855–863.

Dolcos, F., LaBar, K.S., and Cabeza, R. (2005). Remembering one year later: role of the amygdala and the medial temporal lobe memory system in retrieving emotional memories. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 2626–2631.

Van Dongen, E.V., Thielen, J.-W., Takashima, A., Barth, M., and Fernández, G. (2012). Sleep supports selective retention of associative memories based on relevance for future utilization. PloS One *7*, e43426.

Drachman, D.A., and Arbit, J. (1966). Memory and the hippocampal complex. II. Is memory a multiple process? Arch. Neurol. *15*, 52–61.

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

Dudchenko, P.A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. Neurosci. Biobehav. Rev. *28*, 699–709.

Dudek, S.M., and Bear, M.F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 4363–4367.

Dunnett, S.B., Nathwani, F., and Brasted, P.J. (1999). Medial prefrontal and neostriatal lesions disrupt performance in an operant delayed alternation task in rats. Behav. Brain Res. *106*, 13–28.

Dunwiddie, T.V., and Masino, S.A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annu. Rev. Neurosci. *24*, 31–55.

Eacott, M.J., and Norman, G. (2004). Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 1948–1953.

Easton, A., Webster, L.A.D., and Eacott, M.J. (2012). The episodic nature of episodic-like memories. Learn. Mem. *19*, 146–150.

Ego-Stengel, V., and Wilson, M.A. (2010). Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. Hippocampus *20*, 1–10.

Ehrlich, I., and Malinow, R. (2004). Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 916–927.

Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., and Malinow, R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 4176–4181.

Eichenbaum, H. (2004). Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. Neuron *44*, 109–120.

Eichenbaum, H., and Cohen, N.J. (2014). Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function? Neuron *83*, 764–770.

Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., and Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? Neuron *23*, 209–226.

Eschenko, O., Mölle, M., Born, J., and Sara, S.J. (2006). Elevated sleep spindle density after learning or after retrieval in rats. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 12914–12920.

Eschenko, O., Ramadan, W., Mölle, M., Born, J., and Sara, S.J. (2008). Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *15*, 222–228.

Esteban, J.A., Shi, S.-H., Wilson, C., Nuriya, M., Huganir, R.L., and Malinow, R. (2003). PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. Nat. Neurosci. *6*, 136–143.

Euston, D.R., Tatsuno, M., and McNaughton, B.L. (2007). Fast-forward playback of recent memory sequences in prefrontal cortex during sleep. Science *318*, 1147–1150.

Euston, D.R., Gruber, A.J., and McNaughton, B.L. (2012). The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making. Neuron *76*, 1057–1070.

Fanselow, M.S. (1980). Conditional and unconditional components of post-shock freezing. Pavlov. J. Biol. Sci. Off. J. Pavlov. *15*, 177–182.

Finnie, P.S.B., and Nader, K. (2012). The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. Neurosci. Biobehav. Rev. *36*, 1667–1707.

Fioravante, D., and Regehr, W.G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. Curr. Opin. Neurobiol. *21*, 269–274.

Fischer, S., and Born, J. (2009). Anticipated reward enhances offline learning during sleep. J. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn. *35*, 1586–1593.

Fort, P., Salvert, D., Hanriot, L., Jego, S., Shimizu, H., Hashimoto, K., Mori, M., and Luppi, P.-H. (2008). The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. Neuroscience *155*, 174–181.

Foster, D.J., and Wilson, M.A. (2006). Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state. Nature *440*, 680–683.

Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. Nat. Rev. Neurosci. *6*, 119–130.

Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., and Silva, A.J. (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. Science *304*, 881–883.

Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. Hippocampus *6*, 347–470.

Frey, S., and Frey, J.U. (2008). "Synaptic tagging" and "cross-tagging" and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation. Prog. Brain Res. *169*, 117–143.

Frey, U., and Morris, R.G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. Nature *385*, 533–536.

Frey, U., Krug, M., Reymann, K.G., and Matthies, H. (1988). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. Brain Res. *452*, 57–65.

Funahashi, S., Bruce, C.J., and Goldman-Rakic, P.S. (1989). Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. J. Neurophysiol. *61*, 331–349.

Funahashi, S., Bruce, C.J., and Goldman-Rakic, P.S. (1993). Dorsolateral prefrontal lesions and oculomotor delayed-response performance: evidence for mnemonic "scotomas." J. Neurosci. *13*, 1479–1497.

Fuster, J.M., and Alexander, G.E. (1971). Neuron Activity Related to Short-Term Memory. Science *173*, 652–654.

Gale, G.D., Anagnostaras, S.G., Godsil, B.P., Mitchell, S., Nozawa, T., Sage, J.R., Wiltgen, B., and Fanselow, M.S. (2004). Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories across the Adult Lifetime of Rats. J. Neurosci. *24*, 3810–3815.

Gallopin, T., Fort, P., Eggermann, E., Cauli, B., Luppi, P.H., Rossier, J., Audinat, E., Mühlethaler, M., and Serafin, M. (2000). Identification of sleep-promoting neurons in vitro. Nature *404*, 992–995.

Gallopin, T., Luppi, P.-H., Cauli, B., Urade, Y., Rossier, J., Hayaishi, O., Lambolez, B., and Fort, P. (2005). The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in the ventrolateral preoptic nucleus. Neuroscience *134*, 1377–1390.

Galvez, R., Mesches, M.H., and McGaugh, J.L. (1996). Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock stimulation. Neurobiol. Learn. Mem. *66*, 253–257.

Gao, X.-B. (2009). Electrophysiological effects of MCH on neurons in the hypothalamus. Peptides *30*, 2025–2030.

Ge, S., Yang, C.-H., Hsu, K.-S., Ming, G.-L., and Song, H. (2007). A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. Neuron *54*, 559–566.

Giachello, C.N.G., Fiumara, F., Giacomini, C., Corradi, A., Milanese, C., Ghirardi, M., Benfenati, F., and Montarolo, P.G. (2010). MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity. J. Cell Sci. *123*, 881–893.

Giese, K.P., Fedorov, N.B., Filipkowski, R.K., and Silva, A.J. (1998). Autophosphorylation at Thr286 of the α Calcium-Calmodulin Kinase II in LTP and Learning. Science *279*, 870–873.

Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S.I., Buzsáki, G., and Zugaro, M.B. (2009). Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. Nat. Neurosci. *12*, 1222–1223.

Glanzman, D.L. (2013). PKM and the maintenance of memory. F1000 Biol. Rep. *5*.

Gomori, A., Ishihara, A., Ito, M., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Ito, M., Tanaka, T., Tokita, S., Moriya, M., et al. (2003). Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *284*, E583–E588.

Goosens, K.A., and Maren, S. (2001). Contextual and Auditory Fear Conditioning are Mediated by the Lateral, Basal, and Central Amygdaloid Nuclei in Rats. Learn. Mem. *8*, 148–155.

Goshen, I., Brodsky, M., Prakash, R., Wallace, J., Gradinaru, V., Ramakrishnan, C., and Deisseroth, K. (2011). Dynamics of retrieval strategies for remote memories. Cell *147*, 678–689.

Greenspan, R.J., Tononi, G., Cirelli, C., and Shaw, P.J. (2001). Sleep and the fruit fly. Trends Neurosci. *24*, 142–145.

Grosmark, A.D., Mizuseki, K., Pastalkova, E., Diba, K., and Buzsáki, G. (2012). REM sleep reorganizes hippocampal excitability. Neuron *75*, 1001–1007.

Guyon, A., Conductier, G., Rovere, C., Enfissi, A., and Nahon, J.-L. (2009). Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. Peptides *30*, 2031–2039.

De Haan, M., Mishkin, M., Baldeweg, T., and Vargha-Khadem, F. (2006). Human memory development and its dysfunction after early hippocampal injury. Trends Neurosci. *29*, 374–381.

Van Haaren, F., van Zijderveld, G., van Hest, A., de Bruin, J.P., van Eden, C.G., and van de Poll, N.E. (1988). Acquisition of conditional associations and operant delayed spatial response alternation: effects of lesions in the medial prefrontal cortex. Behav. Neurosci. *102*, 481–488.

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. Nature *436*, 801–806.

Hagewoud, R., Havekes, R., Novati, A., Keijser, J.N., Van der Zee, E.A., and Meerlo, P. (2010). Sleep deprivation impairs spatial working memory and reduces hippocampal AMPA receptor phosphorylation. J. Sleep Res. *19*, 280–288.

Halassa, M.M., Florian, C., Fellin, T., Munoz, J.R., Lee, S.-Y., Abel, T., Haydon, P.G., and Frank, M.G. (2009). Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. Neuron *61*, 213–219.

Hanriot, L., Camargo, N., Courau, A.C., Leger, L., Luppi, P.H., and Peyron, C. (2007). Characterization of the melanin-concentrating hormone neurons activated during paradoxical sleep hypersomnia in rats. J. Comp. Neurol. *505*, 147–157.

Harney, S.C., Rowan, M., and Anwyl, R. (2006). Long-term depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on activation of metabotropic glutamate receptors and is altered to long-term potentiation by low intracellular calcium buffering. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 1128–1132.

Hassani, O.K., Lee, M.G., and Jones, B.E. (2009). Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 2418–2422.

Hasselmo, M.E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. Curr. Opin. Neurobiol. *16*, 710–715.

Hasselmo, null (1999). Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. Trends Cogn. Sci. *3*, 351–359.

Hatfield, T., and McGaugh, J.L. (1999). Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. Neurobiol. Learn. Mem. *71*, 232–239.

Hawes, B.E., Kil, E., Green, B., O'Neill, K., Fried, S., and Graziano, M.P. (2000). The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. Endocrinology *141*, 4524–4532.

Hebb, D.O. (2002). The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory (Psychology Press).

Helmstetter, F.J., and Bellgowan, P.S. (1994). Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. Behav. Neurosci. *108*, 1005–1009.

Van der Helm, E., Yao, J., Dutt, S., Rao, V., Saletin, J.M., and Walker, M.P. (2011). REM sleep depotentiates amygdala activity to previous emotional experiences. Curr. Biol. CB *21*, 2029–2032.

Hennevin, E., Hars, B., Maho, C., and Bloch, V. (1995). Processing of learned information in paradoxical sleep: relevance for memory. Behav. Brain Res. *69*, 125–135.

Horne, J.A. (1985). Sleep function, with particular reference to sleep deprivation. Ann. Clin. Res. *17*, 199–208.

Horst, N.K., and Laubach, M. (2009). The role of rat dorsomedial prefrontal cortex in spatial working memory. Neuroscience *164*, 444–456.

Hosoi, N., Holt, M., and Sakaba, T. (2009). Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. Neuron *63*, 216–229.

Hu, P., Stylos-Allan, M., and Walker, M.P. (2006). Sleep facilitates consolidation of emotional declarative memory. Psychol. Sci. *17*, 891–898.

Huerta, P.T., and Lisman, J.E. (1995). Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. Neuron *15*, 1053–1063.

Huerta, P.T., Sun, L.D., Wilson, M.A., and Tonegawa, S. (2000). Formation of Temporal Memory Requires NMDA Receptors within CA1 Pyramidal Neurons. Neuron *25*, 473–480.

Hulme, S.R., Jones, O.D., and Abraham, W.C. (2013). Emerging roles of metaplasticity in behaviour and disease. Trends Neurosci. *36*, 353–362.

Hunsaker, M.R., and Kesner, R.P. (2008). Dissociations across the dorsal–ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. Neurobiol. Learn. Mem. *89*, 61–69.

Ikegaya, Y., Abe, K., Saito, H., and Nishiyama, N. (1995). Medial amygdala enhances synaptic transmission and synaptic plasticity in the dentate gyrus of rats in vivo. J. Neurophysiol. *74*, 2201–2203.

Jahn, R., and Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. Nature *490*, 201–207.

James, W. (1890). Principles of psychology (New York: Holt).

Jego, S., Glasgow, S.D., Herrera, C.G., Ekstrand, M., Reed, S.J., Boyce, R., Friedman, J., Burdakov, D., and Adamantidis, A.R. (2013). Optogenetic identification of a rapid eye movement sleep modulatory circuit in the hypothalamus. Nat. Neurosci. *16*, 1637–1643.

Jeneson, A., and Squire, L.R. (2012). Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. Learn. Mem. *19*, 15–25.

Jenkins, J.G., and Dallenbach, K.M. (1924). Obliviscence during Sleep and Waking. Am. J. Psychol. *35*, 605.

Ji, D., and Wilson, M.A. (2007). Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. Nat. Neurosci. *10*, 100–107.

Johansen, J.P., Cain, C.K., Ostroff, L.E., and LeDoux, J.E. (2011). MOLECULAR MECHANISMS OF FEAR LEARNING AND MEMORY. Cell *147*, 509–524.

Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, A., Bliss, T.V., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., and Davis, S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. Nat. Neurosci. *4*, 289–296.

Jouvet, M., and Michel, F. (1959). [Electromyographic correlations of sleep in the chronic decorticate & mesencephalic cat]. Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil. *153*, 422–425.

Jouvet, M., Michel, F., and Courjon, J. (1959). [On a stage of rapid cerebral electrical activity in the course of physiological sleep]. Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil. *153*, 1024–1028.

Jung, M.W., Wiener, S.I., and McNaughton, B.L. (1994). Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 7347–7356.

Jung, M.W., Qin, Y., McNaughton, B.L., and Barnes, C.A. (1998). Firing characteristics of deep layer neurons in prefrontal cortex in rats performing spatial working memory tasks. Cereb. Cortex *8*, 437–450.

Jung, M.W., Qin, Y., Lee, D., and Mook-Jung, I. (2000). Relationship among Discharges of Neighboring Neurons in the Rat Prefrontal Cortex During Spatial Working Memory Tasks. J. Neurosci. *20*, 6166–6172.

Kametani, H., and Kawamura, H. (1991). Circadian rhythm of cortical acetylcholine release as measured by in vivo microdialysis in freely moving rats. Neurosci. Lett. *132*, 263–266.

Kaouane, N., Porte, Y., Vallée, M., Brayda-Bruno, L., Mons, N., Calandreau, L., Marighetto, A., Piazza, P.V., and Desmedt, A. (2012). Glucocorticoids can induce PTSD-like memory impairments in mice. Science *335*, 1510–1513.

Karashima, A., Katayama, N., and Nakao, M. (2007). Phase-locking of spontaneous and tone-elicited pontine waves to hippocampal theta waves during REM sleep in rats. Brain Res. *1182*, 73–81.

Karni, A., Tanne, D., Rubenstein, B.S., Askenasy, J.J., and Sagi, D. (1994). Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill. Science *265*, 679–682.

Katz, B. (1969). The release of neural transmitter substances (Thomas).

Katz, B., and Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. J. Physiol. *195*, 481–492.

Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M., Kishida, M., and Baker, B.I. (1983). Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. Nature *305*, 321–323.

Kelleher, R.J., Govindarajan, A., Jung, H.-Y., Kang, H., and Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. Cell *116*, 467–479.

Kelly, A., Laroche, S., and Davis, S. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 5354–5360.

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

Kemp, N., and Bashir, Z.I. (2001). Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. Prog. Neurobiol. *65*, 339–365.

Kim, J.J., and Fanselow, M.S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. Science *256*, 675–677.

King, C., Henze, D.A., Leinekugel, X., and Buzsáki, G. (1999). Hebbian modification of a hippocampal population pattern in the rat. J. Physiol. *521 Pt 1*, 159–167.

Kirkwood, A., and Bear, M.F. (1994). Homosynaptic long-term depression in the visual cortex. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *14*, 3404–3412.

Kokkotou, E.G., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Slieker, L., and Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone receptor is a target of leptin action in the mouse brain. Endocrinology *142*, 680–686.

Konadhode, R.R., Pelluru, D., Blanco-Centurion, C., Zayachkivsky, A., Liu, M., Uhde, T., Glen, W.B., van den Pol, A.N., Mulholland, P.J., and Shiromani, P.J. (2013). Optogenetic stimulation of MCH neurons increases sleep. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 10257–10263.

Kovács, K.J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. J. Neuroendocrinol. *20*, 665–672.

Krueger, J.M., and Tononi, G. (2011). Local Use-Dependent Sleep; Synthesis of the New Paradigm. Curr. Top. Med. Chem. *11*, 2490–2492.

Krueger, J.M., Rector, D.M., Roy, S., Van Dongen, H.P.A., Belenky, G., and Panksepp, J. (2008). Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 910–919.

Lana, D., Cerbai, F., Di Russo, J., Boscaro, F., Giannetti, A., Petkova-Kirova, P., Pugliese, A.M., and Giovannini, M.G. (2013). Hippocampal long term memory: effect of the cholinergic system on local protein synthesis. Neurobiol. Learn. Mem. *106*, 246–257.

Laplagne, D.A., Esposito, M.S., Piatti, V.C., Morgenstern, N.A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2006). Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. Plos Biol. *4*, 2349–2360.

Laroche, S., Davis, S., and Jay, T.M. (2000). Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: Dual roles in working memory and consolidation. Hippocampus *10*, 438–446.

Lechner, H.A., Squire, L.R., and Byrne, J.H. (1999). 100 years of consolidation--remembering Müller and Pilzecker. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *6*, 77–87.

LeDoux, J.E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. Annu. Rev. Neurosci. *23*, 155–184.

LeDoux, J.E. (2014). Coming to terms with fear. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 2871–2878.

Lee, I., and Kesner, R.P. (2003). Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. J. Neurosci. *23*, 1517–1523.

Lee, H.-K., Takamiya, K., Han, J.-S., Man, H., Kim, C.-H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., et al. (2003). Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. Cell *112*, 631–643.

Lee, J.S., Kim, M.-H., Ho, W.-K., and Lee, S.-H. (2008). Presynaptic release probability and readily releasable pool size are regulated by two independent mechanisms during posttetanic potentiation at the calyx of Held synapse. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 7945–7953.

Legault, G., Smith, C.T., and Beninger, R.J. (2004). Scopolamine during the paradoxical sleep window impairs radial arm maze learning in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. *79*, 715–721.

Lesburguères, E., Gobbo, O.L., Alaux-Cantin, S., Hambucken, A., Trifilieff, P., and Bontempi, B. (2011). Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. Science *331*, 924–928.

Leutgeb, S., Leutgeb, J.K., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2005). Place cells, spatial maps and the population code for memory. Curr. Opin. Neurobiol. *15*, 738–746.

Lewis, S. (2014). Sleep: a rude awakening. Nat. Rev. Neurosci. *15*, 136–137.

Lima, F.F.B., Sita, L.V., Oliveira, A.R., Costa, H.C., da Silva, J.M., Mortara, R.A., Haemmerle, C.A.S., Xavier, G.F., Canteras, N.S., and Bittencourt, J.C. (2013). Hypothalamic melanin-concentrating hormone projections to the septo-hippocampal complex in the rat. J. Chem. Neuroanat. *47*, 1–14.

Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. Nat. Rev. Neurosci. *3*, 175–190.

Liu, Z.-W., and Gao, X.-B. (2007). Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. J. Neurophysiol. *97*, 837–848.

Louie, K., and Wilson, M.A. (2001). Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep. Neuron *29*, 145–156.

Lu, Z.-H., Fukuda, S., Minakawa, Y., Yasuda, A., Sakamoto, H., Sawamura, S., Takahashi, H., and Ishii, N. (2013). Melanin concentrating hormone induces hippocampal acetylcholine release via the medial septum in rats. Peptides *44*, 32–39.

Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. J. Clin. Invest. *107*, 379–386.

Magleby, K.L., and Zengel, J.E. (1982). A quantitative description of stimulation-induced changes in transmitter release at the frog neuromuscular junction. J. Gen. Physiol. *80*, 613–638.

Makhinson, M., Chotiner, J.K., Watson, J.B., and O'Dell, T.J. (1999). Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca2+/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 2500–2510.

Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, M.W., Bliss, T.V., Vanhoose, A.M., Weitlauf, C., Kandel, E.R., Winder, D.G., and Mansuy, I.M. (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. Cell *104*, 675–686.

Manahan-Vaughan, D., and Braunewell, K.H. (1999). Novelty acquisition is associated with induction of hippocampal long-term depression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 8739–8744.

Maquet, P. (1999). Brain mechanisms of sleep: contribution of neuroimaging techniques. J. Psychopharmacol. Oxf. Engl. *13*, S25–S28.

Maren, S., Aharonov, G., Stote, D.L., and Fanselow, M.S. (1996). N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. Behav. Neurosci. *110*, 1365–1374.

Maren, S., Phan, K.L., and Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 417–428.

Marr, D. (1970). A Theory for Cerebral Neocortex. R. Soc. Lond. Proc. Ser. B *176*, 161–234.

Marr, D. (1971). Simple Memory: A Theory for Archicortex. R. Soc. Lond. Philos. Trans. Ser. B *262*, 23–81.

Marrosu, F., Portas, C., Mascia, M.S., Casu, M.A., Fà, M., Giagheddu, M., Imperato, A., and Gessa, G.L. (1995). Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. Brain Res. *671*, 329–332.

Mashiko, S., Ishihara, A., Gomori, A., Moriya, R., Ito, M., Iwaasa, H., Matsuda, M., Feng, Y., Shen, Z., Marsh, D.J., et al. (2005). Antiobesity effect of a melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist in diet-induced obese mice. Endocrinology *146*, 3080–3086.

Maviel, T., Durkin, T.P., Menzaghi, F., and Bontempi, B. (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. Science *305*, 96–99.

McClelland, J.L., McNaughton, B.L., and O'Reilly, R.C. (1995). Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. Psychol. Rev. *102*, 419–457.

McDermott, C.M., LaHoste, G.J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N.G., and Magee, J.C. (2003). Sleep deprivation causes behavioral, synaptic, and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 9687–9695.

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

McGaugh, J.L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. Annu. Rev. Neurosci. *27*, 1–28.

McGaugh, J.L., McIntyre, C.K., and Power, A.E. (2002). Amygdala Modulation of Memory Consolidation: Interaction with Other Brain Systems. Neurobiol. Learn. Mem. *78*, 539–552.

McHugh, T.J., Blum, K.I., Tsien, J.Z., Tonegawa, S., and Wilson, M.A. (1996). Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. Cell *87*, 1339–1349.

McNaughton, B.L., Douglas, R.M., and Goddard, G.V. (1978). Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents. Brain Res. *157*, 277–293.

Milanovic, S., Radulovic, J., Laban, O., Stiedl, O., Henn, F., and Spiess, J. (1998). Production of the Fos protein after contextual fear conditioning of C57BL/6N mice. Brain Res. *784*, 37–47.

Mochida, S., Few, A.P., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2008). Regulation of presynaptic Ca(V)2.1 channels by Ca2+ sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. Neuron *57*, 210–216.

Mochizuki, T., and Scammell, T.E. (2003). Orexin/Hypocretin: Wired for Wakefulness. Curr. Biol. *13*, R563–R564.

Moita, M.A.P., Rosis, S., Zhou, Y., LeDoux, J.E., and Blair, H.T. (2004). Putting fear in its place: remapping of hippocampal place cells during fear conditioning. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 7015–7023.

Monzon, M.E., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Izquierdo, I., Barros, D.M., and de Barioglio, S.R. (1999). Melanin-concentrating hormone (MCH) modifies memory retention in rats. Peptides *20*, 1517–1519.

Moran, T.H., and Gao, S. (2006). Looking for food in all the right places? Cell Metab. *3*, 233–234.

Morishita, W., Connor, J.H., Xia, H., Quinlan, E.M., Shenolikar, S., and Malenka, R.C. (2001). Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. Neuron *32*, 1133–1148.

Morris, R.G.M. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. Eur. J. Neurosci. *23*, 2829–2846.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature *319*, 774–776.

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

Moser, E.I., Kropff, E., and Moser, M.-B. (2008). Place Cells, Grid Cells, and the Brain's Spatial Representation System. Annu. Rev. Neurosci. *31*, 69–89.

Nádasdy, Z., Hirase, H., Czurkó, A., Csicsvari, J., and Buzsáki, G. (1999). Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 9497–9507.

Nadel, L., and Hardt, O. (2011). Update on memory systems and processes. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *36*, 251–273.

Nadel, L., and Moscovitch, M. (1997). Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. Curr. Opin. Neurobiol. *7*, 217–227.

Nakao, K., Ikegaya, Y., Yamada, M.K., Nishiyama, N., and Matsuki, N. (2002). Hippocampal long-term depression as an index of spatial working memory. Eur. J. Neurosci. *16*, 970–974.

Nakashiba, T., Buhl, D.L., McHugh, T.J., and Tonegawa, S. (2009). Hippocampal CA3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. Neuron *62*, 781–787.

Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., McHugh, T.J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., et al. (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. Cell *149*, 188–201.

Narayanan, R.T., Seidenbecher, T., Kluge, C., Bergado, J., Stork, O., and Pape, H.-C. (2007). Dissociated theta phase synchronization in amygdalo- hippocampal circuits during various stages of fear memory. Eur. J. Neurosci. *25*, 1823–1831.

Neher, E., and Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. Neuron *59*, 861–872.

New, A.S., Hazlett, E.A., Buchsbaum, M.S., Goodman, M., Mitelman, S.A., Newmark, R., Trisdorfer, R., Haznedar, M.M., Koenigsberg, H.W., Flory, J., et al. (2007). Amygdala-prefrontal disconnection in borderline personality disorder. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *32*, 1629–1640.

Nguyen, P.V., Abel, T., and Kandel, E.R. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. Science *265*, 1104–1107.

Nicholls, R.E., Alarcon, J.M., Malleret, G., Carroll, R.C., Grody, M., Vronskaya, S., and Kandel, E.R. (2008). Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. Neuron *58*, 104–117.

Nicoll, R.A., Kauer, J.A., and Malenka, R.C. (1988). The current excitement in long-term potentiation. Neuron *1*, 97–103.

Nishida, M., Pearsall, J., Buckner, R.L., and Walker, M.P. (2009). REM sleep, prefrontal theta, and the consolidation of human emotional memory. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *19*, 1158–1166.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature *307*, 462–465.

Oishi, Y., Huang, Z.-L., Fredholm, B.B., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2008). Adenosine in the tuberomammillary nucleus inhibits the histaminergic system via A1 receptors and promotes non-rapid eye movement sleep. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 19992–19997.

O'Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain Res. *34*, 171–175.

O'Keefe, J., and Nadel, L. (1979). Précis of O'Keefe & Nadel's The hippocampus as a cognitive map. Behav. Brain Sci. *2*, 487–494.

Oliet, S.H., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. Neuron *18*, 969–982.

Olton, D.S., and Samuelson, R.J. (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process. *2*, 97–116.

Olton, D.S., Becker, J.T., and Handelmann, G.E. (1979). Hippocampus, space, and memory. Behav. Brain Sci. *2*, 313–322.

Opazo, P., Sainlos, M., and Choquet, D. (2012). Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. Curr. Opin. Neurobiol. *22*, 453–460.

Pachoud, B., Adamantidis, A., Ravassard, P., Luppi, P.-H., Grisar, T., Lakaye, B., and Salin, P.-A. (2010). Major impairments of glutamatergic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus of mice lacking the melanin-concentrating hormone receptor-1. J. Neurophysiol. *104*, 1417–1425.

Pan, Y.-W., Chan, G.C.K., Kuo, C.T., Storm, D.R., and Xia, Z. (2012). Inhibition of adult neurogenesis by inducible and targeted deletion of ERK5 mitogen-activated protein kinase specifically in adult neurogenic regions impairs contextual fear extinction and remote fear memory. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *32*, 6444–6455.

Panja, D., and Bramham, C.R. (2014). BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. Neuropharmacology *76 Pt C*, 664–676.

Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 383–400.

Paré, D., Quirk, G.J., and Ledoux, J.E. (2004). New Vistas on Amygdala Networks in Conditioned Fear. J. Neurophysiol. *92*, 1–9.

Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., and Haydon, P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. Science *310*, 113–116.

Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A.A., and Sacktor, T.C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. Science *313*, 1141–1144.

Payne, J.D., Stickgold, R., Swanberg, K., and Kensinger, E.A. (2008). Sleep preferentially enhances memory for emotional components of scenes. Psychol. Sci. *19*, 781–788.

Phelps, E.A., and LeDoux, J.E. (2005). Contributions of the Amygdala to Emotion Processing: From Animal Models to Human Behavior. Neuron *48*, 175–187.

Pikkarainen, M., Rönkkö, S., Savander, V., Insausti, R., and Pitkänen, A. (1999). Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. J. Comp. Neurol. *403*, 229–260.

Pissios, P., Bradley, R.L., and Maratos-Flier, E. (2006). Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. Endocr. Rev. *27*, 606–620.

Plihal, W., and Born, J. (1997). Effects of early and late nocturnal sleep on declarative and procedural memory. J. Cogn. Neurosci. *9*, 534–547.

Poe, G.R., Nitz, D.A., McNaughton, B.L., and Barnes, C.A. (2000). Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep. Brain Res. *855*, 176–180.

Poirier, G.L., Amin, E., and Aggleton, J.P. (2008). Qualitatively different hippocampal subfield engagement emerges with mastery of a spatial memory task by rats. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 1034–1045.

Popa, D., Duvarci, S., Popescu, A.T., Léna, C., and Paré, D. (2010). Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 6516–6519.

Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R.E., Thakkar, M., Bjorkum, A.A., Greene, R.W., and McCarley, R.W. (1997). Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. Science *276*, 1265–1268.

Poucet, B., Alvernhe, A., Hok, V., Renaudineau, S., Sargolini, F., and Save, E. (2010). L'hippocampe et le code neural de la mémoire spatiale. Biol. Aujourdhui *204*, 103–112.

Poulos, A.M., Li, V., Sterlace, S.S., Tokushige, F., Ponnusamy, R., and Fanselow, M.S. (2009). Persistence of fear memory across time requires the basolateral amygdala complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 11737–11741.

Prince, T.-M., and Abel, T. (2013). The impact of sleep loss on hippocampal function. Learn. Mem. *20*, 558–569.

Qin, Y.L., McNaughton, B.L., Skaggs, W.E., and Barnes, C.A. (1997). Memory reprocessing in corticocortical and hippocampocortical neuronal ensembles. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *352*, 1525–1533.

Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. Nature *380*, 243–247.

Quinn, J.J., Loya, F., Ma, Q.D., and Fanselow, M.S. (2005). Dorsal hippocampus NMDA receptors differentially mediate trace and contextual fear conditioning. Hippocampus *15*, 665–674.

Radulovic, J., Kammermeier, J., and Spiess, J. (1998). Relationship between fos production and classical fear conditioning: effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 7452–7461.

Rainnie, D.G., Grunze, H.C., McCarley, R.W., and Greene, R.W. (1994). Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. Science *263*, 689–692.

Rao, Y., Lu, M., Ge, F., Marsh, D.J., Qian, S., Wang, A.H., Picciotto, M.R., and Gao, X.-B. (2008). Regulation of synaptic efficacy in hypocretin/orexin-containing neurons by melanin concentrating hormone in the lateral hypothalamus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 9101–9110.

Rasch, B., and Born, J. (2013). About sleep's role in memory. Physiol. Rev. *93*, 681–766.

Rasch, B., Gais, S., and Born, J. (2009). Impaired off-line consolidation of motor memories after combined blockade of cholinergic receptors during REM sleep-rich sleep. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *34*, 1843–1853.

Ravassard, P., Hamieh, A.M., Youssef, M., Fraize, N., Libourel, P.-A., Le Barillier, L., Arthaud, S., Meissirel, C., Touret, M., Malleret, G., et al. (sous presse). REM sleep-dependent bidirectional regulation of hippocampal-based emotional memory and LTP. Cereb. Cortex N. Y. N 1991.

Ravassard, P., Pachoud, B., Comte, J.-C., Mejia-Perez, C., Scoté-Blachon, C., Gay, N., Claustrat, B., Touret, M., Luppi, P.-H., and Salin, P.A. (2009). Paradoxical (REM) sleep deprivation causes a large and rapidly reversible decrease in long-term potentiation, synaptic transmission, glutamate receptor protein levels, and ERK/MAPK activation in the dorsal hippocampus. Sleep *32*, 227–240.

Ravassard, P., Hamieh, A.M., Malleret, G., and Salin, P.-A. (2014). Paradoxical sleep: A vigilance state to gate long-term brain plasticity? Neurobiol. Learn. Mem.

Rebola, N., Lujan, R., Cunha, R.A., and Mulle, C. (2008). Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. Neuron *57*, 121–134.

Reymann, K.G., and Frey, J.U. (2007). The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, "synaptic tagging", "late-associativity" and implications. Neuropharmacology *52*, 24–40.

Ribeiro, S., and Nicolelis, M. a. L. (2004). Reverberation, storage, and postsynaptic propagation of memories during sleep. Learn. Mem. *11*, 686–696.

Ribeiro, S., Goyal, V., Mello, C.V., and Pavlides, C. (1999). Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *6*, 500–508.

Ribeiro, S., Mello, C.V., Velho, T., Gardner, T.J., Jarvis, E.D., and Pavlides, C. (2002). Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 10914–10923.

Ribeiro, S., Gervasoni, D., Soares, E.S., Zhou, Y., Lin, S.-C., Pantoja, J., Lavine, M., and Nicolelis, M.A.L. (2004). Long-Lasting Novelty-Induced Neuronal Reverberation during Slow-Wave Sleep in Multiple Forebrain Areas. PLoS Biol *2*, e24.

Ribeiro, S., Shi, X., Engelhard, M., Zhou, Y., Zhang, H., Gervasoni, D., Lin, S.-C., Wada, K., Lemos, N.A.M., and Nicolelis, M.A.L. (2007). Novel experience induces persistent sleep-dependent plasticity in the cortex but not in the hippocampus. Front. Neurosci. *1*, 43–55.

Rogerson, T., Cai, D.J., Frank, A., Sano, Y., Shobe, J., Lopez-Aranda, M.F., and Silva, A.J. (2014). Synaptic tagging during memory allocation. Nat. Rev. Neurosci. *15*, 157–169.

Rolls, E. (2013). The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. Front. Syst. Neurosci. *7*, 74.

Roozendaal, B., McEwen, B.S., and Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 423–433.

Rudy, J.W., and Sutherland, R.J. (1995). Configural association theory and the hippocampal formation: An appraisal and reconfiguration. Hippocampus *5*, 375–389.

Ruskin, D.N., Liu, C., Dunn, K.E., Bazan, N.G., and LaHoste, G.J. (2004). Sleep deprivation impairs hippocampus-mediated contextual learning but not amygdala-mediated cued learning in rats. Eur. J. Neurosci. *19*, 3121–3124.

Saint-Mleux, B., Bayer, L., Eggermann, E., Jones, B.E., Mühlethaler, M., and Serafin, M. (2007). Suprachiasmatic modulation of noradrenaline release in the ventrolateral preoptic nucleus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 6412–6416.

Saito, Y., Nothacker, H.P., and Civelli, O. (2000). Melanin-concentrating hormone receptor: an orphan receptor fits the key. Trends Endocrinol. Metab. TEM *11*, 299–303.

Sala, C., and Segal, M. (2014). Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. Physiol. Rev. *94*, 141–188.

Saper, C.B., Fuller, P.M., Pedersen, N.P., Lu, J., and Scammell, T.E. (2010). Sleep state switching. Neuron *68*, 1023–1042.

Sapin, E., Bérod, A., Léger, L., Herman, P.A., Luppi, P.-H., and Peyron, C. (2010). A very large number of GABAergic neurons are activated in the tuberal hypothalamus during paradoxical (REM) sleep hypersomnia. PloS One *5*, e11766.

Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B.L., Witter, M.P., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2006). Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. Science *312*, 758–762.

Saxe, M.D., Battaglia, F., Wang, J.-W., Malleret, G., David, D.J., Monckton, J.E., Garcia, A.D.R., Sofroniew, M.V., Kandel, E.R., Santarelli, L., et al. (2006). Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 17501–17506.

Scammell, T.E., Gerashchenko, D.Y., Mochizuki, T., McCarthy, M.T., Estabrooke, I.V., Sears, C.A., Saper, C.B., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2001). An adenosine A2a agonist increases sleep and induces Fos in ventrolateral preoptic neurons. Neuroscience *107*, 653–663.

Scaplen, K.M., Gulati, A.A., Heimer-McGinn, V.L., and Burwell, R.D. (2014). Objects and landmarks: Hippocampal place cells respond differently to manipulations of visual cues depending on size, perspective, and experience. Hippocampus *24*, 1287–1299.

Schacter, D. (1987). Implicit Memory - History and Current Status. J. Exp. Psychol.-Learn. Mem. Cogn. *13*, 501–518.

Schafe, G.E., Doyère, V., and LeDoux, J.E. (2005). Tracking the Fear Engram: The Lateral Amygdala Is an Essential Locus of Fear Memory Storage. J. Neurosci. *25*, 10010–10014.

Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. Nature *429*, 184–187.

Schmitt, W.B., Sprengel, R., Mack, V., Draft, R.W., Seeburg, P.H., Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P., and Bannerman, D.M. (2005). Restoration of spatial working memory by genetic rescue of GluR-A–deficient mice. Nat. Neurosci. *8*, 270–272.

Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *20*, 11–21.

Sears, R.M., Liu, R.-J., Narayanan, N.S., Sharf, R., Yeckel, M.F., Laubach, M., Aghajanian, G.K., and DiLeone, R.J. (2010). Regulation of nucleus accumbens activity by the hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 8263–8273.

Segal-Lieberman, G., Bradley, R.L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D.J., Wang, X., Bates, S., Myers, M.G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 10085–10090.

Sejnowski, T.J. (1977). Storing covariance with nonlinearly interacting neurons. J. Math. Biol. *4*, 303–321.

Seress, L., Abrahám, H., Dóczi, T., Lázár, G., and Kozicz, T. (2004). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) is a selective marker of rat granule cells and of human mossy cells in the hippocampal dentate gyrus. Neuroscience *125*, 13–24.

Sharot, T., and Phelps, E.A. (2004). How arousal modulates memory: disentangling the effects of attention and retention. Cogn. Affect. Behav. Neurosci. *4*, 294–306.

Sherin, J.E., Shiromani, P.J., McCarley, R.W., and Saper, C.B. (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. Science *271*, 216–219.

Sherin, J.E., Elmquist, J.K., Torrealba, F., and Saper, C.B. (1998). Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 4705–4721.

Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. Nature *396*, 670–674.

Sibille, J., Pannasch, U., and Rouach, N. (2014). Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. J. Physiol.-Lond. *592*, 87–102.

Siegel, J.M. (2001). The REM sleep-memory consolidation hypothesis. Science *294*, 1058–1063.

Silva, R.H., Chehin, A.B., Kameda, S.R., Takatsu-Coleman, A.L., Abílio, V.C., Tufik, S., and Frussa-Filho, R. (2004). Effects of pre- or post-training paradoxical sleep deprivation on two animal models of learning and memory in mice. Neurobiol. Learn. Mem. *82*, 90–98.

Siok, C.J., Rogers, J.A., Kocsis, B., and Hajós, M. (2006). Activation of α7 acetylcholine receptors augments stimulation-induced hippocampal theta oscillation. Eur. J. Neurosci. *23*, 570–574.

Sirota, A., Csicsvari, J., Buhl, D., and Buzsáki, G. (2003). Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 2065–2069.

Skaggs, W.E., and McNaughton, B.L. (1996). Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience. Science *271*, 1870–1873.

Smith, C. (1995). Sleep states and memory processes. Behav. Brain Res. *69*, 137–145.

Smith, C., and Rose, G.M. (1996). Evidence for a paradoxical sleep window for place learning in the Morris water maze. Physiol. Behav. *59*, 93–97.

Smith, C., and Rose, G.M. (1997). Posttraining paradoxical sleep in rats is increased after spatial learning in the Morris water maze. Behav. Neurosci. *111*, 1197–1204.

Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol. Rev. *99*, 195–231.

Squire, L.R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. Neurobiol. Learn. Mem. *82*, 171–177.

Squire, L.R. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. Neuron *61*, 6–9.

Squire, L.R., and Alvarez, P. (1995). Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. Curr. Opin. Neurobiol. *5*, 169–177.

Squire, L.R., and Barondes, S.H. (1972). Variable Decay of Memory and Its Recovery in Cycloheximide-Treated Mice. Proc. Natl. Acad. Sci. *69*, 1416–1420.

Squire, L.R., and Zola, S.M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. Proc. Natl. Acad. Sci. *93*, 13515–13522.

Squire, L.R., Amaral, D.G., and Press, G.A. (1990). Magnetic resonance imaging of the hippocampal formation and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *10*, 3106–3117.

Stent, G.S. (1973). A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *70*, 997–1001.

Steriade, M. (2003). The corticothalamic system in sleep. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *8*, d878–d899.

Stevens, C.F. (1993). Quantal release of neurotransmitter and long-term potentiation. Cell *72 Suppl*, 55–63.

Stiedl, O., Birkenfeld, K., Palve, M., and Spiess, J. (2000). Impairment of conditioned contextual fear of C57BL/6J mice by intracerebral injections of the NMDA receptor antagonist APV. Behav. Brain Res. *116*, 157–168.

Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., and Moser, E.I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. Nat. Rev. Neurosci. *15*, 655–669.

Van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., and Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 272–282.

Sumioka, A., Yan, D., and Tomita, S. (2010). TARP phosphorylation regulates synaptic AMPA receptors through lipid bilayers. Neuron *66*, 755–767.

Suthana, N.A., Ekstrom, A.D., Moshirvaziri, S., Knowlton, B., and Bookheimer, S.Y. (2009). Human Hippocampal CA1 Involvement during Allocentric Encoding of Spatial Information. J. Neurosci. *29*, 10512–10519.

Szymusiak, R., Alam, N., Steininger, T.L., and McGinty, D. (1998). Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. Brain Res. *803*, 178–188.

Takehara, K., Kawahara, S., and Kirino, Y. (2003). Time-Dependent Reorganization of the Brain Components Underlying Memory Retention in Trace Eyeblink Conditioning. J. Neurosci. *23*, 9897–9905.

Takeuchi, T., Duszkiewicz, A.J., and Morris, R.G.M. (2014). The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *369*, 20130288.

Tamminen, J., Payne, J.D., Stickgold, R., Wamsley, E.J., and Gaskell, M.G. (2010). Sleep spindle activity is associated with the integration of new memories and existing knowledge. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 14356–14360.

Tayler, K.K., Tanaka, K.Z., Reijmers, L.G., and Wiltgen, B.J. (2013). Reactivation of Neural Ensembles during the Retrieval of Recent and Remote Memory. Curr. Biol. *23*, 99–106.

Thomas, G.M., and Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. Nat. Rev. Neurosci. *5*, 173–183.

Tolman, E.C. (1939). Prediction of vicarious trial and error by means of the schematic sowbug. Psychol. Rev. *46*, 318–336.

Tomita, S., Stein, V., Stocker, T.J., Nicoll, R.A., and Bredt, D.S. (2005). Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazin-like TARPs. Neuron *45*, 269–277.

Tononi, G., and Cirelli, C. (2003). Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. Brain Res. Bull. *62*, 143–150.

Tononi, G., and Cirelli, C. (2006). Sleep function and synaptic homeostasis. Sleep Med. Rev. *10*, 49–62.

Tononi, G., and Cirelli, C. (2014). Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. Neuron *81*, 12–34.

Trouche, S., Bontempi, B., Roullet, P., and Rampon, C. (2009). Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 5919–5924.

Tsumoto, T. (1993). Long-term depression in cerebral cortex: a possible substrate of "forgetting" that should not be forgotten. Neurosci. Res. *16*, 263–270.

Tsunematsu, T., Ueno, T., Tabuchi, S., Inutsuka, A., Tanaka, K.F., Hasuwa, H., Kilduff, T.S., Terao, A., and Yamanaka, A. (2014). Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 6896–6909.

Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. In Organization of Memory, (Oxford, England: Academic Press), pp. xiii, 423.

Vann, S.D., Brown, M.W., and Aggleton, J.P. (2000a). Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests. Neuroscience *101*, 983–991.

Vann, S.D., Brown, M.W., Erichsen, J.T., and Aggleton, J.P. (2000b). Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, 2711–2718.

Varas, M.M., Pérez, M.F., Ramírez, O.A., and de Barioglio, S.R. (2003). Increased susceptibility to LTP generation and changes in NMDA-NR1 and -NR2B subunits mRNA expression in rat hippocampus after MCH administration. Peptides *24*, 1403–1411.

Vecsey, C.G., Baillie, G.S., Jaganath, D., Havekes, R., Daniels, A., Wimmer, M., Huang, T., Brown, K.M., Li, X.-Y., Descalzi, G., et al. (2009). Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus. Nature *461*, 1122–1125.

Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Léger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C., and Luppi, P.-H. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. BMC Neurosci. *4*, 19.

Vertes, R.P. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neuroscience *142*, 1–20.

Vertes, R.P., Hoover, W.B., Szigeti-Buck, K., and Leranth, C. (2007). Nucleus reuniens of the midline thalamus: Link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. Brain Res. Bull. *71*, 601–609.

Vyazovskiy, V.V., Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U., and Tononi, G. (2008). Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. Nat. Neurosci. *11*, 200–208.

Vyazovskiy, V.V., Olcese, U., Lazimy, Y.M., Faraguna, U., Esser, S.K., Williams, J.C., Cirelli, C., and Tononi, G. (2009). Cortical firing and sleep homeostasis. Neuron *63*, 865–878.

Wagner, U., Gais, S., and Born, J. (2001). Emotional memory formation is enhanced across sleep intervals with high amounts of rapid eye movement sleep. Learn. Mem. Cold Spring Harb. N *8*, 112–119.

Walker, M.P., and van der Helm, E. (2009). Overnight therapy? The role of sleep in emotional brain processing. Psychol. Bull. *135*, 731–748.

Wang, G.-W., and Cai, J.-X. (2006). Disconnection of the hippocampal–prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. Behav. Brain Res. *175*, 329–336.

Wang, G.-W., and Cai, J.-X. (2008). Reversible disconnection of the hippocampal-prelimbic cortical circuit impairs spatial learning but not passive avoidance learning in rats. Neurobiol. Learn. Mem. *90*, 365–373.

Wang, S.-H., and Morris, R.G.M. (2010). Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. Annu. Rev. Psychol. *61*, 49–79, C1–C4.

Wang, Y., and Manis, P.B. (2008). Short-term synaptic depression and recovery at the mature mammalian endbulb of Held synapse in mice. J. Neurophysiol. *100*, 1255–1264.

Wenthold, R.J., Petralia, R.S., Blahos J, I.I., and Niedzielski, A.S. (1996). Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *16*, 1982–1989.

Wetzel, W., Wagner, T., and Balschun, D. (2003). REM sleep enhancement induced by different procedures improves memory retention in rats. Eur. J. Neurosci. *18*, 2611–2617.

Wheeler, A.L., Teixeira, C.M., Wang, A.H., Xiong, X., Kovacevic, N., Lerch, J.P., McIntosh, A.R., Parkinson, J., and Frankland, P.W. (2013). Identification of a Functional Connectome for Long-Term Fear Memory in Mice. PLoS Comput. Biol. *9*, e1002853.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., and Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. Science *313*, 1093–1097.

Whitlock, J.R., Sutherland, R.J., Witter, M.P., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2008). Navigating from hippocampus to parietal cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 14755–14762.

Wierzynski, C.M., Lubenov, E.V., Gu, M., and Siapas, A.G. (2009). State-dependent spike-timing relationships between hippocampal and prefrontal circuits during sleep. Neuron *61*, 587–596.

Wilhelm, I., Diekelmann, S., Molzow, I., Ayoub, A., Mölle, M., and Born, J. (2011). Sleep selectively enhances memory expected to be of future relevance. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 1563–1569.

Williams, C.L., Men, D., Clayton, E.C., and Gold, P.E. (1998). Norepinephrine release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: contribution of the nucleus of the solitary tract. Behav. Neurosci. *112*, 1414–1422.

Wilson, M.A., and McNaughton, B.L. (1993). Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. Science *261*, 1055–1058.

Wilson, M.A., and McNaughton, B.L. (1994). Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. Science *265*, 676–679.

Wilson, M.A., and Tonegawa, S. (1997). Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. Trends Neurosci. *20*, 102–106.

Wood, E.R., Dudchenko, P.A., Robitsek, R.J., and Eichenbaum, H. (2000). Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. Neuron *27*, 623–633.

Xu, J., and Wu, L.-G. (2005). The decrease in the presynaptic calcium current is a major cause of short-term depression at a calyx-type synapse. Neuron *46*, 633–645.

Yang, G., Lai, C.S.W., Cichon, J., Ma, L., Li, W., and Gan, W.-B. (2014). Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. Science *344*, 1173–1178.

Yasenkov, R., and Deboer, T. (2012). Chapter 12 - Circadian modulation of sleep in rodents. In Progress in Brain Research, M.M., Till Roenneberg and Russell G. Foster Andries Kalsbeek, ed. (Elsevier), pp. 203–218.

Yassin, L., Benedetti, B.L., Jouhanneau, J.-S., Wen, J.A., Poulet, J.F.A., and Barth, A.L. (2010). An embedded subnetwork of highly active neurons in the neocortex. Neuron *68*, 1043–1050.

Yoo, S.-S., Hu, P.T., Gujar, N., Jolesz, F.A., and Walker, M.P. (2007). A deficit in the ability to form new human memories without sleep. Nat. Neurosci. *10*, 385–392.

Yoon, T., Okada, J., Jung, M.W., and Kim, J.J. (2008). Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. Learn. Mem. *15*, 97–105.

Zelikowsky, M., Bissiere, S., Hast, T.A., Bennett, R.Z., Abdipranoto, A., Vissel, B., and Fanselow, M.S. (2013). Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 9938–9943.

Zeng, H., Chattarji, S., Barbarosie, M., Rondi-Reig, L., Philpot, B.D., Miyakawa, T., Bear, M.F., and Tonegawa, S. (2001). Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. Cell *107*, 617–629.

Zhang, H., Lin, S.-C., and Nicolelis, M.A.L. (2010). Spatiotemporal coupling between hippocampal acetylcholine release and theta oscillations in vivo. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 13431–13440.

Zhu, Q., Xiao, K., Yu, M., Niu, M., Li, C., Gao, Y., Li, G.-D., and Zhou, Y. (2013). Ghrelin but not nesfatin-1 affects certain forms of learning and memory in both rats and mice. Brain Res. *1541*, 42–51.

Zucker, R.S., and Regehr, W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. Annu. Rev. Physiol. *64*, 355–405.